

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16268

研究課題名(和文)臓器移植の免疫寛容における制御性T細胞に制御される臓器特異的抗原の探索

研究課題名(英文)Exploration of organ specific antigen regulated by regulatory T cells in a mechanism of transplant tolerance

研究代表者

篠田 和伸 (Shinoda, Kazunobu)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：60348737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：C57BL/6-Foxp3DTRレシピエントにC57BL/6-Foxp3DTR × DBA/2F1ドナーとの間で混合キメラマウスを作成した。混合キメラの血中にはレシピエント由来リンパ球とドナー由来リンパ球が共存しており、ドナー特異的に移植臓器(心臓・皮膚)の免疫寛容が成立した。制御性T細胞を選択的に消去すると、成立していた免疫寛容は破綻し、皮膚または心移植片は拒絶された。皮膚または心を拒絶した混合キメラマウスの脾細胞を別レシピエントに輸注すると、拒絶された同一臓器は再度拒絶されたが、キメラが拒絶しなかった臓器の免疫寛容状態は継続され、臓器特異的抗原の制御による免疫寛容維持の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

混合キメラにおけるドナー特異的免疫寛容は、末梢における制御性T細胞を消去すると破綻することがわかったが、そのメカニズムとして制御性T細胞が臓器特異的抗原を対象として免疫寛容を成立させていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We created mixed chimeras between C57BL/6-Foxp3-DTR recipients and F1 donors (C57BL/6-Foxp3DTR x 61620; DBA/2). Both recipient and donor-derived lymphocytes coexisted and chimeras had donor-specific tolerance against transplanted organs (skin or heart). Organ transplant tolerance was broken if regulatory T cells were depleted. We also created C57BL/6-Rag1 KO recipients, lacking both T and B cells, that received both skin and heart from DBA/2 donors, and adoptively transferred splenocytes from mixed chimeras that rejected skin or heart of DBA/2. In Rag1 KO recipients, the organs (skin or heart) that were rejected in mixed chimeras were rejected again after adoptive transfer of splenocytes, although allograft tolerance against the other organ (skin or heart) that were not rejected by mixed chimeras persisted after adoptive transfer. These results suggested that organ allograft tolerance in mixed chimeras was established against organ specific antigens regulated by regulatory T cells.

研究分野：移植免疫

キーワード：制御性T細胞 臓器移植 免疫寛容

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

臓器移植における免疫寛容とは、免疫抑制剤を使わずにレシピエントが移植された臓器のみに特異的に免疫不応答状態となり、かつ他の非自己抗原に対しては免疫応答を行う状態である。この免疫寛容誘導法にはいくつかの手法があるが、mixed chimerism (混合キメリズム)誘導法はその一つでありマウスモデルからブタ、カニクイザルモデルをへて現在は臨床応用までされてきた (Sharabi Y, Sachs DH. *J Exp Med.*, 1989. )( Kawai T, Cosimi AB, et al. *Transplantation.*, 1995. )( Kawai T, Cosimi AB, et al. *N Engl J Med.*, 2008. )。原理としては、低容量の全身放射線照射をおこない、カクテル抗体療法 (抗 CD4, CD8, CD40 )で前処置後にドナー由来骨髄細胞を移植することで Graft versus host disease を起こさずにドナー由来およびレシピエント由来血球細胞が共存できる状態である。

免疫寛容には一次リンパ組織 (骨髄、胸腺)において非自己抗原に反応するリンパ球を除去する中心性免疫寛容と二次リンパ組織 (脾臓、リンパ節など)で制御性 T 細胞により反応リンパ球の活動を抑制する末梢性免疫寛容がある。混合キメリズムではドナー由来の主要組織適合抗原 (MHC 抗原)にたいする中心性免疫寛容が主体であるが、制御性 T 細胞 (= Foxp3 陽性細胞)による末梢性免疫寛容の役割は長らく不明であった。

研究代表者らは遺伝子改変マウスを用いて混合キメリズムが誘導されたのちに Foxp3 陽性細胞を消去すると血球の免疫寛容状態はつづくにもかかわらず、同ドナーから移植された皮膚、心移植グラフトの免疫寛容状態が破綻する事を見いだした。さらに Foxp3 陽性細胞が非 MHC 抗原に対する免疫寛容状態を維持させていることを発見した (Shinoda K, Akiyoshi T, et al. *Am J Transplant.*, 2014. )。

