Title	形質細胞様樹状細胞移植による急性肝不全に対する新規治療法の開発
Sub Title	Therapeutic effect of plasmacytoid dendritic cells transplantation for acute liver failure
Author	中本, 伸宏(Nakamoto, Nobuhiro)
Publisher	
Publication year	2022
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	私たちはこれまでに有効な治療法が乏しい急性肝不全の病態を改善させる免疫学的機序として、形質細胞様樹状細胞pDCが、TH1細胞およびその産生する肝炎悪化因子IFN-γを抑制していることを報告した。本申請研究において、pDCを肝炎急性期の傷害肝により効率的にデリバリーさせる分子メカニズムを明らかにし、自己骨髄細胞を用いた将来的な臨床応用への橋渡しを行うことを目的とした。小腸ホーミングレセプターとして知られるCCR9を欠損させたpDCを用いると、pDCの肝臓への集積が促進され肝障害の軽減作用が増強されることが明らかとなり、より効率的なpDCを用いた急性肝障害の病態制御の可能性が示唆された。 Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) perform dual pro-inflammatory and immunosuppressive roles. We recently reported the potential of pDC therapy for treatment of intractable acute liver failure. However, establishment of efficient methods to deliver pDCs to the liver is essential for future clinical therapeutic applications. The present study demonstrates a higher abundance of liver and peripheral blood pDCs in mice lacking the C-C motif chemokine receptor 9 (CCR9), a pDC gut-homing receptor, than that in WT mice. Adoptive pDC transfer resulted in a higher efficiency of Ccr9-/- pDC migration to the liver than that to the original target organ, the small intestine as compared to WT pDCs. Further, Ccr9-/- pDCs consistently migrated efficiently to the concanavalin A induced inflamed liver, and exerted a more effective immunosuppressive effect, resulting in better protection against acute liver inflammation than that demonstrated by WT pDCs.
Notes	研究種目 : 挑戦的研究 (萌芽) 研究期間 : 2020～2021 課題番号 : 20K21607 研究分野 : 肝臓免疫
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20K21607seika

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ８ 月 ３１ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2020～2021
課題番号：２０Ｋ２１６０７

研究課題名（和文）形質細胞様樹状細胞移植による急性肝不全に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）Therapeutic effect of plasmacytoid dendritic cells transplantation for acute liver failure

研究代表者
中本　伸宏（Nakamoto, Nobuhiro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授

研究者番号：４０３８３７４９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　5,000,000円

研究成果の概要（和文）：私たちはこれまでに有効な治療法が乏しい急性肝不全の病態を改善させる免疫学的機序として、形質細胞様樹状細胞pDCが、TH1細胞およびその産生する肝炎悪化因子IFN-γを抑制していることを報告した。本申請研究において、pDCを肝炎急性期の傷害肝により効率的にデリバリーさせる分子メカニズムを明らかにし、自己骨髄細胞を用いた将来的な臨床応用への橋渡しを行うことを目的とした。小腸ホーミングレセプターとして知られるCCR9を欠損させたpDCを用いると、pDCの肝臓への集積が促進され肝障害の軽減作用が増強されることが明らかとなり、より効率的なpDCを用いた急性肝障害の病態制御の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
急性肝不全は非常に致死率が高く、欧米では第一選択の治療法として肝移植が選択されるが、本邦では圧倒的なドナー不足の問題を抱えており、内科的治療の進歩が喫緊の課題である。本研究は従来肝臓の自己再生、肝臓移植までのブリッジング治療として行われてきた人工肝臓補助、副腎皮質ストロイドを用いた急性肝不全に対する内科治療の治療体系を変革する可能性がある挑戦的研究である。実臨床における実現性の点においては今後解明すべき課題があるが、ヒト臨床サンプル、モデルマウスの検討に基づく研究成果であり今後のさらなる前進が期待され、本研究成果が社会に与える影響力も大きい。

