

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659821
 研究課題名（和文） 制御性樹状細胞を誘導させたドナー角膜による新しい移植免疫制御システムの開発
 研究課題名（英文） Establishment of a novel immunoregulatory system by enrichment of tolerogenic DCs in donor cornea.
 研究代表者
 熊倉 重人（KUMAKURA SHIGETO）
 東京医科大学・医学部・講師
 研究者番号：90271296

研究成果の概要（和文）：本研究ではマウス角膜移植モデルを用い、制御性樹状細胞の抑制効果について検討した。制御性樹状細胞を BALB/c レシピエントマウスに移入した後、角膜移植を行い、移植片拒絶反応を移植後 8 週目まで細隙灯顕微鏡で観察した。移植後 8 週目の移植片生着率は無処置マウスが 33%であったのに対し、ドナー由来制御性樹状細胞を移入したマウスでは 83%と拒絶反応が抑制されていた。今後は、角膜内に制御性樹状細胞を増加させ拒絶反応を抑制できるシステムの開発をさらに進めていく予定である。

研究成果の概要（英文）：Significant interest has been focused on the use of ex vivo manipulated dendritic cells (DCs) to optimally induce transplant tolerance and promote allograft survival. Though it is understood that donor-derived tolerogenic DCs suppress the direct pathway of allosensitization, whether such DCs can similarly suppress the indirect pathway remains unclear. We therefore utilized the murine model of corneal transplantation to address this, as these allografts are rejected in an indirect pathway dominant fashion. Interestingly, recipients administered with donor bone marrow derived regulatory DCs (DCregs) generated via culturing with GM-CSF, IL-10 and TGF- β 1, significantly prolonged survival of corneal allografts. We conclude that donor derived tolerogenic DCs significantly suppress the indirect pathway, thereby identifying a novel regulatory mechanism for these cells in transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床学・眼科学

キーワード：角膜移植 制御性樹状細胞 拒絶反応

1. 研究開始当初の背景

角膜移植は、難治性角膜疾患の治療として重要な選択肢の一つであり、臓器移植の中で最も多く行われている移植である。角膜移植拒絶反応は移植後の重篤な合併症の一つであり、拒絶反応を最小限にコントロールすることは、角膜移植を成功させるためにも重要である。現在のところ免疫抑制剤以外の治療法は存在せず、免疫抑制剤による多くの副作用のため場合によっては薬剤の投与を中止せざるを得ないこともあり、医療の現場では、免疫抑制剤に変わる新たな拒絶反応に対する治療法の開発が待たれている。

近年、従来の薬剤投与と異なり、患者体内に直接治療効果のある細胞を投与する細胞治療が注目を浴びている。癌治療の最先端では、免疫活性作用の強い抗原提示細胞である樹状細胞を投与し、癌細胞を消退させる研究が盛んに行われている。樹状細胞は造血幹細胞を起源とする特有な細胞突起を有した抗原提示細胞であり、強い MHC-II 抗原の発現とそれを介しての T 細胞への強力な抗原提示能を有し、一次免疫反応を惹起しうる。近年、樹状細胞はワクチンやガン治療に臨床応用され、その応用の場はさらに広がりつつある。樹状細胞が強力な抗原提示能を有し、免疫反応を惹起する一方で、樹状細胞の中には、免疫反応を抑制する機能を持つ細胞、すなわち“制御性樹状細胞”と呼ばれる細胞集団の存在が近年報告され始めている。これら制御性樹状細胞は、T 細胞の機能を抗原特異的に制御し、さまざまな自己免疫病発症モデルマウスの疾患発症を抑制することが報告されている。さらに佐藤ら (Sato.k et al; Immunity, 2001) は、骨髄細胞を、GM-CSF, IL-10, TGF- β で培養することで制御性樹状細胞を誘導でき、この細胞を GVHD 発症

モデルのレシピエントマウスに移入するとその発症を抑制できることを報告している。当教室では、この制御性樹状細胞が自己免疫性ぶどう膜炎動物モデルのぶどう膜炎発症を抑制することを報告し (Usui.Y et al; Arch of Ophthalmology; 2008)、制御性樹状細胞の作製方法すでにを確立している。一方で、制御性樹状細胞の臓器移植拒絶反応に対する効果およびそのメカニズムに関しては、今だ謎の部分も多い。

