

2009 34044A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

抑制性 T 細胞類似の細胞による免疫寛容誘導の試み

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 寺岡 慧

平成 22 (2010) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	
抑制性T細胞類似の細胞による免疫寛容誘導の試み	3
寺岡 慧	
II. 分担研究報告	
1. 抑制性T細胞類似の細胞による免疫寛容誘導の試み	11
奥村 康	
2. 分子レベルでの研究	12
清野研一郎	
3. 細胞レベルでの免疫学的研究	13
垣生園子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	15
IV. 研究成果の刊行物・別刷	19

I. 総括研究報告

抑制性 T 細胞類似の細胞による免疫寛容誘導の試み

研究代表者 寺岡 慧 東京女子医科大学腎臓外科教授

研究要旨 我々は種々の免疫反応を制御することが知られている調節性 T 細胞様の細胞を生体外で誘導し、この細胞を腎移植後のアカゲサルに移入することにより、移植医療における究極の目標である免疫寛容を誘導することに成功した。すなわちアカゲサルの実験的腎移植において、レシピエントの T リンパ球とドナーの抗原提示細胞を抗 CD80/ CD86 抗体の存在下に 14 日間混合培養すると強い免疫抑制活性を有する細胞（CD4+CD25+CTLA4+調節性 T 細胞様細胞（T_{Reg}-like cell））が得られ、この細胞を腎移植後のアカゲサルに移入することにより、ドナー特異的免疫寛容を誘導することに成功した（J Clin Invest, 115: 1896-1902, 2005）。サルを用いた臓器移植において寛容状態を誘導する手法は、我々の提唱したもの以外に世界で数種類あるのみであるが、大動物を用いた実験では我々の他に成功例の報告はない。その後ヒトリンパ球において同様の方法で得られた培養リンパ球は、CD4+CD25+CTLA4+Foxp3+であり、すなわち調節性 T リンパ球（T_{Reg}）の phenotype を有し、リンパ球混合培養（MLR）においてドナー特異的に MLR を抑制することが明らかとなった（未発表データ）。

我々の研究はこのドナー抗原特異的調節性 T 細胞（donor-specific regulatory T cell, DST_{Reg}）を腎移植患者に投与することによりドナー特異的免疫寛容の導入を試みるものである。ドナー特異的免疫寛容が誘導されたか否かの確認は、ドナー抗原に対する MLR が第三者に対する MLR に比して低応答性であることを確認した上で免疫抑制薬を減量し、この過程を繰り返しつつ免疫抑制薬を漸減してゆき、最終的に免疫抑制薬を中止することによって確認する。この過程において、血清クレアチニン値、超音波ドップラー検査、リンパ球サブセット、MLR、必要に応じて移植腎生検による組織所見などにより総合的に判断しつつ慎重に進めることにより患者の安全性を確保しうる。この方法を用いて 21 年度は 10 例に腎移植を実施し、現在免疫抑制剤を漸減中である。現時点では全例において対ドナー MLR でドナー特異的低応答性が認められており、免疫抑制薬を減量中である。今後移植後約 1 年から 1 年半を目処に、MLR によるドナー特異的免疫学的低応答性を確認しつつ慎重に免疫抑制薬の中止をめざす。

研究分担者

奥村 康 順天堂大学アトピーセンター長

垣生園子 順天堂大学免疫学教授

清野研一郎 聖マリアンナ大学難病治療研究

センター分子治療学研究室准教授

A. 研究目的

レシピエント T リンパ球とドナー抗原提示細胞を抗 CD80/86 抗体存在下に混合培養して、CD4+CD25+CTLA4+Foxp3+ ドナー特異的調節性 T 細胞（DS-T_{Reg}）を誘導

し、この細胞を腎移植後のレシピエントに投与してドナー特異的免疫寛容を導入する。

B. 研究方法

1. インフォームド・コンセントの取得

本法による腎移植の実施に関して、その概要、合併症、危険性、長期予後などを十分に説明して、書面による同意を得る。

2. 対象患者

本年度においては、インフォームド・コンセントが得られた 10 例の患者に本法による腎移植を実施した。10 例のレシピエントの年齢、性別、血液型、原疾患、透析期間、ドナーとの続柄、血液型、HLA ミスマッチ抗原数を表 1 に示す。

3. リンパ球採取とリンパ球混合培養

腎移植予定日の 2 日前にドナー、レシピエント双方にリンフォサイタフェレシスを行い、それぞれ 1×10^{10} 個、 5×10^9 個のリンパ球を得る。得られたそれぞれのリンパ球をカルチャーバッグ (87-301A-100N) に入れ、ドナーリンパ球に 30Gy の放射線を照射する。以下のドナーおよびレシピエントリンパ球浮遊液の調整は東京女子医科大学 Cell Processing Unit (CPU) 内で行う。

リンパ球比重分離液の上に、採取したレシピエントリンパ球を重層させ、2000rpm、20 分間遠心する。中間層に貯まったレシピエントリンパ球分画を採取して、ALyS505N 液で洗浄後 10% 血清加 ALy505N 液に suspend し、10% 血清加 ALyS505S 液をナイロンウールに通過させ、レシピエント T リンパ球を分離採取し細胞数をカウントする。レシピエント T リンパ球をカルチャーバッグ (87-301A-100N) 内の ALyS505N 液 1000mL に suspend し、血清 15mL お

よび抗 CD80 抗体 (2D10) 15mg、抗 CD86 抗体 (IT2.2) 15mg を添加する。

採取後放射線照射 (30Gy) したドナーリンパ球をリンパ球比重分離液の上に重層させ、2000rpm、20 分間遠心する。中間層に貯まった分画を採取し、ALyS505N 液で洗浄した後に ALyS505N 液 500mL に suspend し、これを上記のカルチャーバッグ内に注入して、レシピエントリンパ球と 37°C インキュベーターで 1 週間混合培養する。

1 週間後、カルチャーバッグから培養リンパ球を回収して、ALyS505N 液で洗浄し細胞数をカウントする。この際死細胞が多い場合は、リンパ球比重分離法により死細胞を除去する。こうして得られた培養リンパ球を ALyS505N 液 1000mL に suspend し、カルチャーバッグ内に注入する。

