

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17547

研究課題名(和文)糖鎖修飾による免疫寛容誘導に関する研究

研究課題名(英文)Research on induction of immune tolerance by glycosylation

研究代表者

高橋 一広 (Takahashi, Kazuhiro)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80794528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：血液型不適合移植で使用するリツキシマブ(Rx)によるB細胞免疫寛容に着目し、Rx後のCD4とCD8の糖鎖変化解析を目的とした。人的要因で糖鎖解析ができなくなり、適合一致症例(N=4)と不適合症例(N=4)で術前(Rx投与前)、術後6か月のCD4とCD8のcoding RNA解析を行った。適合一致と不適合術後のCD4のRNA発現を比較すると、制御性T細胞(Treg)がB細胞活性化に関与するIL-10発現量が不適合移植後に7倍増加していた。Th2とCD8がB細胞活性化に関与するサイトカインに変化はなかった。RxがT細胞を介したB細胞免疫寛容に、TregのIL-10が関与している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

臓器移植の現状において、免疫抑制剤は移植片の生着を得るために必須であるが、免疫抑制剤に多彩な重篤な副作用があり、免疫抑制剤に頼らない免疫抑制療法が模索されている。実臨床では、機序不明の免疫寛容を経験することがあり、リツキシマブ投与後のB細胞に対する免疫寛容はその一例である。本研究では、当初目的とした糖鎖解析の変化を明らかにできなかったが、coding RNAを網羅的に解析し、リツキシマブがT細胞を介したB細胞の免疫寛容に関与する機構として、制御性T細胞のIL-10が関与している可能性が示唆された。本研究は、近年注目されている制御性T細胞による免疫抑制・免疫寛容誘導療法を後押しする結果となった。

研究成果の概要(英文)：We focused on B-cell immune tolerance induced by rituximab (Rx) used in blood group incompatible transplant (txp), and aimed to analyze glycan changes in CD4 and CD8 after Rx. Because human factors prevented glycan analysis, we performed coding RNA analysis of CD4 and CD8 before surgery (before Rx) and 6 months postsurgery in identical/compatible (N=4) and incompatible (N=4) txps. Comparing RNA expression of CD4 in identical/compatible and incompatible cases, IL-10 expression, in which regulatory T cells (Tregs) are involved in B cell activation, increased 7-fold after incompatible txp. No changes in cytokines involved in B cell activation by Th2 and CD8. IL-10 in Tregs may be involved in T cell mediated B cell immune tolerance after Rx.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫寛容 制御性T細胞 CD4T細胞 B細胞 リツキシマブ IL-10

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

免疫抑制剤は、拒絶反応を抑制し、移植片の長期生着を得るための必須な薬剤である。一方で、その適正血中濃度の幅は狭く、副作用のために致命的経過を辿ることもある。この問題を克服するため、免疫抑制剤に依存しない免疫抑制状態、つまり免疫寛容を誘導する研究が行われてきたが、確立された方法はない。臓器移植において、臨床的によく遭遇する免疫寛容の一例として、血液型不適合生体腎移植後に、抗 CD20 モノクローナル抗体のリツキシマブにより除去された B 細胞が末梢血中に戻ってきた後も、血液型抗体が産生されずに、抗体関連型拒絶反応が起きない現象がある。これは、B 細胞に対して免疫寛容が誘導されていることが想定されており、制御性 T 細胞が移植臓器局所的に IL-10 や TGF- $\beta$  などの免疫抑制性サイトカインを分泌することによる機序や、移植臓器抗原に対するエフェクター T 細胞のアレルギー反応の誘導による機序などが複合的に関与していることが想定されている。我々は、過去に、リツキシマブ使用後に T 細胞のマンノース系糖鎖発現が増加し、これが移植後長期に渡って保存されることを確認した。そこで、今まで移植免疫学で注目されてこなかった「糖鎖」に着目し、血液型不適合移植後の T 細胞の糖鎖発現を解析することで、免疫寛容を誘導する糖鎖を同定し、免疫寛容の誘導に応用できるかを検討することを研究開始時の目的としていた。

