

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18047

研究課題名(和文) 移植後早期グラフト浸潤リンパ球の抗原特異性の有無に関する基礎的検討

研究課題名(英文) The allo-reactivity of graft infiltrating lymphocytes during early timing post-transplantation

研究代表者

財津 雅昭 (Zaitu, Masaaki)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：20768981

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)：本研究は移植後早期グラフト浸潤細胞(GIL)がアロ攻撃性を有する時期を明らかにすることを目的とした。BALB/cからC57BL/6のマウス心移植では、レシピエント由来の細胞障害性サイトカイン産生CD8陽性GILが移植後5日(5POD)で有意に増加した。このGILを免疫不全のBRGマウスに構築し、ドナー系統心グラフトを移植すると、速やかに拒絶反応が生じ、5POD-GILのアロ攻撃性が明らかになった。一方、3POD-GILの移入は拒絶反応を起こさなかった。また3POD心グラフトのBRGマウスへ再移植は拒絶反応はみられなかった。これはアロ攻撃性細胞が3-5PODの間に浸潤する可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器移植では移植直後から終生にわたり免疫抑制剤が必要であり、薬剤の副作用(腎障害、易感染性、悪性腫瘍の発生など)が問題である。効率的、特異的な免疫抑制が必要だが、アロ抗原特異性を獲得する時期、特異的な攻撃細胞を同定するマーカーなど分かっていない。本研究で明らかにしたアロ攻撃性細胞の移入時期の同定は、特異的な免疫抑制療法や免疫抑制剤の軽減に有用である。また、微小環境に移入した細胞の機能を測定することで、抗原特異的な細胞の同定、更には最近注目されている癌微小環境の機序解析に有用な解析ツールの提供にもつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To identify immunological behaviors of graft infiltrating lymphocytes (GILs) during early post-transplantation (Tx), the alloreactivity of GILs using a murine model of cardiac Tx was assessed. GILs from 120 hours (h) allografts, but not 72 h allografts, showed robust activation and produced proinflammatory cytokines. BALB/c Rag2<sup>-/-</sup> c<sup>-/-</sup> (BRG) mice reconstituted with 120 h GILs displayed donor-specific immune reactivity and rejected donor strain cardiac allografts. Conversely, 72 h GILs exhibited weak anti-donor reactivity and did not reject allografts. These findings were confirmed by re-Tx of cardiac allografts into BRG mice at 72 h post-Tx. Re-transplanted allografts continued to function for >100 days, despite the presence of allogeneic CD3<sup>+</sup> GILs. The immunological behavior of GILs considerably differs over time during the early post-Tx phase. Newly infiltration of GILs after 72 h post-Tx may play a critical role for graft rejection.

研究分野：移植免疫

キーワード：グラフト浸潤細胞 免疫不全マウス アロ攻撃性 心移植

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

臓器移植ではグラフト局所のリンパ球活性がグラフト生着を決定している。拒絶のモニタリングにはグラフト局所の免疫担当細胞の相互作用を直接解析することが重要であるが、その方法論は確立していない。マウス心移植モデルでは移植後 12-24 時間で既にグラフト浸潤細胞 (Graft infiltrating lymphocytes, GIL) を認めると報告されている (A Schenk et al. Am J Transplant, 2008)。この超早期 GIL は移植直後の炎症反応の維持に作用し、同集団を阻害するとグラフトの生着延長効果が得られるが、グラフトに対する直接的な免疫応答の有無については明らかではない。一般に抗原特異的なリンパ球の成熟、活性化には 3-7 日かかり、超早期 GIL にアロ攻撃性はないと考えられる。また、移植後 3 日目からグラフトへのリンパ球浸潤を阻害するとグラフトの生着期間が延長するとの報告が複数あり、これらの結果からは移植後 3 日目の時点での GIL にはアロ攻撃性がないと推察される。しかし、この GIL のアロ攻撃性を解析した報告はない。その理由として、移植直後の GIL は微量であり、機能解析が困難であることが考えられる。

以前より免疫不全マウスに目的とする細胞集団を移入し、その機能を *in vivo* で観察する研究手法は知られていたが、近年免疫不全マウスの改良により、微量のリンパ球でも免疫系の構築が可能となっている。構築後は homeostatic proliferation (HP) と呼ばれる、抗原提示を必要としない過程により増殖するが、これにより少数細胞集団を増幅した後の機能解析が可能になると考えられる。