同時に再度リンフォサイタフェレシスによりドナー末梢血から 5×10^9 個のリンパ球を採取し、カルチャーバッグに注入して 2500rad の放射線照射後、CPU に搬送する。

すでに述べた同様の方法で、上記のドナーリンパ球を比重分離し、中間層の分画を採取して洗浄後 ALyS505N 液 500mL に suspend する。このドナーリンパ球浮遊液に血清 10mL、抗 CD80 抗体 10mg、抗 CD86 抗体 10mg を添加し、上記の培養リンパ球浮遊液の入ったカルチャーバッグ内に注入後、37°C インキュベーターでさらに 1 週間混合培養する。

4. 腎移植と免疫抑制法

ドナーから腹腔鏡下腎摘術で摘出された腎臓を、レシピエント腸骨窩に所定の方法で移植する。免疫抑制法は cyclosporine (CsA) 8mg/kg/日、mycophenolate mofetil

(MMF) 2000mg/日、methylprednisolone (MPS) 500mg/日の経口投与を開始する。抗 CD25 受容体 α 鎖に対する単抗体である basiliximab は使用しない。

MPS は急速に減量して移植後 7 日目で 20mg/日とし、以後 20mg/日 3 日間、16mg/日 3 日間、12mg/日 3 日間投与した後に 8mg/日で 1 ヶ月間維持する。その後は MLR D/3rd party SI 比の低下を確認しつつ漸減する。

CsA については連日血中濃度を測定し、移植後 3 ヶ月間は trough level (C0) を 150 ~ 300ng/mL の範囲内に維持するよう投与量を調節する。その後は MLR D/3rd party SI 比の低下を確認しつつ漸減する。

MMF については移植後 1 ヶ月間は 2000mg/日で維持し、その後 2 週毎に 250mg ずつ減量し、移植後 2 ヶ月半で 1000mg/日とし、以後 1000mg/日で維持する。その後は MLR D/3rd party SI 比の低下を確認しつつ漸減する。

腎移植後 6 日目から cyclophosphamide (CPA) 25~30mg/kg/日を 3 日間静脈内投与し、末梢血リンパ球数を連日測定する。CPA 投与後、末梢血中白血球数が 1500/mm³ 以下、好中球数が 1000/mm³ 以下となった場合は、granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) を投与する。

5. 培養リンパ球の輸注

2 週間培養したリンパ球をカルチャーバッグから回収し、生理食塩水で 2 回洗浄し、細胞数をカウントする。死細胞が多い場合はリンパ球比重分離法で除去し、生理的食塩水でさらに 2 回洗浄した後に細胞数をカウントする。同時に培養液の一部を採取してエンドトキシン定性試験で陰性であるこ

とを確認する。

上記で得られた培養リンパ球を生理的食塩水 100mL に suspend し、輸血用フィルターを通してレシピエントに静脈内投与する。投与に際しては、レシピエントの vital sign を経時的に観察し、発熱、悪寒戦慄、血圧低下などの症状が出現した場合は直ちに投与を中止する。

10 症例における CPA 投与日および投与量、培養リンパ球輸注日および輸注細胞数を表 2 に示す。

6. リンパ球混合培養 (MLR) の実施

腎移植後経時的に、レシピエントリンパ球とドナーリンパ球、および 3rd party リンパ球とを用いて所定の方法で MLR を行う。それぞれの MLR における stimulation index (SI) を算出し、ドナー/3rd party SI 比 (D/3rd party SI 比) を算出する。

7. 免疫抑制薬の減量

移植後経時的に MLR を実施し、D/3rd party SI 比の低下が得られた場合は、まず CsA および MPS を、ついで MMF を漸減する。

8. 拒絶反応の診断と治療

通常の方法により拒絶反応をモニターし、拒絶反応が疑われた場合は移植腎生検を行い、診断が確定した場合は通常の方法により治療を行う。

9. 免疫学的監視

MLR の他に、末梢血リンパ球サブセットを検査し、CD4、CD25、CTLA-4、Foxp3、CD95、granzyme 陽性細胞数を測定する。

10. 副作用および合併症

腎移植に付随する重篤な合併症、培養リンパ球輸注に伴う副作用出現時には、直ちに本試験を中止し、標準的な腎移植後の免

疫抑制法に切り替える。

C. 研究結果

症例 5 は移植前に continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) で維持されていたことによる腹水貯留のため、症例 8 は移植後の急性尿細管壊死 (ATN) のため、症例 10 は脾摘後の脾液瘻のため CPA 投与をそれぞれ術後 11~13 日目、術後 26~27 日目、術後 14~15 日目に遅らせ、それに伴って培養リンパ球輸注日をそれぞれ術後 19 日目、術後 33 日目、術後 21 日目に遅らせた (表 2)。したがって培養期間がそれぞれ 21 日間、35 日間、23 日間となった。

全 10 症例において移植腎は生着しており、MLR で D/3rd party SI の低下 (ドナー特異的免疫学的低応答性) が得られている。

症例 1 は移植後 68 日目に肺塞栓を併発したため、MLR D/3rd party SI の低下が得られ、移植腎機能自体も血清クレアチニン値 (sCr) 0.56mg/dL と良好であったが、本試験の継続を断念した。

全 10 症例の移植後経過日数、sCr、最低 MLR D/3rd party SI 比、免疫抑制薬投与量を表 3 に示す。全例において MLR D/3rd party SI 比の低下が認められ、これを確認しつつ免疫抑制薬の減量を行っている。症例 2 と症例 8 については配偶者間の移植であるため (HLA 抗原ミスマッチ数はそれぞれ 6、3)、MLR D/3rd party SI 比の低下は認められているが、免疫抑制薬の減量を比較的慎重に行っている。

