

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670548

研究課題名(和文)細胞治療を併用した新しい免疫寛容誘導法に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Basic studies for induction of tolerance by a cell-therapy

研究代表者

山下 健一郎(YAMASHITA, KENICHIRO)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：00399940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：免疫抑制性細胞を誘導し、これを用いた新しい免疫抑制法を探索するための基礎的研究を行った。NF- κ BやMAPKsを抑制しドナー抗原を添加して樹状細胞(DC)を体外誘導すると制御性DCが作成され、このDC投与により有効な免疫抑制作用が得られることが判明した。ドナーリンパ球輸注とNF- κ B、MAPKsやAP-1/mTOR/p70S6Kの活性化阻害剤を併用すると強力な免疫抑制が得られ、生体内での制御性T細胞誘導作用も明らかとなった。ヒト末梢血単核球をCD80/86やCD40副刺激経路遮断下にアロ抗原と共培養すると、比較的抗原特異的な制御性T細胞が高率に誘導でき、その臨床応用が期待された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed basic researches on immunoregulatory cells in order to search for new immunosuppressive strategies. We found that tolerogenic dendritic cells (tDCs) were successfully generated ex-vivo by suppressing activation of either NF- κ B or MAPKs in the presence of donor-peptide antigens, and that administration of these tDCs significantly prolonged allograft survival in mice. The inhibition of NF- κ B, MAPKs or AP-1/mTOR/p70S6K activation following infusion of donor-leukocytes exerted a potent immunosuppressive effect. In some of these protocols, regulatory T cells (Tregs) were effectively induced in vivo. Coculture of peripheral blood mononuclear cells and allo-antigens together with either CD80/86- or CD40-costimulation blockers induced antigen-specific Tregs that seemed to have a potential utility for clinical immunosuppression.

研究分野：臓器移植

キーワード：移植免疫 免疫抑制性 細胞治療 分子標的

1. 研究開始当初の背景

臓器移植後には免疫抑制剤を終生にわたり服用しなければならない。既存の免疫抑制療法は、主にステロイド剤やカルシニューリン阻害剤などによる免疫抑制であり、これら薬剤を用いた汎免疫抑制による易感染性や悪性腫瘍発生、薬剤の副作用に起因する腎障害、耐糖能異常、神経障害などの弊害は未解決である。臓器移植後のより生体に優しい新たな免疫抑制療法の確立が望まれている。

1970年代初頭より自己免疫疾患や臓器移植実験モデルにおいて免疫寛容となった状態では抑制性のT細胞が存在することが見いだされ、その後、制御性T細胞(Treg)に関する基礎研究は飛躍的に進んでおり、現在、欧米では第三者由来の polyclonal CD4⁺CD25⁺ Treg を用いた細胞治療の臓器移植への臨床応用が進められている。最近の研究では、Tregのみならず樹状細胞、B細胞、マクロファージ、NK細胞や間葉系幹細胞などにおいても免疫抑制能を有する細胞の存在が明らかになりつつある。我々は、NF-κB、AP-1、p38-MAPK、mTOR/p70S6k、CD40、CD80、CD86などの転写因子や分子に対する標的治療薬の免疫抑制作用を報告してきた。これら転写因子や分子は、様々な免疫細胞において活性化や成熟・増殖への関与が基礎研究で示唆されているが、免疫抑制性細胞の誘導作用およびその効果については十分に検討されていない。

2. 研究の目的

本研究は、免疫抑制能を有する細胞を誘導し、これを用いた新しい免疫抑制法を探求するための基礎的研究を遂行することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) NF-κB 阻害による制御性 DC 誘導効果と誘導細胞による免疫抑制効果の検討：

BALB/c (H-2^d) マウス骨髄細胞より GM-CSF を用い DC を誘導した。DC 培養中又は

成熟刺激前に NF-κB 阻害剤 DHMEQ を添加し、誘導された DC の各種反応を、細胞表面マーカー、サイトカイン産生、リンパ球混合培養試験等で評価した。C3H/HeJ (H-2^k) マウス骨髄細胞より誘導した DC (3x10⁶ 個) を DHMEQ 添加下に C57BL/6 (H-2^b) マウス脾細胞由来の抗原末で刺激した後、C3H マウスに投与した。7日後、このマウスに C57BL/6 マウス心臓を移植し、グラフト生存期間等を検討した。

