

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08474

研究課題名(和文) 白脾髄樹状細胞によるアロT細胞の貪食とアロ抗体産生誘導機構

研究課題名(英文) Allogeneic T-cells are phagocytosed by XCR1+DCs and induce donor antibody production.

研究代表者

北沢 祐介 (Kitazawa, Yusuke)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：00467581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ドナー特異的輸血(DST)は免疫寛容誘導法の1つであるがメカニズムは不明である。研究代表者は1回のDSTが効率的にドナークラスI MHC(MHCI)抗体産生細胞およびドナー特異的制御性T細胞を誘導することを示した。本研究ではこれら抗体の性質と効率的なアロ抗体産生応答の誘導について検討した。その結果、輸血液中のT細胞が脾臓にて最も効率的にアロ応答を誘導すること、アロ応答の抗原認識にXCR1+樹状細胞が関与していることを示した。さらにハプテンを結合させたドナーT細胞では抗ハプテン抗体産生の誘導に成功した。よってドナーT細胞が予防的抗体産生のためのワクチンベクターとして適用できる可能性を導いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者は、輸血液中のドナーT細胞がドナー特異的輸血(DST)のアロ抗体産生応答(AFC応答)を最も効率的に誘導することを突き止め、その誘導メカニズムを明らかにした。さらにハプテン抗原を結合させたドナーT細胞の移入実験によって、脾臓で抗ハプテンAFC応答が起こることを証明した。これによりウイルスや腫瘍のペプチドをT細胞に結合させて、効率よく抗ペプチド抗体を作らせるという全く新しいワクチン構想の提案に繋がるという意義がある。

研究成果の概要(英文)：Donor-specific blood transfusion (DST) is one of the tolerance-inducing protocols used in not only experimental but also clinical transplantation, but detailed mechanism is unknown. The first, we demonstrated that a single DST efficiently induces a anti-donor class I MHC (MHCI) antibody-forming cell and donor-specific regulatory T cell responses, mainly in the spleen. Therefore, in this study, we examined primarily focused on a nature of these antibodies and a mechanism for this efficient alloresponse in rats. The result, we found the T-cells in the blood transfusion can alloresponse most efficiently in the spleen PALS. In spleen, after killed donor T-cell by NK cells, XCR1+ resident dendritic cells phagocytosed donor MHCI + fragments, induced AFC-response. In addition, Hapten-antigen labeled donor T-cell induced AFC-response and produced anti-FITC antibody. The conclusion, Allogeneic T-cells may be clinically applicable as vaccine vectors for prophylactic antibody production even.

研究分野：移植免疫学

キーワード：アロT細胞 ワクチンベクター アロ抗体産細胞応答 脾臓 XCR1陽性DC DST ハプテン抗原 FITC抗原

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ドナー特異的輸血 (DST) とは、臓器移植前にドナー (提供者) の血液をレシピエント (患者) に投与し、免疫寛容を誘導する治療法である (Clin Transplant, 2011)。1970年代から腎移植前にDSTを行うと、ドナーの移植臓器に対する免疫応答 (拒絶反応) が抑制されること、ドナー組織適合抗原 (MHC 抗原) に対する抗体が一回の輸血だけでも簡単に作られることがわかり、それらに伴う副作用があることも臨床現場から報告された。その後、拒絶反応を容易に抑制できる免疫抑制剤の登場によりDSTは行われなくなっている。そのため、アロ抗体産生応答 (AFC 応答) がドナー血液成分中の何の成分により、どこで、どのようにおこるのか、作られた抗ドナー抗体が免疫抑制を含めどのような作用を持つかについては未だに解明されていない。