CPA 投与の副作用としては脱毛、白血球減少が認められ、全例に G-CSF の投与を要している。培養リンパ球の輸注時の発熱、

悪寒戦慄、血圧低下などはいっさい認められなかった。

D. 考察

腎移植におけるドナー特異的免疫寛容の導入を目的として、レシピエント T リンパ球とドナー抗原提示細胞を抗 CD80/86 抗体存在下に混合培養し、CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺Foxp3⁺細胞を誘導して、これを腎移植患者に輸注した。経時的にドナーおよび 3rd party とレシピエントリンパ球とで MLR を行い、D/3rd party SI 比の低下を確認することによって、ドナー特異的免疫学的低応答性が誘導されたか否かを検討し、これを確認しつつ免疫抑制薬の減量を行った。

症例 5、8 および 10 において培養リンパ球の輸注がそれぞれ移植後 19、33 および 21 日目に行われ、結果として培養期間がそれぞれ 21 日間、35 日間、23 日間となり、輸注細胞数はそれぞれ 0.8x10⁹/mm³、0.075x10⁹/mm³、0.3x10⁹/mm³ であった。その他の 7 例においては培養期間は 14 日間であり、輸注細胞数は 0.4~1.5x10⁹/mm³ であった。このことより培養期間は 21 日以内が限界であり、それ以上となると培養細胞が減少すると考えられた。

症例 1 は移植後 68 日目に肺塞栓を併発したため、本試験の継続を中止した。MLR D/3rd party SI は低下しており、移植腎機能自体は sCr 0.56mg/dL と良好である。

培養リンパ球の輸注後、徐々に MLR D/3rd party SI 比が低下し、免疫抑制薬を減量しているが、症例 2 と症例 8 は配偶者間の移植であることから、比較的慎重に免疫抑制薬を減量している。今後症例 3~7 およ

び症例 9 および 10 においては腎移植後 1 年半をめどに免疫抑制薬からの完全離脱を目指す予定である。症例 2 と症例 8 においては、その結果を確認した上で、さらに 6 ヶ月程度をかけて免疫抑制薬からの離脱を目指す予定である。

CPA の投与後全例に末梢血白血球減少と脱毛が認められ、G-CSF の投与を必要とした。末梢血白血球数の回復には数日を要した。症例 4 以降は CPA 投与量を 30mg/kg/日 から 25mg/kg/日に減量した。

培養リンパ球の輸注による発熱、悪寒戦慄、血圧低下などの副作用はいっさい認められなかった。

E. 結論

腎移植におけるドナー特異的免疫寛容の導入を目的として、レシピエント T リンパ球とドナー抗原提示細胞を抗 CD80/86 抗体存在下に混合培養し、CD4+CD25+CTLA-4+Foxp3+細胞を誘導して、これを腎移植患者に輸注した。経時的にドナーおよび 3rd party とレシピエントリンパ球とで MLR を行い、D/3rd party SI 比の低下を確認し、全例においてドナー特異的免疫学的低応答性が誘導され、現在、免疫抑制薬の減量を慎重に行っている。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

学会発表

1) 小山一郎、寺岡 慧、奥村 康、他：腎移植における末梢性免疫寛容の導入。第 45 回日本移植学会総会、東京、2009 年 9 月

2) 小山一郎、寺岡 慧、奥村 康、他：腎移植における末梢性免疫寛容の導入。第 43 回日本臨床腎移植学会総会、高知、2010 年 1 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特記事項なし

No	年齢	性別	移植年月日	原疾患	透析歴	ドナー	血液型	HLAMM
1	42	M	2008/8/28	IgA	preemptive	妹	A→A	3
2	46	F	2009/2/5	Mt遺伝子異常	2y3m	夫	O→B	6
3	53	M	2009/4/9	CGN	1y2m	姉	O→AB	1
4	41	F	2009/5/21	IgA	2y7m	母	AB→AB	2
5	26	M	2009/6/18	IgA	2j5m	母	A→A	3
6	36	F	2009/7/9	CGN	7y10m	母	B→AB	3
7	47	M	2009/8/13	IgA	11m	妹	O→O	3
8	53	M	2009/9/3	IgA	17y4m	妻	A→A	3
9	34	M	2009/10/1	CGN	7y8m	父	B→B	2
10	35	M	2010/2/4	不明	9m	母	O→O	1

表1 患者背景とドナーおよび血液型・組織適合性

No	CPA	投与日	輸注細胞数	輸注日
1	30mg/kgx3	6,7,8	0.4x10 ⁹	12
2	30mg/kgx3	5,6,7	1.5x10 ⁹	12
3	30mg/kgx3	5,6,7	1.2x10 ⁹	12
4	25mg/kgx3	5,6,7	0.8x10 ⁹	12
5	25mg/kgx3	11,12,13	0.8x10 ⁹	19
6	25mg/kgx3	5,6,7	1.2x10 ⁹	12
7	25mg/kgx3	5,6,7	1.2x10 ⁹	12
8	25mg/kgx2	26,27	0.075x10 ⁹	33
9	25mg/kgx3	5,6,7	0.9x10 ⁹	12
10	25mg/kgx2	14,15	0.3x10 ⁹	21

表2 CPA投与と輸注リンパ球数および輸注日

No	経過日数	D/3 rd P SI	sCr	CsA	MMF	MPS	合併症
1	580	0.12	0.56	50/-	250/-	-	68POD肺塞栓
2	419	0.32	0.95	25/25	250/250	-	脱毛、食欲低下
3	356	0.16	1.04	50/25	500/250	-	脱毛
4	314	0.09	1.19	25/-	250/-	-	脱毛
5	286	0.08	1.57	75/75	250/250	4	脱毛
6	265	0.006	1.46	50/50	250/250	2	脱毛
7	230	0.15	0.92	50/25	250/250	-	脱毛
8	209	0.14	1.41	75/75	250/250	4	ATN
9	181	0.27	1.47	50/50	250/250	2	リンパ囊種
10	55	-	1.23	150/150	750/500	6	腓液瘻, CMV抗原血症

