

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791249

研究課題名 (和文) $\gamma\delta$ T細胞を用いた新しい免疫制御法の確立研究課題名 (英文) The research for immunotherapy used by $\gamma\delta$ T cells

研究代表者

吉澤 淳 (YOSHIZAWA ATSUSHI)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：60457984

研究成果の概要 (和文)：生体部分肝移植を行った後、術後長期経過した小児レシピエントの末梢血液中に $\gamma\delta$ T細胞が増殖していることが判明した。その $\gamma\delta$ T細胞はその T cell receptor の V δ 鎖は V δ 1を有しており、さらにその可変領域が限局し、単一なクローンの増殖を認めた。健康人末梢血から分離した $\gamma\delta$ T細胞を *in vitro* で増殖させると、その $\gamma\delta$ T細胞は免疫活性化試験において、T細胞の増殖を抑制することを確認した。この細胞群を用いて養子細胞を用いた免疫抑制療法の開発へとつなげていきたい。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we found the increase of $\gamma\delta$ T cells in the peripheral blood from pediatric living donor liver transplantation recipients. The feature of $\gamma\delta$ T cells from recipients is the oligoclonal expansion; the TCR of $\gamma\delta$ T cell showed V δ 1 TCR and the variable region of V δ 1 chain showed monoclonality. We succeeded the expansion of $\gamma\delta$ T cell from PBMC of healthy volunteers *in vitro*, and those T cells showed the immunosuppressive activity. These immunosuppressive T cells will be applied to new immunosuppressive therapy by transfer of the cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、外科学一般

キーワード：肝移植、移植免疫、 $\gamma\delta$ T細胞

1. 研究開始当初の背景

生体部分肝移植を施行された小児患者において免疫抑制剤を減量または中止できる状態、いわゆる免疫寛容状態が成立している患者がいる。しかし、その免疫寛容を維持している機構について解明はいまだ進んでいない。我々は、免疫寛容状態にある患者において末梢血中の $\gamma\delta$ T細胞が増殖していることを発見した。

この免疫寛容状態にある患者群において $\gamma\delta$ T細胞は健康人、免疫抑制中の肝移植レシピエント患者とことなり、V δ 1TCRを有する $\gamma\delta$ T細胞が増加し、V δ 2TCRを有する $\gamma\delta$ T細胞が減少するという特徴を有していた。このため、 $\gamma\delta$ T細胞が免疫寛容の維持に関与していると考え、このV δ 1 $\gamma\delta$ T細胞が増殖するメカニズムおよび、V δ 1 $\gamma\delta$ T細胞の免疫抑制のメカニズムを

解析することにより、 $V\delta 1 \gamma\delta T$ 細胞を用いた免疫療法への応用を考えた。

2. 研究の目的

(1) 免疫寛容状態にある移植患者における増加している $\gamma\delta T$ 細胞が免疫抑制療法を行っている肝移植後レシピエントや健常人との差異をしらべることにより、免疫寛容状態の維持に関与している $\gamma\delta T$ 細胞を同定する。免疫寛容状態の肝移植後のレシピエントの免疫抑制作用のメカニズムを解明し、免疫寛容状態の維持への関与していることの証明、および、 $\gamma\delta T$ 細胞増殖のメカニズムの解明をおこなう。

(2) 免疫制御に作用する $\gamma\delta T$ 細胞があるリガンドに反応することを証明する。その増殖シグナルのためのリガンドが同定することで、リガンドとなる物質を用いて免疫抑制効果を示すかどうか、また、そのリガンドになる物質を中和することで免疫抑制作用を中和することができるかどうかで、免疫賦活するときにはその物質を用いた免疫療法の確立を行う

3. 研究の方法

(1) ①移植後、免疫寛容状態になっているレシピエント、免疫抑制療法を行っている肝移植後レシピエント、健常人から末梢血を採取して $\gamma\delta T$ 細胞の分画、表面抗原および細胞内 perforin を染色してフローサイトメトリーを行うことにより、活性化の有無を調べた。さらに、PHA を添加して6時間後に細胞内サイトカインを調べることで、サイトカインの分泌能を調べた。

②肝移植後、免疫抑制剤を中止したレシピエント、免疫抑制療法を行っているレシピエント、健常人から末梢血を採取し、 $V\delta 1 \gamma\delta T$ 細胞をフローサイトメトリーで sorting を行い、その $V\delta 1 \gamma\delta T$ 細胞の mRNA を抽出して RT-PCR を行う。その後、 $V\delta$ 鎖の PCR を行い、その後、sequence を解析することで、 $V\delta$ 鎖の配列の可変部を調べた。 $V\delta$ 鎖がどのようなクローンで増殖しているかを調べる。これが monoclonal な増殖をするのならば、その TCR に対してリガンドが作用していると考えられる。その TCR が polyclonal であれば、リガンドは TCR 以外のレセプターを介して増殖していると考えられるため、TCR 以外のレセプターについて調べることにした。