研究代表者はこれまで生体内 (in vivo) での免疫学の観点から、ラットを用いた移植免疫応答における免疫担当細胞の動態と機能を臓器レベルで免疫組織学的に解析してきた (Cell Transplant, 2012. Cell Transplant, 2010. ArchHistol Cytol, 2010. Hepatology, 2012)。近年では、本研究の中心となるアロ免疫応答 (アロ応答) のメカニズムの解明のために、近親交配系でのGvHD (移植片対移植病) ラットモデルを用い、チミジンアナログであるEdU (Ethynyl deoxyuridine) を用いた多重蛍光免疫染色法による免疫組織学とフローサイトメトリー (FCM) を並行しておこなう定性定量解析法を確立した (Histochem Cell Biol, 2015)。この手法によりアロ応答の過程であるドナー抗原の貪食 (ファゴトシス)、MHC抗原情報の提示、細胞間相互作用による伝達、アロ免疫性増殖応答がどこで、どの程度おこるかの定性定量解析が可能となり、アロ応答のメカニズムが解析できるようになった。

そこで、本研究の予備実験としてDST後にレシピエントのアロ応答を解析したところ、主に脾臓でアロAFC 応答が起こること、抗体はドナー I 型MHC 抗原 (MHC I) に対するものであることがわかった。さらに、このアロ応答の誘導にはドナー血液成分中の白血球、特にT細胞分画が有効で、赤血球などのそれ以外の成分は無効であることも明らかになった。

アロ応答にはMHC抗原の提示に至る過程が2経路ある。一つはドナー抗原提示樹状細胞 (DC) がレシピエントT細胞と会合しドナーMHC 抗原を直接的に伝達する直接感作と、ドナー細胞由来のMHC 抗原が一端レシピエントDCに貪食され、レシピエントDCがレシピエントT細胞と会合しドナーMHC 抗原を間接的に伝達する間接感作がある (Immunity, 2001)。アロAFC 応答については、アロ応答によって分化したCD4陽性T細胞 (ヘルパーT細胞) の1つであるTh2細胞や濾胞T細胞 (Tfh) により誘導され、それらT細胞の特長としてIL-4, IL-10などのサイトカインや転写因子であるGATA-3 遺伝子が発現することがわかっている (Immunity, 2009)。ゆえにDSTでは、血液中にDCが殆ど存在しないので、DSTしたレシピエントでのアロ応答には、主に脾臓において間接感作が起こり、T細胞応答が関与していることが予測される。ここで、脾臓でのアロ応答は白脾髄内の動脈周囲リンパ球鞘 (PALS / T細胞領域) で起こり、そこにDCが局在している事、T・B細胞は免疫監視のために多くが全身を再循環しており、常に血液からPALS内に遊走してPALSにしばらく留まる事、T細胞はさらにPALSのDCと会合し抗原情報を確認する事がわかっている (Arch Histol Cytol, 2010)。

これらのことから、研究代表者はドナーT細胞が輸血後に脾臓PALSに遊走し、レシピエントDCと会合した後にはドナーMHC I 抗原を何らかの形で受け渡し、そこで最も効率よく間接感作を起こす、その結果、Th2やTfhが誘導され、効率的にドナーMHC I 抗原特異的な抗体が産生 (アロAFC 応答) されるという仮説を着想した。

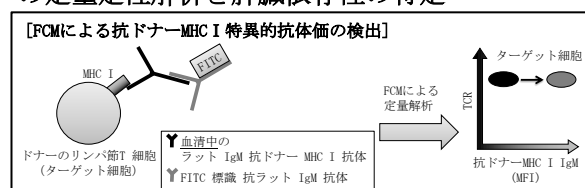
2. 研究の目的

ドナー特異的輸血 (DST) は、臓器移植の免疫寛容を誘導する拒絶反応抑制法の一つである。そのメカニズムは未だ不明な点が多いが、ドナー血液成分がレシピエントの同種間移植免疫応答 (アロ応答) を引き起こし、一回の輸血だけでドナー特異的抗体が効率良く作られる事はわかっている。研究代表者は予備実験で、ドナー血液成分中のT細胞が主にこの効果を持つことを発見した。本研究の目的は、ドナーT細胞によるアロ応答とアロAFC 応答について、組織レベルの多重免疫染色法を駆使した形態学的解析を中心に行い、その誘導メカニズムと特性を解明すること、そして、これを応用した新たなワクチン戦略を考案し、効率的に抗原を誘導し、かつ抗原特異的AFC 応答を誘導する方法を目指すことである。