表3 経過日数、MLR、血清クレアチニン値、免疫抑制薬投与量と合併症

II. 分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

抑制性T細胞類似の細胞による免疫寛容誘導の試み

研究分担者 奥村 康 順天堂大学アトピーセンター

研究要旨：

臓器移植後に免疫寛容を誘導する試みについて、抑制性T細胞類似の細胞を生成して、ヒト腎臓移植の系に応用した。

研究分担者氏名：奥村 康

所属研究機関名：順天堂大学アトピー
センター、センター長

A. 研究目的

臓器移植における免疫寛容誘導の手法は確立されていない。当研究施設においてその手法を考案し、臨床応用する一つの手段とする。

B. 研究方法

レシピエントから 6×10^9 乗個、ドナーから 2×10^9 乗個のリンパ球を採り、1.5 lの培養液（抗CD80/CD86抗体 $8 \mu\text{g/ml}$ ）の存在で培養する。1週間後に生細胞を得、さらにドナーから 2×10^9 乗個のリンパ球を採り、1.2 lの培養液（抗CD80/CD86抗体 $6 \mu\text{g/ml}$ ）で培養する。さらに5日後に300mlの培養液を加え、その2日後に生細胞を採り、レシピエントに戻した。

（倫理面への配慮）

東京女子医大の倫理委員会規定にのっとり実施した。

C. 研究結果

10例の臨床研究を実施した。上記の方法で得られた細胞はドナーとレシピエントの組み合わせのアロMLRを抑制した。またCD25、CTLA-4の発現はnaïve T cellに比べて増強していた。10人の研究参加者は免疫抑制剤の減量が可能であり、副作用もほとんど認められなかった。

D. 考察

ヒトのリンパ球がアロ抗原を認識する際にCD80/CD86経路を阻害すると効率

よく抑制性T細胞類似の細胞が誘導される。このことはCD25、CTLA-4の発現増強と幾許の関連があると考えられた。

E. 結論

サルで得られた成果はヒトの腎臓移植でも有用なこと確かめられた。ただ、まだ免疫抑制剤を投与している状態であり、今後の推移を観察する必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Chiyoko Sekine, Ko Okumura et al. Differential regulation of splenic CD8⁺ dendritic cells and marginal zone B cells by Notch ligands (International Immunology 21, 295-301, 2009)

2. 学会発表

奥村 康：臓器移植と免疫寛容
日本移植学会総会特別講演(東京)
2009年9月

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

分子レベルでの研究

研究分担者 清野研一郎 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター

研究要旨

抑制性T細胞類似の細胞が生成される際に重要なT細胞のanergy誘導のメカニズム、さらに同細胞によってエフェクター細胞を抑制する分子メカニズムについて検討した。

A. 研究目的

臓器移植後免疫寛容誘導のために抑制性T細胞類似細胞を体外で誘導しレシピエント体内に戻すという試みを行っているが、この現象における分子メカニズムは明らかではない。本分担研究では抑制性T細胞類似細胞生成のメカニズム及び同細胞がエフェクター細胞を抑制する分子機構について検討を行う。

B. 研究方法

T細胞の第2シグナルの障害により同細胞はanergy（麻痺）の状態に陥る。我々がこれまでanergyを研究するために用いてきたT細胞の亜群NKT細胞を用い、T細胞のanergy誘導にかかわる細胞内分子機構を解析した。また、抑制性T細胞類似細胞の発現する抑制性分子に関する解析、エフェクター細胞への影響を検討した。

（倫理面への配慮）

聖マリアンナ医大倫理委員会の指針に従って実験を行った。

C. 研究結果

マイクロアレイデータベースよりNKT細胞に高く発現する遺伝子をピックアップし、リアルタイムPCRによりbasic-helix-loop-helixモチーフを持つ遺伝子が自然免疫リンパ球に高く発現していることを確認した。同basic-helix-loop-helixモチーフを持つ遺伝子を強制発現させるとIFN- γ の発現が亢進し、同遺伝子を抑制すると低下することを確認した。抑制性T細胞類似細胞に発現する分子をFACSあるいはPCRを用いて検討した結果CTLA-4、FoxP3といったいわゆる制御性細胞に高く発現する分子の増加がみられた。また、抑制性T細胞類似細胞のエフェクター細胞抑制機構についてtranswellを用いて検討した結果、細胞間の接触は少なくとも試験管内では必要ないという結果であった。寛容誘導後の患者PBMCを用い、NKT細胞のサイトカイン産生性を検討したところIL-10高産生の検体が存在した。

D. 考察

NKT細胞に高く発現するbasic-helix-loop-helixモチーフを持つ遺伝子はその構造から転写因子に結合して働く可能性が高く、現在どのような分子と会合してサイトカイン産生を制御しているのか検討中である。今後、同遺伝子の抑制性T細胞類似細胞における役割を検討していく。また上記の結果から抑制性T細胞類似細胞の液性因子がエフェクター細胞を抑制している可能性があり、今後この物質の特定を試みる。さらに患者PBMCを用いた検討はさらに症例数を重ね検討を行う。

E. 結論

T細胞のanergy、サイトカイン産生制御に重要な因子の一つを同定した可能性が高い。抑制性T細胞類似細胞によるエフェクター細胞の抑制メカニズムはさらに症例数を重ね検討を行う。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

清野研一郎「再生医学時代における免疫制御研究」宮崎サイエンスキャンプ、招請講演、2010年2月宮崎

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

細胞レベルでの免疫学的研究

研究分担者 垣生園子 順天堂大学医学部免疫学客員教授

研究要旨：

移植片に対する免疫寛容の機序を細胞レベルで解明することを目指して、本研究ではモデル実験系を確立して解析を進めている。実験系としては、タンパク抗原 OVA とスーパー抗原 TSST-1 と反応する TCR 遺伝子導入の T 細胞クローンマウスを用いた。TSST-1 で刺激した T 細胞は、TSST-1 のみならず OVA の再刺激に対する増殖反応および IL-2 産生能が抑制されていた。一方、抑制性サイトカインである IL-10 の産生は亢進していた。これら結果から、本実験系は、in vitro で免疫寛容を誘導された T 細胞が同一抗原刺激を受けた場合の反応抑制の機序解明を、in vitro および in vivo にてクローンレベルで解明する系として有用であることが判明した。今後、本実験系を用いて、抑制状態にある細胞の in vivo での寿命、および IL-10 による周辺の活性化細胞への影響を解析する。