研究成果の概要（英文）：Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) perform dual pro-inflammatory and immunosuppressive roles. We recently reported the potential of pDC therapy for treatment of intractable acute liver failure. However, establishment of efficient methods to deliver pDCs to the liver is essential for future clinical therapeutic applications. The present study demonstrates a higher abundance of liver and peripheral blood pDCs in mice lacking the C-C motif chemokine receptor 9 (CCR9), a pDC gut-homing receptor, than that in WT mice. Adoptive pDC transfer resulted in a higher efficiency of Ccr9-/- pDC migration to the liver than that to the original target organ, the small intestine as compared to WT pDCs. Further, Ccr9-/- pDCs consistently migrated efficiently to the concanavalin A induced inflamed liver, and exerted a more effective immunosuppressive effect, resulting in better protection against acute liver inflammation than that demonstrated by WT pDCs.

研究分野：肝臓免疫

キーワード：急性肝不全　樹状細胞

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

現在急性肝不全に対する内科的治療はいずれも自己肝の再生を待つ対症療法と言っても過言ではなく、その間に十分な再生が認められない場合には肝移植以外の手段で救命することは極めて難しい。副腎皮質ステロイドの投与は、過度の免疫応答を抑制する一定の効果がある一方で易感染の副作用など肝移植のブリッジングとしては必ずしも適切でないケースも多く、本疾患の治療標的となる原因物質、または原因細胞の同定が急務である。これまでに病態を進展させる免疫細胞として Th1 細胞、Th17 細胞、炎症性マクロファージ、逆に病態の回復を担う免疫細胞として制御性 T 細胞 (Treg)や、低用量 IL-2 など Treg を誘導する因子を用いた治療応用の可能性が報告されている。特に Treg は有望な候補細胞として臨床応用が試みられてきたが、有効な細胞数の確保、および肝臓への効率的なデリバリーが大きな課題とされてきた。この点において、我々はこれまでの検討で急性肝炎を発症したマウスに、同数の pDC と Treg を治療目的で移入した場合、pDC は Treg と比べ 3 倍以上の効率で傷害肝に定着し、肝障害を有意に抑制することを確認している。また、pDC を用いた細胞療法は Treg や他の免疫細胞とは異なり、肝炎発症後の治療的補充でもモデルマウスの肝障害、および救命率の改善効果を認め、今後の臨床応用の観点から非常に有望な治療選択の一つであると考えている。臨床応用に向けてより効率的なデリバリーを達成するために、pDC が肝臓に臓器特異的に遊走する根幹的機序の解明とその成果に基づいた手法の修正が求められる。

２．研究の目的

急性肝不全は非常に致死率が高く、欧米では第一選択の治療法として肝移植が選択されるが、本邦では圧倒的なドナー不足の問題を抱えており、内科的治療の進歩が喫緊の課題である。抗ウイルス治療や人工肝補助の目覚ましい進歩が認められる一方急性肝不全の救命率の向上には至っておらず、本疾患への根本的な対策、支援が不可欠である。急性肝不全はその原因に関わらず過度の免疫応答による肝細胞の破壊が病態の主座と考えられ、急性期の炎症を制御することが重要である。過度の炎症の制御を目的として副腎皮質ステロイドが広く用いられ一定の効果が報告されている一方、生命予後への寄与に関するエビデンスは乏しく、副作用の点からも病態の中枢を担う真の免疫細胞、および液性因子の同定が望まれる。申請者のグループは本疾患の病態に寄与する免疫細胞を同定するために、急性肝不全肝不全患者の肝臓および血液中の免疫細胞の種類を解析し、樹状細胞の一種である形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell; pDC)が顕著に減少していることを発見した。さらに、遺伝子改変技術により pDC を欠損させたマウスに急性肝炎を発症させると病態が悪化すること、また急性肝炎を発症させたマウスに骨髄細胞から大量培養した形質細胞様樹状細胞を移植すると病態が改善することから、pDC が急性肝炎に対して保護的に機能することを明らかにした。急性肝不全の病態を改善させる免疫学的機序として、pDC が、制御性 T 細胞により産生される抑制性サイトカイン IL-35 を増加させることで、TH1 細胞およびその産生する肝炎悪化因子 IFN-γ を抑制していることを明らかにした（Koda Y, Nakamoto N et.al. ***Journal of Clinical Investigation*** 2019。今後、本細胞を急性肝不全に対する細胞治療のソースとして臨床応用するには解決すべき問題が残されており、本申請研究において、pDC を肝炎急性期の傷害肝により効率的にデリバリーさせる分子メカニズムを明らかにし、自己骨髄細胞を用いた将来的な臨床応用への橋渡しを行うことを目的とする。

