

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：34401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670706

研究課題名(和文)自己Treg培養とCD28SAによる新規免疫寛容とMF1導入による移植腎永久生着

研究課題名(英文)The permanent survival of allografts by tolerance induction mediated by the combined therapy of adoptive transfer of Treg cells and the MF-1-gene transfection

研究代表者

東 治人(Azuma, Haruhito)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：40231914

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)：本研究の目的は、「Treg 投与(in vitro 培養バンクから)による術后感作性免疫寛容療法」と、「MF-1遺伝子導入による移植腎組織保護遺伝子導入療法」を併用することによる全く新しい免疫寛容導入法を開発、および、確立し、移植腎の永久生着を実現させることである。これまでに得られた実験成果として「MF-1遺伝子導入による「移植腎組織保護遺伝子導入療法」の確立、および、Treg 増殖による免疫寛容誘導率の向上」があげられ、新しい免疫寛容法の確立と免疫抑制剤を使用しない腎移植の実現が期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is the permanent survival of allografts by means of the establishment of novel strategy of induction of postoperatively sensitized immune tolerance. We tested the effect of combined therapy of adoptive transfer of Treg cells proliferated in in vitro culture system, so called "Treg bank" and the gene transfection of MF-1, which protect the kidney tissue from the all sorts of injuries after engraftment.

We have obtained the following results so far. The first, "the establishment of MF-1 gene transfection to the transplanted kidney tissue, which establish the protective gene transfer therapy of the allografts. Second, the improvement of immune tolerance induction rate by adoptive transfer of Treg supplied by Treg bank in which Treg are proliferated in in vitro system. Those results may realize the establishment of new immune tolerance method and the renal transplant without using immunosuppressive agents may be feasible.

研究分野：泌尿器科全般

キーワード：CD28-Supergonist 非特異的免疫抑制細胞 Tregバンク ドナー特異的な免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

我々は、約 20 年前から移植腎機能廃絶の原因の約 80% を占める Chronic allograft nephropathy (CAN) の発症メカニズム解析と治療、および移植腎永久生着を目標に研究を重ね以下のことを明らかにしてきた。

我々が作成した CAN モデル (F344- Lew) (平均生存期間: 約 5 2 週) では術後 8 週目頃から生じる接着分子の発現、およびサイトカイン産生増加が CAN の発症過程で重要である (Azuma, et, al. PNAS, 1995; J Clin Invest 1994)。主要組織適合性

抗原が同一である isograft 間における腎移植 (Lew-Lew) でも、発症時期は異なるが Allo graft 同様の CAN 像を認めた (Azuma, et, al. Transplant, 1994; Ann Surg., 1994)。

移植していない naive Lew ラットに腎阻血再灌流障害を生じさせ (Ischemia) 1 年間観察したところ、発症時期は異なるがアログラフト同様の CAN 像を認めた (Azuma, et, al. Transplantation, 1994)。

機能系球体数の異なるラット CAN モデル、すなわち、a) 通常の CAN モデル (1A): b) 系球体数減少モデル。(腎動脈分枝 3 本中 2 本を結紮, 1/3 Allografts); c) 系球体数増加モデル (左右 2 つの F344 腎を 1 匹の Lew ラットに移植, 2 Allografts) を作成した結果、1/3A では早期から単位ネフロン GFR (SNGFR) は著明に増加し (hyperfilter)、術後 10 週目に CAN を発症したのに対してドナー腎を 2 個移植した 2A モデル (機能系球体数増加) では SNGFR はほぼ均一に保たれ、全観察期間を通して CAN を発症しなかった (Azuma, et, al. growth factor (HGF) を全身投与すること J. Clin. Invest. 1994; Transplant, 1997)。

ラット CAN モデルに、腎組織の再生を促す細胞増殖因子 hepatocyte により、術後早期の尿細管壊死を著明に抑制し、機能系球体数を保持することで CAN の発症を防止

した (Azuma, et, al. J. Am. Soc. 2001)。

2. 研究の目的

“Treg バンク作成と Treg 術前投与による新規免疫寛容療法の確立”

