

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03759

研究課題名(和文) 外傷特異的なメモリー制御性T細胞免疫応答の解明と臨床応用への基盤研究

研究課題名(英文) Trauma-specific memory-like regulatory T-cell responses and fundamental research for clinical translation

研究代表者

山川 一馬 (Yamakawa, Kazuma)

大阪医科薬科大学・医学部・准教授

研究者番号：50597507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,910,000円

研究成果の概要(和文)：外傷後の免疫応答の根幹となるメモリーTregの動態制御を検証した。養子細胞移植マウス外傷実験では、二次外傷に反応したTregは免疫記憶マーカーを強く発現し、メモリーTregとして外傷特異的な免疫記憶機能を持っていた。CyTOF解析によると、二次外傷に反応したメモリーTregはGITR、CTLA-4、ICOS、Heliosなど特定の抗原発現が増強されていた。一連の反応は、MHCクラスIIによるT細胞受容体シグナル経路が関与していた。外傷患者検体の臨床的検討では、マウスで同定した外傷特異的なメモリーTregに極めて類似したTregフェノタイプが増加し、受傷後90日目まで持続発現することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、外傷受傷後の過剰炎症と過剰抗炎症のアンバランスが生じるメカニズムの一端について、動物モデルを用いた基礎研究ならびに臨床サンプルを用いた臨床研究の両面から明らかとした。炎症・抗炎症のバランス最適化を、Tregの活性化および反応性の調節により行うことができれば、これまで克服不可能であった外傷後亜急性期以降の死亡軽減に大きく寄与することが期待できる。今後は、外傷後のメモリーTregに関する更なる動態制御機序の解明と、将来のTregを介入点とする新たな治療戦略構築へ向けた研究を継続する。

研究成果の概要(英文)：We examined the dynamic regulation of memory regulatory T cells (Treg), which are positioned as one of the fundamental regulatory mechanisms of immune response after severe trauma. In a mouse trauma model using adoptive transfer, Tregs, expanded in response to secondary trauma, strongly expressed memory markers and have a trauma-specific immune memory function as memory Tregs. CyTOF mass cytometry analysis revealed that memory Tregs in response to secondary trauma showed enhanced expression of specific antigens such as GITR, CTLA-4, ICOS, and Helios. These responses were mediated by the T cell receptor signaling pathway via the MHC class II. Clinical investigation using trauma patient samples revealed an increased Treg phenotype similar to the trauma-specific memory Tregs identified in mice and showed persistent expression up to 90 days post-injury.

研究分野：救急医学

キーワード：制御性T細胞 外傷 マスサイトメトリー CyTOF COVID-19

1. 研究開始当初の背景

本邦における外傷死亡者数は年間 2 万人を超え、若年者層における死因の一位を占める。外傷死亡は三相性に生じ、受傷直後に生じる外傷即死は医学的治療による救命は不可能である(第 I 期)。受傷後 24 時間以内の失血死は、外科的な止血技術の向上や、外傷診療システムの整備により劇的に改善してきた(第 II 期)。一方、受傷後 7 日以上経過した亜急性期に多臓器不全に陥った患者の救命は困難である(第 III 期)。多臓器不全に陥る原因として、度重なる手術侵襲や、二次的に合併する重症感染症・敗血症などが挙げられる。したがって、外傷患者のさらなる救命率向上には、外傷患者が第 III 期に多臓器不全に陥るメカニズムの解明が急がれる。

外傷や大手術など高度な生体侵襲を受けた患者では、複雑な生体反応が惹起され免疫系の恒常性が破綻する。われわれの研究グループ(ハーバード大学 Lederer 研究室)では、自然免疫系により誘導された炎症、そして獲得免疫系により誘導される抗炎症のバランスが外傷侵襲を契機として容易に崩壊することを明らかにし(*J Immunol.* 2003)、複数の研究グループの追試によって証明された。外傷後の炎症/抗炎症の巧妙な免疫応答のバランスを司るのが、CD4 陽性 T 細胞のうち免疫寛容の中心をなす制御性 T 細胞(regulatory T cells, 以下:Treg)である。われわれは、外傷後 15 分という超早期から Treg は誘導され、その反応は損傷局所に首座があることを明らかにした(*Ann Surg.* 2006)。この結果は、外傷後に増加する Treg の誘導メカニズムは、外傷に『特異的』な生体防御反応であることを示唆している。

