

## 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 4 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791488

研究課題名（和文） IDO 陽性樹状細胞が誘導する免疫寛容に関する研究

研究課題名（英文） Immunological tolerance of donor-specific transfusion induced by Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) positive dendritic cells

研究代表者

池本哲也 (IKEMOTO TETSUYA)

徳島大学・大学院ヘルスケアサイエンス研究部・助教

研究者番号：20398019

研究成果の概要（和文）：Donor-specific Transfusion:DST 後（Balb/c to C3H/He、 $10^8$  個の脾細胞を静注）移植実験および cell sorting の結果から、DST は donor の CD11b<sup>+</sup>細胞により donor-specific Treg が expansion することでドナー特異的免疫寛容を誘導し、これには樹状細胞の IDO 発現が強く関与していることが証明された。

研究成果の概要（英文）：A possible mechanism of donor-specific tolerance by donor-specific transfusion (DST) is to be induced by donor-derived CD11b<sup>+</sup> cells due to an expansion of regulatory T cells in recipient, this mechanism is considered that recipient Indoleamine 2,3-dioxygenase positive dendritic cells play an important role.

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	3,300,000 円	990,000 円	4,290,000 円

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：Foxp3、調節性 T 細胞、実験的脾島移植、免疫寛容

## 1. 研究開始当初の背景

ドナー特異的免疫寛容状態はドナー抗原に対する反応のみが低下・消失し、その他の抗原に対する反応は保持される状態であり、免疫学的には clonal deletion, ignorance, Fas-Fas ligand を介した経路などの機序が提唱されているが、実際の機序は不明である。一連の移植免疫反応の担い手は T 細胞であり、移植グラフトは免疫担当細胞から異物（非自己）として認識され、活性化した T 細胞がこれを直接破壊、また液性免疫を誘導し除去を誘導すると考えられている。近年、これらの T 細胞を制御する調節性 T 細胞 (Treg) が 1999 年に坂口らによって同定・発見された。これらの Treg は他の T 細胞を制御することのできる T 細胞集団 (Foxp3+CD4+CD25+T 細胞) であり、自己免疫疾患のみならず、移植免疫にも重要な役割を果たすことが報告されている (Gondek

## DC et al. J Immunol 2008, San Segundo D et al. Transplant Proc 2007)。

研究代表者はこれまでにマウス脾島移植の系においてドナー特異的輸血 (Donor specific transfusion:DST) を前処置として行い調節性 T 細胞を in vivo で活性化 (clonal expansion) させておくとレシピエントの免疫寛容状態を誘導できることを報告しているが (Ikemoto T et al. J Med Invest 2005)、その詳細な機序は依然として不明である。そこで、DST のメカニズムとしてレシピエントの Treg に焦点を当て、DST によってレシピエントの Treg がどのように活性化 (clonal expansion) ・変動するのか、また DST として投与される細胞成分のうち、どの細胞成分がドナー特異的免疫寛容を誘導するのかを解析することで、DST の機序解明を目指すことを着想した。

また、近年急速に発達した Cell sorting

の手法を用いれば、DSTとして移入される細胞を細分化し、どの細胞成分がDSTとして効果的であるかの解析が可能である。DSTによって活性化(clonal expansion)されたレシピエントのTregを解析することは移植免疫において大きなインパクトとなることは間違いないが、これまでの我々の検討では、一旦expansionされたTregも次第に消失、沈静化し、T細胞を制御しているTreg自体も負のフィードバックを受けそのclonal expansionが制御されていると考えられる(Ikemoto T et al. American Transplant Society 2009)。これまで研究代表者はBaylor Institute for Immunology Research (Baylor Medical University, Texas, USA)にて著明なDC研究者であるJacque Bancheureauの元、自己免疫疾患においてこのフィードバックが主としてプロフェッショナルな抗原提示細胞(Antigen presenting cell:APC)である未熟な樹状細胞(DC)によってなされている可能性につき研究してきた(American Diabetes Society 2008)。一方、近年樹状細胞(DC)の中でinterferon-gamma-inducible indoleamine 2,3-dioxygenase (INF-g IDO)を発現し、Tregを制御している一群が発見・同定された。IDOはtryptophan代謝に深く関わる細胞内酵素であり、この発現によってnaive CD4<sup>+</sup>TcellからTregが導されることが主として腫瘍免疫の分野で誘導近年報告され、移植免疫にもこのIDOを介したTreg制御が強く関与している可能性が示唆される。DSTによる免疫寛容誘導の機序がIDOを介したTreg誘導によるものかどうかの検討を行うことで「Allo抗原衝撃的投与法であるDSTによってレシピエント体内でIDO+DCをexpansionすることでナイーブCD4<sup>+</sup>細胞からドナー特異的Tregが誘導され、免疫寛容状態が誘導されるのではないか」という仮説を証明できる。これを証明する手段として、まず、得られたimmunomonitoringの結果を元に、最も効果的に免疫寛容状態を誘導し得る細胞成分を移入されたレシピエントマウスを用い、そのDCプロファイルを経時的に検討、さらにリンパ節、脾臓のIDO免疫化学染色を行い、DCのIDO発現を検討し、コントロール群と比較する。IDOの拮抗剤として1MTが知られているが、DSTを施行したマウスにこの1MTを投与し、その移植生着をコントロール群、DST群、最も効果的な細胞集団を移入された群間で比較検討し、これらの末梢TregプロファイルおよびDCプロファイルを測定、比較検討する。