(2) MAPK 阻害による制御性 DC 誘導効果と誘導細胞による免疫抑制効果の検討：

C57BL/6 マウス骨髄細胞から GM-CSF/IL-4 を用いて DC を作成した。培養 2 日目から MAPK 阻害剤 NK026680 (NK) を添加し、培養 6 日目に BALB/c マウス脾細胞由来抗原を添加し、7日目に DC を回収した。この NK 添加誘導 DC (NK-DC) を用い、1) TNF-α 刺激に対する CD40、CD80、CD86、I-Ab、I-Ad の発現および 2) BALB/c もしくは C57BL/6 マウス脾臓由来 T細胞と混合培養した際の T細胞増殖反応を control-DC 群と比較検討した。また、C3H マウスをレシピエントとして、C57BL/6 マウス由来抗原を添加した NK-DC を投与し、1週間後に C57BL/6 マウス心臓を移植してその生着期間を検討した。

(3) AP-1/mTOR/p70S6k 阻害による制御性 DC 誘導効果の検討：

C57BL/6 マウス骨髄細胞より GM-CSF および IL-4 下に AP-1/mTOR/p70S6k 阻害剤 DTCM-gltarimide とアロ抗原ペプチドを添加して抗原特異的 DC を誘導し、LPS 刺激に対する DC 活性化抑制効果を検討した。

(4) NF-κB、MAPK、AP-1/mTOR/p70S6k 阻害による CD4⁺CD25⁺ 制御性 T細胞誘導効果：

C57BL/6 マウス脾細胞をアロ抗原刺激し、NF-κB、MAPK、AP-1/mTOR/p70S6k 阻害剤を添加し、CD4⁺ T細胞で CD25 発現を FACS にて検討した。

(5) AP-1/mTOR/p70S6k 阻害とリンパ球輸注併用による免疫寛容誘導効果の検討：

BALB/c マウス心臓を C57BL/6 マウスに移植し、AP-1/mTOR/p70S6k 阻害剤 DTCM-gltarimide は移植直後より 14 日間腹腔内投与した。ドナーリンパ球 2×10^7 個を移植 7 日前に輸注し、併用群は DTCM-gltarimide を細胞輸注直後より 14 日間腹腔内投与した。次に、細胞輸注施行後 7 日目(心移植直前)における免疫状態を MLR・ELISPOT・FACS にて検討した。また、DTCM-gltarimide の T 細胞増殖抑制作用を *in vivo* MLR の系で検討した。これは、放射線照射 BALB/c マウスに CFSE 標識 C57BL/6 脾細胞 6×10^7 個を輸注し、DTCM-gltarimide 40 mg/kg を 24 時間毎に腹腔内投与した。52 時間後、リンパ球を回収し、CFSE 標識細胞の増殖/apoptosis を検討した。

(6) MAPK 阻害とリンパ球輸注併用による制御性 T 細胞誘導および免疫抑制効果の検討：

BALB/c マウス心を C57BL/6 マウスに移植した (day 0)。移植 1 週間前 (day -7) にドナーリンパ球 (20×10^6 個) を輸注し、MAPK 阻害剤 NK026680 40 mg/kg/日を day -7 から day 6 まで経口投与し、グラフト生着期間を検討した。また、周術期のドナー抗原に対するリンパ球増殖能、サイトカイン産生能や制御性 T 細胞について検討した。

(7) NF- κ B 阻害とリンパ球輸注の併用により誘導された制御性 T 細胞および寛容に対するタクロリムスの影響に関する検討：

C57BL/6 マウス心を BALB/c マウスに移植し、NF- κ B 阻害とドナーリンパ球輸注の併用で免疫寛容を誘導した。タクロリムス (1.5 mg/kg/日) を day -7、0 または +7 から 2 週間併用投与し、グラフト生着期間日数、脾臓内のアロ反応性 T 細胞および制御性 T 細胞について評価し、細胞治療を用いた免疫寛容におけるタクロリムス併用効果を検討した。

(8) CD80/CD86 副刺激経路遮断によるヒト末梢血単核球細胞由来の抗原特異的制御性 T 細胞誘導効果の検討：

ヒト末梢血単核球細胞(PBMC)由来リンパ

球をドナー抗原と抗 CD80/抗 CD86 抗体存在下に 2 週間培養し免疫抑制性細胞を誘導した。誘導細胞の抑制能を MLR で評価した。また、誘導リンパ球の細胞種や表現型を FACS にて解析し、MACS を用いて細胞を分離して MLR 抑制能を有する細胞種を同定した。

(9) NSG マウスヒト化に関する研究：

NSG (NOD/Scid IL-2Rg null) マウスへヒト PBMC (5×10^6 個および 10×10^6 個) を腹腔内投与し、ヒトリンパ球の構築を評価した。また、CFSE 染色を用いた構築後のヒトリンパ球の増殖反応や Ki67 染色によるヒト抗原投与後の抗原特異的な反応を検討し、ヒト化 NSG マウスが他者ヒト抗原に対して特異的な免疫反応を示すかどうか検討した。