しかしながら、2020 年から始まった COVID19 禍により、筑波大学附属病院では、2020 年 4 月から生体腎移植を行うことが禁止された。その後、2020 年 11 月より生体腎移植は再開されたものの、血液型一致・適合移植のみが許可され、COVID19 含めウイルス感染に易感染性の血液型不適合生体腎移植の再開は許可されなかった。2021 年 9 月より血液不適合生体腎移植は再開したものの、安全面から依然として症例制限がかかり、件数を伸ばすことができなかった。

さらに、予定していた「糖鎖解析」を行う研究室から、人事的な要因で協力を得られなくなったことにより、別系での解析法が必要となった。

### 2. 研究の目的

CD4T 細胞および CD8T 細胞が血液型一致・適合生体腎移植または血液型不適合生体腎移植の術前後で発現する coding RNA の網羅的解析を行い、免疫寛容に関わる遺伝子を同定すること

### 3. 研究の方法

#### I. 対象患者

2022 年 11 月から 2023 年 9 月までに行われた血液型適合・一致生体腎移植患者または血液型不適合腎移植患者の各群 4 人の合計 8 人を対象とした。

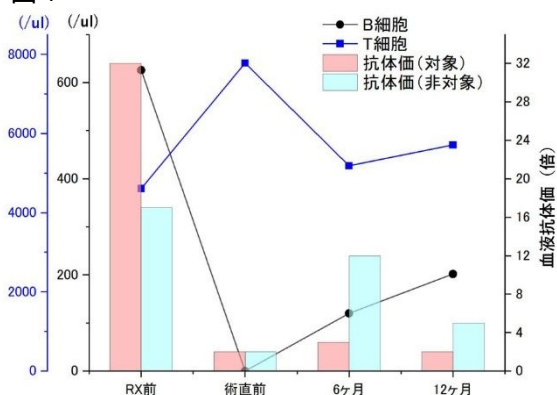
#### II. Coding RNA の抽出と解析

CD4 細胞 CD8 細胞は、患者血液検体からそれぞれ抽出キット (RosetteSep-human CD4 T Cell Enrich Cocktail) または (RosetteSep-human CD8 T Cell Enrich Cocktail) を用いて抽出した。RNA 分離は、各細胞の凍結サンプルを 37 度で融解後に、4000rpm で 3 分遠心後に、ペレットを TRIzol<sup>®</sup> で懸濁後し、使用時まで -20 度で保存した。単離した全 RNA の品質は、RNA 6000 Pico Kit で評価した。2.5ul の RNA を、SMART-seq Stranded Kit を用いて、ハーフボリュームスケールでシーケンスライブラリー合成に使用した。シーケンスリードは、マウスゲノム (mm10) にマッピングし、CLC Genomics Workbench (V10.1.1) CLC Genomics Workbench にマッピングした。転写発現レベルは CLC Genomics Workbench "normalized values" によって決定した。発現の差は、CLC Main Workbench の DGE (edgeR test) ツールを用いて経験的に解析した。

