

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09385

研究課題名（和文）Indirectアロ応答T細胞の同定と抗ドナー抗体感知モニタリングへの応用

研究課題名（英文）Identification of Indirect Alloreactive T-Cells and Application to Monitoring of anti-Donor Antibody Sensing

研究代表者

岩崎 研太（IWASAKI, KENTA）

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10508881

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）：間接的アロ応答によるドナーHLA特異的抗体（DSA）の生成は、移植臓器の長期生存に有害である。本研究では、間接的アロ応答を評価する新しい方法を確立した。CD4+T細胞の増殖は、同種抗原をパルスしたDCとの共培養後に強く観察された。DSA陽性患者において、IL-21産生メモリーT細胞は、移植前と比較して移植後に有意に増加した（ 9.23 ± 9.08 対 43.9 ± 29.1 、 $P < 0.001$ ）。間接経路のCD4 + T細胞応答を評価することにより、de novo DSA産生の基礎となるメカニズムに関する新たな知見が得られ、抗体媒介性拒絶反応に対する効果的な戦略の開発につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器移植患者では術後にB細胞を活性化する濾胞性T細胞が増加する。T/B細胞は外来抗原ペプチド断片や、その3次元構造を各々の受容体で認識することになり、抗原決定基はエピトープと呼ばれる。その重要性についてはこれまでin silicoで解析したところ、T/Bの推定エピトープ数の多さと抗ドナーHLA抗体産生に相関関係が認められた。また、エピトープレベルで共通推定ペプチドが存在する場合にドナーHLA特異的抗体が生じやすいことを報告した。この仮説立証ため、樹状細胞にドナー抗原を貪食・提示させ、活性化されるT細胞を検出し移植後の感作状態を評価できるin vitro実験系を構築した。

研究成果の概要（英文）：Generation of donor-specific human leukocyte antigen antibody (DSA) via indirect allorecognition is detrimental to long-term survival of transplant organs. The detection of such immune responses would make it possible to define patients with high risk of sensitization. In this study, we established a novel method for evaluating indirect allorecognition to assess sensitization in kidney transplant recipients. CD4 + T cell proliferation was strongly observed in following coculture with allogeneic antigen-pulsed DC leading to interferon- and IL-21 production. In de novo DSA-positive patients, IL-21-produced CD45RA - CD4 + T cells were significantly increased after transplantation compared with before transplantation (9.23 ± 9.08 versus 43.9 ± 29.1 , $P < 0.001$). Assessment of indirect pathway CD4 + T cell response could provide new insights into the underlying mechanism of de novo DSA production, leading to the development of effective strategies against antibody-mediated rejection.

研究分野：移植免疫

キーワード：移植免疫 ヒト免疫 エピトープ 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)-1 免疫抑制剤の功罪

禁忌と言われた ABO 血液型・HLA 不適合移植が、強力な脱感作療法 (B 細胞除去、抗体除去) と良質な免疫抑制剤を背景に行われている。しかし、非特異的な免疫抑制に起因する感染症や、悪性腫瘍罹患の問題は解決されていない。免疫抑制薬の長期服薬に伴う副作用は、現代の移植医療における大きな課題として浮かび上がってきた。

(1)-2 免疫順応・寛容

免疫抑制剤が不必要となる免疫寛容誘導では、制御性機能を持つ細胞移入法が中心に位置し、世界中で臨床応用も試みられている。肝移植では免疫抑制剤の完全離脱の成功例も報告されているが、他臓器での寛容達成は少ないことに加え、免疫抑制剤減量時の拒絶反応の発症が大きな課題である。抗体接着・補体活性が確認されるが臨床的に問題の無い免疫順応はしばしば臨床で散見される。申請者はこれまで抗 A/B 血液型抗体にさらされた内皮細胞は補体制御因子発現上昇による補体傷害軽減、PD-L1 発現上昇によるアロ応答減弱など (BBRC 2011, Transplantation 2012, Transplant. Int. 2013, Transplant. Immunol. 2018, Clin. Exp. Immunol. 2020) 免疫順応研究を抗体接着内皮細胞の解析を中心に報告してきた (図 1)。

(1)-3 アロ応答

アロ応答は大きく 2 つに分かれる。Direct recognition ; ドナーHLA-class II をレシピエント CD4 T 細胞が直接認識し、拒絶反応を誘発する。Indirect recognition ; ドナーHLA 抗原を提示した抗原提示細胞 (Antigen Presenting Cell ; APC) と CD4 T 細胞の反応。一部が濾胞性 T 細胞 (follicular helper T-cell ; Tfh) となり、B 細胞の活性化・成熟化を促し DSA 産生細胞へと分化させる。いずれの反応でも制御性 T 細胞 (regulatory T-cell ; Treg) の重要性は提示されている。近年では濾胞性制御性 T 細胞 (T-follicular regulatory cells ; Tfr) といった、胚中心に遊走し抗体産生の活性化を抑制する細胞の重要性も報告されている。成熟 Tfr は、Tfh/Treg 両方の転写ネットワークを獲得しながら IL-2 受容体発現が抑制されていく、Treg の亜群とされている。移植患者では、その発生と維持に必須の IL-2 が免疫抑制剤で阻害されており、レシピエント体内の Treg は極めて少なく、寛容形成が阻害されてしまうというジレンマがある。

2. 研究の目的

Indirect recognition の安定した評価法は少ない。申請者はレシピエント APC とドナー細胞を用いた Indirect recognition を反映する実験系を構築した。レシピエント末梢血 CD14+ Monocyte を、ドナーPBMC 存在下で IL-4/GM-CSF で 4 日間、IL-1 /TGF で 2 日間培養したものを APC として用いた。この APC と CD4 T 細胞との混合培養で、Tfh (CXCR5+PD-1+) への分化が誘導され、代表的な Tfh 産生サイトカインの一つである、B 細胞クラススイッチに必須の IL-21 が確認されている (図 2)。末感作検体では、Tfh への分化とサイトカイン産生は naïve CD4 T 細胞由来 (図 2) である一方、DSA 陽性患者検体では memory CD4 T 細胞からの IL-21 産生も確認される (図 3)。誘導 Tfh を single cell で回収し T-cell Receptor (TCR) のレパトアを解析すると、特定クローンへの偏りが確認された (図 4)。この結果は我々に次の問いを提示した : i) DSA 産生を促す Tfh クローンを移植前 naïve CD4 T 細胞から同定し、DSA 産生時に Tfh へと分化しているのか、かつ TCR 遺伝子の PCR などで追跡可能かどうか、ii) APC-CD4 培養系で、感作状態・拒絶反応を DSA 検出より鋭敏に検出可能か、iii) ドナー抗原に強力に応答する TCR をもつ Treg/Tfr に分化させ、direct/indirect アロ応答が制御できるのか。免疫順応・寛容の本質を知るうえで、アロ応答におけるドナー特異的応答 T 細胞の single cell 解析とモニタリング、さらに同定したドナー特異的 TCR に機能性があるかどうかを確認する必要がある。患者体内のアロ応答の情報を得ることにより、効果的な治療選択や、ドナー抗原特異的な TCR を持つ Treg/Tfr 細胞の細胞移入利用、その T 細胞から iPS 細胞の作製、TCR 認識 HLA-ペプチド複合体に対する Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T 療法など、新たな治療戦略への展開を期待している。

3. 研究の方法

(3)-1 Indirect recognition 応答の移植後継時的変化

2021 年度~2022 年度 : 腎移植後 1 年以内に複数回、以降は年に一回に加え拒絶反応などのイベントが生じた場合に患者の同意のもと生検と血液サンプルを採取している。CD4 T 細胞は naïve/memory に分画し、確立された APC-CD4 培養系を用いて IFN /IL-21 ELISPOT assay を評価する。De novo DSA 陽性患者を対象に検討する。十分な naïve/memory CD4 T 細胞が確保できるときは、ELISPOT assay に加えて、Tfh への分化も検討する。自施設での患者検体で一定の傾向が見られた場合、2023 年度は協力病院の患者検体も用いる (年間 100 例程度の腎移植患者検

体を2007年から本学にて収集・保存している)。

(3)-2 移植前より存在する将来TfhになりうるTCRの同定とその追跡

2021年度~2022年度: de novo DSA陽性となった患者の移植前保存検体を用い、APC-CD4培養系によりドナー反応性Tfh TCRの配列を同定する。まずは入手が比較的容易なドナーPBMCを抗原として用いる。同定されたTCRをマーカーに、移植後検体を用いて当該TCRを持つCD4がいずれのサブセットに存在するかPCR・次世代シーケンス・FCM等で検討する。2023年度はリコンビナントHLAを用いた実験系も構築する。ドナーHLAを標的抗原とした、より"特異性"のあるTCRの同定を目指す。

(3)-3 Treg・Tfr分化実験系の構築と機能解析

2021年度~2022年度: in vitro Treg誘導はIL-2/TGFの添加を行い、CD25/Foxp3/IL127の発現以外に、foxp3遺伝子の脱メチル化で細胞分化を評価する。in vitro Tfr分化についての知見は少ない。Tregへの分化誘導系を基本に、まずはTfrへの分化誘導を可能にするサイトカイン探索を行う。2023年度: 機能解析はすでに実験系が構築されている内皮細胞やB細胞との共培養によるT細胞増殖、チェックポイント分子(PD-L1/CD40/ICOSなど)の発現や抗体産生で評価する(Iwasaki K, et al., Int. Immunol. 2018, Clin. Exp. Immunol. 2020)。

Alternative(本研究が困難な場合): naïve CD4をTregへと分化誘導するといわれている制御性樹状細胞細胞(regulatory Dendritic Cell; DCreg)の作成も検討する。DCregの作成は、本研究で用いているAPCの作成手法に、抑制性のサイトカイン(IL-10/TGF)添加で行う。ドナー特異的Tregへの分化誘導は上記実験系でその機能を確認する。

4. 研究成果

Direct alloresponseについての評価法は、60年代半ばに考案されたレシピエントとドナーの末梢血リンパ球を混合培養する方法が現在も主流である。一方でindirect alloresponseの評価法は、世界でも定まった実験系は確立されていなかった。特に、感作状態を反映する実験系の確立は困難であった。申請者らはドナー抗原を貪食させたmoDCを用いてindirect alloresponseを評価する方法を確立した。この実験系の特徴は、de novo DSA症例など感作状態では、安定期の患者では確認されないmemory CD4 T細胞応答を検知できる点にある。そのため、移植前検体(未感作)と、移植後検体(=de novo DSA陽性)で増殖CD4 T細胞のscRNAseqを行うと、移植前では確認できないeffector T細胞の増幅が確認される。増殖T細胞の表現型のさらなる解析により、Treg phenotypeのT細胞(CD25+ CD127-foxp3+)は移植前から消失せず存在していることも判明した。つまりde novo DSA産生は、Treg消失ではなくeffector T細胞優位の結果であることが示唆された。moDC自身もいくつかのクラスターで分類でき、それぞれに特徴的な遺伝子プロファイリングを示すことも見出した。抗原提示細胞がいくつかのサブタイプに分かれることはマウスで証明されており、Treg/effector Tへの増幅を担うmoDCサブセットは異なることが推定される。それぞれのT細胞サブセット誘導を担う抗原提示細胞の同定は、免疫抑制剤減量時のマーカーや治療介入標的となりうる。免疫抑制剤や、抗体薬などにより、T細胞だけでなく抗原提示細胞機能を評価することは、免疫抑制剤のminimization・免疫寛容の足掛かりとなる。

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 Kenta Iwasaki, Toshihide Tomosugi, Takashi Sekiya, Shintaro Sakamoto, Yuko Miwa, Manabu Okada, Takahisa Hiramitsu, Norihiko Goto, Shunji Narumi, Yoshihiko Watarai, Mai Okumura, Satoshi Ashimine, Kohei Ishiyama, Ezzelarab Mohamed B., Takaaki Kobayashi	4. 巻 107
2. 論文標題 Estimation of Sensitization Status in Renal Transplant Recipients by Assessing Indirect Pathway CD4+ T Cell Response to Donor Cell-pulsed Dendritic Cell	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 1079 ~ 1088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/tp.0000000000004491	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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩崎 研太*, 三輪 祐子, 安次嶺 聡, 石山 宏平, 小林 孝彰
2. 発表標題 樹状細胞を用いたindirect alloresponse検出系によるドナー特異的T細胞解析
3. 学会等名 第20回日本免疫治療学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩崎研太
2. 発表標題 In silico と in vitro 解析における de novo DSA リスク評価
3. 学会等名 第48回日本臓器保存生物医学会学術集会企画プログラム講演（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩崎研太, 友杉俊英, 田中一樹, 浜名洋, 三輪祐子, 河野あゆみ, 奥村真衣, 安次嶺聡, 石山宏平, 岸裕幸, 小林孝彰
2. 発表標題 Indirect allorecognition評価法の確立とモニタリングへの応用
3. 学会等名 移植学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩崎研太, 友杉俊英, 関谷高史, 三輪祐子, 石山宏平, 安次嶺聡, 奥村真衣, 小林孝彰
2. 発表標題 ヒトDCを用いたIndirectアロ抗原の検出
3. 学会等名 組織適合性学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Iwasaki Kenta, Sekiya Takashi, Hamana Hiroshi, Kishi Hiroyuki
2. 発表標題 Establishment of an evaluation method for donor HLA antigen sensitization using CD14 monocytes from organ transplant recipients
3. 学会等名 免疫学会
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
研究分担者	石山 宏平 (ISHIYAMA KOHEI) (50437589)	愛知医科大学・医学部・准教授 (33920)	
研究分担者	小林 孝彰 (KOBAYASHI TAKAAKI) (70314010)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	
研究分担者	三輪 祐子 (MIWA YUKO) (90572941)	愛知医科大学・医学部・助教 (33920)	

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