

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790200

研究課題名(和文) 制御性T細胞誘導機構の免疫組織学的解析

研究課題名(英文) A mechanism for Regulatory T cell induction by DST, In vivo immunohistological analysis.

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) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：DST(ドナー血液輸血療法)は移植に伴う拒絶反応を抑制することが知られており、ドナー特異的Treg細胞誘導やドナー抗体産生などの可能性が示唆されている。我々は、輸血血液成分の何が、このDST効果をどのようなメカニズムで誘導するのかを検討した。その結果、輸血血液中のT細胞が最も強いDST効果をもつこと、レシピエント脾臓のT細胞領域に遊走して在住する抗原提示細胞に貪食・抗原提示されることにより、免疫応答を誘導することが確認された。これにより、初めてDST効果の全貌が明らかになり、臨床応用としてドナーT細胞によりTreg細胞応答や抗体産生を誘導するワクチン開発に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is known that Donor-specific blood transfusion(DST) and additional organ transplantation induces antigen-specific regulatory T cells (iTreg). However, its mechanism is still unknown. We examined which blood components could induce this effect and its mechanism. We found that, T-cells in the blood could induce alloresponse most efficiently in the PALS, because the trafficking pattern of recirculating T-cells in the spleen were designed to freely enter the PALS and cluster with the resident DCs, thus having a chance to provide alloantigen to DCs. This study has revealed the precise mechanism for first time. T-cells pulsed with antigens might be applicable as a vaccine vector, being efficiently targeted on the resident DCs for the prophylactic antibody production.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般

キーワード：制御性T細胞 ethynyl deoxyuridine 細胞増殖 移植免疫応答 ドナー特異的輸血 フェノタイプ解析
多重免疫染色 細胞相互作用

1. 研究開始当初の背景

移植医療における拒絶反応とは、レシピエント(患者)がドナー臓器を異物として認識し、主としてT細胞が移植臓器を攻撃する免疫反応である。これを防ぐため、患者は一生免疫抑制剤を飲み続けなければならないが、免疫系全体が抑制されるため、感染や発ガンなどの副作用が避けられない。従って、ドナーに対する免疫反応性をのみを抑える事ができれば理想の治療法となる。1970年代に腎移植の前に、ドナー血液の輸血(ドナー特異的輸血、DST)を行うと、ドナーに対する免疫反応のみが特異的に抑制されることが臨床現場から報告されたが、そのメカニズムは不明であった。その後、容易に拒絶反応を抑制できるサイクロスポリンやFK506の登場によりDSTは、下火になった。

しかし、1995年に制御性T細胞(Regulatory T cell:Treg)が発見され、DSTによってもTreg細胞が誘導される可能性が報告された(PLoS One 2009)。Treg細胞は、CD4陽性(+)CD25+FoxP3+(J Immunol 1995)であり、CTLA-4(Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4)など多くの制御因子を有していることから免疫抑制のツールとして期待されている。

一旦し、移植免疫における誘導性Treg細胞(iTreg)については、未だ不明な点が多く、ドナー血液中のどの成分がiTreg細胞を誘導するのか、ホスト内での産生部位と増殖・分化のパターンやドナー抗原感作のメカニズム、等々、まだ未解明な部分が多い。

本研究室のこれまでの研究から、DST処置後のラット同種異系肝移植のモデルで、拒絶反応の抑制効果と、主にレシピエント脾臓のT細胞領域(PALS)でFoxP3陽性Treg細胞の増殖性応答の所見が得られた(未発表)。さらに、この増殖性応答の場を形態学的に解析するため、多重蛍光染色が可能でサイミジンアナログ(ethynyl deoxyuridine, EdU)を用いた新たな免疫組織学的手法を予備実験により確立しつつある。

