

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08615

研究課題名(和文) CD8制御性T細胞による臓器移植後免疫寛容をめざした革新的細胞移入療法の開発

研究課題名(英文) Development of an innovative cell transplantation therapy using CD8 regulatory T cells to induce immune tolerance after organ transplantation

研究代表者

野竹 剛 (Notake, Tsuyoshi)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教

研究者番号：40645511

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)：計画した実験の結果が期待したものではなく、CD8Tregを用いた免疫寛容を誘導するという細胞移入療法の開発は断念した。肝移植後の拒絶反応に影響を及ぼす可能性のある、肝臓内の他の免疫細胞に関して検討を行う方針に変更した。肝臓内のKupffer cell (F4/80hiCD11b+Tim4+)に着目し、IRF2の及ぼす影響について検討を行った。Kupffer cell上にMHC classIIを発現ようになるためには、IFNによる外的な刺激とcell intrinsicなIRF2の働きが必要であることが解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Kupffer細胞分化のmechanismを解明することは、肝臓局所での免疫応答、つまり肝移植後の拒絶反応や腫瘍に対する免疫応答、肝臓における発がんの病態解明につながる可能性がある。今回我々は、Kupffer細胞上のMHC classII発現には肝臓局所におけるIFNの存在と、同細胞内でのIRF2の働きが重要であることを解明した。Kupffer細胞が肝臓局所において免疫抑制状態の誘導に重要な役割を果たしていることが報告されている。この知見をもとに、IRF2を介した免疫制御やIRF2発現の程度による拒絶のリスク評価などへの臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The transcription factor IRF2-dependent Ly49 T cells which we found in our previous study had a different phenotype from previously reported CD8 positive inhibitory T cells (CD8 Tregs). We had planned to evaluate the function of CD8 Tregs using an ex vivo TFH-stimulated mice model using peptides, but we were unable to establish this model. For this reason, we gave up on developing a cell transfer therapy to induce immune tolerance using CD8 Tregs, and instead changed our approach to investigating other immune cells in the liver that may affect the rejection reaction after liver transplantation. We focused on Kupffer cells (F4/80hiCD11b+Tim4+) in the liver and investigated the effects of IRF2 on this population. We found that external stimulation by IFN and the action of cell intrinsic IRF2 are necessary for Kupffer cells to express MHC class II.

研究分野：消化器外科学

キーワード：移植免疫 Kupffer細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

周術期管理および免疫抑制剤の発達により、臓器移植は安全に行うことが出来るようになった。しかし、慢性拒絶や免疫抑制剤を生涯にわたり長期に服用することの合併症が、依然として問題となっている。これらの問題を解決する方法として制御性 T 細胞を移入して、免疫寛容を獲得しようという試みがなされ、すでに臨床応用も始まっている(1)。

制御性 T 細胞としては、CD4+ Foxp3+ T 細胞についての研究が進み、近年では臨床応用も行われている。半面、CD8+制御性 T 細胞 (CD8+ Treg) の存在も以前から指摘されていたが詳細は不明であった。近年、NK 細胞受容体として知られる Ly49 や NKG2A を発現した CD8+ T 細胞が follicular helper T 細胞 (TFH) を抑制することで自己抗体産生を抑制し、自己免疫寛容を維持していることが報告された(2, 3)。これらの研究を背景に、CD8+ Treg に関しても注目が集まっている。

我々は、Ly49 分子を発現する T 細胞 (主に CD8+ T 細胞) の発生に転写因子 interferon regulatory factor-2 (IRF-2) が重要な役割を果たしていることを解明した(4)。また、研究対象の Ly49+ CD8+ T 細胞 (Ly49+ T 細胞) は、Ly49 のみならず NKG2A や CD44, CD122, を細胞表面に発現しており、Kim ら(3)の報告した CD8+ Treg と細胞表面マーカーが酷似しており、同じ subset である可能性が高いと考えている。

以上の背景から、Ly49+ T 細胞は CD8+ Treg としての機能を有し、TFH を抑制することで臓器移植における免疫寛容を誘導することが出来るのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

これまでの検討から Ly49+ T 細胞が CD8+ Treg と酷似しているため、同様の機能を有する可能性が高いと考えている。しかし、同 subset が TFH の機能を抑制しうるかについては、まだ十分な結果を得ていない。さらに、臓器移植において免疫寛容を誘導するかは不明である。そこで本研究では、「Ly49+ T 細胞は TFH を介した液性免疫を抑制することにより、臓器移植後のグラフトに対する免疫寛容を誘導する」という仮説をたて、これを証明することを目的とした。