4. 研究成果

(1) NF- κ B 阻害による制御性 DC 誘導効果と誘導細胞による免疫抑制効果の検討：

成熟刺激前に DHMEQ を添加し誘導した DC では control DC に比べ、LPS や TNF- α 刺激に対し、表面成熟/活性化マーカー CD80、CD86、CD40、MHC class II の発現が抑制された。また、誘導した DC では、DHMEQ を添加により IL12p40 産生が濃度依存性に抑制されたが、IL-6 産生は抑制しなかった。DHMEQ 5 μ g/ml で処理後、LPS 刺激した DC はアロ T 細胞の増殖を抑制した。培養中 DC に DHMEQ を添加した群でも同様の結果が得られた。マウス心移植モデルにおいてグラフト平均生存期間は、無処置群で 11.0 日、control-DC 投与群で 15.0 日であった。培養初日より DHMEQ 1 μ g/ml を添加し誘導した DC では 20.0 日、抗原刺激前に DHMEQ 5 μ g/ml を添加し誘導した DC で 23.0 日と、各々無処置群に対して有意にグラフト生着期間は延長した。NF- κ B 阻害剤 DHMEQ を添加して誘導した DC は、成熟反応が抑制されアロ抗原に対し免疫抑制作用を示し、この誘導免疫抑制性

DC を用いた免疫抑制法は、臓器移植後の有効な免疫抑制療法となる可能性が示された。

(2) MAPK 阻害による制御性 DC 誘導効果と誘導細胞による免疫抑制効果の検討：

1) NK-DC は無治療 DC と比較し、表面抗原 (CD40、CD80、CD86、I-Ad) 発現と IL-12 産生を有意に抑制した。2) NK-DC では Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) 発現が亢進し、direct/indirect pathway による T 細胞増殖を共に抑制した。3) NK-DC 投与群の移植心生着期間の中央値は 60.5 日で、無治療群 (13 日) や control-DC 投与群 (11 日) に比し有意に延長した。MAPK 阻害剤 NK026688 を用い誘導した制御性 DC の有用性が示された。

(3) AP-1/mTOR/p70S6k 阻害による制御性 DC 誘導効果の検討：

DTCM-gltarimide を添加し誘導した DC では、LPS 刺激後の表面成熟/活性化マーカーの発現にコントロール DC と差異を認めず、AP-1/mTOR/p70S6k 阻害剤では制御性 DC は誘導されなかった。

(4) NF- κ B、MAPK、AP-1/mTOR/p70S6k 阻害による CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞誘導効果：

DHMEQ、NK026680、DTCM-gltarimide 添加により、いずれも CD4⁺ T 細胞の CD25 発現を抑制し、*in vitro* において CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞の直接誘導効果を認めなかった。

(5) AP-1/mTOR/p70S6k 阻害とリンパ球輸注併用による免疫寛容誘導効果の検討：

DTCM-gltarimide を 20、40、60 mg/kg/日投与することで、グラフト生着期間中央値は各々 13、19、18 日と、無治療群の 6 日と比べ有意に延長した。ドナーリンパ球輸注単独群の 24 日に比べ DTCM-gltarimide 40mg/kg/day 併用群では、70.5 日と著明な延長効果を認めた。リンパ球輸注後 7 日目において、併用群では細胞輸注単独群に比べ、MLR が有意に抑制され、アロ反応性 CD4⁺CD154⁺ T 細胞の発現も抑制された。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T 細胞は有意な増加を認めなかった。IFN- γ の産生細胞

数は併用群で抑制されたが IL-2 産生細胞数はむしろ増加していた。*In vivo* MLR において、DTCM-gltarimide 投与群では対照群に比べ、CFSE 標識 T 細胞の増殖は促進したが、多くはアポトーシスに陥っていた。ドナーリンパ球輸注と DTCM-gltarimide の併用によりアロ反応性 T 細胞の deletion は促進し、強力な免疫抑制効果を発揮することが示された。