近年、自己免疫疾患など複数の領域において Treg の一つのサブセットとして、特定の抗原暴露後に一部が長期生存し抗原を記憶する働きを持つメモリー Treg が存在することが報告されてきた。現状、一般的なメモリー T 細胞とは異なり、制御性 T 細胞に限定されるメモリー Treg の表現型、機能、誘導因子などに関する十分な解析はなく、外傷侵襲に応答するメモリー Treg の役割はこれまでに評価されていない。

2. 研究の目的

われわれはこれまで自然免疫・獲得免疫バランスに基づいた外傷後の免疫応答制御メカニズムを世界に先駆けて解明してきた。そのバランス制御の根幹としてメモリー Treg が存在することが分かってきたが、その動態制御メカニズムは十分に明らかにされているとは言い難い。本研究で明らかにすべき研究仮説を以下の三点に設定した。

- ✓ 外傷後の Treg 誘導の契機となる細胞内シグナル伝達は MHC クラス II 経路を介する
- ✓ 外傷後の Treg の誘導、なかでもメモリー Treg の誘導、に関連する特定因子が存在する
- ✓ Treg の過剰活性化による抗炎症反応が、外傷後の易感染性(免疫抑制状態)と関連する

本研究により、外傷受傷後の過剰炎症と過剰抗炎症のアンバランスが生じるメカニズムを明らかとすることを目的とした。炎症・抗炎症のバランス最適化を、Treg の活性化および反応性の調節により行うことができれば、これまで克服不可能であった外傷後第 III 期の死亡軽減に大きく寄与することが期待できる。外傷後のメモリー Treg に関する動態制御機序が明らかとなれば、将来の Treg を介入点とする新たな治療戦略構築へ向けた方向性を提示しうる。

3. 研究の方法

本研究期間 3 年間で以下の 4 件の研究内容を実施した。

(1) マスサイトメトリー-CyTOF の染色条件の最適化に関する研究

CyTOF (cytometry by time-of-flight) は、フローサイトメトリーで使用される蛍光標識抗体の代わりに、金属同位体標識抗体を用いて細胞内外のタンパク質を検出する多次元サイトメトリー技術である。金属同位体標識抗体を用いるため色調のクロストークがなく、40 種を超える抗体を同一細胞で同時評価することが可能である。これにより、従来検出が困難であった細胞集団の同定や細胞表面や細胞内タンパク質の網羅的な解析が可能となる。

本研究課題を実施するに際し、最初に CyTOF 染色条件の最適化を行った。Treg の同定のためには FoxP3 の細胞内染色が必須であるため、複数の細胞膜透過試薬の比較検討、染色工程の順序変更について検討を行った。細胞染色データの取得は、Helios CyTOF® System (Fluidigm 社) を用いて測定した。

(2) 養子細胞移植(adoptive transfer)を用いたマウス外傷モデルによる研究

マウス熱傷モデルは、組織損傷と血管分布異常性ショックを呈し、外傷を模したモデルとして広く確立されている。体表面積 25% の広範囲熱傷を受傷して 2 週間後の CD45.1 陽性コンジェニ

ックマウスから領域リンパ節を採取・単細胞精製した後に、CD45.2 陽性 C57/BL6 マウスに全リンパ節細胞を移植した。細胞移植翌日に、二次侵襲として 25%熱傷を受傷させ、10 日後に採取した領域リンパ節の CD45.1 陽性細胞（ドナー細胞）の評価を各種サイトメトリー法（フローサイトメトリーおよび CyTOF マスサイトメトリー）により行った。

外傷特異的に反応する Treg の誘導メカニズムについてノックアウトマウスを用いた in vivo 解析を行った。外傷後、多岐に渡る反応を司るパターン認識受容体シグナル経路としての MyD88、そして抗原提示細胞に発現し CD4 陽性 T 細胞に対する抗原提示に関与する MHC クラス II、の二つの経路が想定される。MyD88^{-/-}マウス、MHC クラス II^{-/-}マウスをそれぞれ用い、養子細胞移植を用いた two-hit 外傷モデルによりメモリー Treg が誘導されるか否かを検証した。野生型マウスにおけるメモリー Treg 誘導と同様の現象が生じるかどうかを CyTOF による多次元細胞解析により比較検討した。同結果の頑健性を確認するため、特異抗体を用い MyD88 および MHC クラス II をノックダウンした系においても同様の検証を行った。

