

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22646

研究課題名(和文)免疫記憶の制御をターゲットとした、免疫抑制に対する新規アプローチ法の開発研究

研究課題名(英文) Development of novel approach targeting on the specific molecule of memory lymphocytes

研究代表者

植木 伸也 (Ueki, Shinya)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：30837258

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)：本研究では免疫記憶による治療抵抗性に対する選択的な治療ターゲットを探索した。免疫寛容誘導には抗CD3抗体の遅延投与(移植後3日から5日間)を用い、アロ皮膚移植による抗原感作後のドナー抗原特異的な記憶T細胞の影響を検討した。記憶T細胞存在下では免疫寛容誘導効果は失われ、その機序にTCF-1lowPD-1+CD8+ T細胞が関与した。一方、免疫寛容誘導にはグラフト内TCF-1 high CD8+ T細胞が関与した。この成果をImmunohorizonsに論文報告した。P2X7受容体下流のinflammasome阻害効果はマウスアロ心移植では観察されなかった。免疫抑制剤併用による効果を検討したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器移植後は終生の免疫抑制剤の内服が必要で、それに伴う腎不全、代謝異常、悪性腫瘍発生などが問題である。免疫寛容は免疫抑制剤の使用無しで拒絶反応が生じない状態であり、その誘導は臓器移植の最終目標とされるが、ヒトでは記憶T細胞が免疫寛容の障壁となり達成できていない。本検討で明らかにした記憶T細胞の治療ターゲット分子は拒絶反応を引き起こすT細胞を特異的に抑制する一方で、免疫寛容誘導に重要なT細胞の温存が可能で、臓器移植医療における革新的な治療法につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To identify the therapeutic target molecules in the resistance of transplant tolerance in sensitized mouse model, we used delayed anti CD3 antibody for sensitized mice in heart transplant model. Sensitized mice treated with delayed anti-CD3 antibodies, promoted an allograft rejection rapidly. We found that TCF1low PD-1+ CD8+ T cells played a crucial role for graft rejection in sensitized model. Further, TCF1high PD-1+ CD8+ T cells were key for tolerance induction. We reported these findings in 'Immunohorizons' in 2024. Unfortunately, we could not find any effect of inhibitor of inflammasome which is one of the key molecules in the signaling pathway of P2X7 receptor. The inhibitor of inflammasome together with another immunosuppressants may be of interest in the future.

研究分野：移植免疫

キーワード：記憶T細胞 免疫寛容

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

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治療法として確立されているが、長期成績は未だ十分ではない。特に急性拒絶反応に対する治療法としてカルシニューリン阻害剤に代表されるような免疫抑制剤の発達に伴い、急性期の問題は解決されつつあるが、長期の免疫抑制剤内服に伴う腎不全、代謝異常、悪性腫瘍発生などは解決すべき問題として残されている。また、移植グラフトの血管内膜肥厚を伴うような慢性拒絶反応は長期経過後のグラフト生着を阻害し、その制御は十分とはいえない。免疫寛容の誘導は、免疫抑制剤の使用無しで拒絶反応が生じない状態をつくり出し、上記のあらゆる問題点の解決策として臓器移植における最終目標とされている。マウスなどの基礎研究レベルでは臓器移植における免疫寛容の誘導が可能となっているが、サルなどの臨床前研究や、実臨床の臓器移植においては未だ免疫寛容を誘導するプロトコールは確立されていない。免疫寛容の誘導には、免疫反応に対して抑制的に働く制御性 T 細胞が重要であると報告されているが (Todo S, Goto R, Hepatology 2016) 制御性 T 細胞の効率的な誘導は十分な方法論が確立されていない。マウスとヒトで違いが生じる理由として、特定の病原性微生物が存在しない環境下で育成されたマウスには自然環境で発達する記憶リンパ球の発達がみられない一方で、多くの病原菌に曝露され記憶リンパ球が発達したヒトにおいては、記憶リンパ球の交差反応等による拒絶反応が免疫寛容抵抗性となるためであると考えられている。記憶リンパ球による免疫応答は、抗原暴露後に急速で強固な免疫応答が生じることが分かっている。一方で、免疫寛容の誘導に重要な制御性 T 細胞も記憶細胞の形態をとるタイプがあり、これが特にグラフト保護に重要な役割を果たしているとの報告もある。拒絶反応に関与する記憶リンパ球を選択的に治療する方法論が免疫寛容誘導には重要であると考えられる。近年、ATP 受容体である P2X7 受容体の抑制が、記憶 T 細胞の特異的抑制に関与することが明らかにされつつある。P2X7 受容体はその下流で炎症反応促進に関与し、自然免疫の活性化が獲得免疫、特に記憶 T 細胞に関与する。自然免疫を制御することで獲得免疫、特に免疫寛容の誘導を促進しようとする試みはこれまでになく画期的な研究である。