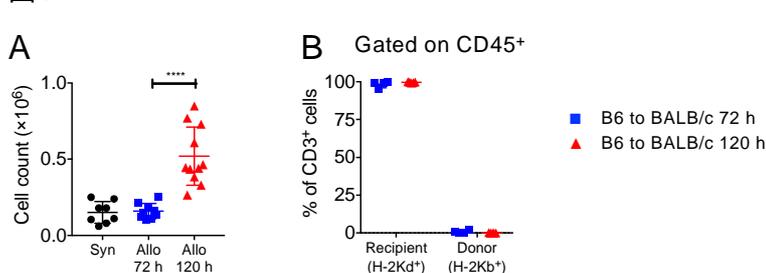
### 2. 研究の目的

移植後早期の GIL のアロ抗原に対する攻撃性を、免疫不全マウスへのリンパ球構築モデルを用いた機能解析により明らかにする。

### 3. 研究の方法

マウスは BALB/c、C57BL/6 を日本エス エル シー株式会社 (浜松) から、BALB/c Rag2<sup>-/-</sup> IL2Rg<sup>-/-</sup> (BRG) を Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) から購入し、北海道大学にて維持した。マウス腹部異所性心移植を顕微鏡下に 10-0 nylon にて吻合し作成した。麻酔はイソフルランの吸入麻酔を用いた。連日の触診で心拍動を触知し、拒絶反応による心拍動の停止をグラフト不全と判断した。再移植の心移植ではグラフトを採取後十分な脱血を行った後に顕微鏡下に再移植した。CD25 陽性細胞の除去には抗 CD25 抗体 (PC61, Bio X Cell, Lebanon, NH, USA) を 500 $\mu$ g *i.p.* 投与した。PD-1 陽性細胞の関与を明らかにするために抗 PD-1 抗体 (J43, Bio X Cell) を 500 $\mu$ g 2 日間 *i.p.* 投与した。グラフト浸潤細胞は、グラフトを細断した後、5mg の collagenase IV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を入れた Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 溶液に 30 分浸けて採取した。フローサイトメトリーは FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を用い、抗体は抗マウス-CD3 (clone 145-2C11), CD4 (GK1.5), CD8a (53-6.7), CD11b (M1/70), CD11c (N418), CD25 (PC61), CD40 (3/23), CD44 (IM7), CD45 (30-F11), CD49d (R1-2), CD62L (MEL-14), CD69 (H1.2F3), CD86 (GL1), CD103 (2E7), PD-1 (J43), Nur77 (12.14), T-bet (4B10), GATA3 (L50-823), ROR  $\gamma$  t (Q31-378), Foxp3 (FJK-16s), H-2Kb (AF6-88.5.5.3), H-2Kd (SF1-1.1.1), I-A/I-E (M5/114.15.2), IFN  $\gamma$  (XMG1.2), TNF  $\alpha$  (MP6-XT22), Granzyme B (NGZB), Perforin (S16009A) を BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)、BioLegend (San Diego, CA, USA) Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した。

図1

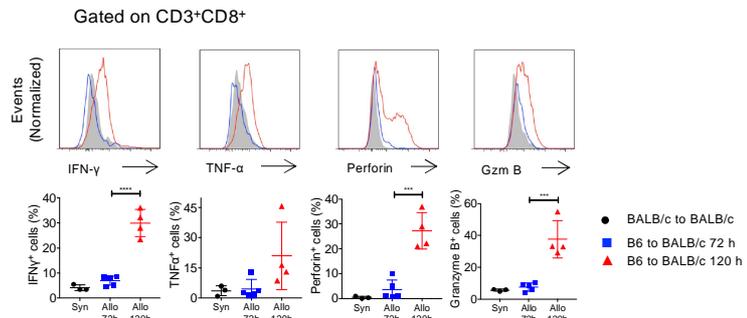


### 4. 研究成果

BALB/c マウスをレシピエント、C57BL/6 マウスをドナーとした心移植では心グラフトへの浸潤細胞は移植後 5 日目に有意に増加 (図 1A) し、それはほとんどがレシピエント由来であることが分かった (図 1B)。またサイトカイン産生の検討では、細胞傷害性のある IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、Perforin、Granzyme B を産生する CD8 陽性グラフト浸潤細胞が移植後 5 日目に有意に増加していることが明らかになった (図 2)。