３．研究の方法

定常状態では pDC は骨髄、小腸、肝臓に最も多く存在する。骨髄で作られた pDC は、ケモカイン CCL25 とその受容体 CCR9 axis を介して小腸へ遊走されることが知られているが、肝臓への遊走のメカニズムについては不明な点が多い。このことを裏付けるように、CCR9 欠損マウス由来骨髄から分離した pDC を急性肝障害マウスに移入すると小腸への遊走が抑制される一方、反応性に肝臓にさらに多くの細胞が集積する。pDC が肝臓に遊走するメカニズムの解明は、現在肝疾患に対する細胞療法を用いた臨床応用の大きな技術面の障壁となっている<u>移入免疫細胞の傷害肝臓への遊走能の欠如</u>の解決に寄与することが期待される。本研究において、正常マウス骨髄、小腸、肝臓、末梢血より Siglec-H^+CD11c^+ pDC をフローサイトメトリーで分離し、RNA seq 解析により、各細胞の遺伝子発現の違いを網羅的に検討する。肝臓に特異的に発現する分子が同定できた場合には、これまでの検討と同様に骨髄細胞から分離した pDC に候補遺伝子の導入を行い、同細胞の移植による傷害肝への遊走能、急性肝障害に対する治療効果を検証する。

４．研究成果

1.　定常状態、および肝炎状態における各臓器における pDC の distribution

これまでの報告で小腸への pDC のホーミングに CCR9 受容体が重要な役割を果たすことが知られているが､肝臓を含めた他の臓器における pDC の集積機序は明らかになっていない｡そこで、定常状態における野生型および CCR9 欠損マウスにおける骨髄、小腸、末梢血、肝臓各臓器の $CD45^+CD11b^-B220^+PDCA\text{-}1^+$ pDC 数をフローサイトメトリーで検討した。これまでの報告どおり CCR9 欠損マウスの小腸において pDC 数は有意に低下する一方、末梢血、および肝臓では CCR9 欠損によりその数が有意に増加していることが明らかになった（図 1）。次に Concanavalin A の経静脈的投与により急性肝障害を惹起した肝炎モデルマウスにおける検討を行ったところ、定常状態と同様に CCR9 欠損により免疫抑制性作用を有する pDC が肝臓に多く集積し、その結果野生型マウスと比較して肝障害が有意に軽減することが確認された。

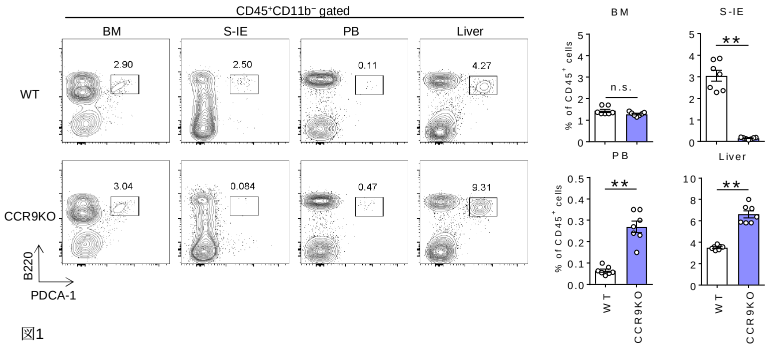

図1

2. 肝臓 pDC の遺伝子プロファイル

pDC の臓器特異的遺伝子発現プロファイル、および肝臓 pDC の表現型に対する CCR9 欠損の影響を明らかにするために、野生型マウスの骨錐および小腸由来 pDC、および野生型、CCR9 欠損マウスの肝臓由来肝 pDC を用いて RNA-seq 分析によりその遺伝子発現プロファイルを検討した。各組織間で遺伝子発現プロファイルは明確に異なっており（図 2）、特に、Tnf、Ccl3、Ccl4 などの炎症性遺伝子の発現は小腸由来 pDC で有意にその発現が上昇していた。一方、CCR9 の欠損により肝臓 pDC の遺伝子発現プロファイルに有意な変化は観察されなかった。上記の結果から、CCR9 が pDC ダイナミクスを調節する一方で､その欠損はその性質に影響を与えないことが示唆された。

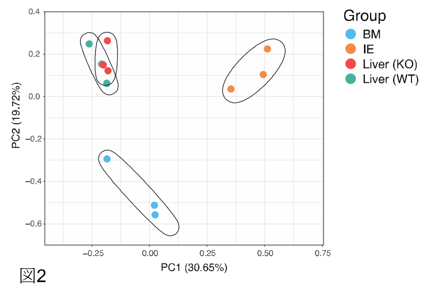

図2

3. CCR9 欠損は pDC の抑制性機能に影響を与えない

次に、WT および Ccr9-欠損マウス骨髄由来 pDC の免疫抑制に関与する遺伝子の発現を比較し、pDC の免疫抑制効果が CCR9 の発現に依存しているか否かを評価した。両細胞において、代表的な pDC 関連遺伝子の発現に有意な差は認められず､RNA-seq の結果と一致していた｡さらに、CCR9 陽性または CCR9 欠損骨髄由来 pDC を CD3/CD28 刺激 CD4+CD25-エフェクターT（Teff）細胞と 4 日間共培養することにより、pDC の T 細胞増殖および IFN-γ 産生抑制す能力を比較検討した。その結果、CCR9 の発現に関係なく、pDC が Teff 細胞の増殖と IFN-γ の産生を抑制することが明らかになった。以上の結果から、pDC における CCR9 発現は、免疫抑制機能に影響を及ぼさないことが示唆された。

4. CCR9 欠損 pDC は効率的に肝臓に集積し、急性肝障害の軽減に寄与する

CCR9 発現が pDC の肝臓への集積に与える直接的な影響を明らかにするために、ジフテリア毒素（DT）を（Siglech）dtr / dtr マウスに投与し内因性 pDC を枯渇させた後、野生型マウス（Ly5.1）および Ccr9 欠損マウス(Ly5.2）から分離した同数の骨髄由来 pDC を混合し、pDC 除去マウスに静脈内移植した。小腸に移動した pDC の大部分は、WT マウスに由来する CCR9+pDC である一方、CCR9 欠損 pDC は、野生型 pDC よりも効率的に肝臓に集積することが明らかになった（図 3）。これらの結果から、CCR9 / CCL25 軸の操作により pDC の肝臓への効率的な肝臓への集積を行える可能性が示唆された。実際、急性肝障害モデルマウスに同数の野生型､および CCR9 欠損マウス骨髄由来 pDC をそれぞれ投与した結果、CCR9 欠損 pDC がより多く肝臓に集積し､その結果肝障害が有意に軽減することが確認された。

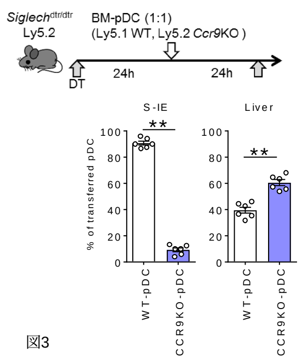

図3

今後骨髄由来 pDC **を** in vitro **で大量に増殖させる方法を確立し、本研究成果を応用し現在有効な治療法が乏しい急性肝不全に対する新規治療法の開発を目指す予定である。**

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 Koda Y, Nakamoto N, Kanai T.
２．発表標題 Plasmacytoid dendrtic cells protect against acute liver injury via IL-35.
３．学会等名 ILC 2020（国際学会）
４．発表年 2020年

１．発表者名 幸田裕造、中本伸宏、金井隆典
２．発表標題 形質細胞様樹状細胞を用いた急性発症型自己免疫性肝炎の病態制御
３．学会等名 第107回消化器病学会総会
４．発表年 2021年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関