

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591634

研究課題名（和文）ドナー特異的制御性 T 細胞解析による移植後の新しい免疫寛容評価法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a new evaluation method of post-transplant immune tolerance by donor-specific regulatory T cell analysis

研究代表者

羽根田 正隆 (HANEDA MASATAKA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座講師

研究者番号：50436995

研究成果の概要（和文）：

Allo reactive T 細胞の免疫状態モニタリングについて特異性を高めた ELISpot assay を用いて解析を行った。移植 1 年後で spot 数に増減を認めなかった。末梢血中の Treg と腎臓移植後の拒絶反応の関連性について解析を行った。移植後一旦 Foxp3 の発現は低下するが、移植 1 年後には移植前値まで回復した。移植 1 年後以降に急性拒絶反応は起こりにくくなるが、この原因は Anergy や clonal deletion ではなく、Treg による免疫制御によると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We performed analysis by using the improved ELISpot assay for monitoring the donor specific allo reactive T cells. The numbers of allo reactive T cells were not altered in one year after kidney transplantation. We also analyzed about the relationship between rejection and Treg cells number in the peripheral blood. Once the expression of Foxp3 is lowered after transplantation, one year after the transplant was recovered up to the value before transplantation. Acute rejection does not occur more than one year after, because Treg, rather than clonal deletion and anergy, may be due to immune regulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：移植免疫

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：ドナー特異性・allo reactive T 細胞・制御性 T 細胞・Anergy・clonal deletion・ELISpot assay・

1. 研究開始当初の背景

日本では年間約 3 万人の新規人工透析導入者がいるが、移植腎提供者数が限られている

ために腎臓移植数は年間約 1400 例といわれている。免疫抑制剤の進歩により、移植腎の拒絶はほとんど見られなくなったが、同時に

免疫抑制剤の過剰投与による感染症や薬剤の副作用による合併症が多く認められるようになっている。感染症としてはサイトメガロウイルス感染症、EBウイルスによる lymphoproliferative disease (PTLD)、BKウイルス感染症が挙げられる。薬剤の副作用としてはカルシニューリン阻害剤による腎毒性、糖尿病、高脂血症、糖尿病などがあり、長期的には腫瘍の発生頻度が上昇する可能性も指摘されている。以上より過剰な免疫抑制による感染症や薬剤の副作用を減らすためには適切な免疫抑制療法の指標となるモニタリングが必要である。

2. 研究の目的

移植症例のうちほんの僅かではあるが、移植後に免疫抑制剤の投与が必要でなくなる免疫寛容状態が得られる場合がある。マウスでの実験結果から免疫寛容の機序として、ドナーHLAに対して同種反応性T細胞クローンが消失 (clonal deletion)、またはクローンは存在するものの増殖やサイトカインの産生が起きなくなるアネルギー (clonal anergy)、また反応するクローンは存在するが、T regにより免疫応答が抑制される機序が考えられる。一方、ドナー特異的allo reactive T細胞が急性拒絶反応に関係するといった報告はあるが、移植後に経時的に観察した報告はほとんどなく、T regとの関連についても報告はない。免疫寛容をモニターする確立された方法については、過去に試みられたMLR, ELISpot assay, 細胞内サイトカイン測定などは、有効な方法ではなく、免疫不全マウスの足掌にドナーとレシピエントの細胞を混合し皮下注射し、皮膚の厚みで判定するといった方法 (Trans vivo DTH) も報告されているが、煩雑であり簡便に行えるものではない。またclonal deletion、anergy、Tregをそれぞれについてモニター出来る方法も未だ存在しない。本研究により免疫寛容をPCR法およびELISpot assay、FACSなどを用い簡便に解析する新たな方法について探求した。

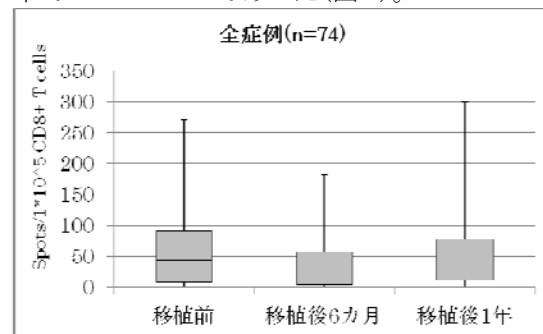
3. 研究の方法

本研究ではまず①ドナー特異的allo reactive T細胞について腎臓移植前後でのELISpot assay法で経時変化を観察し、拒絶反応などの臨床事象との関連を明らかにした。次に②T regについて腎臓移植前後での経時変化を観察し、拒絶反応などの臨床事象との関連を明らかにした。また③allo reactive T細胞のTCR repertoireとTregのTCR repertoireを比較解析し拒絶反応および免疫寛容に関係するT regのsubpopulationを

