

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08459

研究課題名(和文) 免疫寛容型樹状細胞の解析と膠原病疾患への応用

研究課題名(英文) Study of tolerogenic dendritic cells and application of the cells to collagen diseases

研究代表者

松本 卓也 (Matsumoto, Takuya)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70724780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト免疫寛容樹状細胞(tolerogenic Dendritic Cells:tDCs)への分化誘導を促進する物質が多数報告されているが、我々はCキナーゼ阻害剤(Protein kinase C:PKCI)見出し、他の免疫寛容樹状細胞を誘導する物質と比較して、PKCI-tDCsが臨床応用可能なtDCsとして最も有力であることを証明している。未熟DCs、成熟DCs、PKCI-tDCsから全RNAを抽出し比較解析を行い、PKCI-tDCsに発現の高い14種類のmiRNAを検出した。これらのmiRNAを未熟樹状細胞に導入し比較解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

樹状細胞は免疫に関与する抗原提示細胞であり、獲得免疫のみならず免疫寛容においても重要な役割を果たしている。今まで我々はCキナーゼ阻害薬(PKCI)によって誘導されたヒト免疫寛容樹状細胞(tolerogenic DCs:tDCs)が臨床応用の可能性が十分あることを示してきた。また実際の膠原病患者においてもPKCIを用いてtDCsが誘導できることを示した。PKCIを用いて誘導したtDCsに発現が高く認められたmiRNAを解析することで、その機序を解明しtDCsを効率よく安定的に誘導する方法を確立し、膠原病などの自己免疫疾患などの臨床に応用を目指している。

研究成果の概要(英文)：Some compounds have been reported that promote differentiation into human tolerogenic dendritic cells (tDCs). We previously reported that DCs treated with conventional protein kinase C inhibitor (PKCI) had potent immunogenic tolerance properties, and PKCI-tDCs might be good for making clinical grade tDCs, compared to other compounds. For the analysis of PKCI-tDCs, miRNA array were performed with total RNA extracted from immature DCs, mature DCs, and PKCI-tDCs, to find functional differences of these types of DCs. As a result, we found highly expression of 14 types of miRNA in PKCI-tDCs compared with other DCs. We transduced these miRNAs into immature dendritic cells, and we are analyzing the cells.

研究分野：免疫・膠原病

キーワード：免疫寛容樹状細胞 Cキナーゼ阻害剤 miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞(Dendritic Cells:DCs)は、1973年にSteinmanらによって新しい免疫担当細胞として報告されて以来、マウスやヒトにおいて多くの報告や治験がなされている。樹状細胞(DCs)は、高い抗原提示能を有する抗原提示細胞であり、生体において樹状細胞は成熟段階の異なる多様なサブユニットとして末梢非リンパ組織やリンパ組織に広く存在している。造血幹細胞から未熟樹状細胞へと分化しさらに様々な刺激によりMHC分子と共刺激分子の発現が増強して成熟樹状細胞に至る。外界から侵入してきた細菌、真菌、ウイルスなどに未熟樹状細胞が、それらの抗原に反応し捕食を行い、取り込んだ樹状細胞は活性化し、成熟樹状細胞に分化する。成熟樹状細胞は、リンパ節に移動しT細胞に抗原を提示し、抗原に反応するT細胞を誘導するT細胞リンパ球に抗原を提示し免疫の調節を行っている。

樹状細胞は、免疫応答に重要な役割を果たしている一方で、自己免疫疾患、臓器移植後の移植片拒絶反応やアレルギー疾患などの発症、制御に大きく関わっており、免疫寛容を導く点においても重要な役割を果たしていることが報告されている。膠原病をはじめとした自己免疫疾患や臓器移植を受けた患者のほとんどが、免疫抑制剤や生物学的製剤による治療を受けている。これらの治療効果は強力であり、改善している例が増えている。しかし、一方でこれらの薬剤は、その免疫抑制作用に比例して感染症や悪性腫瘍の発生頻度の増加などの副作用も多い。これらの背景から、より選択的で副作用が少なく、長期間寛解を維持できる治療の研究が進められており、自己反応性T細胞を標的とした免疫寛容を導くDCsを用いた抗原特異的な治療が注目されている。欧米などでは型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチなどの病気に対して臨床研究が進められている。

