

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17553

研究課題名（和文）移植後アロ応答性T細胞疲弊機構の人為的誘導による新規免疫制御法の開発

研究課題名（英文）Development of novel immune regulating strategy to induce allo-specific exhaustion after transplantation

研究代表者

谷峰 直樹（Tanimine, Naoki）

広島大学・病院（医）・助教

研究者番号：70866516

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：移植臓器に反応するアロ応答性T細胞は臓器移植後免疫応答の中樞を担い、その制御ならびに寛容機構解明にとって非常に重要な免疫細胞として知られる。本研究ではアロ応答性T細胞応答に着目し、臓器移植免疫応答である拒絶応答ならびに寛容状態を予測する新たな免疫モニタリング法を開発した。また、ヒトサンプルを用いてアロ応答性T細胞を検出・分離し、multiplexシングルセル解析により詳細なフェノタイプを解析する手法を確立した。肝移植後の臨床的免疫寛容および免疫抑制下ドナー特異的低応答レシピエントから、同手法を用いてドナー応答性T細胞の分離、シングルセルライブラリーの作成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器移植後移植臓器に対するアロ免疫応答を詳細かつ臨床需要を満たす短時間で把握するモニタリング法の確立によって、個別化免疫抑制療法を提供することを通じて移植医療のさらなる成績向上が期待される。同時に、本アッセイは基礎研究においても詳細な免疫応答細胞を生細胞として解析可能な新たな解析手法としての有用性を認める。移植後免疫制御機構の解明に大きく寄与することで、新たな免疫抑制良好の開発に向けて応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Allo-reactive T cells after organ transplantation is known as key player of post-transplant allo-immune response. The mechanism of regulation for allo-reactive T cells could be central for understanding of tolerance. In this study, focusing on allo-reactive T cells, we developed a novel monitoring method to detect donor-specific immune response for rejection and tolerance in mouse skin transplantation models. With human samples, we also developed a method for multiplex single cell RNA sequence (scRNA-seq) for analyzing allo-reactive T cells. We successfully generated a series of library for scRNA-seq from recipients after living-donor liver transplantation under stable condition with regular immune suppression and clinical tolerance. They will be expected to open the new mechanism for spontaneous tolerance after liver transplantation.

研究分野：移植免疫学

キーワード：免疫寛容 自然免疫寛容 アロ応答性T細胞 免疫モニタリング

1. 研究開始当初の背景

近年の臓器移植医療の臨床成績は、免疫抑制療法の進歩によって標準的治療にまで向上した。しかし、長期の免疫抑制療法による副作用は、新たな問題となっている。肝移植レシピエントにおいて、理想的な免疫抑制剤を中断しても移植片に機能異常をきたさない自然免疫寛容状態が低率ながら観察されており、その免疫制御機構の解明が望まれる。また、臨床的な免疫抑制状態が適正か否かの病態把握のため、侵襲的な組織生検に代わる可変的免疫状態を的確に評価する非侵襲的検査の確立も望まれる。我々はリンパ球混合試験 (MLR) を用い、ドナー反応性 T 細胞の増殖を定量化することで、免疫学的ハイリスク症例管理を含めた免疫抑制療法の最小化・最適化に努めてきた[1-3]。移植後経過時間が免疫寛容獲得に関連するという臨床研究結果は T 細胞 exhaustion が関与を想起させる。自然免疫寛容状態の免疫制御機構の解明およびその克服法を開発する。

2. 研究の目的

I. 移植後免疫制御を目的とした B 細胞を用いた exhaustion 誘導細胞治療とアロ反応性 T 細胞免疫モニタリング法の開発

T 細胞 exhaustion は慢性ウイルス感染や腫瘍など、長時間かつ高用量の抗原暴露下に観察される CD8 陽性 T 細胞の機能低下機序として見いだされ、サイトカイン産生能に続く細胞傷害能・増殖能の消失という段階的機能低下、及び複数の抑制性レセプターの持続的表出を特徴とする。B 細胞は活性化することで高い抗原提示能を獲得することが報告されているが、間接経路 (レシピエント抗原提示細胞が抗原を取り込み抗原提示する方法) で特異的抗原提示が可能か明らかではない。B 細胞を改変することで生体内に抗原特異的の刺激を起こす exhaustion 誘導 B 細胞の作製を目指した。また、アロ反応性 T 細胞が移植免疫機構において重要な免疫応答を担っていることから、MLR によるアロ応答性細胞の増殖能によるドナー免疫応答のモニタリングを行ってきた。5 日間の培養後の増殖能評価は、免疫応答性を評価として有用であるが、臨床的に培養による免疫状態評価の時間的なギャップに課題を残している。本研究では抗原刺激能を高めたアロ B 細胞を用いて、短時間活性化マーカーを用いた迅速なアロ反応性 T 細胞解析法による臨床応用可能な移植免疫応答評価の有用性を検証する。