③肝移植後レシピエントのグラフト肝生検組織から、肝組織内の $\gamma\delta T$ 細胞の存在、その TCR について調べるため、肝組織から RNA を抽出して、PCR を行った。

末梢血中の $\gamma\delta T$ 細胞が移植臓器の中でどのように作用しているかそして、その TCR が肝組織内の $\gamma\delta T$ 細胞と共通するかに

ついて調べる。

(2) 健常人から提供された $\gamma\delta T$ 細胞を増殖させ、その中から免疫寛容状態の患者の末梢血中に存在する $\gamma\delta T$ 細胞と同様の profile を sorting して機能評価を行う。増殖した $\gamma\delta T$ 細胞から TCR を sequence して免疫抑制作用を持つ $\gamma\delta T$ 細胞の TCR をクローニングをして、テトラマーを作成してリガンドの検索を行う。

4. 研究成果

(1) 肝移植後、免疫抑制剤を中止した、いわゆる免疫寛容状態になっているレシピエントでは $\gamma\delta T$ 細胞の増殖があり、 $V\delta$ 鎖が $V\delta 1$ 鎖をもつ $\gamma\delta T$ 細胞が増殖していた。健常人および、免疫抑制状態の患者群では $V\delta 2$ 鎖をもつ $\gamma\delta T$ 細胞が主である。 $V\delta 1 \gamma\delta T$ 細胞の活性化状態を調べるために表面抗原をフローサイトメトリーで評価を行った。CD69, CD62L, HLA-DR を調べたが、有意差を持って免疫寛容状態の肝移植後レシピエントの $V\delta 1 \gamma\delta T$ 細胞が活性化していることが判明した。その $V\delta 1 \gamma\delta T$ 細胞は CD45RO が陽性であり、memory cell type の $V\delta 1 \gamma\delta T$ 細胞が増加していることが判明した。

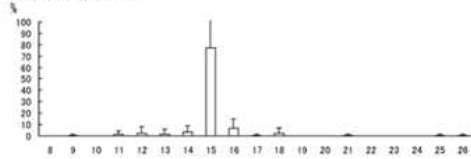
現在、免疫寛容状態のレシピエントの末梢血中で免疫状態を反映する指標は現在認めていない。今回、 $V\delta 1 T$ 細胞の増殖、および、活性化は免疫抑制療法を行っている肝移植後レシピエントには認めない所見である。症例数を増やすことで、この $V\delta 1 T$ 細胞の所見が免疫寛容の指標となる。この所見は今後の免疫抑制療法の調整に有用である可能性が高い。

この免疫寛容状態の患者の $V\delta 1 \gamma\delta T$ 細胞は増殖シグナルであるリガンドによって活性化して増殖していると考えられたため、増殖シグナルがはいる経路として TCR を介しているかを調べることにした。

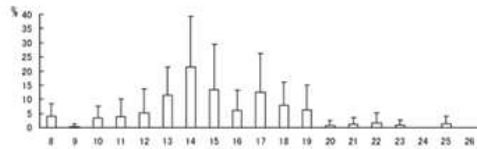
そこで、免疫寛容状態のレシピエントの $V\delta 1 \gamma\delta T$ 細胞の TCR を調べることにした。免疫後レシピエントの末梢血中の $\gamma\delta T$ 細胞を分離して、その TCR の $V\delta 1$ 鎖の可変領域を調べると、免疫寛容患者には monoclonality が見られた。その clone は免疫寛容の他の患者についても共通であった。一方、同様の clone は健常人や肝移植後の免疫抑制療法を行っている患者にも同様に観察することができた。しかし、健常人や免疫抑制中の肝移植後患者の $\gamma\delta T$ 細胞にはこのような monoclonality は見られず、さらにそのような clone が増殖していることはなかった。免疫寛容状態および一部の免疫抑制中の患者にのみある特定の TCR を有した $V\delta 1 \gamma\delta T$ 細胞の増加を認めた。

Vδ1 γδT細胞のTCRの可変部のCDR3のsize(AA)

免疫寛容患者

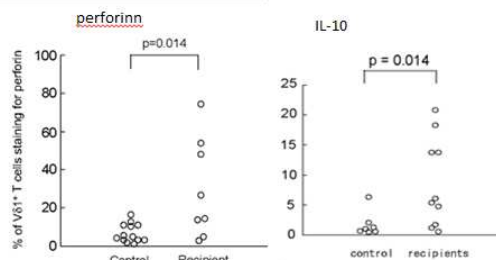


免疫抑制療法中の患者



免疫寛容の患者の末梢血中の $\gamma\delta$ T細胞のサイトカインの分泌を見ると、IL-10の分泌がみられた、さらに、細胞内 perforin も陽性であった。細胞傷害活性を有しながら、Th2 サイトカインを分泌する細胞であることが推察されていた。一方、コントロールである健常人ではサイトカインの分泌と細胞内の perforin を認めなかった。