: 本プロジェクトの大きな目的は免疫抑制剤を使用しない移植の臨床応用である。これまでいくつかの動物モデルで免疫学的寛容導入の成功例が報告されているが、レシピエントに抗体を直接投与する方法がほとんどで、1) 十分な抗体量の確保が困難、および、2) 重篤な副作用が出現することがある、などの問題から、臨床応用は困難であった。しかし、本法はレシピエントの非特異的な免疫制御細胞 (Treg) を予め術前に抽出して in vitro で増殖させ、必要なときに必要な量の Treg をいつでも供給可能な Treg バンクを作成することによって高率にかつ安全に免疫寛容を誘導する極めて画期的な治療法である (CTLA-4 投与療法では、米国で重篤な副作用の出現により臨床応用禁止となった)。さらに興味深いことに、この非特異的 Treg は、ラット腎移植急性拒絶反応モデルのレシピエントに術前投与すると、投与直後の腎移植 (一次移植) のみならず、一次移植の半年後に行った同種ドナーからの心移植をも免疫抑制剤を全く使用することなく永久生着、すなわち “ドナー特異的な免疫寛容” を誘導する (Azuma et al. Am J. Transplant, 2008, Azuma et, al. Transplantation, 2010)。

“レンチウイルス、HVJ リボソーム、および、超音波照射を併用した新規遺伝子導入法による移植腎組織ゲノム内 MF1 遺伝子導入”

: メトロンファクター 1 (MF-1) 遺伝子は、極めて強い組織修復・再生作用によって移植腎組織を保護し、また組織内の Treg を増殖させることによって免疫寛容誘導を促進する。我々は高率に核酸内遺伝子導入を可能にするレンチウイルスベクターに M

F1を組み込んだ Lenti-MF1 を作成し、さらに Lenti-MF1 を細胞内に極めて取り込まれやすい HVJ リポソームに封入することによって“HVJ-Lenti-MF1”を合成した。そしてさらに、移植腎組織を傷害することなく、より高率な導入効率を獲得するため、超音波造影剤（オプチゾン）を加えた HVJ-Lenti-MF1 溶液を腎動脈から定圧ポンプを用いて圧負荷をかけながら腎内に挿入し、水槽内で超音波照射を行う“圧負荷超音波遺伝子導入法”を開発し、現在、詳細な条件設定（超音波造影剤の濃度、腎動脈にかかる圧負荷の程度、超音波照射の強度、超音波の照射時間、照射方法などにおける最適条件の検討）を行っている。本法による MF1 遺伝子ゲノム内導入は、“移植腎内での組織修復・再生作用”と、“Treg 増殖による免疫寛容誘導作用”を同時にしかも長期的に発現させ、移植腎永久生着実現の可能性を示唆する画期的な治療法である。

“分子イメージングシステムを用いた術後フォローアップ” 臨床で利用されている PET に類似したシステムで、種々の糖鎖、抗体、および、標識分子を用いることで、移植腎を摘出することなく腎内の免疫反応や腎機能をリアルタイムに把握し、拒絶反応の診断に有効であるのみならず、抗体糖鎖を選択することで、移植腎の局所治療も可能である）術前後から長期的に移植腎内の免疫反応をリアルタイムに把握することによって、NS-Tregcell がドナー特異性を獲得する機序を含めたさらに詳細な免疫学的メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

Treg バンクの作成: 1. 術前、予めレシピエントの抹消血液中から、CD4+CD25+非特異的免疫制御細胞、CD141 (BDCA3)+ dendritic cells、

CD34 末梢血幹細胞を cellsorter を用いて収集する。2. HGF、および、CD28-SA 投与下に、matrix 3D 培地を用いてこれらの細胞を共培養し、非特異的免疫制御細胞を十分に増殖させる（すなわち、in vitro の細胞培養により必要な時に必要な量を供給できる Treg バンクを作成する）。

Treg adoptive transfer による免疫寛容の誘導:

ラット腎移植急性拒絶反応モデル Donor Wistar; Recipient, Lewis を用いて術前レシピエントに投与する Treg の投与量、投与日程、および投与回数について、免疫寛容を最も確実に、かつ安定して誘導する条件を検討する。

MF-1 遺伝子をレンチウイルスベクター

に組み込んだ Lenti-MF1 の y 調整、および、Lenti-MF1 を HVJ liposome に封入した HVJ-Lenti-MF1 の合成:

MF-1-Plasmid をレンチウイルスベクターに組み込んだ Lenti-MF1 の作成、および、この Lenti-MF1 を HVJ-liposome 内に封入した HVJ-Lenti-MF1 の合成は既に予備実験で終了しており、MF1 遺伝子を腎組織の核酸内に最も確実に導入し、また、MF1 タンパク本来の作用を最も効率的に発揮する HVJ-Lenti-MF1 の合成条件を設定する。