(3) ヒト臨床サンプルを用いた外傷後の免疫恒常性破綻に関する研究

記憶能を持つ Treg が、実臨床の患者検体においても生じているかどうかを検証した。外傷患者の臨床検体を用いた前方視的臨床研究により評価した。外傷患者の全血検体を EDTA 採血し、精製した PBMCs を CS10 および Mr. flosty を用いて -80 で凍結保存した。外傷直後から 90 日目まで適宜検体採取、冷凍保存した。外傷受傷後の臨床経過についてはカルテレビューによるデータ収集を行い、二次性の感染性合併症の有無を評価した。CyTOF 評価を行い、実験(2)で明らかとした外傷特異的なメモリー Treg に特徴的な細胞特性を呈しているかどうかを検証した。

(4) ヒト臨床サンプルを用いた COVID-19 治癒後の免疫恒常性破綻に関する研究

COVID-19 パンデミックが終息の兆しが見えない現況を鑑み、われわれの持つ CyTOF 染色技術を応用し COVID-19 後の免疫評価を行うことは社会的意義が高いと考え実施した。COVID-19 罹患後急性期の免疫評価は数多くなされているが、治癒後に遷延する免疫不全状態に関する評価は十分にされていない。大阪急性期総合医療センター、北海道大学との共同研究により、人工呼吸や ECMO を必要とした重症 COVID-19 患者の退院 3 カ月後、6 カ月後、12 カ月後の末梢血単核球細胞を実験(3)と同様の手法を用いて冷凍保存した。Treg を含む網羅的 PBMC パネルを用いて CyTOF 細胞解析を行った。

4. 研究成果

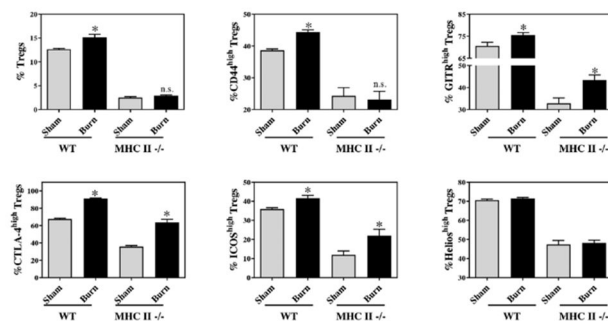
(1) マスサイトメトリーの染色条件の最適化に関する研究

染色プロトコルの確立に際し、Fluidigm 社の提供する染色プロトコル、そして共同研究先であるハーバード大学外科免疫学教室 Lederer 研究室の染色プロトコルの両面を参考にしつつ、比較検討を行った。合計 5 回のテスト染色を経て、Treg 染色に必要な細胞内染色まで含む形で染色条件を最適化することができた。細胞染色に際し複数サンプルを混和して同時染色・測定するバーコーディングの技術精度の確認を行った。最終的な染色プロトコルとしては、細胞透過試薬 A、バーコード染色、細胞表面染色、細胞透過試薬 B、細胞内染色、固定、という流れで最適化を得ることができた。

(2) 養子細胞移植 (adoptive transfer) を用いたマウス外傷モデルによる研究

養子細胞移植を用いた two-hit 外傷モデルによる検証では、一次外傷によりプライミングされた Treg は、二次外傷後により強い反応性を示した。二次外傷に反応し増幅した Treg は免疫記憶マーカー (CD44^{hi}, CD62L^{low}) を強く発現しており、Treg の一部がメモリー Treg として組織に定着し、外傷特異的な免疫記憶機能を持つことが分かった。メモリー Treg の表現型解析を CyTOF を用いて多次元細胞解析を行ったところ、二次外傷に反応したメモリー Treg では GITR、CTLA-4、ICOS、Helios といった特定のマーカー発現が増強されていることが分かった。

外傷特異的なメモリー Treg 誘導に関連する細胞内シグナル経路に関しては、野生型マウスで見られたメモリー Treg 誘導反応は、MyD88 経路抑制モデルでは再現され、MHC クラス II 経路抑制モデルでは再現されなかった。すなわち、これら一連の外傷特異的な Treg 誘導反応および免疫記憶反応は、MHC クラス II 経路による T 細胞受容体シグナル経路が大きく関与していることが明らかとなった。これらの研究成果は、*J Leukoc Biol.* 2021;109(3):645-656. において報告した。

