

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08518

研究課題名(和文)新規4重染色法による免疫応答の組織学的解析：肝臓移植後の免疫拒絶と寛容

研究課題名(英文) In vivo analysis of immune response by a newly developed 4-color immunohistological staining method: Rejection or tolerance following rat liver transplantation

研究代表者

松野 健二郎 (Matsuno, Kenjiro)

獨協医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：20094047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は肝臓移植免疫寛容優位のモデルであるDSTを行うと、(1)抗ドナーI型MHC抗体が産生され、それがドナーDCを除去して拒絶反応を有意に抑制する、(2)ドナー特異的な制御性T細胞を誘導する、そして(3)抗ドナーII型MHC抗体を前投与すると肝障害作用もなく拒絶反応を有意に抑制することを4重免疫蛍光染色などの免疫組織学的解析によって証明し、DSTによる免疫寛容のメカニズムを明らかにしたものである。さらに、抗ドナーII型MHC抗体が肝臓移植の免疫抑制剤として臨床応用可能という特許登録と、全身のリンパ節で多所性に中和抗体を誘導できるT細胞ワクチンの特許出願ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：4重免疫蛍光染色を確立し、肝臓移植拒絶群では、移植肝内のDC亜群が強いアロ抗原刺激能をもち拒絶反応を誘導すること、DST寛容群では、ドナーDC亜群を除去して拒絶反応を有意に抑制する抗ドナーMHC抗体が産生され、移植免疫応答を抑制する制御性T細胞も誘導されることを証明し、移植肝拒絶とDSTによる免疫寛容のメカニズムを明らかにした。

社会的意義：抗ドナーMHC抗体が肝臓移植の拒絶反応の選択的抑制剤として使えることと、ドナーT細胞が全身のリンパ節で多所性に中和抗体を誘導できるワクチンとして使用可能であることを特許出願し、基礎研究成果の臨床応用の道を開いた。

研究成果の概要(英文)：DST-antibodies and anti-donor MHCII antibodies could suppress the CD8+ T-cell-mediated liver transplant rejection by depleting donor immunogenic DCs, blocking the direct pathway of allorecognition. Donor MHCII-specific antibodies may be applicable as a selective suppressant of anti-donor immunity for clinical liver transplantation without the cellular damage of donor MHCII-negative graft cells and recipient cells. Four color immunofluorescence staining confirmed the presence of donor MHCII+CD103+ DC subsets clustering with proliferating EdU+ cells, mostly recipient T cells, which suggests that the DC cluster is a site for the direct alloantigen presentation. DST pretreatment more strongly suppressed the intra-graft response and the transplant rejection, which may be due to the presence of regulatory T cells. Additionally, allogeneic T cells may be clinically applicable as vaccine vectors for polytopical prophylactic antibody production.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ラット肝臓移植 拒絶反応モデル 免疫寛容モデル 3重免疫酵素染色 4重免疫蛍光染色 樹状細胞 免疫組織学 ドナー特異的抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らはこれまで *in vivo* 免疫学の観点から移植免疫応答における免疫担当細胞の動態と機能を組織学的に解析してきた。ラット肝移植の系で、ドナー肝由来の樹状細胞 (DC) に、レシピエントの全身のリンパ臓器に血行性遊走する亜群、リンパ行性に腹腔所属リンパ節に遊走する亜群と、移植肝に残る亜群という3つの亜集団があること、ドナー肝内にレシピエントを攻撃しGvH病を起こすT細胞が存在することなどを報告している。ヒト肝移植では25%程度のレシピエントに免疫寛容がおこり、免疫抑制剤が不要になる事が知られている。また、臓器移植前にドナー末梢血輸血 (DST) をおこなうと、移植した腎臓や肝臓が生着しやすくなることが知られている。しかし、これらの免疫抑制メカニズムに関して、レシピエントのリンパ臓器内や移植片内でどのような免疫応答が起こっているのかは未だによくわかっていない。免疫応答の現場では複数の免疫担当細胞の細胞間相互作用と増殖を伴うが、その解析には増殖マーカーを含む多重免疫染色が必須となる。これまでBromodeoxyuridine (BrdU) などの増殖マーカーが使用されてきたが、いずれも3重酵素抗体染色法が限界で、新たな手法が待たれていた。これを解決するため、研究代表者らは、チミジンアナログであるEthylnyl deoxyuridine (EdU) を用いた増殖細胞染色法に注目し、EdUを含む蛍光4重染色法を2015年に発表した。これにより、2種類の細胞の複数の膜抗原と増殖マーカーの観察が一度にできるようになり、拒絶反応における *in situ* 組織切片レベルでの細胞間相互作用に関してより詳しいアプローチを開始する準備ができていた。