3. 研究の方法

上記の作業仮説を立証するため、以下の実験系を構築した。

Flowcytometry を用いた IRF2 依存性 Ly49+ T 細胞 phenotype の解析

野生型マウスより脾臓およびリンパ節を摘出し、それらの臓器からリンパ球を抽出。抽出したリンパ球を、各種抗体で染色し、Flow cytometer (FACS Aria III, BD Biosciences) を用いて細胞の phenotype を解析した。つまり、IRF2 依存性 Ly49+ T 細胞が CD8+ Treg の特徴である CD44, CD122, PD-1, CXCR5, ICOS を発現しているか確認した。

ex vivo 刺激系を用いた TFH 機能制御の検討

Ly49+ T 細胞が TFH を抑制する能力を有することを証明するために、ペプチドを用いた ex vivo の TFH 刺激系に purify した Ly49+ T 細胞を共培養することで、TFH の活性化を抑制し抗体産生量が変化するか実験した。野生型マウスからの CD8+ T 細胞 (Ly49+ T 細胞含む) または IRF-2 欠損マウス由来の CD8+ T 細胞 (Ly49+ T 細胞含まない) を加えた群、さらに CD8+ T 細胞を加えない群の 3 群で、TFH による抗体産生誘導能について検討を行った。

肝臓内の Kupffer cell (KC) に関する検討

野生型マウス及び IRF2 欠損マウス、さらには IFN 欠損マウスより肝臓を摘出し、肝臓より単球を抽出。抽出した単球を Kupffer cell の marker である F4/80, CD11b, Tim4 で染色。Flow cytometer (FACS Aria III, BD Biosciences) を用いて細胞の phenotype を解析した。F4/80hiCD11b+Tim4+を Kupffer cell として同定。野生型と IRF2 欠損マウスで Kupffer 細胞の数、細胞表面に発現するマーカーの種類について検討を行った。

in vivo における INF 補充実験

1) IFN 投与

IFN を各マウスに腹腔内投与し。投与後 2 日目にマウスより肝臓を摘出。Kupffer 細胞上の MHC class II (MHC-II) の発現に違いが生じるか検討した。

2) Parabiosis

正常な免疫細胞を間組織に移行させて、細胞間の inter action を正常に回復させた状態での KC の状態を評価するために parabiosis の手法を用いた。Parabiosis surgery はすでに報告さ

れている方法にのって行った(5)。概説すると、イソフルエン麻酔下に、2匹のマウスを肘から膝まで縦に皮膚切開を置き、切開した皮膚を、2匹をつなぎ合わせるようにして縫合した。Host (CD45.2 バックグラウンド)と partners (CD45.1 バックグラウンド)由来の細胞はそれぞれ anti-CD45.1 Ab と anti-CD45.2 Ab により評価した。

遺伝子発現の検討

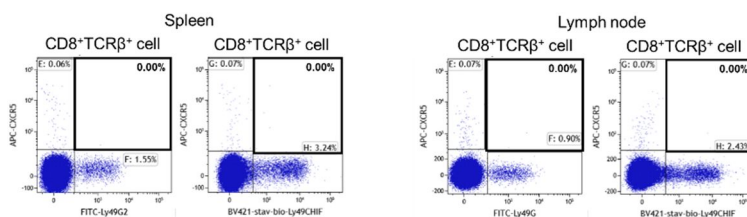
Real-time RT-PCR の手法を用い、MHC-II 発現に関連する遺伝子について、KC での発現レベルを検討した。

4. 研究成果

Flowcytometer による IRF2 依存性 Ly49+T 細胞の phenotype の検討

過去の報告(3)では、CD8 Treg の特徴として CD44, CD122, PD-1, CXCR5, ICOS を発現していると報告されているが、我々のこれまで検討してきた IRF-2 依存性 Ly49+ T 細胞は CD44, CD122 は発現するものの、CXCR5, ICOS の発現は確認されなかった。(図 1)

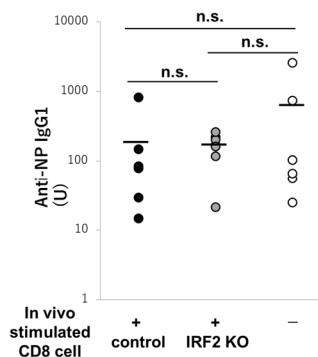
図① FlowcytometerによるIRF2依存性Ly49+T細胞のphenotypeの検討



②ex vivo 刺激系を用いた TFH 機能制御の検討

In vitro で活性化させた CD8 Treg を移入することにより、follicular helper T 細胞の働きが抑えられ、ex vivo の実験系で抗体産生が抑制されていなければならないが、抗体産生の抑制を得ることができなかった。5 回同様の検討を繰り返したが、1 回も上記の予想された結果を得られず、ペプチドを用いた ex vivo の TFH 刺激マウスモデルの確立は断念した。

図② Ly49 T細胞によるTFH機能抑制実験 (ex vivo)



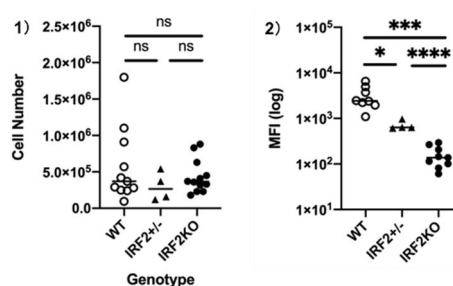
以上の結果より、仮説として立てていた、Kim らの報告した CD8+ Treg と IRF-2 依存性 Ly49 T 細胞が相同であるということが間違っていた可能性が強くなり、かつ CD8 Treg としての機能を評価するための動物モデルの確立もできなかったことから、当初本研究の目的として考えていた、IRF-2 依存性 Ly49 T 細胞の CD8 Treg として作用しているということを証明し、かつ移植医療への応用を目指した動物実験を行うことは困難となった。

そこで、当初の CD8 Treg と移植後の免疫応答に関する実験計画は断念し、肝移植後の拒絶反応に影響を及ぼす可能性のある、肝臓内の他の免疫細胞に関して検討を行う方針に変更した。

肝臓内の Kupffer cell (KC) に関する検討

我々は過去に、IRF-2 欠損マウスでは樹状細胞の分化に異常があることを報告している(6)。そこで今回、肝臓内の Kupffer cells (KC) における IRF-2 の影響について解析を行った。野生型マウスと IRF-2 欠損マウス間では、肝臓内の KC の数に有意差は認めなかったが(図 -1) IRF-2 欠損マウスの KC では有意に MHC-II の発現が低下していた(図 -2)。

図③ IRF-2欠損マウスにおけるKupffer細胞の解析



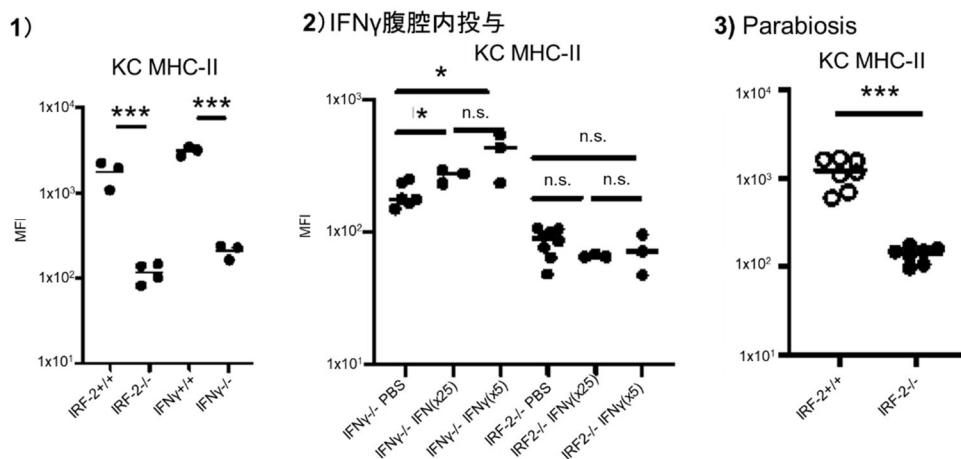
in vivo における INF 補充実験

INF はマクロファージの活性化に重要であることがすでに報告されている。実際、IFN 欠損マウスでは KC 上の MHC-II の発現は低下していた(図 -1)。KC 上の MHC-II の発現が低下して

いる IRF-2 欠損マウス、IFN γ 欠損マウスそれぞれに IFN γ を腹腔内投与して補充すると、IFN γ 欠損マウスにおいては KC 上の MHC-II の発現は回復したが、IRF-2 欠損マウスにおいては回復は見られなかった (図 -2)。

また、マクロファージの活性化にはサイトカインだけでなく、免疫細胞間の細胞間の interaction が重要な可能性があるため、parabiosis の手法を用い、それぞれの遺伝子欠損マウスに、partner として野生型マウスを接合させ、正常なリンパ球をはじめ免疫細胞が、遺伝子欠損マウスの肝臓に移入できる状況を作り、KC 上の MHC-II の発現の変化を検討した。すると、IFN γ 欠損マウスの KC では MHC-II の発現は上昇したが、IRF-2 欠損マウスの KC では MHC-II の発現回復は見られなかった (図 -3)。

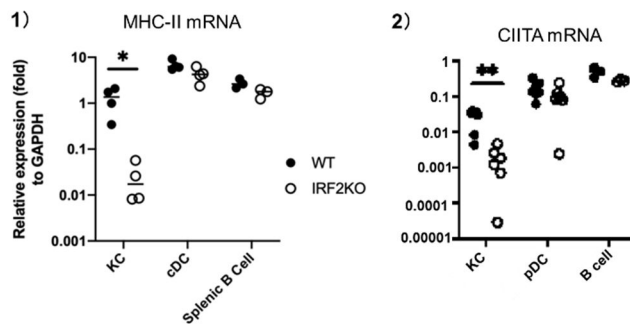
図④ Kupffer細胞上のMHC-II発現におけるIFN γ の影響



RT-PCRによる遺伝子発現の検討

KC における MHC-II mRNA の発現を RT-PCR により定量的に解析すると、IRF-2 欠損マウスでは野生型より有意に MHC-II mRNA 発現のレベルが低下していることが分かった (図 -1)。そこで MHC-II 発現に関わる遺伝子に関して検討すると、IRF-2 欠損マウスの KC では、転写因子 CIITA の発現が低下していた (図 -2)。

図⑤ RT-PCRによるKC内での遺伝子発現レベルの検討



以上の結果から、肝臓内の KC では、MHC-II の発現に IFN γ の存在が必要で、かつ IRF-2 は転写因子 CIITA の発現レベルを制御することで KC 上の MHC-II 発現に重要な役割を担っていることが分かった。

本研究で得た知見を基に、KC の肝移植後の拒絶における働きについて IRF-2 の作用を絡めて研究を進める予定である。

【引用文献】

1. Todo S, Yamashita K, Goto R, Zaitsumi M, Nagatsu A, Oura T, et al. A pilot study of operational tolerance with a regulatory T-cell-based cell therapy in living donor liver transplantation. *Hepatology*. 2016;64(2):632-43.
2. Kim HJ, Verbinnen B, Tang X, Lu L, Cantor H. Inhibition of follicular T-helper cells by CD8(+) regulatory T cells is essential for self tolerance. *Nature*. 2010;467:328-32.
3. Kim HJ, Wang X, Radfar S, Sproule TJ, Roopenian DC, Cantor H. CD8+ T regulatory cells express the Ly49 Class I MHC receptor and are defective in autoimmune prone B6-Yaa mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(5):2010-5.
4. Notake T, Horisawa S, Sanjo H, Miyagawa S, Hida S, Taki S. Differential requirements for IRF-2 in generation of CD1d-independent T cells bearing NK cell receptors. *J Immunol*. 2012 ;188:4838-45.
5. Kamran P, Sereti KI, Zhao P, Ali SR, Weissman IL, Ardehali R. Parabiosis in mice: a detailed protocol. *J Vis Exp*. 2013;80:50556.
6. Ichikawa E, Hida S, Omatsu Y, Shimoyama S, Takahara K, Miyagawa S, et al. Defective

development of splenic and epidermal CD4⁺ dendritic cells in mice deficient for IFN regulatory factor-2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:3909-14.

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
研究分担者	清水 明 (Shimizu Akira) (00447773)	信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・准教授 (13601)	
研究分担者	窪田 晃治 (Kubota Koji) (10598220)	信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師 (13601)	
研究分担者	副島 雄二 (Soejima Yuji) (30325526)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	
研究分担者	増田 雄一 (Masuda Yuichi) (60467149)	信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・准教授 (13601)	

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