

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11209

研究課題名(和文) T細胞亜集団の偏りを生むHLA・A/B抗体と内皮細胞応答：抗体陽性移植の新機軸

研究課題名(英文) HLA / A / B antibodies and endothelial cell responses that generate T cell subpopulation a new innovation in antibody-positive transplantation

研究代表者

岩崎 研太 (Iwasaki, Kenta)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10508881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では内皮細胞HLA-DRに応答するCD4 T-細胞の挙動について検討した。内皮細胞HLA-DR反応性CD4 T細胞はメモリー型であり、内皮細胞にanti-HLA class Iが結合時には亢進し、anit-A抗体結合時には減弱した。マイクロアレイ解析により、anit-A抗体接着時にCD275 (PD-L1)が同定された。ABO不適合腎移植における組織において、PD-L1は高値であった。内皮細胞HLA-DRに対するCD4 T細胞直接アロ応答は、内皮細胞に結合する抗体の種類で変動することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Direct recognition pathwayに関わるCD4 T細胞の挙動とその重要性、DSAの影響について研究を行った。今後さらなる検討知見を得るためには、実際の移植臓器でのメカニズム解明が必要となる。特に実際の腎組織に浸潤しているT細胞の機能解析が必要になる、つまり、ABO不適合/適合腎移植において、腎組織でのPD-L1の高発現がどの程度の患者で確認できるのか、またその際に浸潤T細胞のサブセットに偏りが生じているのか。またそれらクローンは移植前に同定可能なのかどうかの研究を進めることで、免疫順応のメカニズム解明から治療へとつながるはずである。

研究成果の概要(英文)：Here, we explored the role of CD4 T-cell-mediated alloresponses against endothelial HLA-DR in the presence of anti-HLA-class I or anti-A/B antibodies. CD4 T-cells, notably CD45RA-memory CD4 T-cells, undergo extensive proliferation in response to endothelial HLA-DR. The CD4 T-cell proliferative response was enhanced in the presence of anti-HLA-class I, but attenuated in the presence of anti-A/B antibodies. Microarray analysis and molecular profiling demonstrated that the expression of CD274 programmed death-ligand 1 (PD-L1) increased in response to anti-A/B ligation in endothelial cells. Amplified expression of transcript encoding PD-L1 was observed in biopsy samples from ABO-I renal transplants when compared with those from ABO-identical/compatible transplants. Taken together, our findings identified a possible factors that might prevent graft rejection and thus contribute to a favorable outcome in ABO-I renal transplantation.

研究分野：移植免疫

キーワード：免疫順応 免疫寛容 アロ応答 PD-1/PD-L1

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

良質な免疫抑制剤を背景に腎移植では5年生着率が95%を超えるに至った。しかし、服薬管理が十分になされていても、一定の確率で拒絶反応は発症する。非特異的な免疫抑制に起因する感染症や、悪性腫瘍罹患の問題も解決されていない。免疫抑制薬の長期服薬に伴う副作用は、現代の移植医療における大きな課題として浮かび上がってきた。禁忌と言われた ABO 血液型・HLA 不適合移植が、強力な脱感作療法 (B 細胞除去、抗体除去) と良質な免疫抑制剤を背景に行われている。一方で、レシピエントで誘導される移植組織に対する抗体の種類によって予後経過が異なることから、免疫順応 (移植臓器に対する抗体が存在するにもかかわらず、臨床的に問題のない状態) という概念が生まれた。ABO 不適合腎移植では補体活性が確認されても、臨床的問題ないことが多い。ABO 不適合腎移植患者ではドナーHLA-class II DR に対する de novo DSA (Donor Specific HLA Antibody) 発生率が低下していることも経験している。これら臨床における所見は、抗体接着内皮細胞の応答変化と個人差による不均一・異質性 (heterogeneity) に起因すると考えている。長期に渡り免疫抑制剤が不必要となる「免疫寛容」は、移植医療における究極的な到達点である。制御性 T 細胞 (Treg) や制御性樹状細胞移入法は免疫寛容誘導の中心に位置し、臨床応用されている。肝移植では免疫抑制剤の完全離脱の成功例も報告されている。それでも、免疫抑制剤減量過程での拒絶反応の発生や、肝移植以外での寛容達成がほぼ無いことなど、未だ多くの課題が存在する。移植免疫における“アロ応答”は、ドナーHLA をレシピエント CD4 T 細胞が直接認識し拒絶反応を誘発する“direct recognition”と、DSA 産生を惹起する“indirect recognition”に分けられる。免疫寛容が誘導されたグラフトでは Treg を含む三次リンパ組織の形成が確認されたマウス基礎研究もあるが、寛容形成にいかなる細胞がどの程度寄与しているのか、そのメカニズムも含め不明な点は多い。