2. 研究の目的

ラットの異系間 (アロ) 肝移植において肝移植後の (1) 拒絶反応優位のモデルと (2) 免疫寛容優位のモデルを作製し、対象臓器の新鮮凍結切片上に従来のBrdUによる3重酵素抗体染色による網羅的解析とEdUによる4重蛍光免疫染色による細胞亜群 (特定のフェノタイプを有する細胞群) の解析を並行して施行する。これにより、ドナーおよびレシピエントのDCやT細胞の動態とフェノタイプ、DCと周囲の増殖するレシピエントT細胞との細胞集塊 (クラスター) 形成と抗原提示、増殖性免疫応答、さらに移植肝内での拒絶反応や免疫抑制などについて免疫組織学的解析をおこなう。具体的には、(1) でドナーDCやレシピエントリンパ球のどの亜群が拒絶反応に関与するのかを明らかにする。さらに、GFPトランスジェニックラット (遺伝子改変動物) をレシピエントとして用い、レシピエント細胞をGFP陽性細胞として確認し、データの裏付けをする。(2) では(1) と同様の検索をおこない、レシピエントT細胞や免疫寛容に関与している制御性T細胞の動態と増殖性応答を調べ、関与の有無を明らかにする。以上により肝移植における免疫応答の特異性と免疫抑制メカニズムを明らかにし、拒絶反応の抑制法など臨床応用への可能性についての検討をおこなう。

3. 研究の方法

ラットの異系 (アロ) 肝移植において (1) 肝移植後の拒絶反応優位のモデルと、(2) 免疫寛容優位のモデルを作製し、移植後経時的に屠殺し、移植肝の凍結ブロックを作製する。屠殺1時間前には、等モル量のBrdUとEdUを静脈内投与して増殖細胞を標識しておく。新鮮凍結切片を作製後、従来のBrdUによる3重酵素抗体染色とEdUによる4重蛍光抗体染色を並行して施行し、移植肝の免疫組織学的解析をおこなう。さらに、GFPトランスジェニックラット (遺伝子改変動物) をレシピエントにした拒絶反応優位のモデルも作製し、レシピエント細胞をGFP陽性細胞として確

認・並行解析する。

4．研究成果

(1) 3重免疫酵素染色により両モデルの脾臓やリンパ節を比較解析した。拒絶モデルでは、以前報告したように、ドナー肝由来のDC亜群の遊走と遊走部位の脾臓や全身のリンパ節でキラーT細胞の増殖性応答が起こる。一方、寛容誘導処置として知られる移植前のドナー末梢血輸血処置(DST)をおこなうと、どちらも有意に抑制された(論文発表4)。

(2) そこでDST処置のみをおこなったレシピエントを調べると、ドナー特異的な細胞障害性抗体(抗ドナーI型MHC抗体、DST抗体)が脾臓やリンパ節で産生され、移植免疫応答を抑制する制御性T細胞も誘導されることがわかった(論文発表1)。

(3) 実際、DST抗体を含むDST血清を投与後肝移植したところ、DC遊走とT細胞増殖性応答が有意に抑制され、平均生存期間も延長した(論文発表4)。

(4) ここでI型MHC抗原は肝細胞にも発現しているためDST抗体は肝障害性を持つ。そこで、主にドナーDCに発現するドナーI型MHC(MHC I)に対する抗体を投与したところ、DST抗体と同様に拒絶抑制が起こり、肝障害はおこらなかった(論文発表4)。これは、抗ドナーMHC I抗体が肝障害作用もなく肝移植の免疫抑制剤として臨床応用可能であることを示唆する。これに関して特許を出願していたが、2019年度に特許登録された(特許取得1)。