明らかにしようと試みた。

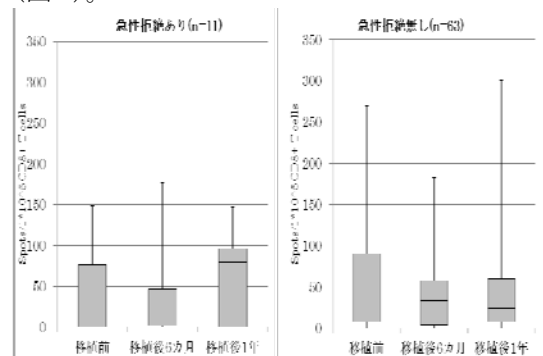
(1)ドナー特異的allo reactive T細胞について

インフォームドコンセントを行い同意いただいたドナー・患者より検体を提供いただいた。ドナー由来B細胞をhumanCD40Lの発現するNIH3T3細胞上で共培養をし、癌化せず無限に増殖するようになったCD40B細胞をドナー特異的抗原定時細胞として用いた。患者検体は移植前、移植後6カ月後、1年後の定期腎生検時に採血をし、この末梢血よりミルテニー社のCD8+ T細胞分離マイクロビーズを用いて細胞を分離した。ELISpot assayはhuman IFN-gをコートしたELISpot plateにドナー由来CD40B細胞と患者由来CD8+ T細胞を40時間共培養し、HRPがラベルされた抗human IFN-g抗体を二次抗体として用い、TBMを発色剤として用いた。得られたSpotを実体顕微鏡で撮影、spot数を計測した。臨床事象としては、病理診断上急性拒絶反応の有無、移植後一年時のCr値/eGFR値との関連について解析した。またCD40B細胞が培養可能であった74症例を用いた。結果は移植前spots数平均値 47.3±61.0、移植後6カ月が34.5±45.9、移植後1年で40.8±55.4であった(図1)。



(図1. 移植前後のallo reactive CD8+ T細胞のELISpot結果)

病理診断で急性拒絶反応有とされた11例と無しとされた63例について移植前spot数および移植後spot数に差は見いだせなかった(図2)。

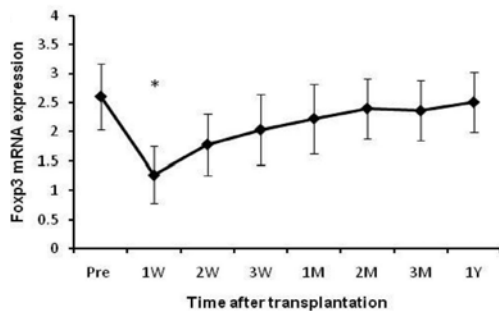


(図2. 急性拒絶反応の有無とallo reactive CD8+ T細胞のELISpot結果)

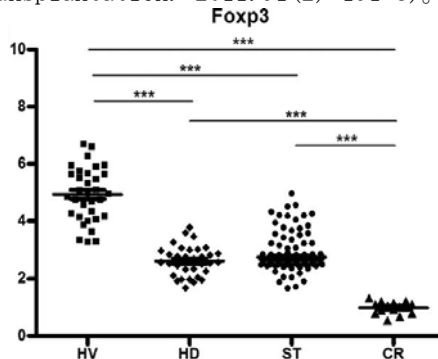
移植後Cr値およびeGFR値についても移植前spot数に関連があるようであったが、統計学的には有意でなかった。臨床事象については経過観察を続けてゆくので、慢性拒絶反応との関連について、今後報告を行う予定である。今まで報告のあったELISpot assayにおいては、移植後急性拒絶反応の発症頻度は30%前後で、臨床的に明らかな症状を伴っていたおり、移植前のspot数が移植後の拒絶反応や腎機能障害を予測できるというものであったが、今回の我々の研究においては急性拒絶反応の発症頻度は14.9%であり、臨床的症状を伴っていたのは僅か2例であった。現在わが国の生体腎移植が大変成績が良く、きちんと免疫抑制がかかっており、そのために海外の報告と大きく異なっていると考えられた。

(2) Tregについて

インフォームドコンセントを行い同意いただいた患者より検体を提供いただいた。患者検体は移植前、移植後6カ月後、1年後の定期腎生検時に採血をし、QIAGEN社のmRNA分離kitを用いて末梢血全血よりmRNAを分離した。移植後すぐにFoxp3の発現は低下し、その後6カ月から1年して移植前のレベルにまで回復した(図3)。



(図3. 末梢血Fxp3 mRNAの発現の経時変化) 急性拒絶反応との関連については見いだせなかったが、慢性拒絶反応を認めた症例において末梢血Fxp3の発現低下を認めた(図4) (Transplantation. 2011. 91(2):191-8)。