A. 研究目的

免疫反応が負に制御されている現象は免疫寛容として古くから知られているが、その機序は不明のままである。その解明に向けて、本研究ではできるだけ単純な実験系を確立する

B. 研究方法

スーパー抗原 (sAg) は T 細胞クローン特異的に活性シグナルを入れるが、続いて反応が抑制されることが知られている。我々が樹立した卵白アルブミン (OVA) と反応する T 細胞受容体 (TCR) の遺伝子導入マウス (Tg) は OVA の他に sAb である TSST-1 にも反応することを確認してある。それぞれの抗原刺激と反応する T 細胞の活性化状態をサイトカイン産生能と活性化マーカーの発現で解析した。前者に関してはタンパク・レベル (ELISA) と mRNA レベル (real time PCR) で、後者に関しては Flow-cytometer にて解析した。

倫理面への配慮に関しては、マウス細胞のみを用いたため必要としなかった。

C. 研究結果

増殖性サイトカインである IL-2 の産生は、OVA と TSST-1 刺激で発現量発現時期に差異が認められた。すなわち、IL-2 は TSST-1 刺激直後に高発現し、24 時間以降急激に低下する。OVA では 24 時間をピークに下降をたどる。その発現量は TSST-1 の 1/2 から 1/8 である。②一方、抑制性サイトカインである IL-10 は両抗原刺激によって徐々に発現し 48 時間でピークとなるが、その発現量は IL-10 で著しく高い。③予め TSST-1 で刺激を受けた T 細胞は、in vivo および in vitro 共に、再刺激における IL-2 の発現量は抑制されたが、IL-10 産生は抑制を受けなかった。興味深いことに、TSST-1 刺激を受けた T 細胞は、OVA 再刺激においても IL-2 の発現量は低下していた。

細胞は、OVA 再刺激においても IL-2 の発現量は低下していた。

D. 考察

上記の結果、TSST-1 の初回刺激で IL-2 の発現抑制が誘導された T 細胞には、IL-2 特異的に抑制性の記憶が誘導されたことを推測させる。しかし、IL-2 産生を抑制された T 細胞では、抑制性サイトカインとして知られる IL-10 の産生亢進が認められたことから、IL-10 を介した増殖抑制の関与が推測された。同一 TCR を介した OVA と TSST-1 刺激によって同一 T 細胞クローンに正・負の機能を誘導できることが確認された本実験系は、IL-2 産生抑制の分子機序を解析する良いツールと考える。また、本 Tg マウスの T 細胞は CD4 陽性であることから、Treg 細胞ファミリーの誘導解析にも有用であろう。

E. 結論

同一 TCR を介した 2 種類の異なる抗原刺激 (スーパー抗原および通常タンパク抗原) を使い分けることによって、IL-2 産生抑制を誘導する系を確立した。誘導された T 細胞は再刺激によっても増殖抑制が維持されていることから免疫寛容の機序解析の良いモデルと考え、同実験系を用いて次年度更なる解析を進める。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Development of monoclonal antibodies for analyzing immune and hematopoietic systems of common marmoset. Kametani Y, Suzuki D, Kohu K,

Satake M, Suemizu H, Sasaki E, Ito T, Tamaoki N, Mizushima T, Ozawa M, Tani K, Kito M, Arai H, Koyanagi A, Yagita H and Habu S. *Exp. Hematol.* 37:1318, 2009

2) Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, Tomioka I, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, Ito M, Ito R, Kito C, Yagihashi C, Kawai K, Miyoshi H, Tanioka Y, Tamaoki N, Habu S, Okano H, Nomura T. *Nature.* 459(7246):523-7, 2009

3) Effects of liposome-encapsulated hemoglobin on human immune system: evaluation in immunodeficient mice reconstituted with human cord blood stem cells. Kawaguchi AT, Kametani Y, Kato S, Furuya H, Tamaoki K, Habu S. *Artif. Organs* 33:169-176, 2009

4). Over-expression of Runx1 transcription factor impairs the development of thymocytes from the double-negative to double-positive stages. Wong WF, Nakazato M, Watanabe T, Kohu K, Ogata T, Yoshida N, Sotomaru Y, Ito M, Araki K, Telfer J, Fukumoto M, Suzuki D, Sato T, Hozumi K, Habu S, Satake M. *Immunology 2010 in press*

5) Th2 Immune Response Plays a Critical Role in the Development of Nickel-Induced Allergic Contact Dermatitis. Matsumura Y, Kanoh M, Habu S, Komotori J, Niiyama S, Tamauchi H, Amoh Y, Terashima M, Katsuoka K. *Allergy Immunol.* 2010 in press

2. 学会発表

1) Hozumi K, Hirano K, Nakano Y, Yagita H, Habu S. The physiological significance of D114 for T cell development in the thymus (胸腺内T細胞分化におけるD114の生理的役割) : 第39回日本免疫学会総会・学術集会

2) Sato T, Chiba T, Sugou T, Satake M, Habu S. Evidence for the coupling of DNA replication control and lineage choice into CD4/8 thymocytes (CD4/8胸腺細胞分化とDNA複製制御は共役する) : 第39回日本免疫学会総会・学術集会

3) Kametani Y, Yamada Y, Sasaki E, Ito T, Takabayashi S, Yagita H, Suemizu H, Kato H, Satake M, Habu S. Response of common marmoset T cell to I,n. administration of cedar pollen

extract (花粉点鼻によるコモンマーモセットT細胞の反応) : 第39回日本免疫学会総会・学術集会
4) 古川敦子、亀谷美恵、荻島大貴、唐小燕、渡辺達夫、梅村しのぶ、垣生園子、徳田裕、関博之、竹田省。卵巣がんにおけるTrkB発現の免疫組織科学的検討 : 第13回日本がん免疫学会総会

5) Yamada Y, Kametani Y, Kofu K, Suemizu H, Sasaki E, Ito T, Koyanagi A, Yagita H, Takabayashi S, Kato H, Ishikawa K, Satake M, Nomura T, Habu S. Development of Pollinosis model of Common Marmoset (コモンマーモセット花粉症モデルの開発) : 第56回日本実験動物学会総会