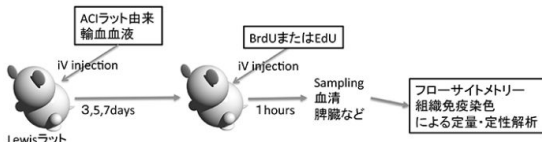
2. 研究の目的

DST処置後の免疫応答によるTreg細胞誘導メカニズムを、*in vivo* 器官レベルで形態学解析により解明して、肝移植後の拒絶反応抑制におけるTreg細胞の役割を考察することが目的である。具体的には、EdUを用いたドナー特異的輸血(DST)効果の解析法の確立、iTreg細胞を誘導するドナー血液中の有効成分の検索、脾臓T細胞領域(PALS)でのドナー抗原提示のメカニズム解析、肝移植モデルにおけるDSTによる免疫寛容誘導効果の解析である。

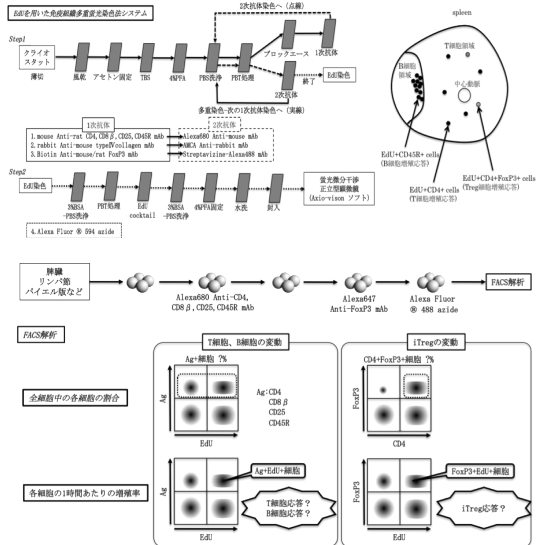
3. 研究の方法

EdUを用いたドナー特異的輸血(DST)効果の解析法の確立
同種異系ラットにDST処置(新鮮血1mL

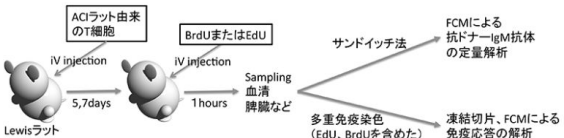
を静脈内投与)し、3日および5日後にEdUを投与して増殖細胞を標識後、犠牲死させ、脾臓やリンパ節などの2次リンパ器官を採取する。各器官の凍結切片と細胞懸濁液を作製し、EdU蛍光プローブと細胞特異的CD抗原に対する蛍光標識抗体との併用により多重蛍光免疫組織学的解析(IS)およびフローサイトメトリーによる定量的解析(FCM)を行なう方法を確立する(予備実験済)。ドナーにはACIラット(RT1a)を、レシピエントにはLewisラット(RT1l)の組織適合抗原(MHC型および型)全不適合の組み合わせを主に用いる。



ISでは、4重蛍光抗体法(CD抗原、型コラーゲン、FoxP3、EdU)にて解析し、FCMでは、3重蛍光抗体法(2種類のCD抗原とEdU)を行ない、T細胞、B細胞、亜集団の増殖率と百分比の経時的動態を解析する。

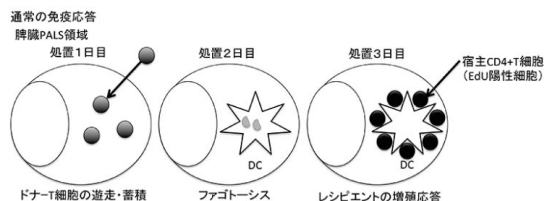


ドナー血液成分によるiTreg細胞の誘導能
ドナー輸血血液成分から各種血球や液性分画(赤血球、T細胞、B細胞、血小板、血清など)を精製し、同種異系ラットに投与後、2次リンパ器官でTreg細胞の増幅性応答の誘導能を比較検索する。また、DST効果が知られている抗ドナー抗体産生応答についても解析を行う。予備実験でT細胞が最も誘導効果があることを確認している。