(図4. 末梢血Fxp3 mRNA発現レベル: 健常人(HV)・透析患者(HD)・腎臓移植症例において腎機能の安定している症例(ST)・慢性拒絶反応(CR))

(3) TregのTCR repertoireとallo reactive T細胞のTCR repertoireを比較解析についてまずallo reactive T細胞のTCR repertoireについて解析した。上記①の方法で用いたドナーCD40B細胞と患者末梢血よりミルテニー社のCD4+ T細胞分離マイクロビーズを用いて細胞を分離したCD4+T細胞を共培養し、Spotが出現する40時間後に反応増殖した所でTCR repertoireを行った。しかし反応前と変化がなく、全体のCD4+T細胞の割合に対して反応するT細胞が僅かなため、検出できないと判明した。そこで、IFN-g産生細胞を分離するkitを用いてallo reactive T細胞のみを分離するように試みた。しかしながら得られる細胞数が微量なため、通常の方法ではmRNAが分離できず、反応増殖するCD4+ T細胞をクローン化し、TCRを観察するか、あるいはsingle cell mRNA分離のような微量なサンプルを処理できる技術が必要となってしまい、中止とした。次にTregのTCR repertoireについて、現在健常人を用いて解析中であるが、通常のCD4+ T細胞と比較して差が認められていない。抗原特異的(腎移植の場合Allo特異的)なTCRによってTregが働くのかあるいは、非特異的でも細胞集団としてある一定数存在することで働くのか、現在も議論が続いているところであるが、まずはTregの量が一定数ないと制御する力が弱くなることは判っており、移植前にTregの少ない症例において拒絶反応がおりやすいかどうか、移植前より末梢血mRNAが保存してある症例については今後さらに慢性拒絶反応発症との関連性について解析が必要である。

4. 研究成果

(1) 今まで報告されていたELISpot assayは抗原提示細胞としてドナー細胞をその都度準備する必要があった。今回我々が開発した用いた方法では、CD40L細胞上でドナーB細胞を培養することで、細胞を無限に増殖でき、ドナーへの負担を減らすことが出来る。また反応するT細胞が末梢血リンパ球(T細胞とB細胞の混合)あるいは末梢血単核球PBMCのままであったが、より特異性を高め、CD8+あるいはCD4+ T細胞を用いてELISpot assayを行うことが確認できた。しかしながらこの特異性を高めたELISpot assayを用いたallo reactive T細胞の免疫状態モニタリングでも、現在日本で行われている免疫抑制剤の組合せ、使用量においては、急性拒絶反応を予測することは困難であることが判明した。

(2) Tregと腎臓移植の関連について、移植後一旦Fxp3の発現は低下するが、移植一年後には移植前値に回復した。また急性拒絶反応

については関連性を見いだせなかったが、慢性拒絶反応との関連を見出した。

(3)次にTregのTCR repertoireについて、現在健常人を用いて解析中であるが、通常のCD4+ T細胞と比較して差が認められていない。抗原特異的(腎移植の場合Allo特異的)なTCRによってTregが働くのかあるいは、非特異的でも細胞集団としてある一定数存在することで働くのか、現在も議論が続いているところであるが、Tregの量が一定数ないと制御する力が弱くなるので、Tregが少ないことで拒絶反応がおこっていると考えられる場合には、Tregの細胞移植により増やすことで、治療することができると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

①Iwasaki K, Miwa Y, Ogawa H, Yazaki S, Iwamoto M, Furusawa T, Onishi A, Kuzuya T, Haneda M, Watarai Y, Uchida K, Kobayashi T. Comparative Study on Signal Transduction in Endothelial Cells After Anti-A/B and Human Leukocyte Antigen Antibody Reaction: Implication of Accommodation. *Transplantation*. 査読有、2012、93(4)、390-397.

②Iwase H, Kobayashi T, Kodera Y, Miwa Y, Kuzuya T, Iwasaki K, Haneda M, Katayama A, Takeda A, Morozumi K, Watarai Y, Uchida K, Nakao A. Clinical significance of regulatory T-cell-related gene expression in peripheral blood after renal transplantation. *Transplantation*. 査読有、2011、91(2)、191-8.

③Iwasaki K, Miwa Y, Haneda M, Uchida K, Nakao A, Kobayashi T. Significance of HLA class I antibody-induced antioxidant gene expression for endothelial cell protection against complement attack. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有、2010、391(2)、1210-5.

④Miwa Y, Yamamoto K, Onishi A, Iwamoto M, Yazaki S, Haneda M, Iwasaki K, Liu D, Ogawa H, Nagasaka T, Uchida K, Nakao A, Kadomatsu K, Kobayashi T. Potential value of human thrombomodulin and DAF expression for coagulation control in pig-to-human

xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 査読有、2010、17(1)、26-37.