### 4. 研究成果

#### I. 血液不適合移植の周術期における T 細胞数、B 細胞数、血液抗体価 (対象、非対象) の推移

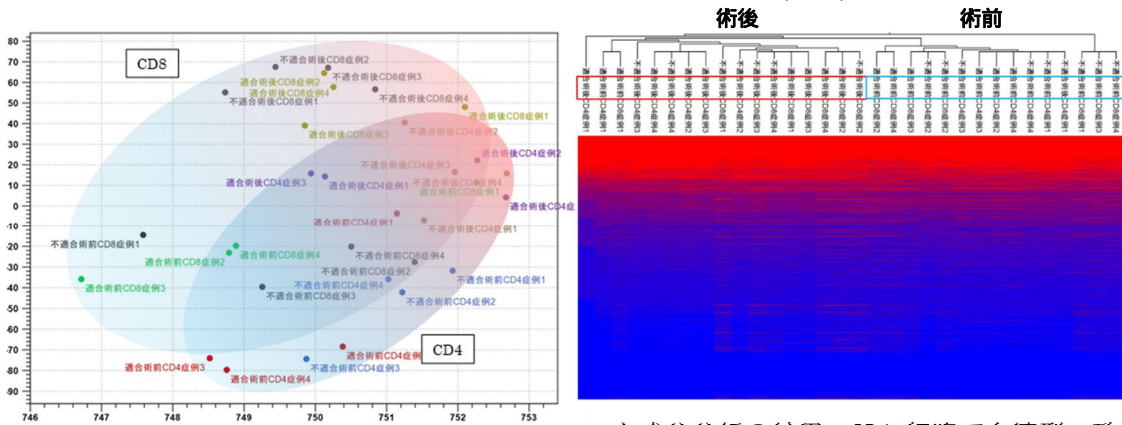
図 1



Rx: リツキシマブ

脱感作を行うことによって、B 細胞は消失したが、術後 6 ヶ月で術前の 1/6 程まで戻り、1 年後には 1/3 程まで戻った。一方、T 細胞は脱感作により一時的な上昇を認め、術後 6 ヶ月、12 ヶ月で術前とほぼ同じ値にまで戻った。非対象側の血液型 IgG 抗体は、脱感作により 2 倍まで低下し、術後 6 ヶ月、12 ヶ月で、血液型抗体の上昇を認めなかった。一方で、非対応側の血液型 IgG 抗体も、脱感作により 2 倍まで低下し、術後 6 ヶ月、12 ヶ月で抗体価の上昇を認めた。以上のことから、術後 6 ヶ月の時点で B 細胞は末梢血に戻っているものの、ドナーに対応する血液型抗体のみに対する「免疫寛容」が起きていることを確認した。

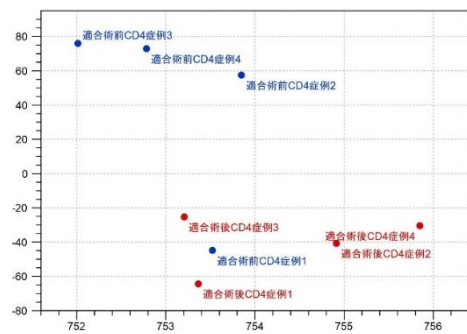
II. 全症例（血液型適合・一致/不適合、CD4 細胞、CD8 細胞、術前後の合計 16 サンプル）主成分分析（図 2）



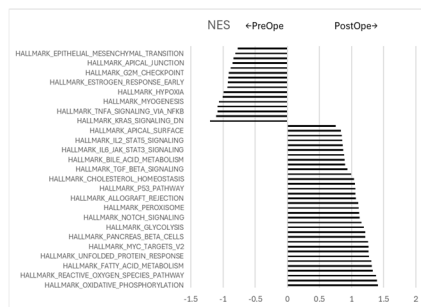
主成分分析の結果、CD4 細胞で血液型一致・適合移植と不適合移植の術前後でクラスタリングされた（図 2）。CD8 細胞も血液型一致・適合移植と不適合移植の術前後でクラスタリングされた（図 2）。ヒートマップでは、CD4 細胞/CD8 細胞/一致適合/不適合に関係なく、術前後でクラスタリングされた（図 3）。

III. 血液型一致・適合移植前後の CD4 細胞の coding RNA の変化

主成分分析（図 4）



Gene set enrichment analysis (GSEA) (図 5)

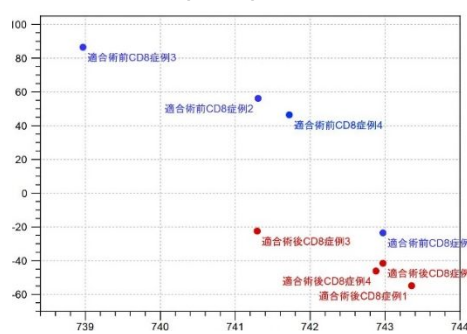


主成分分析において、術前後でクラスタリングされていた（図 4）。術後上昇する pathway として、Oxidative phosphorylation (p<0.01), MYC targets (p<0.01), reactive oxygen

