

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08293

研究課題名(和文) 新生児・早産児における免疫寛容及び免疫応答機構の統合的免疫細胞・分子学的解析

研究課題名(英文) Cellular and molecular mechanism of neonatal immune tolerance in term and preterm infants

研究代表者

高橋 尚人 (Takahashi, Naoto)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：50197159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は新生児免疫寛容の細胞分子学的機序を明らかにするものである。臍帯血T細胞はスーパー抗原刺激で制御性T細胞のマスター転写因子であるFoxP3の発現が成人より有意に高値となり、同二次刺激に対しては臍帯血単核球でIL2遺伝子の発現が低下しFoxP3を始め制御性T細胞関連の遺伝子発現が有意に亢進した。また、FoxP3の上流にあるIKFZ2(Helios)遺伝子は臍帯血で常に高発現で、これは胎児の遺伝子発現と共通したパターンであった。新生児免疫寛容の機序の一つは制御性T細胞による能動的なもので、Helios、FoxP3遺伝子が関与しており、これは胎児期から引き継いだ特徴と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児免疫寛容は新生児の易感染性の原因や臍帯血移植の際の拒絶反応の弱さと関係していると考えられて来たが、その細胞分子学的機序は十分には解明されて来ていない。一方、制御性T細胞の発見と胎児期にその細胞分画が多いことから、我々は新生児免疫寛容はむしろ能動的に行われている可能性が高いと考えた。今回の研究結果は、その考えを証明しており、また関係する転写因子としてFoxP3やHeliosを候補として同定することができた。今後はさらにこれら転写因子の発現調節機構を明らかにすることにより、新生児の易感染性の改善や臍帯血移植をより効果的に行う方法の開発などの研究に役立てることが可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study is to elucidate cellular and molecular mechanism of neonatal immune tolerance in human. Cord blood (CB) T cells showed a significantly higher level of FoxP3 expression induced by a primary stimulation with a superantigen than adult peripheral blood (APB). CB mononuclear cells showed a lower expression level of IL2 gene and a higher expression of genes related to regulatory T cells (Treg) namely FoxP3 induced by secondary stimulation with a superantigen. IKFZ2 gene (Helios) was consistently expressed at a higher level in CB T cells than APB T cells. A possible mechanism of neonatal immune tolerance can be active induction of immune suppression with Treg and is related to expression of genes of Helios and FoxP3. We think that the findings seen in neonates is consistent with that reported in immune system of fetus in utero in the past papers.

研究分野：新生児免疫

キーワード：新生児免疫寛容 制御性T細胞 スーパー抗原 臍帯血 FoxP3 Helios

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 新生児免疫寛容は妊娠維持、臍帯血移植などにも関係し、基礎的にも臨床的にも重要な課題である。代表者は一貫して臨床と基礎をつなぐ新生児免疫学の研究を続けて来た。その過程でTSST-1産生MRSAによって日本に蔓延した新生児TSS様発疹症 (NTED) を発見し報告した (Lancet 1998)。NTEDは成人であればTSSとして重症化するはずだが、通常軽症で自然軽快する。我々はNTEDにおいて、in vivoでTSST-1特異的anergyが誘導されていることを明らかにした (J Clin Invest 2000)。またNTEDでは、TSST-1で増幅するTCRV₂陽性T細胞の特徴的な挙動も確認した。すなわち超急性期で一旦末梢血から消失した後、急速に増幅し、さらに数日後の回復期にはまた急速に末梢血から消失する (J Microbio Immunol 2013)。このdeletionは成人TSSでは見られず、新生児独特のアポトーシス誘導の関与が考えられた。しかし、これら免疫寛容と考えられる事象の細胞分子学的機構は未解明のままになっていた。免疫寛容については制御性T細胞の発見により、胸腺から末梢免疫組織におよぶ多様な調節機構の存在が明らかとなっている。制御性T細胞の関与を含め現在の細胞分子学的手法を応用することにより、新生児免疫寛容の機構を解明できる状況と考えられた。

(2) 一方、早産児の免疫応答がどのように調節されているのかの研究も临床上重要で、新生児免疫寛容が早産児でも誘導されるのかも未解明の課題と考えられた。

2. 研究の目的

(1) 臍帯血免疫寛容モデルを用いた新生児T細胞の免疫寛容誘導の細胞・分子学的機構の解明：マウスと違いヒト、特に新生児領域においては免疫寛容を解析する良いモデルがないこともあり、その細胞分子学的機構は十分には解明されていない。スーパー抗原はT細胞受容体を刺激することから、その刺激は他のレクチンなどの物質より生理的で、抗CD3抗体刺激よりも強く有効な刺激を与えることが可能である。そこで、スーパー抗原を用いたヒト臍帯血モデルにより、新生児免疫寛容における制御性T細胞の関与とそれに関連する遺伝子発現調節の特徴を明らかにすることを第一の目的とした。

(2) 早産児の免疫応答特殊性に関わる細胞・分子学的機構の解明。
また、早産児の免疫制御異常の原因となりうる免疫系遺伝子発現調節の弱点を明らかにすること、在胎週数別に免疫寛容・免疫制御機構がどのように変化するのかを明らかにすることを第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 対象：正期産の健康新生児を対象とし健康成人を対照とし、可能な限り臍帯血と成人末梢血は同日に採取した。

(2) 方法：

細胞調整：単核球を比重遠心により分離し、磁気ビーズ法によりCD14陽性のpositive selectionによる単球の分離とCD45RO陰性のnegative selectionによりNaïve T細胞を回収した。

TSST-1による一次刺激：TSST-1を用い、全単核球を用いたり、単球とT細胞を用いて各種TSST-1濃度での一次刺激を行い、dose-responseおよびtime courseの反応性を検討した。また同時にフローサイトメトリーにより細胞表面抗原解析を行った。さらに、ソーティングにより芽球化したT細胞を回収した。

芽球化T細胞の増殖と二次刺激：回収した芽球をrIL-2により増殖させ、抗CD3/CD28抗体で二次刺激を行い、一次刺激と同様に各種反応を検討した。

細胞表面分子・細胞内分子の免疫染色による細胞分画の解析：フローサイトメトリーで18種類の蛍光標識抗体を用い3色レーザーによる解析を行った。細胞内染色としてはFoxP3とTCR V2を対象分子として解析した。

細胞増殖評価：Cell Trace Violetを用い分裂能の評価を行った。

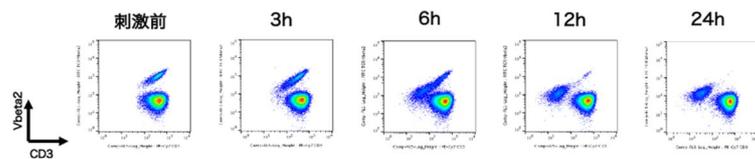
サイトカイン測定：Bio-plexのBeads array法により多項目サイトカイン濃度をプロファイルとして解析した。

RNA抽出と遺伝子発現解析：刺激後の細胞からRNAを抽出し、その後各種遺伝子発現をRNA-seq法により解析した。

4. 研究成果

(1) TCR V2の細胞内移行

行：二次刺激用に一次刺激後のVbeta2陽性T細胞を回収するにあたり、すでに報告



されていることではあるが、**図1 TSST-1刺激後のTCR V2分子の細胞表面発現の経時的变化**右の図1のように刺激後にTCR V2分子が徐々に細胞内に移行し、表面分子の確認だけでは正確に細胞を回収できないことを明確にした。そこで、TCR V2分子の細胞内染色も行うこととし正確に芽球化Vbeta2陽性T細胞を回収できる様にした。

(2) TSST-1刺激後の培養上清IL-2の変化：

TSST-1の一次刺激でも二次刺激でも、培養上清のサイトカインプロファイルの特徴的な所見として、臍帯血でのIL-2濃度が低いことが観察された。右の図2は二次刺激後のIL-2濃度の経時的变化で、このように有意に臍帯血でのIL-2濃度が低かった。これは以前の我々の報告と一致しており、このIL-2の産生低下が新生児免疫寛容の一つの原因と考えられた。

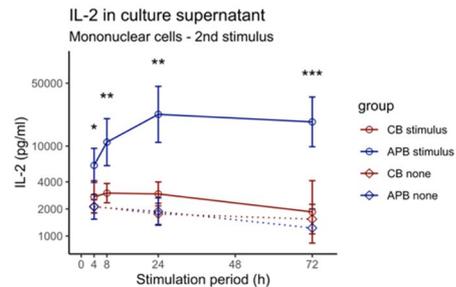


図2 TSST-1二次刺激後のIL-2の経時的变化

(3) 抑制性サイトカイン産生：免疫寛容誘導が抑制性サイトカインによるものか確認するために、TSST-1一次刺激後72時間と二次刺激24時間・72時間後の培養上清中のサイトカインプロファイルを確認した。しかし、IL-10、TGF β などの抑制性サイトカインは臍帯血と成人血で上清中濃度に有意差はなかった。

(4) 臍帯血での高い制御性T細胞の誘導性：

TSST-1刺激後の制御性T細胞のマスター転写因子であるFoxP3の細胞内発現を経時的に観察すると、臍帯血において有意にその発現高値が見られた。右の図3は一次刺激64時間後のFoxP3発現の代表例である。また、臍帯血の方が成人血細胞より細胞分裂の開始が早く、増殖能が大きいことも確認した。

