

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791262

研究課題名（和文） 小腸グラフト遊走性抗原特異的制御性 T 細胞導入による小腸移植後免疫寛容誘導法の確立

研究課題名（英文） Induction of tolerance to small intestine allografts by adoptive transfer of in vitro generating regulatory T-cells

研究代表者

阿部 雄太（ABE YUTA）

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：70327526

研究成果の概要（和文）：我々はレチノイン酸を用いた in vitro cell conversion Treg (RA-Treg) を作成し、①RA-Treg を無処置マウスに末梢より投与し、RA-Treg が腸間膜リンパ節などに有意に到達することを確認した。さらに投与後 18 時間でピークに達することを確認した。これらを②小腸虚血再灌流マウス③同種同系小腸移植マウス④同種異系小腸移植マウスの 3 群に施行したところ Treg の集積・増加は③=④=②>①となり虚血再灌流障害が Treg 増加に関与している可能性が示唆された。しかしこれらの細胞が投与された Treg なのか、あるいは naïve が持つ Treg なのかを一部のサンプルを除き検証できていないためこれらを確認が必要である。また同種異系小腸移植マウスの拒絶反応の抑制効果を今後引き続き検討する。

研究成果の概要（英文）：We demonstrate the in vitro generation of regulatory T cells (RA-Treg) in the presence of IL-2, TGF beta and all trans retinoic acid (RA) to acquire a gut-homing ability and more potent at suppressing T-cell activation in vitro. We also demonstrate that RA-Treg injected into Naive mice, intestinal ischemia/reperfusion injury mice, syngeneic intestine transplanted mice, allogeneic intestine transplanted mice respectively can reach recipient mesenteric nodes. More increased accumulation of RA-Treg was observed in I/R injury mice, syngeneic transplanted mice, allogeneic transplanted mice than that in naive mice demonstrating the role of I/R injury for accumulation Tregs in this model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：外科・免疫学

1. 研究開始当初の背景
免疫系には制御性 T 細胞 (Treg) と呼ばれる T

細胞サブセットが存在し、自己免疫・炎症・
感染免疫・アレルギー・移植免疫・腫瘍免疫

などのさまざまな免疫応答を抑制的に制御することで免疫恒常性の維持に極めて重要な機能を担っている。このT細胞は、自己免疫疾患やアレルギーといった過剰な免疫反応を抑制し、また臓器移植においては Treg の増殖、機能を強化することで拒絶反応を抑え臓器を生着する方向へ導く。このことから、Treg の機能を操作する方法や、Treg を *in vitro* または *in vivo* で増殖させる方法の開発は免疫疾患や臓器移植の際の免疫寛容に向けて非常に魅力的なアプローチと期待されている。

免疫系がその役割を果たすためには、必要な機能を持つ免疫細胞が生体内の的確な場所に移動する必要がある。免疫系の司令塔であるT細胞は血液やリンパ液の流れに乗って全身を巡回しているが、抗原と出会い活性化されるまでは原則的に2次リンパ系器官以外の組織内には移入できない。しかし、一旦2次リンパ系器官で抗原と出会って活性化/メモリーT細胞となると他の組織にも移入できるようになる、つまり血流から臓器に活性化T細胞が移行する能力は2次リンパ組織にて抗原提示細胞である樹状細胞(DC)により刷り込まれる。たとえば小腸粘膜固有層にホーミングするT細胞はインテグリン $\alpha 4 \beta 7$ を発現しており、このリガンドはMadCAM-1とCCR9であり小腸粘膜固有層に存在する。粘膜固有層・パイエル板・腸間膜リンパ節に存在するCD103陽性DCはビタミンA(レチノール)からレチノイン酸(RA)を精製する能力があり、このDCはレチノイン酸存在下にて小腸へホーミングする能力をT細胞に刷り込ませる(imprinting)と考えられている。

一方、CD4(+)Foxp3(-)ナイーブT細胞は胸腺由来の内在性Treg(nTreg)と同じ免疫抑制効果、フェノタイプを有するFoxp3(+)Treg(adaptive Treg: A-Treg)へコンバートできる(*vivo* & *vitro*)ことがいくつかの施設より報告された。このコンバージョンは*in vitro*ではTGF β とIL-2を必要とする。免疫寛容導入を目指したA-Tregの導入は動物実験レベルにて炎症性腸疾患と臓器移植モデルにて検証され効果が確認されようとしているが、その変換効率、*vitro*におけるsuppressive activityは施設ごとにはばらつきがあり不安定である。またこのA-Treg療法のさらなる改善は非常に興味深く、具体的にはこのA-Tregに特異的臓器に到達させる能力(加えては抗原特異的に抑制する能力)を獲得させることにより、さらに効果的な免疫抑制効果が期待できると考える。そういった状況でさらに*in vitro*にて培養時にRAを添加してコンバートしたretinoic acid mediated A-Treg(RA-Treg)が*in vivo*にて