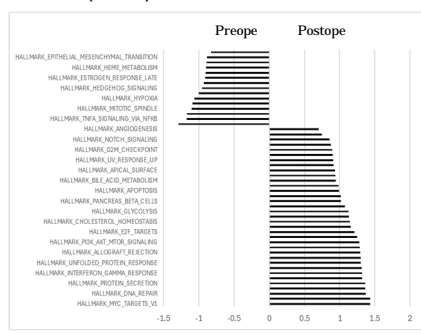
species pathway (p<0.01), DNA repair (p=0.04), fatty acid metabolism (p=0.02), adipogenesis (p<0.01) で有意に上昇していたが、術後低下する pathway を認めなかった（図 5）。Allograft rejection pathway では有意な変化を認めなかった (p=0.36)。

IV. 血液型一致・適合移植前後の CD8 細胞の coding RNA の変化

主成分分析（図 6）



GSEA (図 7)

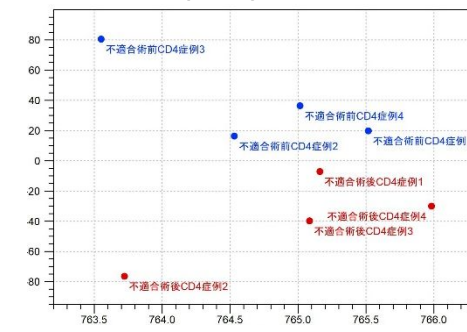


主成分分析において、術前後でクラスタリングされていた（図 6）。術後上昇する pathway として、MYC targets (p<0.01), Oxidative phosphorylation (p<0.01), DNA repair (p<0.01),

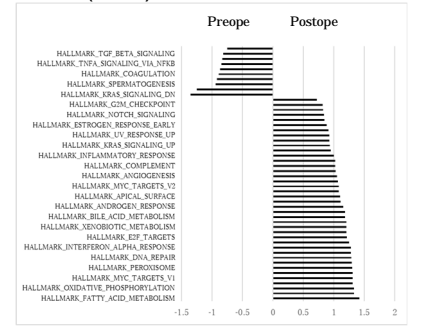
adipogenesis (p<0.01), protein secretion (p=0.02), fatty acid metabolism (p<0.01) で有意に上昇していた。Kras signaling down regulation pathway で術後に有意に低下していた (p<0.01)。Allograft rejection pathway では有意差を認めなかった (p=0.07, 図 7)。

V. 血液不適合移植術前後の CD4 細胞の coding DNA RNA の変化

主成分分析（図 8）



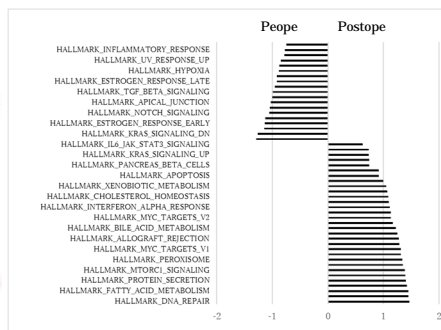
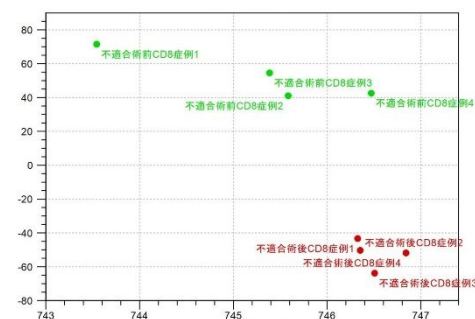
GSEA (図 9)



主成分分析において、術前後でクラスター分離できた（図 8）。術後上昇する pathway として、fatty acid metabolism (p<0.01)、Oxidative phosphorylation