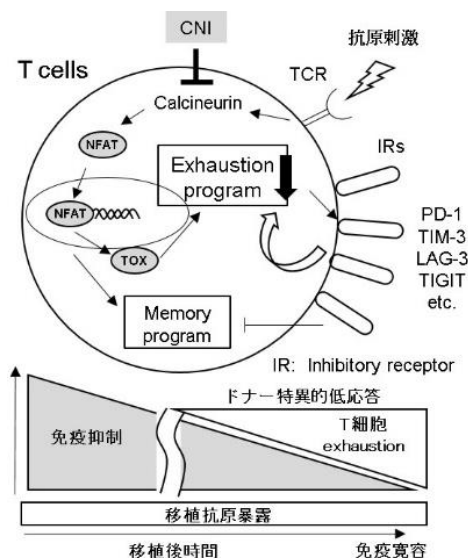


図 1 : T 細胞 exhaustion と臓器移植後免疫寛容
抗原暴露を背景に期待される exhaustion は、免疫調整によって活性化、時間経過を経て免疫制御機構として機能する (仮説)。

II. 肝移植後自然免疫寛容における免疫制御機構の解明

近年の計画的免疫抑制漸減による自然免疫寛容獲得を目指した臨床試験において、寛容誘導独立因子として“移植後経過時間”が唯一繰り返し報告されている[4]。このところからは、ドナー特異的な exhaustion 機構が移植免疫制御機構として働いている可能性が示唆されるが、その詳細は明らかではない (図 1)。本研究では、ドナー反応性 T 細胞を検出する新規免疫モニタリング法により、肝移植後レシピエントのドナー特異的低応答、自然免疫寛容における T 細胞 exhaustion 機構の意義、ならびに免疫制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

I. B 細胞を用いた exhaustion 誘導治療とアロ反応性 T 細胞免疫モニタリング法の開発

I-1. 特異的抗原提示能を有する B 細胞の作成

B細胞は抗原提示能を持つことが知られているが間接経路で抗原提示能を要しているかは明らかではない。LPS 刺激の後、抗原提示フェノタイプの解析、OVA ペプチド特異的応答 T 細胞 (OTI, OTII マウス T 細胞) に対する抗原提示能を評価した。One-way MLR 刺激後の増殖能および活性化指標として活性化応答分子である exhaustion 関連分子の表出変化を評価した。また、刺激 B 細胞をパルス後、OTII マウスに経尾静脈投与を行い、生体内での抗原提示能を探索した。

I-2. 迅速なアロ反応性 T 細胞解析のマウス移植モデルでの検証

短時間反応性活性化マーカー CD154 と CD137 を用い、短培養で施行可能な包括的アロ反応性 T 細胞解析法 (以下、アロ反応性 T 細胞解析法) を考案した。CD40L multimer と IL-4 で刺激培養した活性化ドナーリンパ球を刺激細胞として one-way MLR を行うことで、12-18 時間と短時間でアロ反応性 effector T 細胞、および regulatory T 細胞を検出、解析した。マウス皮膚移植の拒絶モデルおよび CTLA-4 IgG, antiCD40L antibody を投与する末梢性免疫寛容誘導モデル (Balb/c⇒B6WT or C3H) [5] を作成し、ドナー反応性 CD4⁺ CD8⁺ T 細胞の量的・質的な解析を経時的に行い、移植後免疫応答の評価を検証した。

II. 臨床検体を用いたアロ反応性 T 細胞に着目したドナー特異的低応答、臨床的免疫寛容機構の解明

自然免疫寛容状態であってもドナー反応性 T 細胞が検出されることを確認されている。したがって、自然免疫寛容の機構として、exhaustion など末梢性 T 細胞応答制御機構が働いている可能性が高いと考えた。アロ反応性 T 細胞に着目したシングルセル全遺伝子発現解析によって包括的にこれを捉えることとした。健康人ボランティアのランダムアロペアに対し、アロ反応性 T 細胞解析アッセイ [6] を行った。複数検体を同時解析する multiplex 解析を用いて効率的解析を進めるため、アロ反応性 T 細胞および非反応性 T 細胞をフローメトリーでソーティング後、一旦凍結保存した。凍結細胞を解凍後、6-8 検体を同時に 10X platform を用いた multiplex シングルセルライブラリーの作成を行い、遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