2. 研究の目的

拒絶反応に関与する記憶 T 細胞を選択的に制御するために、拒絶反応に関与する記憶 T 細胞を識別するマーカーを同定する。一方で、グラフト保護に関わる T リンパ球を明らかにすることで、治療ターゲットにすべき細胞集団を同定する。記憶細胞存在下における適切な治療法を確立する。特に P2X7 受容体に注目した治療法を試みる。

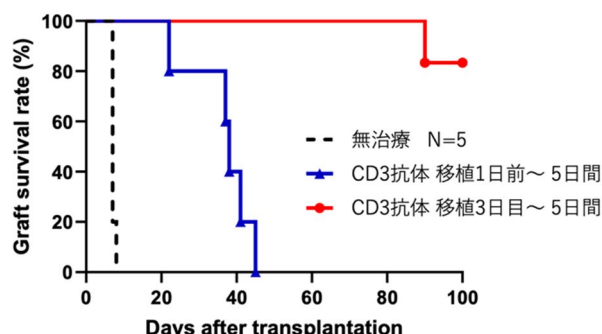
3. 研究の方法

マウスは C57BL/6 (B6, H2b), BALB/c (H2d), C3H/HeJ (H2k) を Japan SLC (静岡) から購入し、北海道大学動物実験施設で飼育し、8-12 週齢を研究に用いた。顕微鏡下にマウスの腹部異性心移植モデルを確立した。具体的には脱血したマウスを 10%ヘパリン生食 1ml で灌流し、肺動脈、下行大動脈を切離し摘出した心移植グラフトをレシピエントマウスの腹部大動脈と下大静脈に顕微鏡下にそれぞれ 10-0 ナイロン連続縫合で端側吻合し灌流した。心グラフトの拒絶反応は連日の触診にて心拍動を確認し、最終的には直視下の拍動と病理所見で拒絶反応を確認した。皮膚移植はマウス尻尾の皮膚 直径約 1cm をレシピエントマウスの背部に 6-0 非吸収性縫合糸で結節縫合し 1 週間バンデージで保護した。抗原感作マウスとして皮膚移植の 8 週間後のマウスを用いた。Fc 非結合型抗マウス CD3 抗体 (145-2C11) は BioXcell から購入し、1 日 1 回 50 μ g を 5 日間、マウス尾静脈から静脈内投与した。投与開始時期は移植前日、移植後 1 日目、移植後 3 日目にそれぞれ行った。グラフト浸潤細胞の評価のため、移植後の心臓を摘出しハサミで細切した後、コラゲナーゼ IV (Sigma-Aldrich) に 30 分浸漬させ、組織を溶解した後に 70 μ m セルストレーナーと通してリンパ球を摘出した。リンパ球は BD Biosciences, BioLegend, Thermo Fisher Scientific より購入した抗体を用いて染色し、FACS canto II、FlowJo にて解析した。サイトカイン産生 T 細胞の解析には 10 ng/ml の PMA、1 μ M の Ionomycin、Brefeldin A を用いた。また抗原特異的反応の解析に IFN γ -ELISpot (BD Biosciences), CellTrace Violet (Thermo Fisher Scientific) で染色したリンパ球の混合リンパ球反応を用いた。

4. 研究成果

まずマウス心移植モデルを確立した。B6 から B6 マウスへの組み合わせで拒絶反応が生じないこと、BALB/c マウスをドナーとして B6 レシピエントマウスに移植した場合移植後 7-8 日で拒絶反応が生じ、グラフト心拍動が停止することを確認した。また手術の成功率は 90%であることを確認した。またマウ