(5) ラット腸移植の系で4重免疫蛍光染色を試み、ドナー腸のDCがレシピエントの増殖するT細胞とクラスターを形成することを明らかにした(論文発表2)。さらに、レシピエントにGFPラットを用いた拒絶モデルの肝臓で多重免疫蛍光染色を試み、レシピエントT細胞が主に増殖すること、移植肝内のドナーDC(ドナーMHC I・CD103・CD11b/c 3重陽性)がレシピエント増殖細胞(Edu陽性)と細胞集塊(クラスター)形成することを確認した(論文発表4)。これはドナーDC亜群が直接感作をおこしレシピエントCD8+ T細胞の拒絶反応を移植肝内で誘導していることを示唆する。一方、免疫寛容優位モデル(DST)では、移植肝内のドナーDC亜群は5%以下に減少するので、移植肝内の拒絶反応が抑制され、免疫寛容の一因となることが強く示唆された(論文発表4)。

(6) 移植肝内に浸潤したレシピエントのCD8+ T細胞については、増殖率のデジタル定量化をおこなった(各群 n=3)。その結果、抗ドナーI型MHC抗体と抗ドナーMHC II抗体の前投与群で、肝移植後5日目の類洞領域におけるCD8+ T細胞とBrdU+CD8+ T細胞の有意の抑制を認めた(発表論文4)。本論文は発表雑誌の5月号のEditor's Choiceに選ばれ、高評価を受けている。

(7) DST処置で全身性に抗体応答が起こることは新型ワクチンの開発にもつながり、本研究の発展研究に繋がる発見となった。DSTではドナーT細胞が最も有効であること、ドナーT細胞に病原体抗原を標識投与することにより、脾臓のみならず全身のリンパ節で多所性に中和抗体を誘導することを明らかにした(論文発表3)。これを学会発表し(学会発表1,2)、日本免疫学会ではベストプレゼンテーション賞を受賞した。並行して特許出願し、2021年5月に特許登録された(特許取得2)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ueta Hisashi, Kitazawa Yusuke, Sawanobori Yasushi, Ueno Takamasa, Ueha Satoshi, Matsushima Kouji, Matsuno Kenjiro	4. 巻 30
2. 論文標題 Single blood transfusion induces the production of donor-specific alloantibodies and regulatory T cells mainly in the spleen	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 53 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxx078	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 -

1. 著者名 Uchida Tomomi, Ueta Hisashi, Xu Xue-Dong, Hirakawa Jotaro, Tahara Kazunori, Zhou Shu, Sawanobori Yasushi, Simmons Szandor, Kitazawa Yusuke, Kawashima Hiroto, Matsuno Kenjiro	4. 巻 30
2. 論文標題 Rapid immunosurveillance by recirculating lymphocytes in the rat intestine: critical role of unsulfated sialyl-Lewis X on high endothelial venules of the Peyer's patches	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 23 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxx072	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 該当する

1. 著者名 Kitazawa Yusuke, Ueta Hisashi, Sawanobori Yasushi, Katakai Tomoya, Yoneyama Hiroyuki, Ueha Satoshi, Matsushima Kouji, Tokuda Nobuko, Matsuno Kenjiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel Targeting to XCR1+ Dendritic Cells Using Allogeneic T Cells for Polytopical Antibody Responses in the Lymph Nodes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.01195	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 -

1. 著者名 Ueta Hisashi, Xu Xue-Dong, Yu Bin, Kitazawa Yusuke, Yu Enqiao, Hara Yoshiaki, Morita-Nakagawa Miwa, Zhou Shu, Sawanobori Yasushi, Ueha Satoshi, Rokutan Kazuhito, Tanaka Toshiya, Tokuda Nobuko, Matsushima Kouji, Matsuno Kenjiro	4. 巻 33
2. 論文標題 Suppression of liver transplant rejection by anti-donor MHC antibodies via depletion of donor immunogenic dendritic cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 261 ~ 272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa076	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 該当する

〔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 Ueta H, Kitazawa Y, Sawanobori Y, Katakai T, Ueha S, Matsushima K, Tokuda N, Matsuno K
2. 発表標題 Novel DC targeting by allogenic T-cells for multifocal prophylactic antibody productio
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会（ベストプレゼンテーション賞受賞）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松野健二郎
2. 発表標題 DC亜群の貪食能、traffickingとtargetting
3. 学会等名 第29回日本樹状細胞研究会シンポジウム（招聘シンポジスト）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 移植免疫応答の抑制方法	発明者 松野健二郎、上田祐司	権利者 獨協医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6613412号	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 T細胞ワクチン	発明者 松野健二郎、上田祐司、北沢祐介	権利者 獨協医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6884450号	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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	上田 祐司 (Ueta Hisashi) (10364556)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	

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