(6) MAPK 阻害とリンパ球輸注併用による制御性 T 細胞誘導および免疫抑制効果の検討：

無治療群のグラフト生着期間中央値は 6.5 日で、リンパ球輸注群、NK 単独群では各々 24.5 日と 25.0 日へ延長したが、両者併用群では生着期間が 75.5 日まで著明に延長した。レシピエント脾細胞のドナー抗原刺激に対する増殖反応および IFN- γ 産生は、day 0 においてリンパ球輸注群、NK とリンパ球輸注の併用群で促進されたが、day 7 では両群で抑制された。CD8⁺ T 細胞上の CD44、CD62L、ICOS 発現も各治療群で無治療群に比べ抑制され、アロ抗原反応性 IFN- γ 産生細胞は NK 群、NK+リンパ球輸注群で減少した。CD4⁺Foxp3⁺ T 細胞は、day 0 および day 7 で各群に差異を認めなかったが、day 14 では NK 群、NK+リンパ球輸注群で有意に増加した。Foxp3⁺制御性 T 細胞の割合は、day 0 で各治療群に差を認めなかったが、ドナー抗原再暴露後に NK+リンパ球輸注群でのみ有意に増加した。MAPK 阻害とドナーリンパ球輸注による細胞治療の併用療法は、effector T 細胞を抑制する一方、制御性 T 細胞増加を促進することで免疫バランスを修飾し、アロ移植心生着期間を延長することが明らかになった。

(7) NF- κ B 阻害とリンパ球輸注の併用により誘導された制御性 T 細胞および寛容に対するタクロリムスの影響に関する検討：

リンパ球輸注に NF- κ B 阻害を併用することで 60% の症例でグラフトは 100 日以上長期生着し免疫寛容が誘導されたが、このプロトコールにタクロリムス治療を day -7 もしくは

day +7 から併用すると、グラフト生着期間の中央値は各々54日、50日と有意に短縮した。タクロリムス併用 (day -7) 群では、移植7日後のアロ反応性T細胞 (MLR、IFN- γ 産生細胞、CD4⁺T細胞中のCD154発現) を抑制しており、タクロリムス併用による差異を認めなかった。これに対しCD4⁺Foxp3⁺ 制御性T細胞はNF- κ B阻害とドナー由来リンパ球輸注の併用により増加していたが、タクロリムスをday -7またはday +7から併用すると逆に制御性T細胞は減少した。即ちタクロリムス併用治療はNF- κ B阻害とドナーリンパ球輸注による抑制性優位の免疫バランスを消失させた。一方、タクロリムスをday 0から併用投与すると、アロ反応性T細胞は更に抑制され、9例中8例(89%)で100日以上グラフト長期正着が得られ、免疫寛容誘導が促進された。細胞治療を用いた免疫寛容誘導プロトコールにおいて、カルシニューリン阻害剤の併用は「諸刃の剣」となり得るため、その併用開始時期が重要であることが示された。

(8) CD80/CD86 副刺激経路遮断によるヒト末梢血単核球細胞由来の抗原特異的制御性T細胞誘導効果の検討：

誘導リンパ球を添加することでMLRはドナー抗原に対してより特異的にかつ細胞数依存性に抑制された。また、抗体存在下に培養を行うとT細胞はより純化され、特にCD4⁺T細胞が増加した。中でもCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T細胞は6.9 \pm 1.1%から35.0 \pm 15.4%、CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺T細胞は9.0 \pm 3.1%から31.0 \pm 13.5%と制御性T細胞の割合が著しく増加した。これは抗CD40抗体下に培養した場合にも同様の結果が得られ、これらの方法によりヒトリンパ球から制御性T細胞が高率に誘導されることが判明した。また、本培養を行うと、CTLA4を発現する制御性T細胞の他にIL-10産生性CD4⁺CD8⁺T細胞も増加した。誘導リンパ球からCD3⁺細胞を除去した細胞群ではMLR抑制能が完全に失われ、

CD3⁺細胞を添加すると抑制は復したが、B細胞、単球、NK細胞、樹状細胞を各々除去してもMLR抑制能は変化せず抑制力は保たれた。CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞を各々除去すると、MLR抑制能は部分的に残されていた。これにより、本培養法で誘導される免疫抑制性細胞は制御性T細胞であり、機能分子としてCTLA4及びIL-10の関与が示唆された。

(9) NSGマウスヒト化に関する基礎研究：

NSGマウスにヒトPBMC 5 \times 10⁶個を腹腔内投与すると、主としてヒトT細胞がマウスに構築された。リンパ球10 \times 10⁶個ではGVHD反応により死亡するものがあり、ヒト化には5 \times 10⁶個のリンパ球移入が至適と判断した。ヒトリンパ球は投与1週間後には急速に分裂し、再構築されたヒトリンパ球は移植後4-6週間をピークに末梢でも観察された。本ヒト化モデルで、リンパ球構築後約2-3週間経過した後に他者ヒト抗原を腹腔内投与し、Ki67染色で構築されたヒトリンパ球の反応を検討したところ、アロ抗原に対する特異的反応を観察し得なかった。ヒトリンパ球をNSGマウスに構築しても、GVHD反応を生じてリンパ球が分裂することから、本モデルにおいてアロ抗原に対する反応のみを観察することは困難である可能性が示唆された。