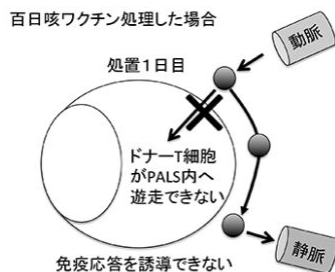


脾臓T細胞領域(PALS)でのドナー抗原感作のメカニズム解析
ドナーT細胞投与後1,2日目のレシピエント脾臓の凍結切片を作製し、ドナー特異的

MHCI 抗体 (ドナーT 細胞) とレシピエント特異的 MHC 抗体 (レシピエント抗原提示細胞) で多重染色して、ドナーT 細胞の運命と、レシピエント抗原提示細胞の反応を解析する。予備実験で、ドナーT 細胞が殺されてレシピエント抗原提示細胞に貪食され、その後、レシピエントT 細胞応答が起こる、いわゆる間接感作がドナー抗原提示のメカニズムであることを確認している。レシピエントT 細胞の免疫応答については、EdU を追加した蛍光多重染色法による細胞集塊形成により解析する。



さらに百日咳ワクチンでドナーT 細胞の遊走を抑えた場合の免疫応答を調べて、一連の免疫応答を誘導するためにドナーT 細胞が粉-抗原提供のため、PALS 内へ遊走することが必要であることを確認する。



肝移植モデルにおける DST による免疫寛容誘導

同種異系ラットに DST 成分処置後、7 日目に肝移植を行い、2 次リンパ臓器並びに移植肝にて iTreg 細胞を同様の解析方法を用い、DST 効果に伴う Treg 細胞の誘導並びに後のアロ移植における免疫寛容への役割について全貌を明らかにする。

尚、本研究で用いた実験動物の使用方法は、本大学動物実験規程 (本大学ホームページの実験動物センターにて情報公開) に基づき適正に行われている。

4. 研究成果

EdU を用いたドナー特異的輸血 (DST) 効果の解析法の確立

DST 処置後のレシピエント脾臓について、EdU を用いた多重免疫蛍光染色法により、CD4 陽性 T 細胞や FoxP3 陽性 T 細胞の増殖応答を切片レベルと細胞レベルで定性的・定量的に並行解析することに成功した。これにより、DST による免疫応答の解析が可能になった。

(論文作成中により一部のデータを公開)

a. FCMによる定量解析

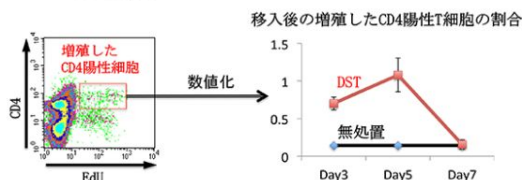


図1. ドナー輸血血液移入後の脾臓での CD4 陽性細胞における増殖応答。移入 3, 5, 7 日目の脾臓由来の CD4 陽性細胞の増殖応答。

ドナー輸血血液成分による iTreg 細胞の誘導能

成果 の解析法を用いて、輸血血液成分を分離・比較したところ、T 細胞が最も効率的に Treg 細胞増殖を誘導することがわかった (ドナー輸血血液成分を移入した各群の解析結果は未公開。ドナー輸血血液移入 3 日目の脾臓の組織染色のみ図 2 にて公開)。

また、DST 効果として知られている抗ドナー抗体産生については、各輸血血液成分移入群の血清中における抗ドナー抗体を解析したところ、最も効率的に抗ドナー抗体産生を誘導したのも T 細胞であることが確認できた (論文作成中のためデータ未公開)。

脾臓 T 細胞領域 (PALS) でのドナー抗原提示のメカニズム解析

ドナーT 細胞を移入後の宿主脾臓 T 細胞領域を解析すると、6~24 時間にドナーT 細胞の集積 (図 3)、2 日目にドナーT 細胞の断片が宿主抗原提示細胞に貪食され (図 4)、3 日目には抗原提示細胞に隣接した Treg 細胞の増殖応答が確認された。これにより、ドナー抗原が間接感作により Treg 細胞の免疫応答を誘導することが明らかになった (論文作成中のためデータ未公開)。