( $p=0.04$ ), Glycolysis ( $p=0.02$ ), adipogenesis ( $p=0.02$ ), peroxisome ( $p<0.01$ )で、有意に上昇していた。有意ではなかったが、MTORIC1 signaling ( $p=0.06$ )、MYC targets ( $p=0.06$ )、protein secretion ( $p=0.06$ )、DNA repair ( $p=0.06$ )で上昇する傾向にあった。一方、Kras signaling down regulation pathway で有意に低下していた ( $p<0.01$ , 図 9)。

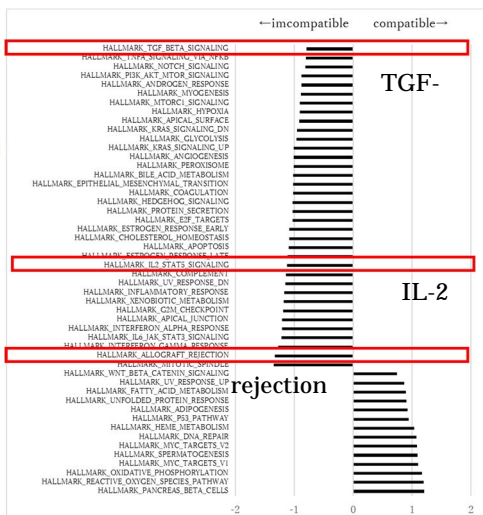
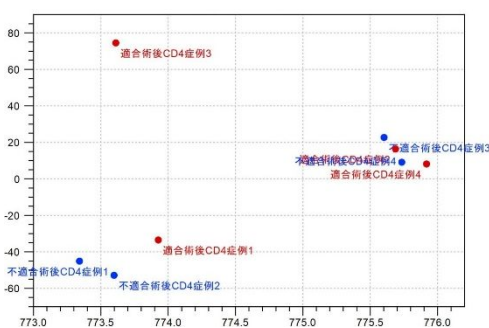
### VI. 血液不適合移植術前後の CD8 細胞の coding RNA の変化 主成分分析 (図 10) GSEA(図 11)



主成分分析において、術前後でクラスター分離できた(図 10)。術後上昇する pathway として、DNA repair ( $p<0.01$ )、Oxidative

phosphorylation ( $p<0.01$ ), fatty acid metabolism ( $p<0.01$ ), E2F targets ( $p=0.03$ ), Protein secretion ( $p<0.01$ ), reactive oxygen species pathway ( $p=0.03$ ), MTORIC1 signaling ( $p=0.03$ ), adipogenesis ( $p<0.01$ ), peroxysome( $p=0.02$ ), PIK-AKT-MTOR signaling( $p=0.03$ ), androgen response ( $p=0.04$ )で有意に上昇していた。Kras signaling down regulation pathway で術後に有意に低下していた ( $p<0.01$ )。Allograft rejection pathway では有意な変化を認めなかった ( $p=0.17$ , 図 11)。

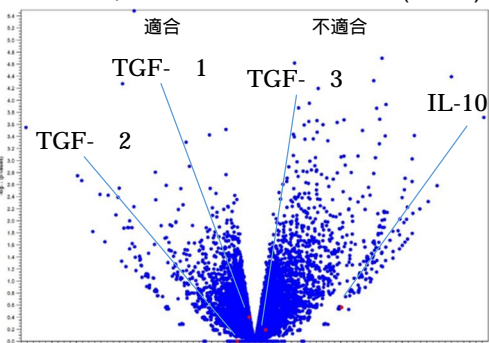
### VII. 血液型一致・適合移植後 CD4 細胞と血液型不適合移植後 CD4 細胞の coding RNA の変化 主成分分析 (図 12) GSEA(図 13)