⑤Niwa M, Miwa Y, Kuzuya T, Iwasaki K, Haneda M, Ueki T, Katayama A, Hiramitsu T, Goto N, Nagasaka T, Watarai Y, Uchida K, Nakao A, Kobayashi T. Stimulation index for PCNA mRNA in peripheral blood as immune function monitoring after renal transplantation. *Transplantation*. 査読有、2009、87(9)、1411-4.

⑥Kurata Y, Kato M, Kuzuya T, Miwa Y, Iwasaki K, Haneda M, Amioka K, Watarai Y, Uchida K, Nakao A, Kobayashi T. Pretransplant pharmacodynamic analysis of immunosuppressive agents using CFSE-based T-cell proliferation assay. *Clin Pharmacol Ther*. 査読有、2009、86(3)、285-9.

[学会発表] (計9件)

①大脇麻未、羽根田正隆、倉田洋子、葛谷孝文、網岡克雄、山田清文、岩崎研太、小林孝彰：免疫抑制薬の抗体産生抑制効果に対する薬力学解析の試み、第47回日本移植学会、2011年10月5日、仙台国際センター(宮城県)

②岩瀬勇人、小林孝彰、岩崎研太、羽根田正隆、片山昭男、武田朝美、両角國男、渡井至彦、打田和治、小寺泰弘、中尾昭公：腎移植後の免疫モニタリングとしての末梢血 Foxp3 mRNA 定量の意義、第46回日本移植学会、2010年10月22日、みやこめっせ(京都府)

③羽根田正隆、岩崎研太、小林孝彰、葛谷孝文、渡井至彦、武田朝美、両角國男、打田和治：ELISpot assay を用いた腎臓移植後のドナー特異的 allo reactive T細胞の解析、第46回日本移植学会、2010年10月20日、みやこめっせ(京都府)

④Iwase, H.; Kobayashi, T.; Iwasaki, K.; Haneda, M.; Katayama, A.; Takeda, A.; Morozumi, K.; Watarai, Y.; Uchida, K.; Kodera, Y.; Nakao, A. Potential Value of Foxp3 and Regulatory T cell-Related Gene Expression Monitoring in Peripheral Blood After Renal Transplantation International Congress of The Transplantation Society. Vancouver(Canada) 2010/8/15~19

⑤Niwa, M.; Miwa, Y.; Haneda, M.; Iwasaki,

K.; Katayama, A.; Hiramitsu, T.; Goto, N.; Nagasaka, T.; Watarai, Y.; Uchida, K.; Kobayashi, T. Immune Function Monitoring of PCNA and P21 mRNA Expression in Stimulated Peripheral Blood after Renal Transplantation. AMERICAN TRANSPLANT CONGRESS 2010. SanDiego(USA) 2010/5/1~5

⑥岩瀬勇人、小林孝彰、岩崎研太、羽根田正隆、片山昭男、武田朝美、渡井至彦、打田和治、小寺泰弘、中尾昭公：腎移植後の末梢血 Foxp3mRNA モニタリングの臨床意義、第 110 回日本外科学会定期学術集会、2010 年 4 月 8 日、名古屋国際会議場(愛知県)

⑦岩瀬勇人、小林孝彰、羽根田正隆、岩崎研太、片山昭男、渡井至彦、打田和治、中尾昭公：腎移植における免疫寛容と Foxp3、第 45 回日本移植学会、2009 年 9 月 17 日、京王プラザ(東京都)

⑧羽根田正隆、岩崎研太、小林孝彰、葛谷孝文、渡井至彦、武田朝美、両角國男、打田和治：腎臓移植後のドナー特異的 allo reactive T 細胞の動態解析と病理所見の関連性について、第 45 回日本移植学会、2009 年 9 月 17 日、京王プラザ(東京都)

⑨Iwase, H.; Kobayashi, T.; Iwasaki, K.; Haneda, M.; Kuzuya, T.; Katayama, A.; Uchida, K.; Koder, Y.; Nakao, A. Semi-quantitative Analysis of Foxp3. ESOT Paris(France)、2009, 8/30~9/2

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/tx-immunology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽根田 正隆 (HANEDA MASATAKA)
名古屋大学・医学系研究科・寄附講座講師
研究者番号：50436995

(2) 研究分担者

小林 孝彰 (KOBAYASHI TAKAAKI)
名古屋大学・医学系研究科・寄附講座教授
研究者番号：70314010

岩崎 研太 (IWASAKI KENTA)
名古屋大学・医学系研究科・寄附講座助教
研究者番号：10508881