## 2. 研究の目的

(1) DSTのメカニズムとしてレシピエント

のTregに焦点を当て、DSTによってレシピエントのTregがどのように活性化(clonal expansion)・変動するのか、またDSTとして投与される細胞成分のうち、どの細胞成分がドナー特異的免疫寛容を誘導するのかを解析することで、DSTの機序解明を目指す。

(2) 樹状細胞(DC)の中でinterferon-gamma-inducible indoleamine 2,3-dioxygenase (INF-g IDO)を発現し、Tregを制御している一群が発見・同定された。腫瘍免疫においてはIDO発現によってnaive CD4<sup>+</sup>TcellからTregが導されることが近年報告され、移植免疫でもこのIDOを介したTreg制御が強く関与している可能性が示唆される。DSTによる免疫寛容誘導の機序がIDOを介したTreg誘導によるものかどうかの検討を行うこととした。

## 3. 研究の方法

3-1. マウス脾臓移植モデルを用いたDSTがレシピエントTregに与える影響に関する検討

3-2. DSTにおけるTreg expansionに係る責任細胞集団の同定

### 【実験群】

①コントロール群 (PBS投与群) ②DST群 (whole splenocytes $10^8$ 個投与群)の2群において下記の項目を検討する。

### 【検討項目】

①移植片生着日数  
②経時的レシピエント体内Treg(Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tcell)比率 (Day0, Day3, Day5, Day7, Day10, Day14, Day21)のFACs解析  
③DST後のTregをMagnetic cell sorting system(MACS)により分離・精製し、リンパ球混合試験(stimulatorとして誘導されたTreg.responderとしてnaive C3H/He:donor strain, naive Balb/c:recipient strain, naive C57/Bl6:3<sup>rd</sup> partyのリンパ球を用いる)を行い、ドナー特異的であるかどうかを検討する。

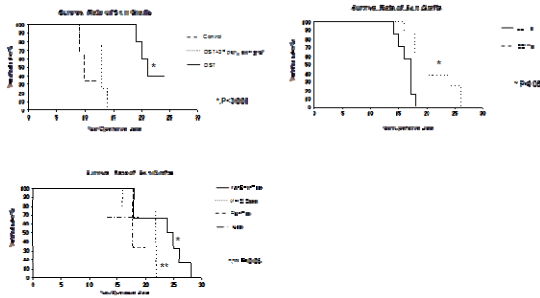
3-3. DSTによる未熟IDO発現樹状細胞のTreg誘導に関する検討

3-4. IDO+DCが実際のDSTに及ぼす影響の検討

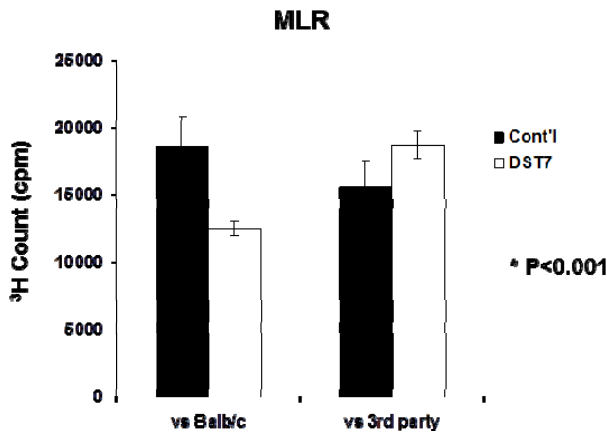
## 4. 研究成果

Donor-specific Transfusion群(6-8週令Balb/c(H-2d)をdonor、C3H/He(H-2k)をrecipientとし、 $10^8$ 個、0.5mLの脾細胞を尾静脈より静注)はControl群(同条件でPBSを静注)に比し有意に移植片の生着延長を見た(P<0.001)。DST後に3rd partyの皮膚を移植するとコントロール群と同様の期間で拒絶された。Cell sortingした細胞成分では