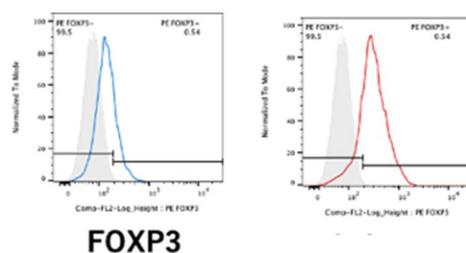


図3 TSST-1刺激64時間後の細胞内FoxP3発現

(5) 臍帯血と成人血のTSST-1刺激後の遺伝子発現：

RNA-seqのデータを主成分分析すると、臍帯血と成人血及びTSST-1刺激前後で、それぞれ有意差を持ってクラスタリングされた。一方遺伝子のエンリッチメント解析を行うと、一次刺激でも二次刺激でも、臍帯血と成人血で発現変動遺伝子(DEG)は共通して、細胞増殖、免疫応答に関わるものが多かった。

(6) TSST-1刺激後の臍帯血と成人血の各種遺伝子発現の違い：

IL-2発現：右の図4

はTSST-1一次刺激72時間後と二次刺激24時間後のサイトカインに関する遺伝子発現で、上向きが臍帯血で高発現であることを示している。サイトカイン濃度測定で確認されていた臍帯血でのIL-2

濃度の低下を裏付けるように、IL2発現が臍帯血で低発現となっていた。

FOXP3とIKZF2発現：

右の図5は一次刺激後72時間（左）及び二次刺激24時間後（右）の制御性T細胞に関わる転写因子の発現の解析結果である。FOXP3発現は臍帯血で有意に発現が高く、さらにFOXP3だけでなく、その上流に位置するIKZF2(Helios)遺伝子が臍帯血で常に高発現であることが分かった。

また遺伝子セットエンリッチメント解析でも、臍帯血の転写因子発現は胎児の遺伝子発現と共通したパターンで、同じように制御性T細胞への分化傾向があることが分かった。。

(7) 早産児の免疫寛容

当初の研究計画では、早産児の免疫応答についても解析するとしていたが、早産児は予定通りの出生でないため解析時間的制約があり、解析を行うには細胞凍結が必要とされた。そこで、細胞凍結による細胞の変化について検討を行い、その結果、凍結しても同様の解析が可能であることが判明した。しかし研究期間の制限から、実際の早産児の免疫応答の解析には至らなかった。一方で早産児の免疫応答研究の一つとして、早産児の生後の血清サイトカインプロファイルを40名で行うことができ、炎症性サイトカインおよびIL5の持続的高値を認めた。

(8) まとめ

以上の結果から、臍帯血とスーパー抗原を用いた新生児免疫応答の細胞分子学的機構の特徴として、制御性T細胞への誘導傾向が成人より強いことが明らかとなった。新生児は決して免疫応答が弱いわけではなく能動的に免疫応答抑制を行っており、この傾向は胎児期の免疫応答の特徴と一致していた。一方、この免疫抑制傾向はいわゆる抑制性サイトカイン産生に依存していないことも明らかとなり、その機序のより詳しい説明は今後の課題として残った。早産児の免

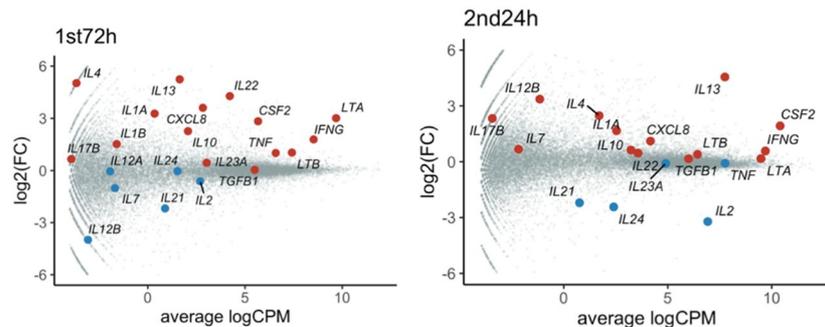


図4 一次（左）二次刺激（右）のサイトカイン関連遺伝子発現

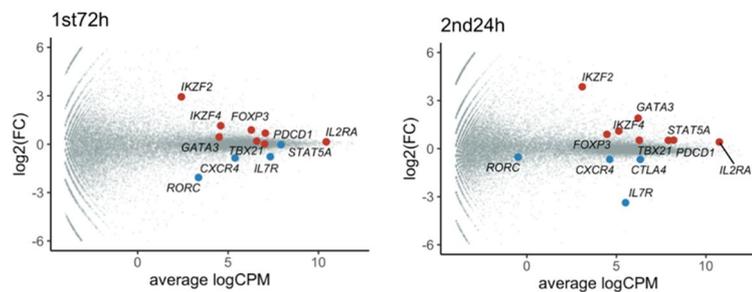


図5 一次（左）二次刺激（右）の転写因子関連遺伝子発現

疫応答の解析と合わせて、今後も検討していくべきと考えられる。今回の研究結果は臍帯血移植や新生児の感染症診療において大いに役立つと考えられ、その結果は大学院生武藤浩司氏の学位論文として公表され、今後学会や論文での発表も予定されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------