更に、ドナーとのリンパ球混合試験を行ったところ、免疫寛容患者においてT細胞の免疫応答を抑制的に働いていることが判明した。しかし、ドナー特異的ではなかったため、過剰免疫を抑制する方向に働く制御性細胞



ではないかと推察された。

次に、免疫寛容患者における、肝臓内の $\gamma\delta$ T細胞について研究を行った。移植後肝生検組織から、RNAを抽出して、 $\gamma\delta$ T細胞のTCRについて、同様にVδ1鎖の可変領域についてPCRの手法を用いて、その可変領域のsequenceを行った。肝臓内のVδ1 $\gamma\delta$ T細胞のTCRは検出されない症例も見られた。検出された症例では、monoclonalであったが、末梢血中にみられたcloneと異なっていた。そのため、肝内から検出されたVδ1 $\gamma\delta$ TCRのclonalityについてはその意義は判然としなかった。

この研究から、Vδ1 $\gamma\delta$ T細胞が免疫寛容患者において免疫抑制的に作用している

と考えられる細胞群であった。しかし、実際に、グラフト肝の中で作用しているかどうかについては、肝内の $\gamma\delta$ T細胞のTCRについては組織切片からとれるRNAが少量であることから機能評価は困難であった。グラフト肝生検組織を免疫染色を行って調べる必要があると考えた。現在、組織染色を行うためにVδ1TCRに対する抗体を作成している。

(2) 健常人の末梢血中からVδ1 $\gamma\delta$ T細胞を分離して、PHAで刺激を行っていきから、IL-2を添加しながら、増殖培養を行った。PHAで増殖刺激を入れてから、増殖させた細胞では免疫応答を抑制しなかった。

しかし、同様に健常人の末梢血からVδ1 $\gamma\delta$ T細胞を採取し、同じ健常人から採取した末梢血中のリンパ球をアロ抗原で活性化したリンパ球を放射線照射したのちに共培養を行い、その後、IL-2を加えながら増殖培養したVδ1 $\gamma\delta$ T細胞はアロ抗原に対するリンパ球の免疫応答を強く抑制した。さらに、リンパ球にPHAの刺激によるリンパ球からのサイトカイン分泌を調べると、IFN- γ 、IL-2の産生を有意に抑制させ、IL-10の分泌を認めた。健常人から採取したVδ1 $\gamma\delta$ T細胞をある条件下(ある抗原下で)増殖させることで免疫抑制性の $\gamma\delta$ T細胞を作成することが可能であったことが判明した。この増殖を行った免疫抑制性の $\gamma\delta$ T細胞のTCRのsequenceを行ったがpolyclonalであった。その一部に免疫寛容状態の患者にみられたTCRのsequenceをみとめた。

(3) 特異的なVδ1 $\gamma\delta$ T細胞のTCRのクローンに対するリガンドを作成するためにTCRの γ 鎖のパターンを調べた。 γ 鎖もoligoclonalであったため、TCRの $\gamma\delta$ 鎖は単一のクローンを持っている可能性は高いと考えられた。

$\gamma\delta$ T細胞の増殖を行って、そのTCRに対するリガンドを検索しているが、リガンドの同定には至らなかった。

まず、単一のクローンのTCRの $\gamma\delta$ T細胞を同定して、sortingするため、目的とするTCRに対するモノクローナル抗体の精製を試みているが、作成に至っていない。クローンの作成が可能になれば、リガンドの精製が可能になると考えられる。

また、肝内の $\gamma\delta$ T細胞のうち、この特定のクローンの $\gamma\delta$ T細胞の増殖の証明を行うことで、この $\gamma\delta$ T細胞がグラフト肝内で免疫抑制のメカニズムに関与していることが推察される。

今回の研究課題では、免疫抑制作用を有する $\gamma\delta$ T細胞が特定のTCRを有して増殖

することが判明し、そのクローンのTCRの塩基配列が判明した。その塩基配列をもつTCRに対するモノクローナル抗体の精製とそのTCRに対するリガンドの同定、精製を行っている。

上記の件については、抗体の精製およびリガンドの同定が行われていないために、まだ、論文、学会などへの発表は行っていない

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 0件)

[学会発表] (計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉澤 淳 (YOSHIZAWA ATSUSHI)
京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：60457984