2. 研究の目的

本研究ではこの制御性樹状細胞を臓器移植後拒絶反応の治療に応用することを目的に以下の点に的をしぼり検討を行う。

(1) ドナー骨髄由来制御性樹状細胞は、角膜移植拒絶反応を抑制しうるか？

ドナー骨髄細胞を、サイトカイン (GM-CSF、IL-10、TGF- β) 存在下で培養することで作製した制御性樹状細胞を角膜移植レシピエントに移入し拒絶反応を抑制できるか否か検討し、抑制できればそのメカニズムを要細に検討する。

(2) ドナー臓器内の前駆細胞を制御性樹状細胞に変化させ、角膜移植の拒絶反応を抑制できるか？

近年骨髄だけでなく各臓器にも樹状細胞の前駆細胞が存在していることが報告されている。そこで本研究の最大の目的は、ドナー臓器保存液 (本研究では、角膜保存液) にサイトカイン (GM-CSF、IL-10、TGF- β) を加えることでドナー臓器内の前駆細胞を制御性樹状細胞に変化させ、角膜移植の拒絶反応を抑制できるか否か検討する。

3. 研究の方法

(1) ドナー由来制御性樹状細胞が、角膜

移植拒絶反応を抑制しうるか

①ドナー由来制御性樹状細胞が、角膜移植拒絶反応を抑制しうるか: C57BL/6 マウス骨髄を GMCSF, IL-10, TGF- β (各 20ng/ml) で 7 日間培養した後、LPS (1 μ g/ml) 添加しさらに 24 時間培養し制御性樹状細胞を作製する。同時に mature DC (GMCSF で 7 日間培養、LPS 刺激あり), immature DC (GMCSF で 7 日間培養、LPS 刺激なし) も作製する。術前 7 日前に各 DC を BALB/c レシピエントに静脈内注射 (1 \times 10⁶/マウス) し、C57BL/6 マウス角膜を移植する。移植後 8 週目までスリット顕微鏡にて角膜混濁を確認し、移植片生着率を下記に示した各実験群で比較する。i) 無処置群、ii) immature DC 投与群、iii) mature DC 投与群、iv) DCregs 投与群

②角膜移植抑制メカニズムの解析 (Indirect Pathway を抑制しているか: (2) の実験にて角膜移植拒絶反応を抑制できれば、そのメカニズム解析特に Indirect Pathway を抑制しているか否かについて検討を行う。

i) ELISPOT assay: Direct pathway、Indirect pathway の解析には、ELISPOT assay が大変有効である。そこで各 DC 投与群と無処置群のレシピエントから、移植後 3 週目に頸部リンパ節を採取し、ELISPOT assay を行う。

ii) DCregs 投与により CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺抑制性 T 細胞を誘導しているか: DCregs は、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺抑制性 T 細胞を誘導し、免疫抑制効果をもたらすことが報告されている。そこで CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺抑制性 T 細胞が DCregs 投与にて角膜移植後に所属リンパ節内で誘導されているか否かフローサイトメトリーで確認する。さらに CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺抑制性 T 細胞が、Indirect pathway を抑制しているのか否か ELISPOT assay にて検討する。

(2) ドナー臓器内の前駆細胞を制御性樹状

細胞に変化させ、角膜移植の拒絶反応を抑制できるか

①角膜内前駆細胞は、制御性樹状細胞になりうるか

上記にてその存在を角膜内に確認した CD14⁺細胞をフローサイトメトリーにて確認する。しかし、マウス正常角膜細胞のフローサイトメトリーは、現在までほとんど報告がなく、試行錯誤が必要であることが予想される。フローサイトメトリーにて CD14⁺細胞を確認できれば、その細胞を単離してることが可能である。そこで単離した CD14⁺細胞を GMCSF, IL-10, TGF- β (CD14⁺細胞は骨髄細胞より分化しているため、7 日以内の培養が有効と考える。) にて培養した後、MHC-II 抗原、補助シグナル分子、CD11c、CD11b の発現を免疫組織化学染色、またはフローサイトメトリーにて検討する。