小腸粘膜固有層特異的なホーミング能力を持ち、さらにこのRAを用いた培養はTGF β によるコンバージョンを促進し、Treg変換率を高めることがわかった。今回我々はこのRAによりコンバートされたRA-Tregが移植臓器、特に小腸グラフトにおける拒絶反応を効果的に抑制するとの仮説から、マウス異所性小腸移植モデルを用いて検討することを目的とした。移植臓器にこのTregが実際に誘導するのか、あるいは拒絶反応に対してどう作用するかについての検討はいまだどの施設でもなされていない。

2. 研究の目的

RA-Tregが移植臓器、特に小腸グラフトにおける拒絶反応を効果的に抑制するとの仮説から、マウス異所性小腸移植モデルを用いて検討する。

- (1) RA-Tregが自身の小腸だけでなくグラフト小腸にもホーミングするかを検討する
- (2) RA-Tregを導入したマウスの移植小腸の拒絶を組織学的に検討評価する
- (3) TGF β /IL-2/RA存在下にドナー特異的抗原刺激にてRA-Treg(antigen specific RA-Treg: asRA-Treg)にコンバートされるかを検討する。RA-Treg同様にasRA-Tregのコンバージョン効率、サブタイプ解析、抑制性細胞としての機能解析、ホーミング能力の検討(*vivo*)、そして移植モデルによる拒絶抑制の検討を行う。

既存の免疫抑制剤の全身的な免疫抑制や副作用に代わる臓器移植時の拒絶抑制の検討は、1995年にCD25分子を発現するT細胞が自己免疫疾患を抑制する機能を有することが明らかにされて以降、Tregによる移植臓器の免疫寛容導入法の開発として多くの施設で行われている。本研究は中でも特に臓器特異的ホーミング能力を有した、加えてドナー抗原特異的に抑制能力を有したTregを開発し、動物モデルにおいてこれを確認することを目的としており、未だ内外のいずれの施設からも報告が無い。本研究は、将来の臨床応用を見越した計画であり、特に拒絶反応が強く他臓器に比べ術後成績の悪い小腸移植において新たな治療法につながることを期待されるため、意義深いと考えられた。

3. 研究の方法

(1)小腸移植レシピエントにおける RA-Treg のホーミングの検討

a. RA-Treg コンバージョン

前記 Foxp3/GFP マウスの脾臓細胞および腸間膜リンパ節を採取、破碎し単細胞とする。マイクロビーズ法を用いた CD4(+)T 細胞ネガティブセレクションののち、Foxp3/GFP 陰性細胞をセルソーティングにより得る。この細胞を CD3 プレート固着抗体・hIL-2・RA 存在下にて 24 ウェルプレートにて 5 日間培養する。細胞を回収し Foxp3/GFP 陽性細胞 (RA-Treg) を抽出する。

b. RA-Treg のグラフト小腸ホーミングの確認と細胞至適投与タイミングの検討

5~10x10⁶ の RA-Treg を C57BL/6 に静注し 0~18 時間後に B6C3F1 ドナー小腸を腹腔内に異所性移植する。ドナー上腸間膜動脈は根部にてドナー腹部大動脈を一部付けるようテント状に採取しレシピエント大動脈に端側吻合しドナー門脈はレシピエント腹部下大静脈に吻合する。移植 24 時間後グラフト小腸と付随する腸間膜リンパ節、及びレシピエント小腸・腸間膜リンパ節・脾臓・末梢リンパ節 (鼠経、頸部)・肺・末梢血を採取し、それぞれから単核球を分離する。

(2)RA-Treg による移植小腸グラフトの拒絶抑制の検討

RA-Treg 静注群とコントロール群 (細胞非導入群) に分け検討する。静注群では静注後前実験にて確認した至適時間後に小腸移植を施行する。移植後経時的 (1, 3, 5, 7, 9, 12 日) にグラフトを含めた各臓器 (グラフト小腸と付随する腸間膜リンパ節・レシピエント小腸・腸間膜リンパ節・脾臓・末梢リンパ節 (鼠経、頸部)・肺・末梢血) を摘出する。単核球を分離しフローサイトメトリーにて GFP/Foxp3 陽性細胞を含めたリンパ球のフェノタイプ解析を行い、GFP 発光の有無により、導入された Treg とレシピエント由来の Treg の発現を経時的に検討する。また小腸内の各種サイトカイン (IL-2, IL-4, IL-10, TGF β , TNF α , IFN γ) を RT-PCR にて定量し、RA-Treg 導入による免疫寛容のメカニズムを解明する。組織学的検討では HE 染色にて拒絶の程度を評価し、免疫染色を用いて T 細胞浸潤、Treg の組織学的浸潤の程度を評価する。