腎動脈から定圧ポンプで圧負荷を加え、超音波造影剤を用いて遺伝子導入効率を向上させる“圧負荷超音波照射法”における適正条件の設定:

超音波造影剤を加えた HVJ-Lenti-MF1 溶液を腎動脈から定圧ポンプを用いて圧負荷をかけながら腎内に挿入し、水槽内で超音波照射を行う“圧負荷超音波遺伝子導入法”条件設定（超音波造影剤の濃度、腎動脈にかかる圧負荷の程度、超音波照射の強度、超音波の照射時間、照射方法などに

おける最適条件の検討)を行う。

新規分子生体イメージングシステムの

開発:臨床で利用されているPETに類似したシステムで、種々の糖鎖、抗体、および、標識分子を用いることによって、移植腎を摘出することなく術後の免疫反応や腎機能をリアルタイムに把握することが可能である。

大動物移植モデル(ブタ腎移植モデル)

における新規免疫寛容導入法の確立と

MF-1 遺伝子治療効果の検討:ラット腎移植モデルを用いて行った上記 1

までの実験を大動物移植モデル(ブタ腎移植モデル)において施行し、免疫寛容誘導における最適な条件を臨床応用を念頭に入れて設詳細に検討する。

4 . 研究成果

A . 「MF-1 遺伝子導入による “移植腎組織保護遺伝子導入療法” の確立、および、B. Treg 増殖による免疫寛容誘導率の向上」

我々は、HGFとMSPのキメラであるMF-1 遺伝子を、レンチウイルスベクター(アデノウイルス並みの使いやすさ、および、安全で高率にゲノム内に遺伝子導入が可能)および、超音波照射用造影剤(オプチゾン)を併用したレンチウイルス超音波照射遺伝子導入法を新しい腎組織遺伝子導入法として確立した。この新規遺伝子導入法によってMF-1 遺伝子が移植腎組織ゲノム内に導入され、移植腎に生じる様々な組織障害因子から移植腎を長期的に保護することが期待され、移植腎の長期生着に寄与すると考えられる。また、MF-1遺伝子を導入することによって、免疫寛容誘導率が向上する傾向が見られた。この理由としてHGF、あるいは、HGFとMSPのキメラであるMF-1 は、移植動物モデルにおいて、体内に自然に存在するTregを増殖させることによって、免疫寛容を誘導し移植臓器の明らかな生着延長効果を示すことが明らかとなっており、本実験においても、新規遺伝子導入法によってMF-1 遺伝子が移植腎組織ゲノム内に導入されることによって、Tregバンクから投

与されたNS-NTregを移植腎内で増殖させ、免疫寛容誘導率を有意に向上させることが期待され、極めて画期的であると思われる。

ラット腎移植モデルにおける免疫寛容の誘導、および、生着率に関しては、現在、ラットを用いて約80%の成功率で、免疫寛容を誘導することに成功している。今後、臨床応用を行うためには100%に到達させる必要があり、その完成度を高めるべく研究を継続中である。

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6件)

1. Teruo Inamoto, Kohei Taniguchi, Kiyoshi Takahara, Ayako Iwatsuki, Tomoaki Takai, Kazumasa Komura, Yuki Yoshikawa, Taizo Uchimoto, Kenkichi Saito, Naoki Tanda, Junko Kouno, Koichiro Minami, Hirofumi Uehara, Hajime Hirano, Hayahito Nomi, Satoshi Kiyama, Yukihiro Akao, Haruhito Azuma. Intravesical administration of exogenous microRNA-145 as a therapy for mouse orthotopic human bladder cancer xenograft. *Oncotarget*. 査読有、2015 6(25):21628-21635
DOI: 10.18632/oncotarget.4129
2. Takahara K, Inamoto T, Minami K, Yoshikawa Y, Takai T, Ibuki N, Hirano H, Nomi H, Kawabata S, Kiyama S, Miyatake S, Kuroiwa T, Suzuki M, Kirihata M, Azuma H. The Anti-Proliferative Effect of Boron Neutron Capture Therapy in Prostate Cancer Xenograft Model. *PLoS One* 査読有.2015,10(9) online
DOI: 10.1371/journal.pone.0136981
3. Haruhito Azuma, Teruo Inamoto, Kiyoshi Takahara, Hayahito Nomi, Hajime Hirano, Naokazu Ibuki, Hiroshi Uehara, Kazumasa Komura, Koichiro Minami, Taizo Uchimoto, Kenkichi Saito, Tomoaki Takai, Naoki Tanda, Kazuhiro Yamamoto, Yoshihumi Narumi and Satoshi Kiyama. Novel Bladder Preservation Therapy with Osaka Medical College Regimen. *THE JOURNAL OF*

UROLOGY.査読有.2015,193829443-450
doi: 10.1016/j.juro.2014.08.094.