この細胞集団のアロ攻撃性を *in vivo* で確認するためにグラフト浸潤細胞を取り出し、これを免疫不全マウスに再構築するモデルを考案した (図 3A)。免疫不全マウスは BALB/c Rag2<sup>-/-</sup> IL2R $\gamma$ <sup>-/-</sup> (BRG) マウスを用いた。グラフト浸潤細胞は非常に少数であるが、全例で BRG マウスへの免疫再構築が可能であることが確認された (図 3B)。このマウスにドナー抗原と同系統の心グラフト片を移植すると、移植後 3 日目のグラフト浸潤細胞を免疫不全マウスに移入した場合には拒絶が生じなかったのに対し、移植後 5 日目のグラフト浸潤細胞を移入したマウスでは速やかに拒絶反応が生じ、移植後 5 日目のグラフト浸潤細胞は *in vivo* においてもアロ攻撃性の機能を持つことが明らかになった (図 4)。一方で、移植 3 日目のグラフト浸潤細胞はレシピエント由来の細胞にも関わらず、拒絶反応を引き起こさない結果とであった (図 4)。そこで移植後 3 日目と 5 日目の違いが、移植後 3 日目以降に浸潤してくる細胞に依存している可能性を調べる目的で、抗 LFA 抗体で移植後 3 日目からのグラフトへの浸潤細胞を抑制し移植後 5 日目のグラフト浸潤細胞を採取した。これを免疫不全マウスに構築し、homeostatic proliferation により増えたリンパ球を採取して IFN $\gamma$ -Elispot アッセイを実施した (図 5A)。結果として、ドナー抗原に対する IFN $\gamma$  産生細胞が観察された (図 5B)。

図2



この解釈として、抗 LFA 抗体では完全に新たな浸潤細胞を抑制できていない可能性を排除するために、3 日目の心移植片 (含グラフト浸潤細胞) を採取して BRG マウスへ再移植した (図 6A)。この系においては 3 日後以降新たにグラフト浸潤細胞が移入してくることは無いが、3 日目までに浸潤した細胞がその他のグラフト内の細胞により活性化、抗原提示などでアロ抗原攻撃性を獲得する場合には拒絶反応が生じることになる。しかし 3 日目に採取した心グラフトは BRG マウスの中で拍動を続け、拒絶は生じなかった (図 6B)。このことから、アロ抗原攻撃性の

図3

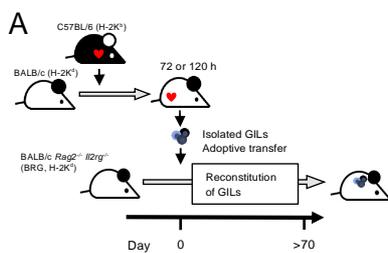
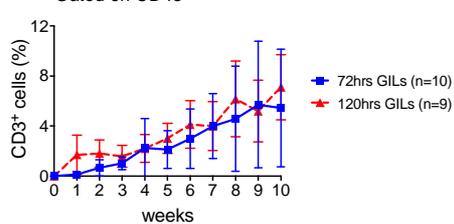


図3B



機能を持つことが明らかになった (図 4)。一方で、移植 3 日目のグラフト浸潤細胞はレシピエント由来の細胞にも関わらず、拒絶反応を引き起こさない結果とであった (図 4)。そこで移植後 3 日目と 5 日目の違いが、移植後 3 日目以降に浸潤してくる細胞に依存している可能性を調べる目的で、抗 LFA 抗体で移植後 3 日目からのグラフトへの浸潤細胞を抑制し移植後 5 日目のグラフト浸潤細胞を採取した。これを免疫不全マウスに構築し、homeostatic proliferation により増えたリンパ球を採取して IFN $\gamma$ -Elispot アッセイを実施した (図 5A)。結果として、ドナー抗原に対する IFN $\gamma$  産生細胞が観察された (図 5B)。

図4

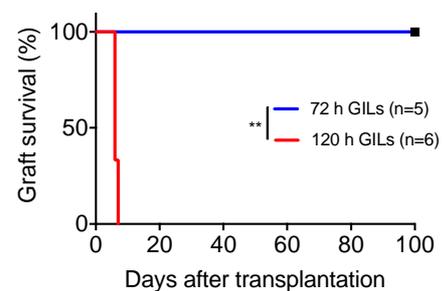


図5

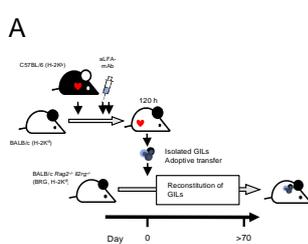
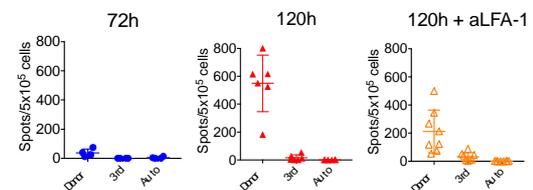