nonBnonT cell および MHC classII cell が有意に移植片生着を延長した (P<0.05)。

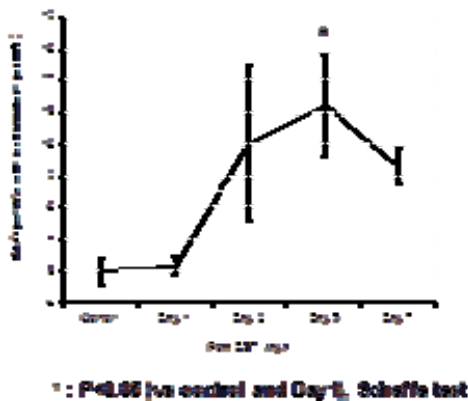


nonBnonT cell および MHC classII cell のうち、CD11b+ cell が有意に移植片生着を延長した (P<0.05)。Recipient の調節性 T 細胞 (Treg) は DST 後 7 日で増加のピークを迎えた (P<0.01)。増加した Treg はリンパ球混合試験で donor 由来細胞のみを有意に抑制した (P<0.01)。



CD11b+ 細胞輸注後、レシピエントの IDO+CD11c+細胞は有意に増加した (P<0.01)。Recipient LNs の IDO 発現は CD11b+輸注後 3

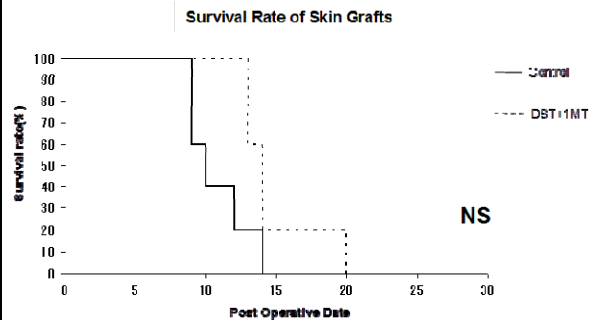
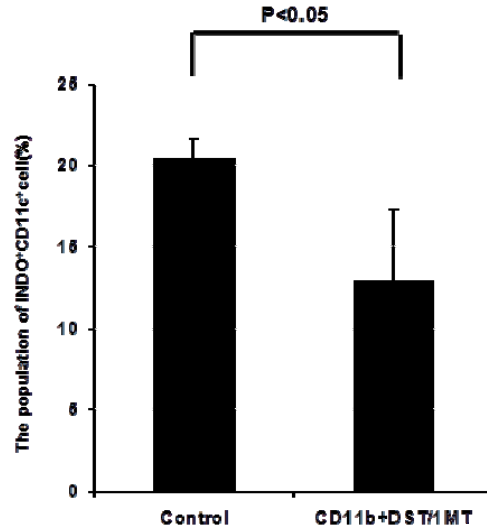
#### Change of IDO positive cells



日から急激に上昇し 5 日目にピークを迎えた (P<0.05)。DST 後に 1MT (IDO 阻害剤) を投与された recipient の移植片は生着延長が認められなかった)。同マウスでは末梢の Treg が

expansion しておらず、また IDO+CD11c+細胞はむしろ低下していた (P<0.05)。

#### The population of IDO+CD11c+cells



すなわち、DST は主として donor の CD11b+細胞により donor-specific Treg が輸注後 7 日目に expansion することでその効果を発揮し、そのメカニズムに IDO が強く関与していることが証明され、移植免疫の理解への大きな前進につながる可能性があると考えられる。

#### 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)

- Ikemoto T, Shimada M, Iwahashi S, et al. Changes of Immunological parameters with administration of Japanese Kampo medicine ( Juzen-Taihoto/TJ-48) in patients with advanced pancreatic cancer. Int J Clin Oncol. 2013 in press. 査読有
- Ikemoto T, Shimada M, Komatsu M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase Affects the Aggressiveness of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms Through

Foxp3+CD4+CD25+ T Cells in Peripheral Blood. *Pancreas*. 2012 Jun 20. [Epub ahead of print] 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1、池本哲也、島田光生 他 各臓器移植における免疫寛容 IFN inducible IDO+形質細胞様樹状細胞による免疫寛容誘導 第 47 回日本移植学会 2011 年 10 月 4 日 仙台国際センター (宮城県)

2、Ikemoto T, et al.

The role of donor specific regulatory T cells expanded by interferon-gamma inducible indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) + plasmacytoid dendritic cell  
12th Congress of the Asian Society of Transplantation 2011 年 9 月 25 日 COEX (韓国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池本哲也 (IKEMOTO TETSUYA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号 : 20398019

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :