

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02555

研究課題名(和文)多機能抑制性B細胞による臓器移植の新規脱感作・免疫寛容誘導法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel desensitization/immune-regulatory method by use of multi-potent suppressor B cells to induce immune-tolerance in allogeneic organ transplantation

研究代表者

大段 秀樹(OHDAN, Hideki)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・教授

研究者番号：10363061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,000,000円

研究成果の概要(和文)：臓器移植において、ドナーリンパ球輸注(DLI)によりアロ応答性T細胞の低応答や免疫学的寛容の誘導が報告されてきたが、DLIに効果的な細胞集団の特定には至っていない。本研究では、アロ応答性T細胞に対する抗原提示能を有し、免疫寛容を誘導し得るMHC class II+CD80+CD86+PD-L1+PD-L2+ B細胞サブクラスがマウス腹腔内B細胞、特にB-1a細胞に多く存在することを確認した。このB細胞サブクラスは、抗体産生抑制能、T細胞アロ応答抑制能を有し、DLIとして投与する同系ドナーからの移植心移植の生着を有意に延長し、DLIに最適な細胞集団である可能性がある成果を得た。

研究成果の概要(英文)：B cells constitute a complex system of antigen-presenting cells (APCs) and exist as distinct subsets that differ in their lineage affiliation, surface molecule expression, and biological function, potentially regulating the immune response. In this study, we investigated the immune-regulatory roles of murine B cell subsets as regulatory APCs targeting alloreactive T cells. Anti-Balb/c T cell responses and serum levels of anti-Balb/c antibodies in the recipients of peritoneal cavity (PerC) B cells containing MHC class II+ CD80+ CD86+ PD-L1+ PD-L2+ cells were significantly lower than those in the recipients of splenic B cells. Pre-incubated with anti-PD-L1/PD-L2 mAbs prior to injection abrogated their immune-regulatory effects on anti-Balb/c T cells. The inoculation with Balb/c PerC B cells significantly prolonged the survival of subsequently grafted Balb/c hearts in B6 mouse recipients. Thus, the PerC PD-L1/PD-L2 B-1a cells suppress T cells responding to allostimulation.

研究分野：消化器外科、移植外科、移植免疫

キーワード：臓器移植 免疫寛容 脱感作 B細胞

1. 研究開始当初の背景

臓器移植は、末期臓器不全に対する根治治療として定着した。しかし、既存抗ドナー抗体(DSA)陽性の高感作症例は、抗体関連拒絶反応が必発であるため禁忌とされており、抗体関連拒絶反応の克服は臓器移植における'unmet medical needs'である。さらに、臓器移植後の慢性かつ非特異的な免疫抑制による重症感染症、悪性腫瘍の発生は、未だ深刻な課題である。そこで、免疫寛容の誘導法が求められている。臨床において、ドナーリンパ球輸注(DLI)によりアロ応答性T細胞の低応答や免疫学的寛容の誘導が報告されてきたが、DLIに効果的な細胞集団の特定には至っていない。

2. 研究の目的

本研究は、複数の制御機能を併せ持つ多機能免疫抑制性B細胞(multi-potent suppressor B cells: m-sup B細胞)の特定と、細胞移入によるアロ応答性T/B細胞の選択的抑制法を開発し、臓器移植における unmet medical needs である脱感作療法および免疫寛容誘導法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

①多機能免疫抑制性B細胞(multi-potent suppressor B cells: m-sup B細胞)の検索

C57/BL6マウスおよびBalb/cマウスを用いて、アロ応答性T細胞に対し抗原提示細胞とともに免疫寛容を誘導し得るB細胞集団についてマウスを用いて評価した。腹腔内、脾臓、肝臓、骨髄、リンパ節、末梢血における単核球フェノタイプをフローサイトメトリーで解析し、各臓器特有のB細胞サブセットについて評価した。抑制性分子は、Fas-Ligand(FasL), TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL), Programmed death ligand (PDL)-1 および 2 について評価した。

②多機能免疫抑制性B細胞(multi-potent suppressor B cells: m-sup B細胞)の特定による抗ドナー抗体産生抑制能および抗ドナーT細胞応答評価の解析