2. 研究の目的

今までの報告によると、生理活性物質、薬剤、遺伝子改変を加えて免疫寛容を導く樹状細胞；免疫寛容樹状細胞(toleregenic DCs:tDC)を誘導した報告がある。これらの中でどの物質が最も効率よく免疫寛容樹状細胞に誘導できるのか、また生体内において、特に炎症下で十分働くかは不明であった。そこで我々は、生理活性脂質、核内受容体リガンド、キナーゼ阻害剤ライブラリーからのスクリーニングを行い、ヒトtDCへの分化誘導を促進する物質として、Cキナーゼ阻害剤(Protein kinase C inhibitor:PKCI)を見出した。PKCIで誘導した樹状細胞は(1)二次リンパ組織への遊走能が維持されていること、(2)炎症環境下でも安定していること、(3)Tregsなどの機能的な制御性T細胞が十分誘導できることの3つの観点からPKCI-tDCsは上記の臨床応用可能な3条件を満たしていることを証明した(J. Immunol 191:2247, 2013)。

次に今までの免疫寛容樹状細胞の誘導について報告があるTGF-beta、VitaminD3(VitD3)、dexamethazone(Dexa)、rapamycin(Rapa)、PPARgamma+retinoic acid(PPAR+RA)の6種類で誘導したtDCsとPKCI-tDCsとの比較検討を行った。表面マーカーについては、PKCI、IL-10、VitD3、PPAR+RAで誘導したtDCsはimmatureあるいはsemi matureの表現型を示し、Dexa、Rapa、TGF-betaはやや上記物質より発現が認められた。CCR7の発現が成熟細胞に準じた発現と遊走能が保たれており、CCL19に対する遊走能が維持されていたのはPKCI、TGF-beta、Rapaであった。上記結果から、PKCI-tDCsは臨床応用に使用するにおいて有用である可能性が示唆された。

PKCI-tDCsは、臨床応用の期待が持てる結果であった。実際の患者においても同様に誘導できるかの研究をすすめ、PKCIを用いて膠原病患者の末梢血からPKCI-tDCsが誘導出来るかを検証し、関節リウマチ患者、シェーグレン症候群患者からPKCI-tDCsの誘導は可能であった。ただ、MPO-ANCA関連血管炎の患者においてはPKCI-tDCsは誘導できなかった。ANCA関連血管炎については共同研究者のバイオマーカー検索を含めて免疫応答の解析を進めている。

これらの結果から、PKCIにより誘導された免疫寛容樹状細胞は臨床応用に有用である可能性が強まったことから機序の解析をすすめるため、PKCI-tDCsはどのように誘導されるかを検索する目的で、PKCI-tDCsにおいて発現が増強しているmicroRNAを見出し、それを未熟樹状細胞に導入することで同様の細胞形態、作用を発現するかを確認することを目的とした。

3. 研究の方法

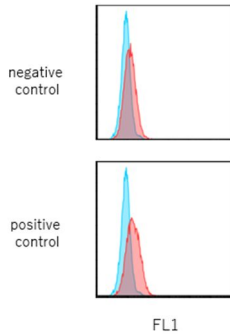
ヒトの末梢血検体を用いて、樹状細胞を誘導した。単核球分離を行った後、CD14陽性細胞を分離し、IL-4+GM-CSFを用いて未熟樹状細胞を誘導し、成熟刺激としてTNF+IL-1+PGE2を用いて成熟樹状細胞を誘導した。また、成熟樹状細胞誘導過程において、PKCIを加えて、PKCI-tDCsを誘導培養した。未熟DCs、成熟DCs、PKCI-tDCから全RNAを抽出し、miRNA arrayにて比較解析を行った。未熟、成熟DCsおよびPKCI-tDCsから全RNAを抽出し、miRNA arrayにて比較解析を行った(ジェネティックラボ株式会社と共同)。約370種類について解析を行い、PKCI-tDCsに発現の高いmiRNAをスクリーニングした。これらのmiRNA mimicsをリポフェクタミンを用いて未熟樹状細胞に導入し、PKCI-tDCsと同様の表現型を誘導できるmiRNAを検索した。

4. 研究成果
(図 1)