ケモカイン阻害剤の百日咳ワクチン処理により脾臓 T 細胞領域への遊走を一時的に阻害したドナーT 細胞の移入実験では、阻害作用が有効な時間だけ免疫応答が遅れた。(論文作成中のためデータ未公開)

肝移植モデルにおける DST による免疫寛容誘導。

研究成果①~③において、DST により脾臓 T 細胞領域にて Treg 細胞の増殖応答が誘導されることがわかった。さらに、治療後のある一定期間内に同じドナー由来の肝移植を行うと、脾臓 T 細胞領域の Treg 細胞の増殖応答がさらに増加する事がわかった。(論文作成中のためデータ未公開)

以上の結果より、今回の科学研究費によって新たな解析ツールである EdU を用いた免疫応答の解析法を確立したことは、iTreg 細胞

誘導メカニズムを解明するための大きな第一歩である。増殖指標である BrdU の免疫染色には酸や加熱等の DNA 開環処理が必要で、それが蛍光多重染色を阻害するため、これまで増殖する iTreg 細胞のフェノタイプ解析や樹状細胞 (DC) とのクラスター形成の解析は極めて困難であった。今回、cell cycle 研究に使われ、開環処理が不要な thymidine analogue の EdU (ethynyl deoxyuridine) 検出法を応用して、増殖細胞を検出可能な多重蛍光染色法を新たに開発した。これにより、iTreg 細胞の増殖応答に関する組織および細胞レベルの並行解析を世界で初めて行ったことになる。

さらに我々は、この技法を生かして、ドナー輸血血液成分において、T 細胞が最も効果的に DST 効果 (Treg 誘導、抗ドナー抗体産生) を導くことを明らかにした。また、百日咳ワクチンや本研究者の所属機関 (解剖学講座) で得意とする多重免疫染色法を用いた免疫組織染色による形態学的解析を駆使して、T 細胞が DST 効果を誘導するメカニズムも明らかにした (論文作成中)。

今後は、増殖した Treg 細胞がどの Treg 細胞亜群 (nTreg, iTreg 他) に属するかを白血球混合培養試験や特異的な蛋白質の発現解析して明らかにすることで、DST により誘導した Treg 細胞の免疫応答での役割が明らかになる。本研究は、初めて DST 効果の全貌が明らかにし、臨床応用としてドナー T 細胞により Treg 細胞応答や抗ドナー抗体産生を誘導するワクチン開発に重要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Yu B, Ueta H, Kitazawa Y, Tanaka T, Adachi K, Kimura H, Morita M, Sawanobori Y, Qian HX, Kodama T, Matsuno K. Two immunogenic passenger dendritic cell subsets in the rat liver have distinct trafficking patterns and radiosensitivities. *Hepatology*, 査読有, 56(4):1532-45. 2012.

[学会発表] (計 3 件)

1. Simultaneous analysis of proliferating cells in the same specimens by immunohistology, and FACS. KITAZAWA Yusuke, UETA Hisashi, SAWANOBORI Yasushi, MATSUNO Kenjiro. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 千葉 (幕張), 2013. 12. 11-13,
2. 新しい蛍光多重免疫染色法による切片レベルでの免疫応答の解析. 北沢 祐介, 上田 祐司, 沢登 祥史, 松野 健二郎. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 香川 (高松), 2013. 3. 28-30,
3. Single transfusion of allogeneic T-cell

induces spleen-dependent regulatory T cell production. KITAZAWA Yusuke, UETA Hisashi, SAWANOBORI Yasushi, MATSUNO Kenjiro. DC2012 (第 12 回国際樹状細胞学会), 韓国 (大邱), 2012. 10. 7-11

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北沢 祐介 (Kitazawa Yusuke)

獨協医科大学 解剖学マクロ 助教

研究者番号: 00467581