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)

Zaito M, Yamashita K, Shibasaki S, Tsunetoshi Y, Fukai M, Ogura M, Yoshida T, Igarashi R, Kobayashi N, Umezawa K, Todo S. 3-[(dodecylthiocarbonyl)methyl]-glutarimide attenuates graft arterial disease by suppressing alloimmune responses and vascular smooth muscle cell proliferation. *Transplantation* 99(5): 948-56, 2015. DOI: 10.1097/TP.0000000000000576. 査読有

Shibasaki S, Yamashita K, Goto R, Wakayama K, Tsunetoshi Y, Zaitu M, Igarashi R, Haga S, Ozaki M, Umezawa K, Todo S. Immunosuppressive Effects of DTCM-G, a Novel Inhibitor of the mTOR Downstream Signaling Pathway. Transplantation 95(4): 542-50, 2013. DOI: 10.1097/TP.0b013e31827b3d90. 査読有

[学会発表](計 6 件)

江本 慎、後藤了一、柴崎 晋、長津明久、小野 仁、青柳武史、深井 原、武富紹信、嶋村 剛、藤堂 省、山下健一郎 : NK026680 と donor specific transfusion 併用による免疫修飾効果. 第 50 回日本移植学会総会、京王プラザホテル(東京都・新宿区)、2014 年 9 月 10-12 日

Emoto S, Goto R, Shibasaki S, Nagatsu A, Ono H, Igarashi R, Aoyagi T, Fukai M, Shimamura T, Saiga K, Taketomi A, Todo S, Yamashita K. Immunomodulation induced by a novel immunosuppressant, NK026680 plus donor specific transfusion permits a long-term cardiac allograft survival in mice. World Transplant Congress 2014, Moscone West Convention Center, San Francisco, CA, USA, July 26-31, 2014.

Yamashita K, Goto R, Zaitu M, Nagatsu A, Oura T, Watanabe M, Aoyagi T, Suzuki T, Shimamura T, Kamiyama T, Sato N, Sugita J, Hatanaka K, Demetris AJ, Bashuda H, Okumura K, Todo S. Induction of Operational Tolerance by a Cell Therapy using Donor Ag-pulsed Tregs in Living Donor Liver Transplantation. World Transplant Congress 2014, Moscone West Convention Center, San Francisco, CA, USA, July 26-31, 2014.

Yamashita K, Goto R, Zaitu M, Nagatsu A, Oura T, Watanabe M, Aoyagi T, Suzuki T,

Shimamura T, Kamiyama T, Sato N, Sugita J, Hatanaka K, Bashuda H, Okumura K, Todo S. Successful Withdrawal of Immunosuppression by a Cell Therapy Using Donor Ag-pulsed Tregs in Living Donor Liver Transplantation: An Update on Clinical Trial. 2014 Joint International Congress of ILTS, ELITA & LICAGE. Queen Elizabeth II Conference Center, London, UK, June 4-7, 2014

長津明久、山下健一郎、江本 慎、旭 火華、財津雅昭、小倉正臣、小野 仁、常俊雄介、後藤了一、五十嵐瑠美、場集田寿、奥村 康、武富紹信、藤堂省: 抗 CD80 抗体、抗 CD86 抗体下共培養により誘導される免疫抑制性細胞の同定. 第 114 回日本外科学会定期学術集会、京都国際会館(京都府・京都市)、2014 年 4 月 3-5 日

Nagatsu A, Yamashita K, Zaitu M, Emoto S, Asahi Y, Ono H, Goto R, Bashuda H, Taketomi A, Okumura K, Todo S. Ex-vivo generation of human Tregs by CD80 /CD86 costimulation blockade. 16th Congress of the European Society for Organ Transplantation. Austria Centre Vienna, Vienna, Austria, September 8 - 11, 2013

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山下 健一郎 (YAMASHITA, Kenichiro)
北海道大学・大学院医学研究科・特任教授
研究者番号 : 00399940

(2) 研究分担者

後藤 了一 (GOTO, Ryoichi)
北海道大学・北海道大学病院・医員
研究者番号 : 10645287

青柳 武史 (AOYAGI, Takeshi)
北海道大学・北海道大学病院・医員
研究者番号 : 90374347