異系(allogeneic)マウスの組み合わせでm-sup B細胞を移入し、その後抗原特異的なアロT細胞応答の抑制能をリンパ球混合試験で、アロ抗体産生能をフローサイトメトリーで評価した。

③マウス移植モデルを用いた抑制性分子発現B細胞の生着延長評価実験

実際の臓器移植において、m-sup B細胞をDLIとして用いることで生着期間の延長が得られるかを異系(allogeneic)マウスの組み合わせによる異所性心臓移植モデルで検証した。

4. 研究成果

①多機能免疫抑制性B細胞の検索

B細胞の抑制性分子及び抗原提示能について、臓器別に、解剖学的スクリーニングを行った結果、腹腔内B細胞にPD-L1⁺PD-L2⁺CD80⁺CD86⁺MHCクラスII⁺のフェノタイプを示す細胞集団が存在する事を確認した(図1)。このB細胞は抗原提示能を有し、かつPD-L1/PD-L2を共発現しており、DLIに有効なpotentialを有している可能性が示唆された。さらにB細胞サブクラスで評価すると、B1aサブクラスに最も多く存在することが分かった(図2)。今回の検討では、FasLやTRAIL分子の発現の違いは認めなかった。

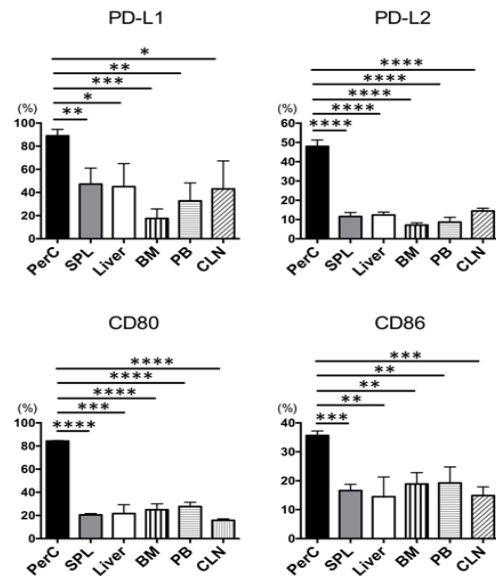


図1. 臓器別B細胞の抑制性分子および副刺激分子の発現様式(n=3) (*: P < 0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.001, ****: P < 0.0001)

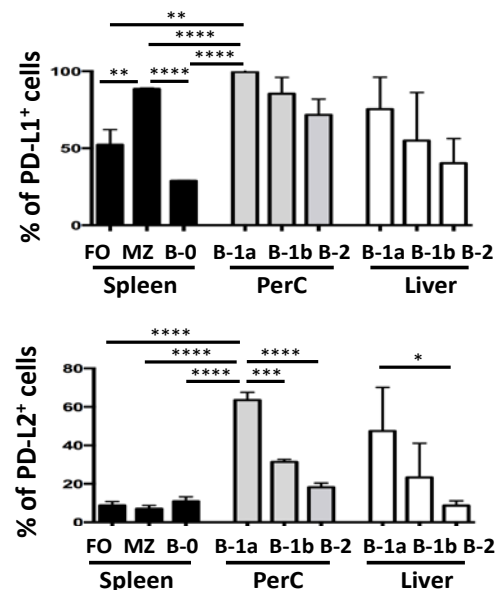


図2. B細胞サブクラス別でのPDL-1/PDL-2発現様式(n=3) (*: P < 0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.001, ****: P < 0.0001)

②多機能免疫抑制性 B 細胞(multi-potent suppressor B cells: m-sup B 細胞)の特定による抗ドナー抗体産生抑制能および抗ドナー T 細胞応答評価の解析

m-sup B 細胞の T 細胞に対するアロ応答抑制能を評価するため、Balb/c マウスの脾臓 B 細胞、腹腔内 B 細胞及び非 B 細胞を各々 B57CL/6 (B6) マウスに投与し、抗 Balb/c 抗体 (IgG) を測定すると、腹腔内 B 細胞投与群は他の 2 群に比べて有意に低下していた (図 3)。また、同様に細胞投与 2 週後に B6 マウス脾細胞を responder、Balb/c マウス脾細胞を stimulator としてリンパ球混合試験 (MLR) を行った。腹腔内 B 細胞投与群では、CD4⁺T 細胞及び CD8⁺T 細胞の stimulation index (SI) が他の 2 群に比べて有意に低下しており、腹腔内 B 細胞による T 細胞のアロ応答抑制効果が示唆された (図 4)。また、これらの抑制効果は抗 PDL-1 および抗 PDL-2 抗体添加により解除された。