4. Kazumasa Komura, Teruo Inamoto, omoaki Takai, Taizo Uchimoto, Kenkichi Saito, Naoki Tanda, Koichiro Minami, Hirofumi Uehara, Kiyoshi Takahara, Hajime Hirano, Hayahito Nomi, Satoshi Kiyama, Toshikazu Watsuji, Haruhito Azuma. Could transurethral resection of the prostate using the TURis system take over conventional monopolar transurethral resection of the prostate? A randomized controlled trial and midterm results. Urology.査読有
2014.84(2):405-411 doi: 10.1016/j.urology
 5. Kazumasa Komura, Teruo Inamoto, Tomoaki Takai, Taizo Uchimoto, Kenkichi Saito, Naoki Tanda, Koichiro Minami, Rintaro Oide, Hirofumi Uehara, Kiyoshi Takahara, Hajime Hirano, Hayahito Nomi, Satoshi Kiyama, Toshikazu Watsuji, Haruhito Azuma. Incidence of urethral stricture after bipolar transurethral resection of the prostate using TURis: results from a randomised trial. BJU International.査読有2014.115(4):644-652
doi: 10.1111/bju.12831
 6. HARUHITO AZUMA, TERUO INAMOTO, KIYOSHI TAKAHARA, HAYAHITO NOMI, HAJIME HIRANO, NAOKAZU IBUKI, HIROSHI UEHARA, KAZUMASA KOMURA, KOICHIRO MINAMI, TAIZO UCHIMOTO, KENKICHI SAITO, TOMOAKI TAKAI, NAOKI TANDA, KAZUHIRO YAMAMOTO, YOSHIHUMI NARUMI, SATOSHI KIYAMA.
The novel bladder preservation therapy BOAI-CDDP-radiation (OMC-regimen): A new treatment option for invasive bladder cancer patients with lymph node metastasis. Int.J Oncol.査読有.2014.44(6):1895-1903
DOI: 10.3892/ijo.2014.2378
- [学会発表](計4件)
1. Teruo Inamoto, Shigeru Sakano, Tomoaki Takai, Kazumasa Komura, Taizo Uchimoto, Kenkichi Saito, Naoki Tanda, Koichiro Minami, Kazuhiro Nagao, Ryo Inoue, Kiyoshi Takahara, Hideyasu Matsuyama, Haruhito Azuma. The systemic inflammation-based Glasgow Prognostic

Score as a powerful prognostic factor in patients with upper tract urothelial carcinoma. AUA2015 Annual Meeting. 2015.05.15.
New Orleans USA.

2. Hajime Hirano, Hayahito Nomi, Ryoichi Maenosono, Matsunaga Kazuhisa, Takahara Kiyoshi, Inamoto Teruo, Satoshi Kiyama, Haruhito Azuma. SUCCESSFULLY RESULTED IN A SHARP INCREASE OF THE NUMBER OF RENAL TRANSPLANTATION; STRATEGY OF OUR CENTER. Congress of the Asian Society of Transplantation. 2015.08.23. Singapore.
3. 能見勇人, 平野 一, 前之園良一, 西本優大, 松永知久, 吉川勇希, 齋藤賢吉, 内本泰三, 南 幸一郎, 木山 賢, 東 治人. 7α活性化マクロファージによる7α移植細胞の拒絶機構に関する検討. 第50回日本移植学会総会. 2014.09.11.
京王プラザホテル(東京)
4. 平野 一, 能見勇人, 齋藤賢吉, 前之園良一, 松永知久, 反田 直希, 内本泰三, 高井朋聡, 南 幸一郎, 高原 健, 稲元輝生, 木山 賢, 東 治人. 移植後リンパ増殖性疾患(PTLD)の治療後に発症した薬剤性間質性肺炎の一例. 第50回日本移植学会総会. 2014.09.11. 京王プラザホテル(東京)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 治人 (Azuma Haruhito)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40231914

(2) 研究分担者

原 史郎 (Takahara Siro)
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・
寄附講座教授
研究者番号: 70179547

猪阪 善隆 (Isaka Yoshitaka)
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号: 00379166

梨井 康 (Li Xiaokang)
国立成育医療センター(研究所)・
移植、外科研究部・室長
研究者番号: 60321890

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：