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Chiyoko Sekine, Yuko Moriyama, Akemi Koyanagi, Noriko Koyama, Hideko Ogata, <u>Ko Okumura</u> , and Hideo Yagita	Differential regulation of splenic CD8 ⁺ dendritic cells and marginal zone B cells by Notch ligands	International immunology	21	295-301	2009
Kametani Y, Suzuki D, Kohu K, Satake M, Suemizu H, Sasaki E, Ito T, Tamaoki N, Mizushima T, Ozawa M, Tani K, Kito M, Arai H, Koyanagi A, Yagita H and <u>Habu S</u>	Development of monoclonal antibodies for analyzing immune and hematopoietic systems of common marmoset.	Exp.Hematol	37	1318	2009
Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamiooka M, Tomioka I, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, Ito M, Ito R, Kito C, Yagihashi C, Kawai K, Miyoshi H, Tanioka Y, Tamaoki N, <u>Habu S</u> , Okano H, Nomura T.	Generation of transgenic non-human primates with germline transmission.	Nature.	459(7246)	523-7	2009
Kawaguchi AT, Kametani Y, Kato S, Furuya H, Tamaoki K, <u>Habu S</u> .	Effects of liposome-encapsulated hemoglobin on human immune system: evaluation in immunodeficient mice reconstituted with human cord blood stem cells.	Artif.Organs	33	169-176	2009
Wong WF, Nakazato M, Watanabe T, Kohu K, Ogata T, Yoshida N, Sotomaru Y, Ito M, Araki K, Telfer J, Fukumoto M, Suzuki D, Sato T, Hozumi K, <u>Habu S</u> , Satake M.	Over-expression of Runx1 transcription factor impairs the development of thymocytes from the double-negative to double-positive stages.	Immunology	130	243-253	2010
Niiyama S, Tamauchi H, Amoh Y, Terashima M, Matsumura Y, Kanoh M, <u>Habu S</u> , Komotori J, Katsuoka K	Th2 Immune Response Plays a Critical Role in the Development of Nickel-Induced Allergic Contact Dermatitis.	Allergy Immunol	153	303-314	2010

IV. 研究成果の刊行物・別冊

Differential regulation of splenic CD8[−] dendritic cells and marginal zone B cells by Notch ligands

Chiyoko Sekine¹, Yuko Moriyama¹, Akemi Koyanagi², Noriko Koyama^{1,3}, Hideko Ogata¹, Ko Okumura¹ and Hideo Yagita¹

¹Department of Immunology, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

²Division of Cell-Biology, Bio-medical Research Center, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

³Probiotics Research Laboratory, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

Keywords: Delta-like 1, dendritic cells, marginal zone B cells, Notch

Abstract

The importance of Notch signaling to maintain CD8[−] dendritic cells (DCs) in the spleen has recently been revealed. However, the ligand responsible for this Notch signaling has not been determined yet. In this study, we demonstrated that blocking of Delta-like (DII) 1 alone had no significant effect on the maintenance of CD8[−] DCs while marginal zone (MZ) B cells were significantly reduced in the spleen of mice. On the other hand, blocking of DII1, DII4, Jagged1 and Jagged2 significantly decreased CD8[−] DCs. All these Notch ligands are expressed predominantly in the red pulp of the spleen where CD8[−] DCs reside. These results indicate a differential regulation of CD8[−] DCs and MZ B cells by Notch ligands in the spleen.

Introduction

Notch signaling pathways are evolutionarily conserved and play key roles in cell fate determination and differentiation in many tissues during embryonic and postnatal development (1). Four mammalian Notch receptors have been identified, designated as Notch1–Notch4. Interaction of Notch receptors with membrane-bound ligands of the Delta and Jagged families [Delta-like (DII) 1, DII3, DII4, Jagged1 and Jagged2] is critical for Notch signaling. The ligand binding induces γ -secretase-mediated cleavage and translocation of Notch intracellular domain into the nucleus, where it interacts with a DNA-binding protein RBP-J to induce the expression of downstream target genes such as *Hes1* and *Deltex1* (2).

Recently, a critical role for the Notch signaling has been revealed in the homeostasis of innate immune cells, such as dendritic cells (DCs) and marginal zone (MZ) B cells (3–6). DCs play an important role in the immune system, especially in innate immunity by recognition and capture of invading pathogens. This induces DC maturation to activate adaptive immunity (7). DCs are composed of distinct subsets, such as conventional DCs and plasmacytoid DCs (8). In the spleen, two major subsets of conventional DCs are found, distinguished in mice by the expression of surface marker CD8 (9). CD8⁺ DCs reside mainly in the T cell zone and are uniquely capable of cross-presenting exogenous antigens via the MHC class I pathway, while CD8[−] DCs are in the red pulp and MZ and preferentially present exogenous anti-

gens via the MHC class II pathway (9). The CD8[−] DCs can be also identified by their specific expression of DC inhibitory receptor 2, recognized by the 33D1 mAb (9).

A recent report has shown that splenic CD8[−] DCs selectively decreased in DC-specific RBP-J conditional knockout (cKO) mice with defective DC-mediated cytokine responses (3). Progenitors of the CD8[−] DC subset were not affected but CD8[−] DCs showed increased apoptosis in the spleen of the cKO mice, suggesting that RBP-J regulates the maintenance of committed CD8[−] DCs by facilitating their survival in the spleen. Messenger RNA of Notch1, 2, 4 and its target genes *Hes1* and *Deltex1* were expressed in CD8[−] DCs. This *Deltex1* expression in CD8[−] DCs was completely abolished in the absence of RBP-J, while Notch receptors were expressed (3). Among Notch ligands, DII1 had been shown to promote DC maturation *in vitro* (10) and DII1-positive cells were located in close contact with 33D1⁺ CD8[−] DCs in the spleen (3). Thus, it was suggested that DII1 might be responsible for the Notch signaling that promoted the survival and maintenance of CD8[−] DCs.