主成分分析において、一致・適合移植、不適合移植でクラスター分離することができなかった。不適合移植術後で適合移植術後に比較して、mitotic spindle

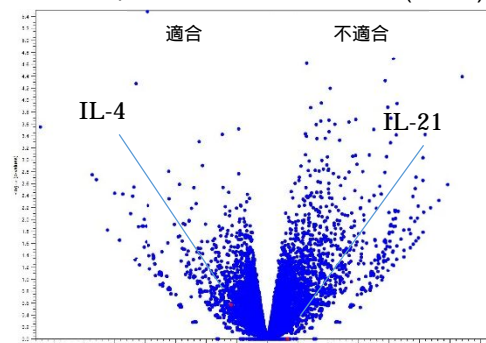
( $p=0.04$ )、allograft rejection ( $p=0.04$ )、apical junction ( $p=0.03$ )での有意な上昇を認めた。TGF- および IL-2 において優位差を認めなかった ( $p=0.84$ ,  $p=0.26$ )。

TGF- , IL-10 の volcano Plot (図 14)



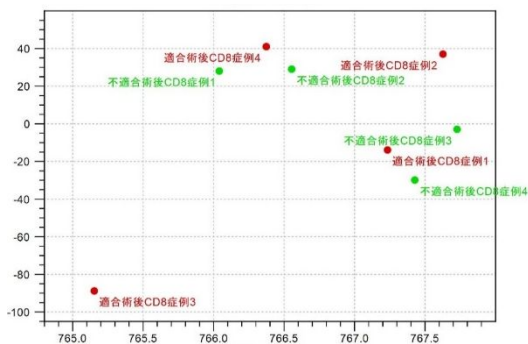
TGF- 1, fold change=-1.13 ;  $p=0.40$ , TGF- 2, fold change=-1.48 ;  $p=1.00$   
TGF- 3, fold change=1.28 ;  $p=0.65$ , IL-10, fold change=7.10;  $p=0.27$ (図 14)

IL-4, IL-21 の volcano Plot (図 15)

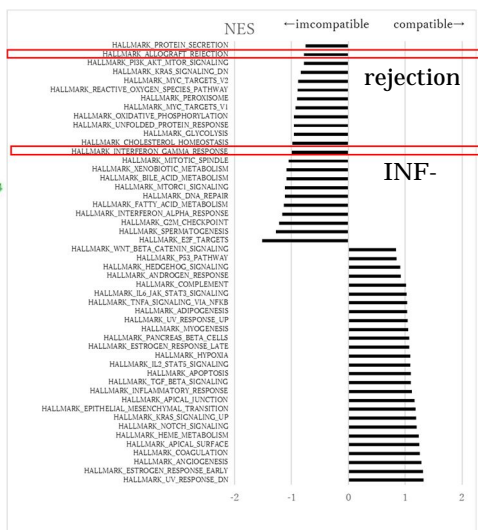


IL-4, fold change=-0.45 ;  $p=0.27$ , IL-21, fold change=1.59;  $p=1.00$ (図 15)

VIII. 血液型一致・適合移植後 CD8 細胞と血液型不適合移植後 CD8 細胞の coding RNA の変化主成分分析 (図 16)



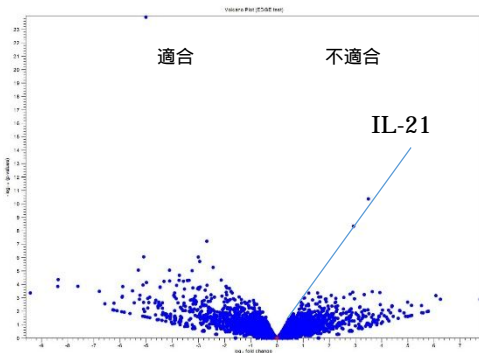
GSEA(図 17)



主成分分析において、一致・適合移植、不適合移植でクラスター分離できなかった(図 16)。不適合移植術後に比較して、UV response pathway の

有意な低下を認めた ( $p < 0.01$ ) が、E2F targets pathway の有意な上昇を認めた。Allograft rejection、INF- では有意な変化を認めなかった (各  $p = 0.94$ ,  $p = 0.37$ 、図 17)。

IL-21 の volcano Plot(図 18)