3. 研究の方法

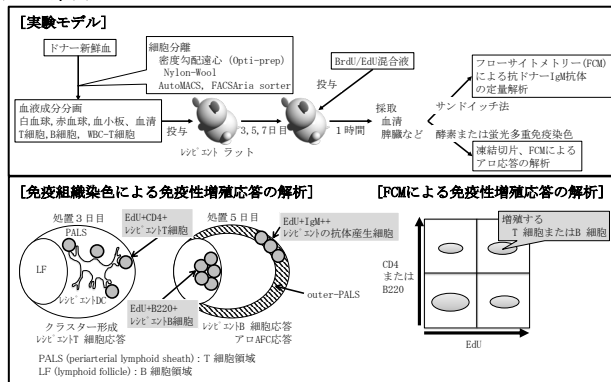
(1) ドナーMHC I 特異的抗体 (抗ドナー抗体) の定量定性解析と脾臓依存性の特定

DST 処置として、ドナーのヘパリン化新鮮血1 mLをレシピエントのラットへ静脈内投与後、経時的に採血する。ドナーリンパ節T細胞 (MHC I 発現ターゲット細胞) にレシピエント血清を反応させた後、蛍光標識抗ラットIgG 抗体を用いたFCMにより抗ドナー抗体を測定する。血清中の抗体によるドナー細胞障害性については、in vitro 補体結合反応と、in vivo 血清前投与によるドナー細胞消失試験とGvHD抑制試験で確認する。アロAFC 応答の脾臓依存性については、DST直前に脾摘を行い、脾臓残存ラットに対する抗ドナー抗体産生量の低下を測定する。これによりDST抗体効果を明らかにする。



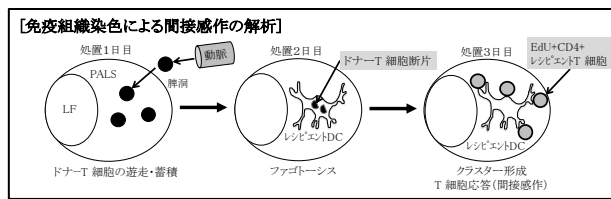
(2) DST 効果の引き金となるドナー血液成分の解析

ドナー新鮮血を白血球、赤血球、血小板、血漿に、さらに白血球についてはT細胞、B細胞とT細胞を除去した白血球分画に分離し、血液1mL相当量の分画をレシピエントに投与、どの分画がDST効果を持つかを明らかにする。投与後、経時的に脾臓、血清を採取し、脾臓の新鮮凍結切片と脾細胞混濁液を作製する。屠殺1時間前にはBrdUとEdUを投与して増殖細胞を標識し、多重免疫染色(CD4, CD8, B220, IV型collagen, BrdU, EdU)による免疫組織学的検索ならびにFCMによる定量解析を行う。また、血清中の抗ドナーMHC I 特異的抗体価も(1)同様に測定する。これによりどの分画がDST効果を持つかを明らかにする。



(3) 脾臓PALSへ遊走するドナーT細胞の検出とレシピエントDCとの相互作用の解明

脾臓PALSでの間接感作によるアロ応答のメカニズムを解析するために、ドナーT細胞移入後1, 2, 3日目の脾臓を摘出・標本を作製しドナー特異的MHC I抗体(ドナーT細胞)とMHC II抗体(レシピエントDC)で染め分けし、両者による間接感作を形態学的にとらえる。また、その後のレシピエントT細胞の抗原情報の認識については、EdUを追加した蛍光多重染色法により細胞集塊形成を確認、増殖応答とDCフェノタイプを特定する。これにより間接感作によるアロ応答のメカニズムを鮮明にする。

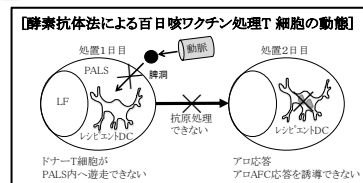


(4) Th バランスとThfの解明による液性免疫の優位性

ドナーT細胞移入後にて間接感作によるT細胞増殖応答が起き始めてからの脾臓から瞬時にレシピエントT細胞を抽出し、一方は細胞培養を行い培養液中に分泌したサイトカイン(IL-4, IL-10, IFN- γ など)を蛋白レベルで測定。もう一方はRNA抽出を行い、蛋白レベルで検出できなかった場合を考慮し遺伝子レベルでも関連する転写因子(GATA-3など)の発現について定量PCRを行う。それにより、レシピエントT細胞がTh2細胞とTfhへの分化することを明らかにし、アロAFC応答(細胞液性免疫)を導く手がかりとする。

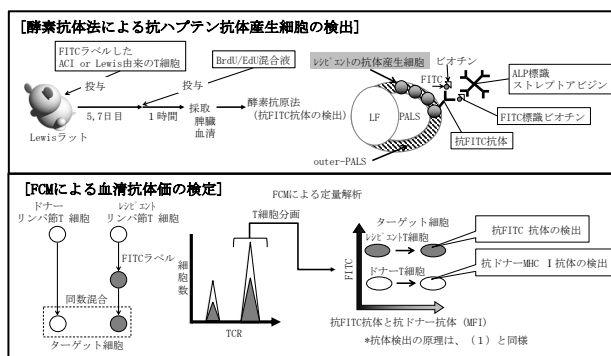
(5) アロAFC 応答誘導におけるドナーT細胞のPALS 遊走の必要性

百日咳ワクチンでドナーT細胞のPALS内への遊走を抑えた場合のアロAFC応答の解析をすることで、一連のアロ応答を誘導するためにドナーT細胞がPALSへ進入することが必要であることを明確にする。



(6) 抗原標識T細胞を用いたワクチン開発

ハプテン抗原(FITC: fluorescein isothiocyanate)を結合させたドナーT細胞移入後、5, 7日目の脾臓組織切片を蛍光標識した抗ビオチン抗体を用いたアルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンによる酵素抗原染色法(Cell Tissue Ras, 1989)で抗FITC抗体産生細胞(AFC)を確認する。さらにFITCをラベル化したレシピエントのリンパ節T細胞をターゲット細胞としてFCMによる血清中の抗FITC抗体を検定する。これによりドナーT細胞に結合させたハプテン抗原の抗体が産生されることを証明し、ワクチンベクターとして用いる可能性を見いだす。さらに、臨床応用を考慮し、同様の方法が同種同系でも可能であるか検討する。

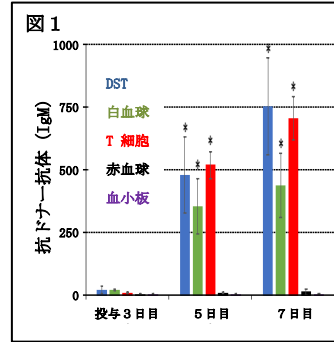


以上により、ドナーT細胞がDSTのアロAFC効果を最も効率的に誘導するメカニズムが明らかになる。さらにハプテン抗原を結合させたドナーT細胞の移入実験によって、脾臓で抗ハプテンAFC応答が起こることが証明できれば、ウイルスや腫瘍のペプチドをT細胞に結合させて、効率よく抗ペプチド抗体を作らせるという全く新しいワクチン構想の提案に繋がるという意義がある。

4. 研究成果

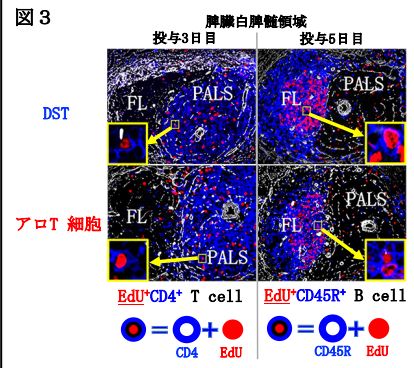
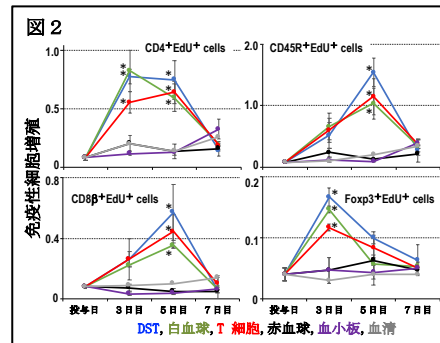
(1) ドナーMHC I 特異的抗体 (抗ドナー抗体) の定量定性解析と脾臓依存性の特定