I-1. 特異的抗原提示能を有する B 細胞の作成

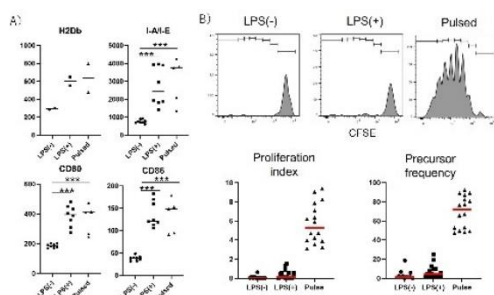


図 2: LPS 活性化 B 細胞は抗原パルス後間接経路での抗原提示能を有する。

B 細胞は LPS 刺激により抗原提示関連分子 MHC class I, class II, CD80, CD86 いずれも発現が増強すること、ペプチドパルスによる変化は認めなかった (図 2A)。直接経路での抗原提示能は既報にて多く報告されているが、間接経路での抗原提示が可能かどうかはエビデンスが少ない。OVA 蛋白に特異性のある T 細胞を有する OTI (CD8⁺)/OTII (CD4⁺) システムを用い、one-way

MLR にてペプチドパルス後間接経路を介した抗原提示能を増殖試験および活性化マーカーとして一過性の exhaustion 関連分子 (PD-1, TIM-3, TIGIT) の発現増強を確認した (図 2B)。パルス後刺激 B 細胞の尾静脈投与により in vivo の生体感作を試みたが単回投与、複数回投与いずれにおいても、OTII マウスの末梢、リンパ節内の T 細胞に免疫応答を認めなかった。現在、exhaustion を誘導するため生体内への効率的な抗原刺激を行うための手法を探索中であ

る。

I-2. 迅速なアロ反応性T細胞解析は皮膚移植モデルで拒絶/寛容導入を予見する

迅速アロ反応性 T 細胞解析法を用い、マウス皮膚移植 MHC full mismatch モデル(拒絶モデル)におけるドナー応答を経時的に評価した。移植後時間経過により CD4+、CD8+ドナー反応性 T 細胞の増加、ドナー反応性 T 細胞に局限したメモリーフェノタイプの増加、IFN- γ ・Granzyme B 産生を認め(図 3)、移植後免疫感作状態が的確に検出されていることが示唆された。

寛容導入モデルでは、BALB/c \rightarrow C3H に末梢性寛容誘導導入を行うことで移植片は長期生着を認めたが、BALB/c \rightarrow B6 では長期生着症例は得られなかった(図 4)。本モデル間において、免疫寛容モデル(BALB/c \rightarrow C3H)では非寛容モデル(BALB/c \rightarrow B6)と比較し、有意にアロ反応性 CD8+T 細胞の割合が低いことが観察された(図 4A)。また、Balb/c ドナーの B6 マウスに対する免疫原性は、C3H に対しての免疫原性と比較し高度なことが、アロ反応性 CD8+T 細胞の Granzyme B や IFN- γ 産生能から示唆された(図 4B)。本新規アッセイにより検出された免疫応答の差異は、一般的な増殖能評価では検出できておらず、新規アロ反応性 T 細胞解析によって、微細な免疫応答状態の観察が可能であることを示した。