It has been shown that conditional inactivation of DII1 led to a selective loss of MZ B cells in the spleen (4). Similarly, studies using conditional gene inactivation have shown that the Notch2 signal in B cells is essential for the generation of MZ B cells at the branching point of MZ B and conventional follicular B cells in the spleen (6). In that case, *Msx-2*-interacting

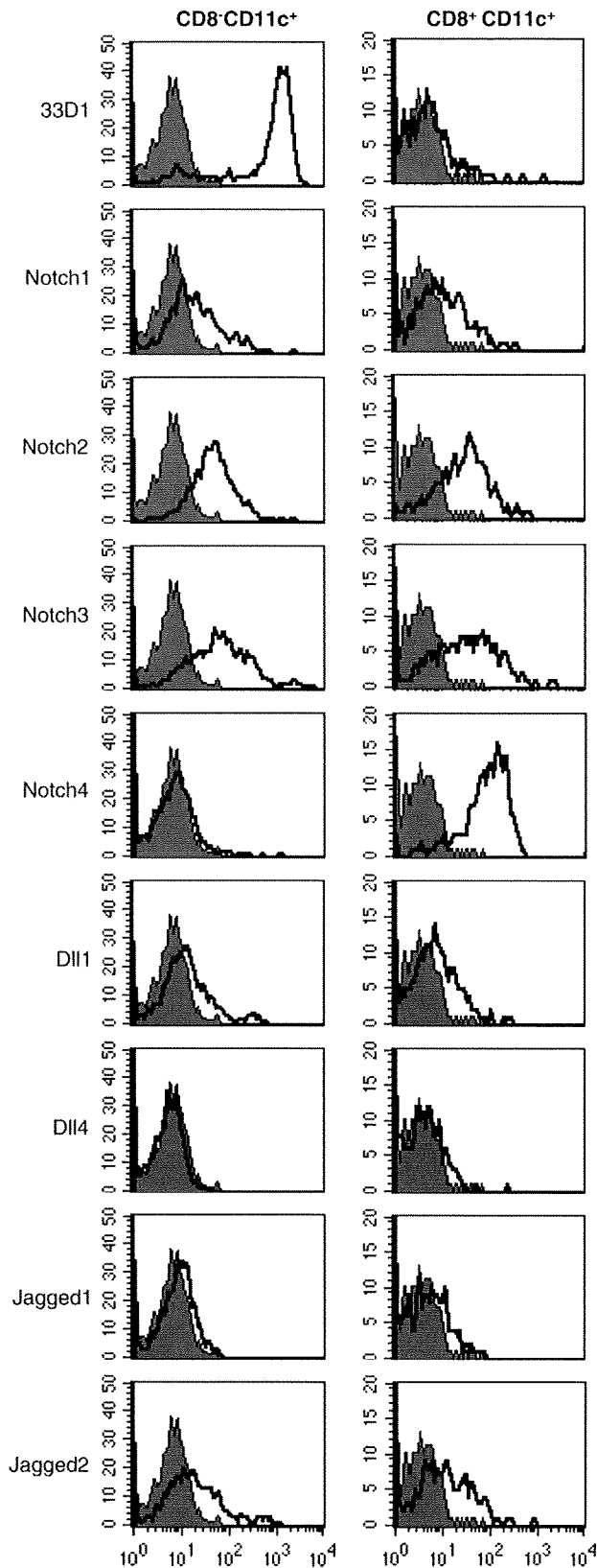


Fig. 1. Expression of Notch receptors and ligands on splenic DCs. Expression of Notch receptors and ligands on CD8⁻ and CD8⁺ subpopulations of CD11c⁺ splenic DCs were analyzed by flow cytometry. Filled histograms indicate the staining with control Hamster IgG.

nuclear target protein was shown to be a signal modifier in the cytoplasm (5). Based on these findings, it has been suggested that Notch2 and Dll1 interaction regulates the MZ B cell development in the spleen.

In this study, we have investigated the effect of Dll1 blocking on splenic CD8⁻ DC population to determine whether Dll1 is really involved in the maintenance of CD8⁻ DCs. We have found that Dll1 plays an important role to regulate CD8⁻ DCs but other Notch ligands also participate in it. On the other hand, Dll1 plays a non-redundant role for the development of MZ B cells. These results indicate a differential regulation of CD8⁻ DCs and MZ B cells by Notch ligands.

Materials and methods

Mice

C57BL/6 mice were purchased from Charles River (Tokyo, Japan). All procedures were in accordance with institutional regulations for animal experiments.

Antibodies

Generation and characterization of hamster IgG mAbs specific for mouse Notch1 (HMN1-12), Notch2 (HMN2-35), Notch3 (HMN3-133), Notch4 (HMN4-14), Jagged1 (HMJ1-29), Jagged2 (HMJ2-1), Dll1 (HMD1-5) and Dll4 (HMD4-2) have been described in our recent papers (11, 12). Briefly, flow cytometrical analysis showed that each mAb specifically reacts with CHO cells expressing respective Notch receptor or ligand but not with the other ones. Blocking activities of the anti-ligand mAbs have been verified *in vitro* or *in vivo*. Administration of these mAbs does not deplete the cells expressing respective ligand *in vivo*. FITC-labeled mAbs against mouse CD11c (HL3) and CD21 (7G6), PE-labeled mAb against mouse CD23 (B3B4) and PE-conjugated streptavidin were obtained from eBioscience (San Diego, CA, USA). Biotin-labeled mAb against mouse DC inhibitory receptor 2 (33D1), PerCP-labeled mAb against mouse B220 (RA3-6B2) and non-labeled mAb against mouse CD31 (MEC13.3) were obtained from BD Pharmingen (San Jose, CA, USA). Non-labeled mAb against mouse reticular fibroblasts [endoplasmic reticulum (ER)-TR7] was from BMA Biomedicals (Augst, Switzerland). FITC-labeled mAb against mouse F4/80 (Cl:A3-1) was from CALTAG (Carlsbad, CA, USA).