② GMCSF, IL-10, TGF- β との培養にてドナー角膜内に制御性樹状細胞を誘導できるか

骨髄由来 DCregs は、CD200R3 を強発現している結果を我々は得ている。(図 3-c) そこで CD200R3 を DCregs の特異的マーカーとし、その発現にて角膜内での DCregs 誘導の有無を検討する。すなわち、ドナー角膜を GMCSF, IL-10, TGF- β にて培養し (培養時間、最適温度も検討する)、培養した角膜の mRNA から cDNA を作製、real-time PCR にて CD200R3 の発現を naive マウス角膜と比較する。さらに、培養した角膜内における MHC-II 抗原、補助シグナル分子、CD11c、CD11b の発現を免疫組織化学染色、またはフローサイトメトリーにて検討する。

GMCSF, IL-10, TGF- β による培養が、角膜内皮細胞に与える影響についての検討

: DCregs を角膜内に誘導出来ていても、その培養が角膜内皮細胞に悪影響であれば、角膜移植は成功しえない。そこで、GMCSF, IL-10, TGF- β

による培養で角膜内皮細胞にどのような影響を与えるか、特に角膜内皮細胞のアポトーシスについて ZO-1 (角膜内皮細胞のマーカー) および AnnexinV (アポトーシス細胞のマーカー) による免疫組織化学染色で確認する。

③GMCSF, IL-10, TGF- β にて培養した角膜により角膜移植拒絶反応を抑制できるか: 上記 2-b) の実験にて角膜内に DCregs を誘導し、その培養時間、最適温度を決定出来れば、C57BL/6 マウスから採取したドナー角膜を、培養し、BALB/c レシピエントに移植する。移植後 8 週目までスリット顕微鏡にて角膜混濁を確認し、移植片生着率を下記に示した各実験群で比較する。i) 無処置群、ii) メディウム (サイトカインなし) 培養群、iii) メディウム+GMCSF 培養群、iv) メディウム+GMCSF, IL-10, TGF- β 培養群

4. 研究成果

我々は、既報に則り制御性樹状細胞を作成した。骨髄細胞を採取し GMCSF、IL-10、TGF- β で培養後、LPS にて刺激を加え、制御性樹状細胞を作成した。作成した細胞は MHC-II、CD80、CD86 が低発現であった。また CD200R3、IL-10 を高発現しており、IL-12 は低発現であった。また、in vitro における allogenic T 細胞の刺激性は低く、既報通りの制御性樹状細胞であると考えられた。そこで B6 マウス骨髄から作成したこの細胞を角膜移植レシピエントに静脈内投与したところ拒絶反応が有意に抑制された。このレシピエントマウスの頸部リンパ節では Foxp3 の発現が増加し、IFN- γ 産生 CD4 陽性細胞の数が低下していた。また ELISPOT assay により、レシピエント T 細胞の direct recognition と indirect recognition を比較したところコントロールに比較し、direct recognition と indirect

recognition の双方が有意に低下していた。本研究結果は、ドナー由来制御性樹状細胞が indirect recognition を抑制することをはじめて明らかにした結果となった。

さらに角膜を GMCSF、IL-10、TGF- β を含む培養液にて培養したところ角膜内の細胞は LPS 下でも MHC-II、CD80、CD86 が低発現のままであった。この結果は角膜内に制御性樹状細胞を誘導できている可能性がある。今後この角膜を用いて角膜移植を行い拒絶反応を抑制できるか否か検討していく予定である。

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 2 件)

1) Non-Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty for bullous keratopathy secondary to iridoschisis Terumi Minezaki, Takaaki Hattori, Hayate Nakagawa, Shigeto Kumakura, Hiroshi Goto. Clinical Ophthalmology. in press. (査読あり)

2) Depiction of cavity formation in Terrien marginal degeneration by anterior segment optical coherence tomography. Hattori T, Kumakura S, Mori H, Goto H. Cornea. 2013 ;32(5):615-8 (査読あり)

Doi : 10.1097/ICO.0b013e318259c970.

[学会発表] (計 2 件)

① 制御性樹状細胞による角膜移植拒絶反応の抑制 服部貴明 熊倉重人 後藤 浩 角膜カンファレンス 2011 (2011.2.18 東京)

② 制御性樹状細胞による角膜移植拒絶反応の抑制 服部貴明 東京医大医学会総会 2011 (2011.11.05 東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊倉 重人 (KUMAKURA SHIGETO)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：90271296

(2) 連携研究者

服部 貴明 (HATTORI TAKAAKI)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：20408173

臼井 嘉彦 (USUI YOSHIHIKO)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：50408142