IL-21, fold change=1.00;  $p = 1.00$ (図 18)

IX. 考察

本研究において、リツキシマブによる血液不適合移植術後の B 細胞及び血液型抗体価 (IgG) に対する影響を調べると、術直前にはリツキシマブにより B 細胞は完全に除去され、併せて血漿交換により血液型抗体も低下した。しかしながら、約 6 か月後には B 細胞は末梢血に戻り始め、ドナー抗原に対応する血液型抗体価の上昇はなく、非対応側の血液型抗体は IgG 抗体価の上昇を認めた。これは、新しく骨髓で形成された B 細胞が、ドナー抗

原選択的に“中枢性”免疫寛容を獲得していることが考えられた。

移植手術そのものの影響を見るために、血液一致・適合移植前後の CD4T 細胞および CD8T 細胞の術前後の coding RNA の発現を比較したところ、共に酸化的リン酸化関連遺伝子群、脂肪代謝関連遺伝子群、DNA 修復遺伝子群などの発現が有意に上昇しており、それぞれの細胞の活動性が上昇していることが示唆された。また、MYC 経路は、CD4T 細胞の活性化や増殖に関与する遺伝子であると同時に、ミトコンドリアの整合性や酸化的リン酸化に関与していることが知られており、本結果における MYC 関連遺伝子群の発現上昇は、酸化的リン酸化関連遺伝子群の発現上昇に関連していると考えられた。また、経過中に明らかな拒絶反応を示さなかったことを反映して、拒絶反応関連遺伝子の発現に差を認めなかった。

CD4T 細胞の血液型不適合移植術前後において、上記で示した血液一致・適合移植前後に認められた活発な代謝変化に加え、mTOR 遺伝子群の発現が上昇する傾向を認めた。mTOR 経路は、CD4T 細胞の細胞分化や活性化に関与しており、特に CD4T 細胞の一つである Th2 細胞は、B 細胞の活性化や抗体産生に関与することが知られている。本結果では、mTOR 関連遺伝子の発現の上昇は、減少した B 細胞に対して、Th2 細胞が代償的に活性化と抗体産生を促していることによるものと推測された。一方で、CD8T 細胞の血液型不適合移植術前後において、特記すべき変化は認められなかった。

CD4T 細胞の一つである制御性 T 細胞は TGF- や IL-10 産生し、B 細胞の増殖、活性化、抗体産生を抑制し、免疫応答の過剰な活性化を防ぎ、免疫寛容の維持に寄与することが知られている。本研究では、血液型適合・一致と血液型不適合移植術後の CD4T 細胞の遺伝子発現を比較したところ、TGF- 関連遺伝子群に変化はなかったものの、拒絶反応関連遺伝子群の有意な上昇を認めた。その中で、IL-10 は有意差を認めなかったものの、平均発現量が 7 倍と大きく増加していた。一方、Th2 細胞の B 細胞分化・活性化に関与する IL-4 と IL-21 に変化は見られなかった。また、CD8T 細胞が、B 細胞の活性化や抗体産生に直接的に関与する IL-21 や、間接的に関与する INF- において、有意な変化を認めなかった。

結論として、リツキシマブが T 細胞を介した B 細胞の中枢性免疫寛容に関与する機構として、制御性 T 細胞の IL-10 が関与している可能性が示された。同時に、リツキシマブの Th2 細胞に対する影響や CD8T 細胞を介する機構の影響は大きくないことが推測された。今後、CD4 + T 細胞をより詳細に分離・解析し、遺伝子発現の変化を調べる必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 高橋一広
2. 発表標題 生体腎移植術後のT細胞糖鎖発現変化についての考察
3. 学会等名 臨床腎移植学会
4. 発表年 2022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
研究協力者	古屋 欽司 (Furuya Kinji) (20867915)	筑波大学医学医療系消化器外科  (12102)	
研究協力者	中橋 宏充 (Nakahashi Hiromitsu)	筑波大学消化器外科  (12102)	

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