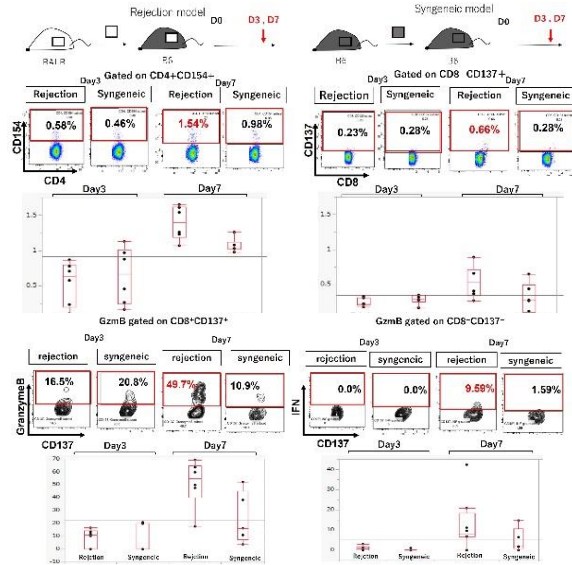


図 3: 皮膚移植後 7 日目に CD4,CD8 ともにドナー反応細胞の増加を認めた。CD8+細胞中ドナー反応性細胞にのみ機能亢進を認めた。

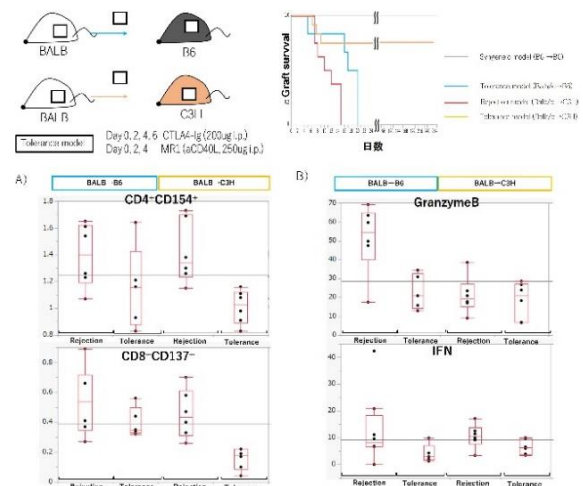


図 4: 寛容達成(Balb/c \rightarrow C3H)モデルでは寛容非達成モデルと比較しドナー応答性 T 細胞の有意な増加を認める。C3H レシピエントに対する CD8 応答細胞機能は B6 に対する応答よりも強力であることが示唆される。

II. 臨床検体を用いたアロ反応性 T 細胞に着目したドナー特異的低応答、臨床的免疫寛容機構の解明

研究代表者が携わった米国における免疫抑制剤積極的漸減による寛容誘導試験において、考案したアロ応答 T 細胞解析により免疫抑制療法下において、また自然免疫寛容状態の肝移植後からもドナー反応性 T 細胞が検出されることが判明した。しかし、免疫抑制剤漸減前の免疫寛容達成は単純な応答性のみからの予測は困難であった。このことから、肝移植レシピエントの抗ドナー T 細胞応答制御には末梢性制御機構が関与していることが示唆される。末梢性 T 細胞制御機構として不応、疲弊、老化ならびに制御性細胞による制御機構など多岐にわたる可能性が考慮される。臨床的な複合状態の理解には包括的な解析が必要であると考え、理化学研究所 Hon Chung 先生との共同研究としてアロ反応性 T 細胞のシングルセル遺伝子発現解析に取り組

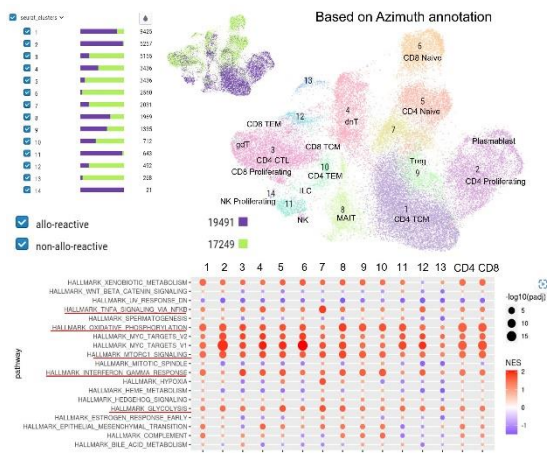


図 5: アロ応答性 T 細胞のシングルセル RNA シークエンス解析 アロ応答性 T 細胞は非応答性 T 細胞と明確に区別され、活性化シグナルならびに代謝経路の亢進など、アロ応答による活性化状態を反映する遺伝子プロファイルを示す

細胞アッセイを行い、非 T 細胞集団、ドナー/サードパーティー反応性 T 細胞、非反応性 T 細胞を分離した。10X platform による Multiplex RNA-seq ライブラリーの作成にも成功しており、コントロール群、移植後免疫抑制群ならびに免疫寛容群の遺伝子発現を比較することで、自然免疫寛容機構を含む肝移植後免疫制御に関わる特徴的に制御されたシグナル経路が検出されることが期待される。