### 2. 研究の目的

上記の研究を発展させ、本研究では、混合キメリズムを誘導されたレシピエントにおいて制御性 T 細胞により免疫寛容となっている非 MHC 分子が、異なる移植グラフト (皮膚、心臓、腎など)で共通発現しているのか、それともグラフト特異的な発現をしているのかを検証するのが目的である。これにより、今後制御性 T 細胞治療が臨床応用される際にグラフト特異的な分子を認識させる必要があるか否かを定めるうえで非常に重要な知見が得られる。

### 3. 研究の方法

#### **実験1 混合キメラマウスの細胞輸注によりドナー特異的免疫寛容が継続していることの確認**

混合キメリズム (DBA×B6Foxp3-DTR B6Foxp3-DTR)を誘導されたレシピエント (B6Foxp3-DTR)の脾臓細胞を採取する。脾臓細胞  $10 \times 10^6$  個を、DBA および C3H (3rd party)の皮膚グラフトをあらかじめ移植された B6 RAG-1 ノックアウトマウス (成熟 T 細胞、B 細胞が欠如しているのでレシピエント単独では拒絶反応を起こさない)に輸注し、C3H 皮膚グラフトは拒絶されるが、DBA 皮膚グラフトの免疫寛容が継続されるかを確認する。

#### **実験2 皮膚グラフトを拒絶した混合キメラマウスにメモリー細胞が存在することの確認**

混合キメリズム (DBA×B6Foxp3-DTR B6Foxp3-DTR)を誘導されたレシピエント (B6Foxp3-DTR)に DBA ドナーからの皮膚移植を行い、ジフテリアトキシンで Foxp3 陽性細胞を消去し DBA 皮膚グラフトを拒絶させる。そのレシピエントの脾臓細胞  $10 \times 10^6$  個を、DBA および C3H

の皮膚グラフトをあらかじめ移植された B6 RAG-1 ノックアウトマウスに輸注し、DBA および C3H 皮膚グラフトがともに拒絶されるか否かを確認する。

### **実験3 皮膚グラフトの非 MHC 抗原を認識したメモリー細胞が心臓グラフトを拒絶するか否かの確認**

混合キメリズム (DBA×B6F<sub>oxp3</sub>-DTR B6F<sub>oxp3</sub>-DTR) を誘導されたレシピエント (B6F<sub>oxp3</sub>-DTR) に DBA ドナーからの皮膚移植を行い、ジフテリアトキシンで F<sub>oxp3</sub> 陽性細胞を消去し DBA 皮膚グラフトを拒絶させる。そのレシピエントの脾臓細胞  $10 \times 10^6$  個 (皮膚グラフトに対するエフェクターメモリーリンパ球が存在する) を、DBA 心臓グラフトおよび皮膚グラフトをあらかじめ移植された B6 RAG-1 ノックアウトマウスに輸注し、心臓および皮膚グラフトの変化を観察する。

### **実験4 心臓グラフトの非 MHC 抗原を認識したメモリー細胞が皮膚グラフトを拒絶するか否かの確認実験3の対実験**

混合キメリズム (DBA×B6F<sub>oxp3</sub>-DTR B6F<sub>oxp3</sub>-DTR) を誘導されたレシピエント (B6F<sub>oxp3</sub>-DTR) に DBA ドナーからの心臓移植を行い、ジフテリアトキシンで F<sub>oxp3</sub> 陽性細胞を消去し DBA 心臓グラフトを拒絶させる。そのレシピエントの脾臓細胞  $10 \times 10^6$  個 (心臓グラフトに対するエフェクターメモリーリンパ球が存在する) を、DBA 心臓グラフトおよび皮膚グラフトをあらかじめ移植された B6 RAG-1 ノックアウトマウスに輸注し、心臓および皮膚グラフトの変化を観察する。

#### 4. 研究成果

C57BL/6-F<sub>oxp3</sub>DTR レシピエントに C57BL/6-F<sub>oxp3</sub>DTR × DBA/2F1 ドナーとの間で混合キメラマウスを作成した。混合キメラの血中にはレシピエント由来リンパ球とドナー由来リンパ球が共存しており、ドナー特異的に移植臓器 (心臓・皮膚) の免疫寛容が成立した。制御性 T 細胞を選択的に消去すると、成立していた免疫寛容は破綻し、皮膚または心移植片は拒絶された。皮膚または心を拒絶した混合キメラマウスの脾細胞を別レシピエントに輸注すると、拒絶された同一臓器は再度拒絶されたが、キメラが拒絶しなかった臓器の免疫寛容状態は継続された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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