図1. マウス心移植 (BALB/c \rightarrow B6) における抗CD3抗体の効果



ス皮膚移植モデルを確立し、BALB/c の皮膚を B6 マウスに移植すると拒絶反応が生じ廃絶されること、皮膚移植後 8 週後の B6 マウスの脾細胞中に BALB/c マウスのドナー抗原特異的に反応する記憶 T 細胞が存在していることを 30Gy 照射後の BALB/c マウスの脾細胞を用いた混合リンパ球反応を IFN-g ELISpot で観察することで確認した。さらに皮膚移植後 8 週目の B6 レシピエントマウスに BALB/c マウスの心グラフトを移植すると、皮膚移植を受けていないマウスより有意に速く拒絶反応が生じ、グラフトが廃絶することを確認した (n=5、移植グラフト生存期間中央値 [median survival time, MST] 5 日)。続いて、研究分担者の後藤らが報告 (Am J Transplant 2012) した免疫寛容誘導の手法、即ち Fc 非結合型抗 CD3 抗体による免疫寛容誘導法 (移植後 3 日目から 5 日間投与) が、既報と異なるマウス系統間 (BALB/c C57BL/6) の心移植で成立するかを確認した。既報よりもより厳しい MHC-fully mismatch 間にも関わらず、抗 CD3 抗体 遅延投与の免疫寛容誘導プロトコールは有効であった (n=5, MST>100 日, 図 1)。加えて、この遅延投与においてはグラフト内に CD4 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞が増加していることが確認された。また Exhaustion のマーカーである TCF-1 を強発現する CD8 陽性 PD-1 陽性 T 細胞が免疫寛容の誘導に成功したグラフトで観察され (図 2) この細胞集団がグラフト保護に関与している可能性が考えられた。さらにこの細胞集団は細胞表面マーカーとして Ly108 の発現が増強していることが分かった (図 3)。

続いて、記憶 T 細胞存在下における抗 CD3 抗体の移植後 3 日目からの遅延投与とプロトコールの効果を検証した。前述の BALB/c 皮膚移植後 8 週目の B6 マウスに BALB/c に抗 CD3 抗体の治療を行うと 3 日目からの投与による免疫寛容誘導効果は完全に失われた (図 4)。3 日目までにグラフトに浸潤してくる記憶 T 細胞が速やかに拒絶反応を引き起こすことで、CD3 抗体の効果が失われたと考えられ、移植後 3 日目のグラフト内の T 細胞を観察すると、著明な TCF-1 陰性 PD1 陽性 CD8 陽性 T 細胞の増加が観察された。この細胞集団は Eomes 陽性、T-bet 陽性のいわゆるエフェクター T 細胞の表現型を持っていることが分かった。さらに抗原感作されたマウスの脾細胞を採取して、ドナー抗原に対して増殖反応を示すドナー抗原特異的 T 細胞の表現型を観察するとやはり、TCF-1 陰性 PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞であることが分かった (図 5)。抗原感作モデルにおいてはこれらの早期に浸潤するグラフト攻撃性のある CD8 陽性 T 細胞の抑制が重要であり、移植後 3 日目から投与する抗 CD3 抗体の治療プロトコールでは無く、移植後 1 日目から投与することで、効率的に攻撃性 T 細胞の抑制が可能で、グラフト生存期間の延長効果が得られることを明らかにした。これらの結果をまとめ、論文投稿し、アメリカ免疫学会雑誌の一つである Immunohorizons (Ota T, et al, TCF1^{high} PD-1⁺ Ly108⁺ CD8⁺ T Cells are associated with graft preservation in sensitized mice treated with mon-Fc receptor-binding CD3 Antibodies. Immunohorizons, 2024, DOI; [10.4049/immunohorizons.2300117](https://doi.org/10.4049/immunohorizons.2300117) にアクセプトされた。また ATP 受容体である P2X7 受容体の拒絶反応への関わりについて、その下流の inflammasome 阻害のマウスアロ心移植モデルでの効果を検討した。マウス心グラフトの冷阻血中に inflammasome 阻害を行い、マウスアロ心移植生存期間延長効果を観察したが、薬剤投与の効果は得られなかった。これらの研究成果を進展させ、抗原感作モデルでの inflammasome 阻害、または P2X7 受容体阻害薬の効果についても検討したいと考えている。