図5B



この系においては 3 日後以降新たにグラフト浸潤細胞が移入してくることは無いが、3 日目までに浸潤した細胞がその他のグラフト内の細胞により活性化、抗原提示などでアロ抗原攻撃性を獲得する場合には拒絶反応が生じることになる。しかし 3 日目に採取した心グラフトは BRG マウスの中で拍動を続け、拒絶は生じなかった (図 6B)。このことから、アロ抗原攻撃性の

図6

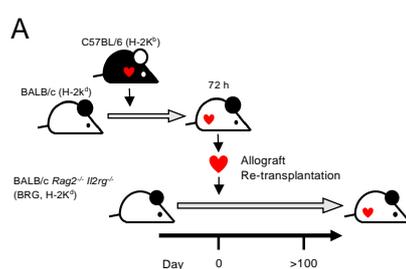
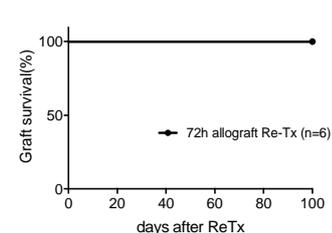


図6B



リンパ球を含む5日目のグラフト浸潤細胞は、3日目以降に新たに加わったアロ攻撃性の細胞である可能性が高いと考えられた。この成果を論文化し *Transplant international* に受理された(1)。

#### 参考文献 9

1. Ganchiku Y, Goto R, Kanazawa R, Ota T, Shibuya K, Fukasaku Y, et al. Functional roles of graft-infiltrating lymphocytes during early-phase post-transplantation in mouse cardiac transplantation models. *Transpl Int.* 2021;34(12):2547-61.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ganchiku Yoshikazu, Goto Ryoichi, Kanazawa Ryo, Ota Takuji, Shibuya Kazuaki, Fukasaku Yasutomo, Kobayashi Nozomi, Igarashi Rumi, Kawamura Norio, Zaitzu Masaaki, Watanabe Masaaki, Taketomi Akinobu	4. 巻 34
2. 論文標題 Functional roles of graft infiltrating lymphocytes during early phase post transplantation in mouse cardiac transplantation models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transplant International	6. 最初と最後の頁 2547 ~ 2561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tri.14146	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 巖築 慶一、後藤 了一、太田 拓児、金沢 亮、川村 典生、財津 雅昭、渡辺 正明、嶋村 剛、武富 紹信
2. 発表標題 リンパ球の再構築による移植片局所免疫機能解析法の開発
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 巖築 慶一、後藤 了一、太田 拓児、金沢 亮、川村 典生、財津 雅昭、渡辺 正明、嶋村 剛、武富 紹信
2. 発表標題 移植後早期グラフト浸潤リンパ球の抗原特異性に関する基礎的検討
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshikazu Ganchiku, Ryoichi Goto, Rumi Igarashi, Ryo Kanazawa, Kazuaki Shibuya, Yasutomo Fukasaku, Norio Kawamura, Masaaki Zaitzu, Masaaki Watanabe, Moto Fukai, Akinobu Taketomi.
2. 発表標題 The Functional Alloreactivity in Vivo of Graft Infiltrating Lymphocytes in Early Phase Post-transplantation in mice.
3. 学会等名 19th Congress of the European Society for Organ Transplantation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshikazu Ganchiku, Ryoichi Goto, Rumi Igarashi, Ryo Kanazawa, Kazuaki Shibuya, Yasutomo Fukasaku, Norio Kawamura, Masaaki Zaistu, Masaaki Watanabe, Akinobu Taketomi
2. 発表標題 Potential Alloreactivity of Early Phase Graft Infiltrating Lymphocytes in Murine Cardiac Transplantation Model
3. 学会等名 American Transplant Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院医学研究院 消化器外科学教室I 研究グループのご紹介 移植グループ  
<http://www.surg1-hokudai.jp/research/>

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