DST処置後のレシピエント血清中の抗ドナーMHC I 抗体 (抗ドナー抗体) について検定したところ、7日目の血清 (DST 血清) がドナーリンパ節T 細胞 (MHC I 陽性細胞) に対し強い陽性反応を示した。さらに、この抗体がIgM抗体であることもわかった (図1:青)。このDST 血清は、in vivoで赤血球に対してIgMと補体結合反応により溶血反応を示し、in vivoにおいては前投与によるドナー細胞消失試験にてドナー細胞が消失、GvHD抑制試験では抑制的に働くことを確認した (発表論文1: Int Immunol, 2018)。DST 直前に脾摘したラットの血清においては脾臓残存ラットに対し、抗ドナー抗体および溶血反応の低下が見られた (発表論文1)。このことにより、DST はドナーMHC I に対するIgM 抗体が主に産生され、この抗体は細胞障害性を有することからGvHD早期の治療効果が期待できると結論した。



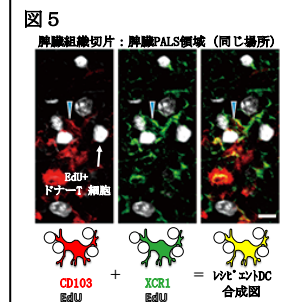
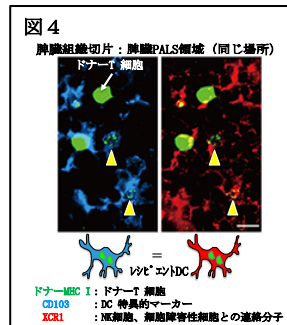
(2) DST 効果の引き金となるドナー血液成分の解析

ドナー新鮮血を各成分に分離しその細胞分画を投与したところ、投与後のレシピエント脾臓において、DST処置群 (青) 同様に白血球 (緑) とT 細胞 (赤) 分画投与群のみに投与後3~5日をピークとしてPALS (T 細胞領域) にてレシピエント増殖性T 細胞 (Edu⁺CD4⁺ cells、Edu⁺CD8⁺ cells、Edu⁺Foxp3⁺ cells)、5日目にFL (濾胞) にて増殖性B 細胞 (Edu⁺CD45R⁺ cells) を多数検出した (図2, 3)。また、同じ実験動物の血清 (緑, 赤) についてもDST 処置群 (青) 同様に抗ドナー抗体を検出した (図1)。T 細胞と同様にリンパ球に属するB 細胞分画については、白血球からB 細胞分画を除いて投与した処置群の血清において顕著に抗ドナー抗体が減少した (発表論文2: Front Immunol, 2019)。また、T 細胞分画と対比してB 細胞分画の細胞数を変動させて投与した場合、血清中の抗ドナー抗体は投与する細胞量依存的に検出され、かつB 細胞投与群の方は全体的に抗ドナー抗体が減少した (発表論文2)。このことにより、DST 効果がドナー血液成分中の白血球、特にT 細胞分画が有効で、赤血球などのそれ以外の成分は無効であることがわかった。これは現在までに報告が無い新発見となる。



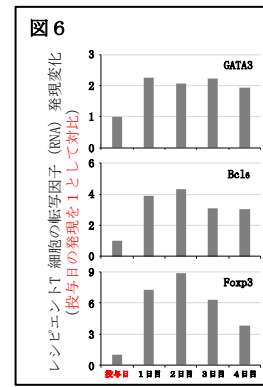
(3) 脾臓PALS へ遊走するドナーT 細胞の検出とレシピエントDC との相互作用の解明