図2. 免疫寛容誘導グラフト内の TCF-1^{high} PD-1⁺ CD8⁺ T細胞の有意な上昇

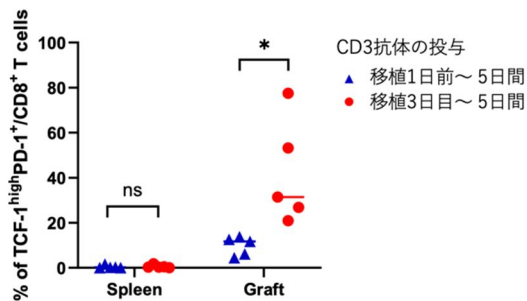


図3. TCF-1^{high} PD-1⁺ CD8⁺ T細胞におけるLy108の発現

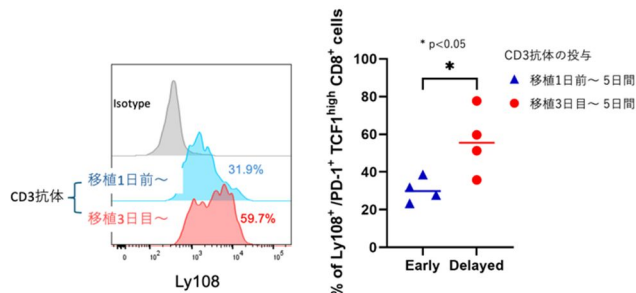


図4. 抗原感作モデルにおける抗CD3抗体の治療効果

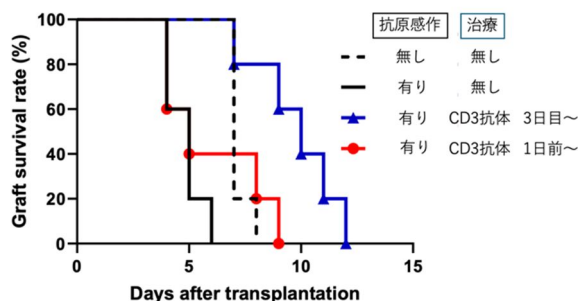
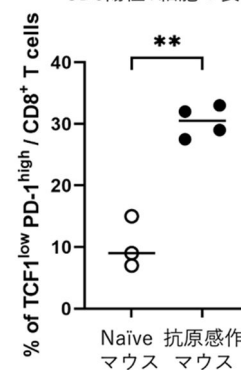


図5 混合リンパ球反応を示す CD8陽性T細胞の表現型



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ota Takuji, Goto Ryoichi, Harada Takuya, Forgioni Agustina, Kanazawa Ryo, Ganchiku Yoshikazu, Kawamura Norio, Watanabe Masaaki, Fukai Moto, Shimamura Tsuyoshi, Taketomi Akinobu	4. 巻 8
2. 論文標題 TCF1highPD-1+Ly108+CD8+ T Cells Are Associated with Graft Preservation in Sensitized Mice Treated with Non-Fc Receptor-Binding CD3 Antibodies	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 295 ~ 306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/immunohorizons.2300117	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 太田拓児、後藤了一、原田拓弥、Agustina Forgioni、巖築慶一、川村典生、渡辺正明、深井 原、嶋村 剛、武富紹信
2. 発表標題 アロ感作マウスを用いた異所性アロ心移植に対する抗CD3F(ab') ₂ の効果の検討
3. 学会等名 第122回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田拓児、後藤了一、原田拓弥、Agustina Forgioni、巖築慶一、川村典生、渡辺正明、深井 原、嶋村 剛、武富紹信
2. 発表標題 アロ感作マウスを用いた異所性アロ心移植に対する抗CD3F(ab') ₂ の効果の検討
3. 学会等名 第122回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ota T, Goto R, Kanazawa R, Shibuya K, Ganchiku Y, Kawamura N, Zaitzu M, Watanabe M, Fukai M, Shimamura T, Taketomi A
2. 発表標題 The Efficacy of Delayed Fc-nonbinding Anti-CD3 Antibody Treatment in Sensitized Allogeneic Mouse Heart Transplantation
3. 学会等名 American Transplant Congress
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田拓弥、後藤了一、巖築慶一、Agustina Forgioni、太田拓児、渡辺正明、川村典生、深井 原、嶋村 剛、武富紹信
2. 発表標題 冷阻血中NLRP3阻害によるマウス心グラフト保護効果の検討
3. 学会等名 第123回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>北海道大学院医学研究院消化器外科I 移植リサーチ ホームページ https://surg1.med.hokudai.ac.jp/wp-content/themes/surg1_sun/assets/pdf/research_report_transplant.pdf 北海道大学大学院医学研究院 消化器外科学教室I 研究グループのご紹介 移植グループ http://www.surg1-hokudai.jp/research/</p>

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
研究分担者	後藤 了一 (Goto Ryoichi) (10645287)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	
研究分担者	財津 雅昭 (Zaitzu Masaaki) (20768981)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101)	
研究分担者	渡辺 正明 (Watanabe Masaaki) (40789848)	北海道大学・医学研究院・特任講師 (10101)	

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
---------	---------