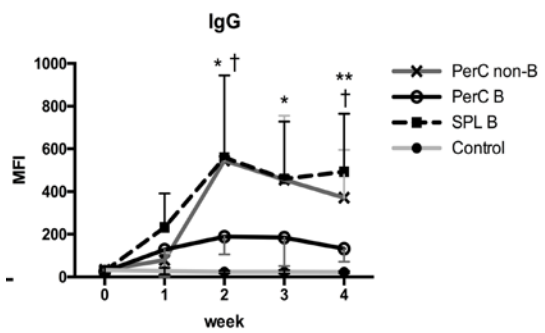


図 3. PD-L1/PD-L2 陽性腹腔内 B 細胞は抗 Balb/c-IgG 抗体産生能を有意に低下させた (n=6) (*p < 0.05, and **p < 0.01 (mice receiving PerC B cells vs mice receiving SPL B cells); †p < 0.05, ††, and p < 0.01, and ††† p < 0.001 (mice receiving PerC B cells vs mice receiving PerC non-B cells))

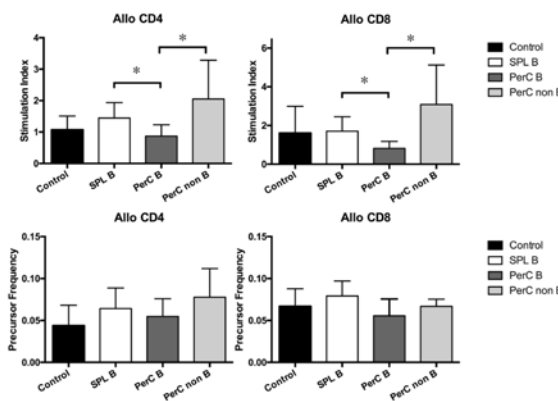


図 4. T 細胞のドナー応答が腹腔内 B 細胞 DLI により低下した (n=6) (*p < 0.05)

③マウス移植モデルを用いた抑制性分子発現 B 細胞の生着延長評価実験

Balb マウスをドナーとして、脾臓 B 細胞、腹腔内 B 細胞を抽出し、DLI としてレシピエントの B6 マウスに経静脈的に移入し、2 週間後にドナータイプの心臓を移植し、生着を評価した。その結果、DLI を行っていないコントロール群、脾臓 B 細胞投与群は約 1 週間程度で graft loss が生じた一方で、腹腔内 B 細胞投与では有意な生着期間の延長を認めた (図 5)。

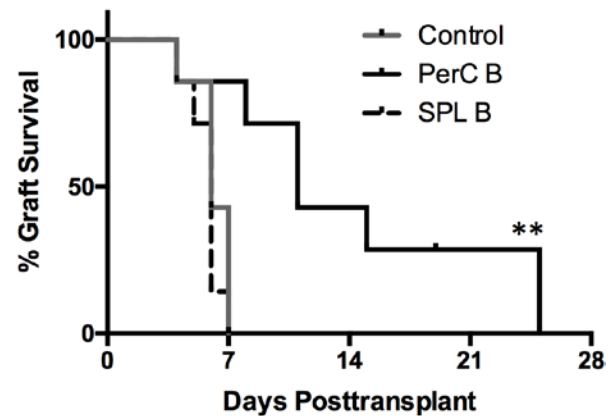


図 5. B 細胞移入による異系異所性心移植の生着期間の評価 (n=7)

以上の研究成果は、特異的 B 細胞移入による免疫寛容誘導法の臨床応用へとつなが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 4 件)