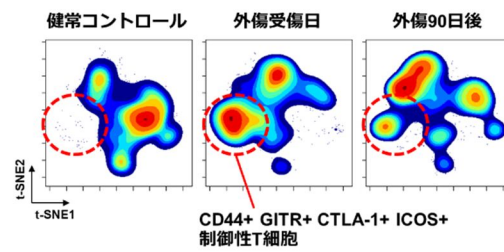


外傷後 Treg 誘導は主に MHC クラス II を介する

メモリー Treg に特徴的な細胞群のうち、一部は MHC クラス II^{-/-} マウスでの反応が見られない。Treg 誘導メカニズムの一端を示している。

(3) ヒト臨床サンプルを用いた外傷後の免疫恒常性破綻に関する研究

記憶能を持つ Treg が、その後の二次性感染の合併に関連するかどうか、Treg フェノタイプの変化が臨床経過にどのような影響を及ぼすかを検討するために、外傷患者の臨床検体を用いて臨床的検討を実施した。ベッドサイドの外傷患者においても、マウスで同定したものに極めて類似したメモリー Treg フェノタイプ (GITR+/CTLA-4+/ICOS+/Helios+) が増加しており、受傷後 90 日目まで持続発現することが分かった (執筆準備中)。



外傷患者のTregフェノタイプの変化

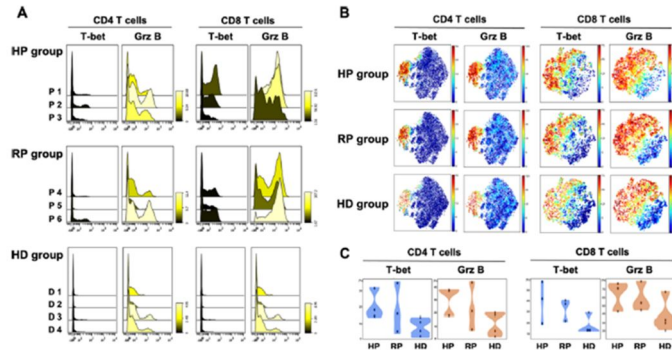
外傷患者5例の検体を用いCyTOFにより受傷後90日間のTregフェノタイプを追跡したマウスで示されたメモリー機能を持つ制御性T細胞は、受傷後90日経過した後も体内に残存し続け外傷侵襲を記憶していることが示されている (未公開データ)

(4) ヒト臨床サンプルを用いた COVID-19 治癒後の免疫恒常性破綻に関する研究

人工呼吸器管理あるいはECMO管理を必要とした重症 COVID-19 患者の退院 3 カ月後の末梢血単核球細胞を網羅的 PBMC パネルを用いて CyTOF 細胞解析を行った。社会復帰している治癒後患者においても T-bet あるいは Granzyme B を発現する細胞障害性 T 細胞が長期間過剰産生されていることが明らかとなったこれらの研究成果は、*J Intensive Care*. 2021;9(1):76. において報告した。

さらに、当該症例の長期フォローを行い、6 カ月後、12 カ月後まで含める形での再解析を行った。

上記論文で示した細胞障害性リンパ球の過剰発現は 12 カ月持続することが明らかとなった。さらに、CD16 陽性 NK 細胞や Treg などさまざまな細胞集団について長期間の免疫フェノタイプ変化が続いていることが分かった (論文投稿中)。



COVID-19退院3カ月後も持続する免疫機能変化

COVID-19退院3カ月後においても細胞障害性リンパ球の過剰発現は持続していた。その変化は長期入院患者でより顕著であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 20件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 16件）

1. 著者名 Yamakawa Kazuma, Tajima Goro, Keegan Joshua W., Nakahori Yasutaka, Guo Fei, Seshadri Anupamaa J., Cahill Laura A., Lederer James A.	4. 巻 109
2. 論文標題 Trauma induces expansion and activation of a memory like Treg population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Leukocyte Biology	6. 最初と最後の頁 645 ~ 656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JLB.4A0520-122R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mitsuyama Yumi, Yamakawa Kazuma, Kayano Katsuhide, Maruyama Miho, Wada Takeshi, Fujimi Satoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Prolonged enhancement of cytotoxic T lymphocytes in the post-recovery state of severe COVID-19	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Intensive Care	6. 最初と最後の頁 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40560-021-00591-3	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3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
研究分担者	小倉 裕司 (Ogura Hiroshi) (70301265)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	藤見 聡 (Fujimi Satoshi) (70362720)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪急性期・総合医療センター（臨床研究支援センター）・救急診療科・主任部長 (84432)	

6. 研究組織（つづき）

	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	谷口 高平 (Taniguchi Kohei) (70779686)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	嶋津 岳士 (Shimazu Takeshi) (50196474)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	吉村 旬平 (Yoshimura Jumpei) (30835202)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪急性期・総合医療センター（臨床研究支援センター）・救急診療科・医師 (84432)	
研究分担者	松原 庸博 (Matsubara Tsunehiro) (70747154)	大阪大学・医学部附属病院・医員 (14401)	

	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
研究協力者	和田 剛志 (Wada Takeshi)		

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		
米国	Harvard University		