	Ct			Δ Ct			$\Delta\Delta$ Ct			RQ		
	im DCs	ma DCs	tol DCs	im DCs	ma DCs	tol DCs	im DCs	ma DCs	tol DCs	im DCs	ma DCs	tol DCs
hsa-let-7a-4373169	27.40	27.64	26.33	7.61	7.98	6.41	0.00	0.37	-1.20	1.00	0.77	2.30
hsa-let-7c-4373167	30.03	30.35	28.76	10.24	10.69	8.84	0.00	0.46	-1.39	1.00	0.73	2.63
hsa-miR-15a-4373123	27.76	27.86	25.67	7.97	8.20	5.75	0.00	0.23	-2.22	1.00	0.85	4.67
hsa-miR-98-4373009	29.79	30.08	28.91	10.01	10.42	8.99	0.00	0.42	-1.02	1.00	0.75	2.02
hsa-miR-130a-4373145	33.85	36.27	31.81	14.06	16.62	11.89	0.00	2.55	-2.18	1.00	0.17	4.52
hsa-miR-138-4395395	36.54	-	32.30	16.75	-	12.38	0.00	-	-4.37	1.00	-	20.65
hsa-miR-139-5p-4395400	33.48	31.74	29.99	13.69	12.08	10.07	0.00	-1.61	-3.62	1.00	3.04	12.33
hsa-miR-192-4373108	31.17	31.04	30.19	11.38	11.39	13.20	0.00	0.01	-1.11	1.00	0.99	2.16
hsa-miR-193a-5p-4395392	30.21	29.49	28.96	10.42	9.84	9.04	0.00	-0.58	-1.38	1.00	1.50	2.60
hsa-miR-202-4395474	35.51	33.30	31.22	13.89	13.65	11.29	0.00	-0.24	-2.60	1.00	1.31	6.05
hsa-miR-218-4373081	35.62	32.13	29.98	15.83	12.48	10.06	0.00	-3.36	-5.77	1.00	10.24	54.73
hsa-miR-221-4373077	25.92	25.31	24.93	6.13	5.66	5.01	0.00	-0.47	-1.12	1.00	1.39	2.17
hsa-miR-296-5p-4373066	37.84	34.88	33.94	18.05	15.22	14.02	0.00	-2.83	-4.03	1.00	7.13	16.38
hsa-miR-376a-4373026	37.14	36.63	35.48	17.35	16.97	15.56	0.00	-0.38	-1.79	1.00	1.30	3.46
hsa-miR-423-5p-4395451	30.91	31.32	29.67	11.12	11.67	9.74	0.00	0.54	-1.38	1.00	0.69	2.60
hsa-miR-490-3p-4373215	38.95	-	35.87	19.16	9.96	9.68	0.00	-	-3.21	1.00	-	9.25
hsa-miR-509-5p-4395346	34.31	34.31	32.99	14.52	16.61	13.07	0.00	2.09	-1.45	1.00	0.23	2.74
hsa-miR-517c-4373264	38.73	37.26	34.24	18.95	17.60	14.32	0.00	-1.34	-4.62	1.00	2.53	24.65
hsa-miR-518f-4395499	35.56	35.91	32.95	15.77	15.01	15.61	0.00	-0.48	-2.74	1.00	0.72	6.69
hsa-miR-519a-4395526	35.32	-	34.42	15.53	16.25	13.03	0.00	-	-1.03	1.00	-	2.04
hsa-miR-582-3p-4395510	37.44	-	33.19	17.65	-	13.27	0.00	-	-4.38	1.00	-	20.81
hsa-miR-616-4395525	34.30	34.75	32.83	14.51	15.10	12.91	0.00	0.59	-1.60	1.00	-0.67	3.04
hsa-miR-708-4395452	35.65	35.52	32.70	15.86	15.86	12.78	0.00	0.00	-3.08	1.00	1.00	8.45

上記 miRNA のスクリーニング(図 1)において PKCI-tDCs において発現が高く認められた中から、より高く認められた let7a-5p, Let7c-5p, miR-15a-5p, miR-98-5p, miR-130a-3p, miR-192-5p, miR-202-3p, miR-221-3p, miR-376a-3p, miR-423-5p, miR-509-5p, miR-518f-3p, miR-616-3p, miR-708-5p の 14 種類を抽出した。miRNA の導入を lipofectamine で確認し、上記 miRNA を未熟樹状細胞に導入し、細胞の表現型の比較を行い、免疫寛容樹状細胞への誘導を比較研究した。

(1)miRNA の導入を未熟樹状細胞に positive siRNA, negative siRNA を用いてリポフェクタミンで導入し FACS で確認し、RNA の導入ができたことを確認した。