### 2. 研究の目的

ドナーHLA に対するレシピエント T 細胞のアロ応答後の増殖・分化・成熟は、グラフト細胞が産生する因子によって規定される。移植臓器の長期生着には「移植臓器に対する抗体が存在し、補体活性が認められるにもかかわらず移植臓器が機能を維持しうる状態:免疫順応」の理解と、その誘導法が必要不可欠である。申請者はこれまで抗ドナー抗体接着が引き起こす内皮細胞応答が補体・凝固・ストレスに対する抵抗性を獲得することを示してきたが、内皮細胞因子のアロ応答 T 細胞に対する影響については明らかではない。本研究は、内皮細胞 HLA にアロ応答する T 細胞クローンを同定し、HLA・A/B 糖鎖抗体接着による内皮細胞応答が、アロ応答 T 細胞クローンの増殖・分化に及ぼす影響を明らかとすることを主目的とした研究である。

### 3. 研究の方法

内皮細胞を IFN $\gamma$  で刺激し HLA class II は誘導した。CD4T 細胞増殖は CFSE-FCM 法で評価した。HLA class II DR 応答性 CD4 T 細胞は、OX40 をマーカーに、シングルクローンで単離後 CDR3 領域を決定した。遺伝子発現はフローサイトと qRT-PCR で測定した。マイクロアレイ解析は、anti-HLA class I もしくは anti-A 抗体接着後 4 8 時間経過した内皮細胞より得られる RNA を用いて行った。

### 4. 研究成果

ドナーHLA class II に反応するレシピエント CD4 T 細胞の直接認識 (direct recognition) によるアロ応答は、非常に強い T 細胞応答であり、移植臓器に対する拒絶反応の原因となる。移植後、特に慢性期ではグラフト細胞発現 HLA がその標的となるが、その反応については必ずしも明らかではない。本研究では内皮細胞 HLA-DR に応答する CD4 T-細胞クローンを同定後、anti-HLA class I もしくは anti-A/B 抗体存在下でのそのクローンの挙動について検討した。内皮細胞 HLA-DR 反応性 CD4 T 細胞はメモリー型であり、特に Th17 と Tfh は強く反応した。この CD4 T 細胞増殖は、内皮細胞に anti-HLA class I が結合時には亢進し、anti-A 抗体結合時には減弱した。シングル CD4 T 細胞解析により、TCR の出現頻度が 2% を超えるクローンが 10 個存在し、その中でも 11% と最も高い頻度を示した TCR は、増殖が最も亢進していた画分で確認された。マイクロアレイ解析により、IFN $\gamma$  に関わらず anti-A 抗体接着時に遺伝子変動を認めた遺伝子として、CD275 (PD-L1) が同定された。PDL-1 は anti-A/B 抗体接着で内皮細胞での発現上昇がみられ、anti-PD-1 使用で、anti-A 抗体による細胞増殖抑制効果が消失した。ABO 不適合腎移植における組織において、PD-L1 は高値であった。内皮細胞 HLA-DR に対する CD4 T 細胞直接アロ応答は、内皮細胞に結合する抗体の種類で変動することが示唆された。移植においては、肝臓を構築する類洞内皮細胞で PD-L1 が高発現であり、このことが肝移植でたびたび見られる免疫寛容誘導に重要であるという報告もある。今回 ABO 不適合移植患者の腎組織において PD-L1 が高発現であり、anti-PD-1 抗体で、anti-A/B 抗体接着による CD4 T-細胞のアロ応答減弱がキャンセル