引用文献

1. Tanaka, Y., H. Ohdan, T. Onoe, et al., Low incidence of acute rejection after living-donor liver transplant: immunologic analyses by mixed lymphocyte reaction using a carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling technique. *Transplantation*, 2005. 79(9): p. 1262-7.
2. Tanimine, N., K. Ide, M. Yamashita, et al., Kinetics of cellular and humoral immunity in a successful case of positive crossmatch kidney transplantation: a case report. *Transplant Proc*, 2011. 43(6): p. 2411-4.
3. Tanaka, Y., H. Tashiro, T. Onoe, et al., Optimization of immunosuppressive therapy based on a multiparametric mixed lymphocyte reaction assay reduces infectious complications and mortality in living donor liver transplant recipients. *Transplant Proc*, 2012. 44(2): p. 555-9.
4. Benitez, C., M.C. Londono, R. Miquel, et al., Prospective multicenter clinical trial of immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients. *Hepatology*, 2013. 58(5): p. 1824-35.
5. Larsen, C.P., E.T. Elwood, D.Z. Alexander, et al., Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature*, 1996. 381(6581): p. 434-8.
6. Tanimine, N., B.E. Burrell, K. Deng, et al., Detection of alloreactive T cells from cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods*, 2021. 491: p. 112987.

んだ。多検体を同時解析するため、細胞分離後に一旦凍結処置を行うプロトコルを確立した。凍結/解凍細胞の生存率を検証、最適化した上で、シングルセル RNA 解析が可能な条件設定を行った。健康人同士のランダムアロ応答から抽出されたアロ反応性 T 細胞は NF κ B、TNF シグナルならびに代謝経路の亢進が観察され、アロ応答陽性コントロール群として矛盾しない遺伝子発現プロファイルが確認された。現在までに 6 名の通常免疫抑制療法下に安定した肝移植後レシピエントおよびドナー、6 名の臨床的免疫寛容状態の肝移植後レシピエントおよびそのドナーペアに対し、アロ反応性 T 細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名	谷峰直樹、アハメットセイダヒメトフ、荒田了輔、佐藤幸毅、井出隆太、竹井大介、好中久晶、築山尚史、小野紘輔、竹元雄紀、今岡佑輝、中野亮介、橋本昌和、黒田慎太郎、大平真裕、田原裕之、井手健太郎、小林剛、田中友加、大段秀樹
2. 発表標題	新規移植免疫寛容誘導法の開発めざして
3. 学会等名	第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	荒田了輔、谷峰直樹、中野良介、坂井寛、田原裕之、大平真裕、井手健太郎、田中友加、大段秀樹
2. 発表標題	皮膚移植モデルにおけるアロ反応性T細胞に着目した新規免疫モニタリングの検証
3. 学会等名	第123回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	荒田了輔、谷峰直樹、中野良介、坂井寛、田原裕之、大平真裕、井手健太郎、田中友加、大段秀樹
2. 発表標題	皮膚移植モデルにおけるアロ反応性T細胞に着目した新規免疫モニタリングの検証
3. 学会等名	第41回日本肝移植学会学術集会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	谷峰直樹、Akmet Seidakhmetov、荒田了輔、佐藤幸毅、井出隆太、竹井大介、好中久晶、築山尚史、小野紘輔、竹元雄紀、今岡佑輝、中野亮介、橋本昌和、黒田慎太郎、大平真裕、田原裕之、井手健太郎、田中友加、小林剛、大段秀樹
2. 発表標題	新規移植免疫寛容誘導法の開発を目指して
3. 学会等名	第122回外科学会総会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 谷峰直樹、田中友加、今岡祐輝、佐藤幸毅、小野紘輔、望月哲也、橋本昌和、黒田慎太郎、大平真裕、田原裕之、井手健太郎、小林剛、大段秀樹
2. 発表標題 アカデミックサージョンを育む外科医教育
3. 学会等名 第83回臨床外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷峰直樹、大平真裕、田原裕之、井手健太郎、田中友加、小林剛、大段秀樹
2. 発表標題 外科医は独自性を生かした基礎研究で臨床医学と科学双方の発展に寄与する
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021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
研究協力者	大段 秀樹 (ohdan Hideki)		
研究協力者	田中 友加 (Tanaka Yuka)		

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