Treatment with mAbs

Mice at 6 weeks old were injected intra-peritoneally with 0.25 mg each of the indicated mAbs or control hamster IgG (eBioscience) twice a week for a week (on days 0 and 3). The spleen was removed for flow cytometric and immunohistological analyses on day 7. For the kinetics study, mice were similarly treated once and the spleen was analyzed on indicated days.

Open histograms indicate the staining with 33D1, HMN1-12 (Notch1), HMN2-35 (Notch2), HMN3-133 (Notch3), HMN4-14 (Notch4), HMD1-5 (Dll1), HMD4-2 (Dll4), HMJ1-29 (Jagged1) or HMJ2-1 (Jagged2).

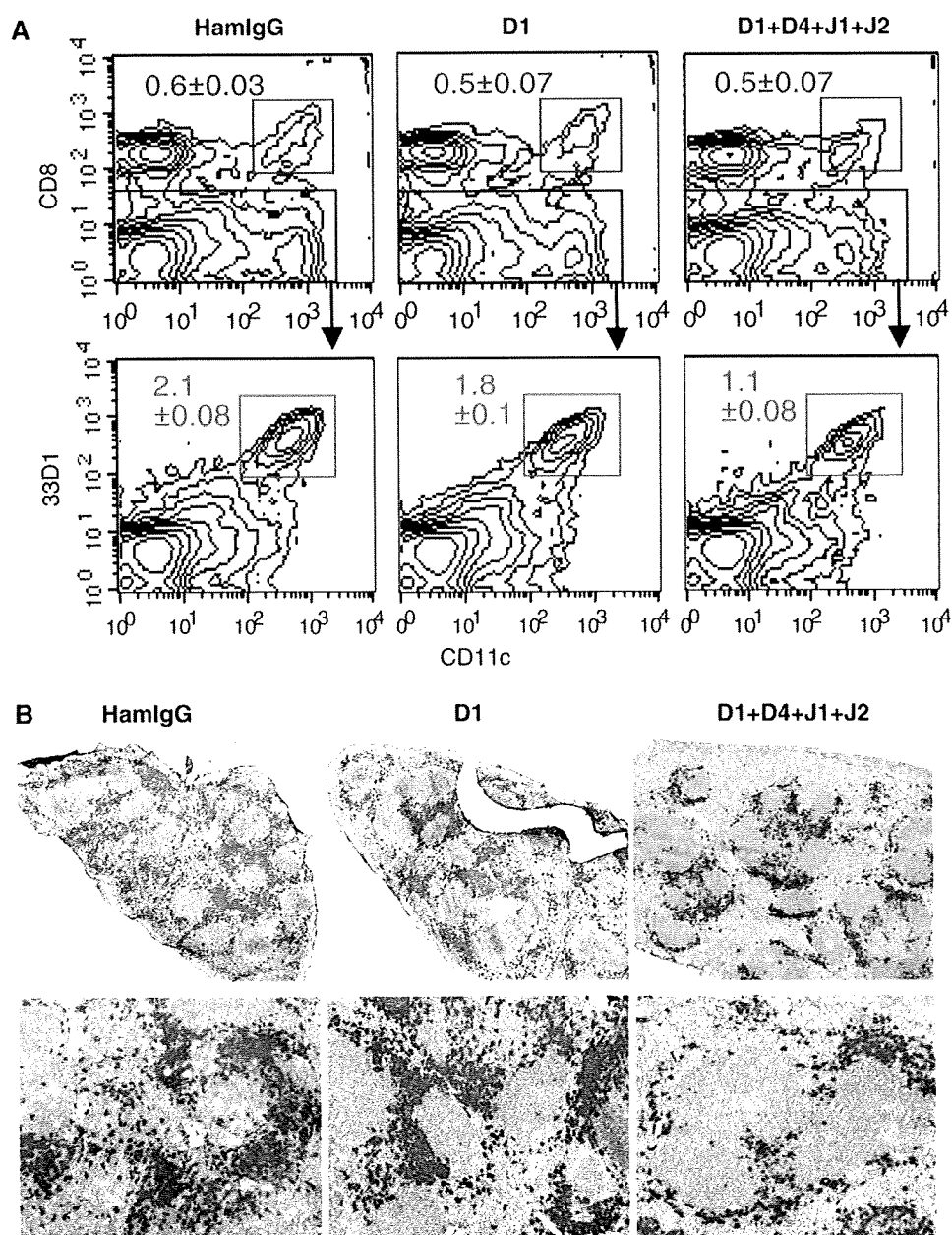


Fig. 2. Effect of anti-Dll1 mAb on the maintenance of CD8⁺ DCs. (A) Flow cytometric analysis of CD8⁺ and CD8⁻ DCs in the spleen of mice treated with control hamster IgG (HamIgG), HMD1-5 (D1) or a mixture of HMD1-5, HMD4-2, HMJ1-29 and HMJ2-1 (D1 + D4 + J1 + J2). CD8⁻ DCs were detected as CD8⁻ gated CD11c^{high}/33D1⁺ cells (lower panels). The percentages among whole splenocytes are indicated. Data are represented as the mean \pm SD of three mice in each group. (B) Immunohistological analysis of the spleen of mice treated as in (A). Frozen sections were stained with 33D1 mAb in brown. Representatives of three mice in each group. Original magnification: upper panels, $\times 40$; lower panels, $\times 100$.

Flow cytometry

Spleen was digested with collagenase (Wako, Tokyo, Japan) for 30 min at 37°C, filtered and subjected to red blood cell lysis. Multicolor staining was conducted using combinations of the indicated mAbs. Briefly, spleen cells were first incubated with FcBlock (BD PharMingen) and then with an optimized dilution of biotinylated mAbs. After washing, the cells were incubated with FITC-, PE-, PerCP-labeled mAbs or streptavidin. For apoptosis detection, cells were stained

with antibodies, FITC-labeled Annexin V (Biolegend, San Diego, CA, USA) and 7-amino-actinomycin D (BD PharMingen). The cells were analyzed on FACSscan or FACScaliber (BD Biosciences) and analyzed with CellQuest (BD Biosciences).

Stimulation of splenocytes

Collagenase-treated splenocytes were stimulated with 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ imiquimod (Alexis, San Diego, CA, USA), 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$