ドナーT 細胞は、投与6時間後にはレシピエントの脾臓PALS領域に多数検出され、投与2日目から顕著に減少、3日目には全く検出されなかった。一方レシピエントDCは、正常状態を含め常にPALS内に局在し駐留していることを確認した。そこで両者の細胞検出抗体を用い多重免疫組織染色を行ったところ、ドナーT 細胞がPALSに遊走された期間内において、レシピエントDC の細胞内に断片化したドナーT 細胞のMHC I が取り込まれていること (ファゴトシス) がわかった (図4:黄△)。さらに、そのレシピエントDC の膜表面に抗原を壊す役割を有するNK細胞や細胞障害性細胞との連絡ツールであるXCR1 分子が発現している事もわかった (図4, 発表論文2)。ここで、ドナーT 細胞投与数時間後にNK細胞がPALS内に優位に集結することも明らかにした。これは、このNK細胞がドナーT 細胞を破壊し、そのドナーT 細胞のMHC I 断片をレシピエントDC が貪食したことを示唆している (発表論文2)。一方、間接感作にてレシピエントT 細胞の免疫性増殖応答時 (投与2日目以降) に、レシピエントDC と活性化レシピエントT 細胞 (Edu⁺CD4⁺T 細胞) のクラスター形成がレシピエント脾臓PALS 領域で顕著に確認された。また、クラスターの中心に存在するレシピエントDC がXCR1 分子を発現していることも確認できた (図5:青▽)。これによりXCR1⁺DC が間接感作を起こし、ある一定の免疫性増殖応答 (図2) を示すことが解明できた。また、この解析法は前回の科研費 (若手研究B : 課題番号24790200) で立案した独自の方法であり、その重要性も証明できた。



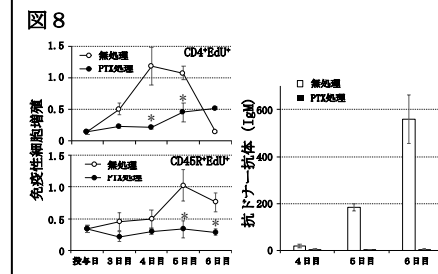
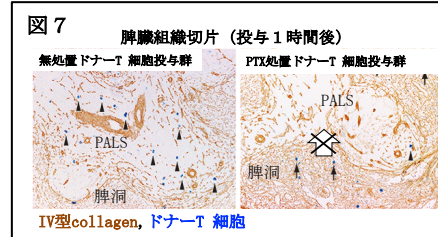
(4) Th バランスとThf の解明による液性免疫の優位性

ドナーT 細胞投与後の脾臓でのクラスター形成時以降のレシピエントT 細胞を1晩培養し、培養中に放出されたサイトカイン因子を測定したが低い値のため、その変化は見られなかった。一方、培養せずにすぐに細胞からRNA抽出し、そのサンプルで定量PCRを行ったところ、クラスター形成時以降において各T 細胞への分化や増殖のきっかけとなるTh2 転写因子 (GATA-3)、Tfh 転写因子 (Bcl6)、制御性T 細胞転写因子 (Foxp3) の上昇が見られた (図6:未発表)。これにより、XCR1⁺DC の間接感作により免疫性増殖応答 (図5) を示したレシピエントT 細胞 (図2: CD4⁺Edu⁺cells) がTh2 ヘルパーT 細胞、Tfh (濾胞T 細胞) に分化していることがわかり、CD45R⁺B 細胞増殖 (図2: CD45R⁺Edu⁺cells) に伴うアロAFC応答 (液性免疫応答) を導いている可能性が示唆された。



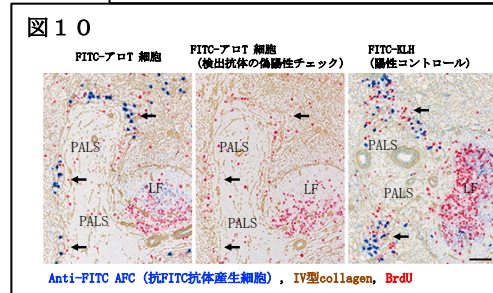
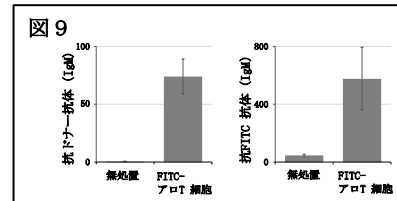
(5) アロAFC 応答誘導におけるドナーT 細胞のPALS 遊走の必要性