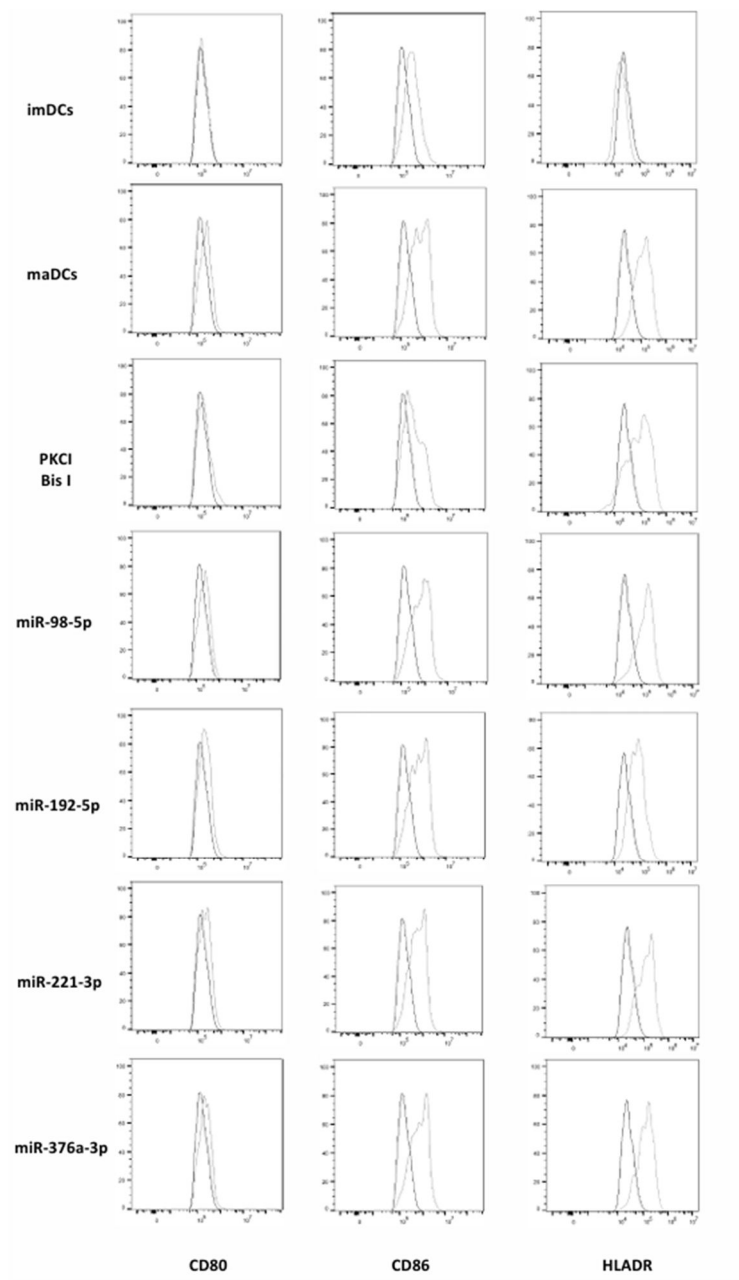


(2)14 種類の上記 miRNA を未熟樹状細胞に導入し、フローサイトメトリーを用いて細胞の表現型の比較を行った。下記に未熟樹状細胞、成熟樹状細胞、PKCI(bisindolylmaleimide I:Bis I)で誘導した免疫寛容樹状細胞と 4 種類の miRNA(miR-192-5p, miR-221-3p, miR-3761-3p)を未熟細胞を導入した細胞の表現型の比較 CD80/86、HLADR を示す(図 2)。

上記 4 種類の miRNA は、PKCI で誘導した樹状細胞で示された表現型の傾向、炎症環境下での semi-mature な CD80/86 の表出, HLADR の発現は比較的保たれているという表現型を示していたが、特に miR192-5p を導入した樹状細胞にて、その傾向が強く認められた。

そこで、現在 miR192-5p を導入した樹状細胞を中心に解析を行っており、PKCI で誘導した樹状細胞の機序の解明を進めている。この研究から、PKC を用いた抗原特異的免疫抑制療法の確立を目指し、自己免疫疾患に対しての臨床応用に繋げていきたいと考えている。引き続き他物質と比較を行いながら抑制機能を持った Tregs や tDCs を効率よく、安定的に誘導する方法を確立し、自己免疫疾患特に膠原病に対して、抗原特異的治療へ展開させていきたい。

図 2 ; 未熟樹状細胞 : imDCs、成熟樹状細胞 : maDCs、PKCI-tDCs、miRNA を導入した樹状細胞
表現型の比較



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishizaki J, Takemori A, Horie K, Hiraoka D, Suemori K, Matsumoto T, Sada KE, Amano K, Harigai M, Arimura Y, Makino H, Takenaka K, Takemori N, Hasegawa H	4. 巻 23:91
2. 論文標題 Usefulness of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 as a predictor of sustained remission in patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-021-02471-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------