- Igarashi Y, Onoe T, Ohdan H. The role of liver sinusoidal endothelial cells in induction of carbohydrate reactive B cells tolerance through the programmed death/programed death ligand 1 pathway. Transplantation. 査読有. 99(11):2325-2336, 2015.
- Yamashita M, Tanaka Y, Tazawa H, Sakai H, Ohdan H. Different sensitivities calcineurin inhibitors between B cells responding to blood group A and B antigens. ISBT Science Series. 査読有. 11(S1):307-316, 2016.
- Morimoto H, Ide K, Tanaka Y, Ishiyama K, Ohira M, Tahara H, Akita T, Tanaka J, Ohdan H. Different sensitivity of rituximab-treatment to B-cells between ABO-incompatible kidney and liver transplantation. Human Immunology. 査読有. 77:456-463, 2016.
- Hirose T, Tanaka Y, Tanaka A, Sakai H, Sasaki Y, Shinohara N, Ohdan H.

PD-L1/PD-L2-expressing B-1 cells inhibit alloreactive T cells in mice. PLoS One. 査読有. 12(6):1-16. 2017.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Hirose T, Tanaka Y, Sakai H, Sasaki Y, Ohdan H. Identification of mouse tolerogenic B cells expressing PD-L1/PD-L2 in B-1a subset. American Transplant Congress 2015. 2015.
2. Ohdan H. New approach for ABO-mismatched solid organ transplantation. ISBT 2015. 2015.
3. Sakai H, Tanaka Y, Ohdan H. Bacterial pathogens provoke B cells responding to blood group A-antigens to be resistant to calcineurin inhibitors through TLR-MyD88 pathway. 14th Transplantation Science Symposium. 2015.
4. Hirose T, Tanaka Y, Sakai H, Sasaki Y, Ohdan H. Identification of a novel tolerogenic B cell subclass co-expressing PD-1/PD-L2 to inhibit allo-reactive T cells. 14th Transplantation Science Symposium. 2015.
5. 坂井寛, 田中友加, 清水誠一, 井手健太郎, 広瀬貴行, 田中飛鳥, 矢野琢也, 佐伯吉弘, 谷峰直樹, 大平真裕, 田原裕之, 石山宏平, 尾上隆司, 田代裕尊, 大段秀樹. Fc γ R の遺伝子多型が及ぼすリツキシマブ B 細胞抑制効果への影響. 第 5 1 回日本移植学会総会. 2015.
6. 大段秀樹. HLA 抗体サブクラスと拒絶反応. 第 4 9 回日本臨床腎移植学会. 2016.
7. Ohdan H. Distinct sensitivity of B-1a/B-1b/B-2 cell subpopulations to immunosuppressants. Transplantation Science Symposium Asian Regional Meeting 2016. 2016.
8. Hirose T, Tanaka Y, Sakai H, Tanaka A, Sasaki Y, Ohdan H. American Transplant Congress 2016. 2016.
9. Ohdan H. Players of clinical tolerance: Tregs, Bregs, Macrophages, and others. Asian Transplant Week 2016. 2016.
10. Sakai H, Tanaka Y, Ohdan H. A novel role for MyD88 signaling downstream from toll-like receptors in B cells responding to blood group antigens. American Transplant Congress 2017. 2017.
11. 広瀬貴行, 田中友加, 田中飛鳥, 坂井寛, 篠原信雄, 大段秀樹. PD-L1/PD-L2 を発現した B 細胞による免疫学的寛容誘導. 第 5 3 回日本移植学会総会. 2017.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大段 秀樹 (OHDAN, Hideki)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・教授
研究者番号 : 1 0 3 6 3 0 6 1

(2) 研究分担者

田中 友加 (TANAKA, Yuka)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・准教授
研究者番号 : 9 0 4 3 2 6 6 6

小林 孝彰 (KOBAYASHI, Takaaki)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 7 0 3 1 4 0 1 0

尾上 隆司 (ONOE Takashi)
独立行政法人国立病院機構 (呉医療センター臨床研究部)・免疫応用科学研究室・室長
研究者番号 : 9 0 5 4 9 8 0 9

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()