百日咳ワクチン (PTX) で処理したドナーT 細胞を投与したレシピエントの脾臓では、ドナーT 細胞 (青, 黒矢印) が血行性経路で脾臓内の脾洞を通るがPTX 効果によりPALS 内には遊走されない (図7)。その結果、無処理のドナーT 細胞投与群と比べ、PALS 内のXCR1⁺DC のファゴトーシスがなく (発表論文2)、その後の免疫性増殖反応 (図8:左)、ドナー抗体産生 (図8:右) といった一連のアロAFC応答が得られなかった。これによりアロAFC応答の誘導には、ドナーT 細胞がレシピエント脾臓のPALS 内に入ることが必要であることが立証できた。

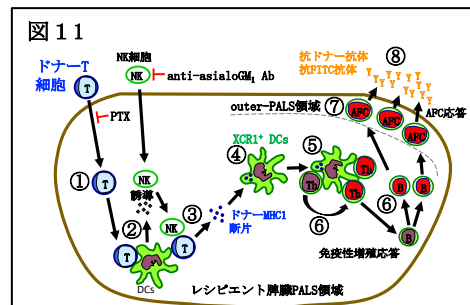


(6) 抗原標識T 細胞を用いたワクチン開発

FITC 抗原を結合させたドナーT 細胞 (FITC-T 細胞) を投与したレシピエントでは、投与7日目の血清中にて抗ドナー抗体と抗FITC 抗体 (抗ハプテン抗体) を検出した (図9)。また、同じレシピエントの脾臓outer-PALS にて抗FITC抗体を産生する抗体産生細胞 (AFC) の出現を確認した (図10:左 黒矢印)。よってアロT 細胞は、ハプテン抗原のAFC 応答を誘導するワクチン効果をもたらすことがわかった。しかし、ドナーとレシピエントが同系である (シンジェニック) の組み合わせでのFITC-T 細胞投与では、投与7日目の血清中にて抗FITC 抗体は検出されず、レシピエントの脾臓outer-PALS においてもAFCを確認できなかった。これは、アロT 細胞がハプテン抗原のAFC応答を誘導するワクチン効果 (アジュバンド効果) はもたらすが、シンジェニックではワクチン効果が出ないことを示唆している。そこで、今後はシンジェニックT 細胞に抗原とアジュバンド分子を結合させて、同系でもワクチン効果をもたらす改良型のワクチン開発を行いたい。



以上により研究代表者は、投与したドナー (アロ) T 細胞が①レシピエント脾臓の PALS 内に遊走され、②XCR1⁺/-DC に抗原認識される、③DC から指示を受けたNK 細胞に破壊され、④駐留する XCR1⁺DC にファゴトーシスされ、その後、間接感作により XCR1⁺DC が⑤クラスター形成し、⑥免疫性増殖応答および⑦抗体産生細胞 [アロ AFC 応答] を誘導し、⑧抗体が産生される事を証明した (図11)。この原理を用いて FITC をラベル化したドナーT 細胞投与により抗 FITC 抗体の産生を誘導した。よって研究代表者は本研究を通してドナーT 細胞をワクチンベクターとして用いるという全く新しいワクチン構想に繋げることができた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ueta Hisashi, Kitazawa Yusuke, Sawanobori Yasushi, Ueno Takamasa, Ueha Satoshi, Matsushima Kouji, Matsuno Kenjiro	4. 巻 30
2. 論文標題 Single blood transfusion induces the production of donor-specific alloantibodies and regulatory T cells mainly in the spleen	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 53～67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxx078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kitazawa Yusuke, Ueta Hisashi, Sawanobori Yasushi, Katakai Tomoya, Yoneyama Hiroyuki, Ueha Satoshi, Matsushima Kouji, Tokuda Nobuko, Matsuno Kenjiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel Targeting to XCR1+ Dendritic Cells Using Allogeneic T Cells for Polytopical Antibody Responses in the Lymph Nodes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2019.01195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北沢祐介
2. 発表標題 ドナーT細胞のXCR1+樹状細胞による抗体産生応答
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 T細胞ワクチン	発明者 松野健二郎、上田祐司、北沢祐介	権利者 獨協医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/006949	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----