されたことから、ABO 不適合腎移植においては、この PD-1-PD-L1 の重要性を示唆する結果となった。PD-L1 自身は組織においては炎症状態で容易に誘導される。炎症状態の内皮細胞は活性化状態にあるため、anti-A/B 抗体接着による PD-L1 の発現制御は、これまでの研究から内皮細胞の活性低下が起因であると推察される。一般的に T 細胞における PD-1 の発現は、定常状態ではそれほど高くはなく、活性化すると誘導し、PD-1 と PD-L1 との相互作用により T 細胞の活性化は抑制される。また、PD-L1 は CD80 と相互作用することが可能であり、その結果、T 細胞の活性化が抑制されることも報告されている。Treg にも発現が確認されており、免疫抑制メカニズムの一つとされている。これらのことから、anti-A/B 抗体接着により内皮細胞内シグナル伝達が制御されることで、PD-L1 が誘導され、その結果内皮細胞 HLA-DR 応答性 CD4T 細胞のうち、PD-1 陽性細胞の活性化が抑制されることが考えられる。臓器移植において recipient T 細胞は direct/indirect recognition の 2 種類の反応を介して活性化する。これらの反応は、移植後二次リンパ組織で起こるとされているが、げっ歯類の研究においては、移植後速やかに donor 由来の APC が処理されるため、Direct recognition は短命であることが報告されている。内皮細胞の HLA class II は誘導性たんぱく分子である。ヒト内皮細胞はげっ歯類と異なり、IFN で活性化させると CD4 T 細胞を活性化することが報告されている。本研究では、Direct recognition pathway に関わる CD4 T 細胞の挙動とその重要性、DSA の影響について研究を行った。今後さらなる検討知見を得るためには、実際の移植臓器でのメカニズム解明が必要となる。特に実際の腎組織に浸潤している T 細胞の機能解析が必要になる、つまり、ABO 不適合/適合腎移植において、腎組織での PD-L1 の高発現がどの程度の患者で確認できるのか、またその際に浸潤 T 細胞のサブセットに偏りが生じているのか。またそれらクローンは移植前に同定可能なのかどうかの研究を進めることで、免疫順応のメカニズム解明から治療法へとつながるはずである。が、本研究が本総説で取り扱ったこれまでの研究、さらに今回我々が得た知見が、ABO 不適合移植に頻繁に見られる免疫順応の理解、さらには移植医療の究極的な目標である免疫寛容の研究に役立つことが出来れば幸いである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩崎研太、三輪祐子、打田和治、小林孝彰
2. 発表標題 MEK阻害剤はIFN 刺激内皮細胞でPD-L1を上昇させ、MHC class II応答性CD4を減弱させる
3. 学会等名 第45回臓器保存生物医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 64.岩崎研太、三輪祐子、打田和治、堀見孔星、松岡裕、岡田学、浜名洋、岸裕幸、村口篤、小林孝彰
2. 発表標題 内皮細胞HLA-class II DRとアロ応答するCD4 T細胞は、anti-A/B 抗体接着により抑制される
3. 学会等名 第26回日本組織適合性学会
4. 発表年 2017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
研究分担者	小林 孝彰  (Kobayashi Takaaki)  (70314010)	愛知医科大学・医学部・教授   (33920)	
研究分担者	三輪 祐子  (Miwa Yuko)  (90572941)	愛知医科大学・医学部・助教   (33920)	