(3)ドナー抗原特異的 Treg (asRA-Treg) の in vitro コンバージョンの検討

前記のごとく CD4(+)Foxp3(-)T 細胞を採取する。これに加えて B6C3F1 マウスの脾臓細胞からマイクロビーズ法を用いて樹状細胞 (DC) を採取し、24 ウェルプレートにて CD4(+)Foxp3(-)T 細胞と B6C3F1 由来 DC を TGF β /IL-2/RA 存在下にて 5 日間共培養する。細

胞を回収したのちフローサイトメトリーにて Foxp3(+)T 細胞へのコンバージョンを評価し、さらに α 4 β 7, CCR9 など小腸粘固有層ホーミングに重要な表面分子マーカーを確認する。ナイーブ C57BL/6 マウスの CD4(+)T 細胞をエフェクター細胞とし、B6C3F1 または third party 由来の放射線照射脾細胞を刺激細胞としたリンパ球混合試験に asRA-Treg を加えた際の細胞増殖抑制効果を検討し asRA-Treg の機能評価をする。

(4) asRA-Treg の小腸グラフトへのホーミングの検討

RA-Treg の検討と同様に 5~10x10⁶ の asRA-Treg を C57BL/6 に静注した際の細胞のホーミングを検討する。

(5) asRA-Treg による移植小腸グラフトの拒絶抑制の検討

RA-Treg の検討と同様に移植小腸グラフトの拒絶抑制を検討する。

4. 研究成果

我々は前記の RA を用いた in vitro cell conversion の至適条件を新たに見出した。Foxp3/GFP マウスを用いて CD4(+)Foxp3(-)細胞をソーティングし、この細胞を CD3 抗体刺激の下、TGF β /IL-2/RA 存在下にて培養した。他施設に比し培養条件にいくつかの変更を行った結果、われわれは既知の方法に改良を加え、独自の方法で変換効率の高い RA-Treg を培養することに成功した。また機能的解析として in vitro リンパ球混合試験を行い、RA-Treg は nTreg より極めて効率よく T 細胞増殖抑制効果を示すことを確認した。研究期間前半はまず Naïve マウスからの細胞ソーティング、Treg コンバージョンの再現性を確認した。続いて年度後半は予定していたマウスへの投与実験を行った。まず①RA-Treg を無処置マウスに末梢より投与し、RA-Treg が腸間膜リンパ節などに有意に到達することを確認した。さらに投与後 18 時間でピークに達することを確認した。同じことを小腸移植レシピエントに行ったところ、ほぼ同様かそれ以上に RA-Treg が比較的早い時間で到達することを確認しえた。これらを②小腸虚血再灌流マウス③同種同系小腸移植マウス④同種異系小腸移植マウスの 3 群に施行したところ Treg の増加は③=④=②>①となり虚血再灌流障害が Treg 増加に関与している可能性が示唆された。しかしこれらの解析は移植後 1 日生存 50~60%モデルにて生存マウスのみを抽出した解析結果にて再検を要すると考えている。つまり問題となったのは小腸グラフトレシピエントマウスの術後早期死亡であった。研究代表者は 2009 年まで在籍した米国にてこのモデルの 5 日生存率>90%であ

ったが施設変更などもあり1日生存が50%程度のモデルは不十分なクオリティーであった。実体顕微鏡の改良、手術器械の改良とトレーニングにより研究機関後半によりやくある一定のクオリティーのモデル作成に至った。これらの改良後のデータにはまだ不足があり検討例数が少ないため今後の継続的な課題である。またこれらの細胞が投与されたTregなのか、あるいはnaïveが持つTregなのかを一部のサンプルを除き検証できていないためこれらを確認が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

(1) Kasuya K, Tsuchida A, Nagakawa Y, Abe Y et al, Prediction of a Side Effect and Efficacy of Adjuvant Chemotherapy with Gemcitabine for Post Operative Patient of Pancreatic Cancer by a Genetic Polymorphism Analysis. Hepatogastroenterology. 59(117): 1609-13, 2012

(2) Itoi T, Kasuya K, Abe Y, Ishiyama H: Endoscopic placement of a new short-term biodegradable pancreatic and biliary stent in an animal model. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 18(3): 463-7. 2011

(3) Kasuya K, Tsuchida A, Abe Y et al., Hypoxia-inducible factor-1 α expression and gemcitabine chemotherapy for pancreatic cancer. Oncol Rep. 26(6): 1399-406, 2011

(4) 阿部雄太, 島津元秀 [免疫抑制剤]肝臓と免疫抑制剤 移植 45(1)8-15, 2010

[学会発表] (計1件)

中村有紀, 阿部雄太 ほか, 腎移植患者に対するグラセブターへの切り替えの検討 日本移植学会 2010 京都

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 雄太 (ABE YUTA)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号: 70327526

(2) 研究分担者

該当なし ()
研究者番号:

(3) 連携研究者

該当なし ()
研究者番号: