

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：30-20 (B)

課題名：シングル細胞遺伝子発現解析による臓器移植後免疫寛容状態情報の構築

梨井 康 (国立成育医療研究センター)  
(RI 管理室/移植免疫研究室・室長)

(研究成果の要約) 本研究の目的は、移植後免疫寛容に関わるモニタリング法を開発することである。本年度の研究は、マウス肝臓移植モデルを作製し、移植肝から浸潤リンパ球 (GILs) 分離精製し、レシピエントの脾臓からのリンパ球 (SPCs) と一緒に、マスサイトメトリー (Cytometry by Time-of-Flight: CyTOF®) を用い、レシピエント細胞レベルでの細胞表面抗原の網羅的な解析した。また、移植肝内・脾臓におけるドナー由来細胞・レシピエント由来浸潤細胞の時間・空間的な動態を免疫組織多重染色 (IHC) により解析した。今後、CyTOF 解析で示された免疫寛容に関与する CD86 分子発現する CD8<sup>+</sup>T 細胞、制御性抗原提示細胞 (樹状細胞・マクロファージ) の経時的 (移植後 7, 14, 30, 100 日)、或いは移植肝臓内の分布等について、FCM 及び免疫染色によって検討を行う。さらに、発現分子の特異的な抗体を用い、或いは特異的の分子欠損するマウスを作成して、これら細胞の機能を検証したい。

### 1. 研究目的

本研究の目的は、移植後免疫寛容に関わるモニタリング法を開発することである。現在臓器移植は、免疫抑制剤の開発により臓器不全に対する究極的な治療法として確立されるに至っている。しかしながら、宿主の免疫から異物である移植片に対する拒絶反応を抑制するために、原則として移植患者は終生に渡って免疫抑制剤の投与が必要とされる。免疫抑制剤は、移植された臓器を宿主の免疫から守る働きを行う一方で、他の異物からの宿主への攻撃に対する免疫反応を減弱させる副作用を併せ持つ。したがって、免疫抑制剤を投与されている患者は、感染症ならびに、癌の発生頻度が上昇する。そのために、免疫抑制剤投与量の軽減方法、あるいは免疫抑制剤からの離脱方法が検討されている。

一方、動物実験および臨床例において免疫抑制剤の投与を停止しても、移植された臓器

が拒絶されない、いわゆる免疫寛容の状態が確立される知見が得られている。また、マウス肝臓移植モデルでは、非自己の臓器でありながら、免疫抑制剤の投与無しに宿主免疫系が免疫寛容状態に至り、移植臓器が自然生着する現象が知られている。しかしながら、免疫寛容誘導に関する方法は確立されておらず、また、詳細な免疫学的な機序ならびに分子機構は不明のままである。よって、免疫寛容誘導方法の確立ならびに、誘導機序解明が待ち望まれている。

### 2. 研究組織

研究者	所属施設
梨井 康	国立成育医療研究センター
阪本靖介	国立成育医療研究センター

### 3. 研究成果

本年度の研究は、マウス肝臓移植モデルを

作製し、効率的な標的細胞を絞り込みとシングル細胞の分取を行うために、移植肝から浸潤リンパ球 (GILs: graft infiltrating lymphocytes) 分離精製し、レシピエントの脾臓からのリンパ球 (SPCs) と一緒に、マスサイトメトリー (Cytometry by Time-of-Flight: CyTOF<sup>®</sup>) を用い、シングル細胞レベルでの細胞表面抗原の網羅的な解析した。結果として、まずは、移植後のグラフト浸潤細胞 GILs 及び脾臓リンパ球 (SPCs) は 7 日目 (POD7) より顕著に認められ、POD14 をピークに、POD30 では大きく減少したことがわかった (図 1)。

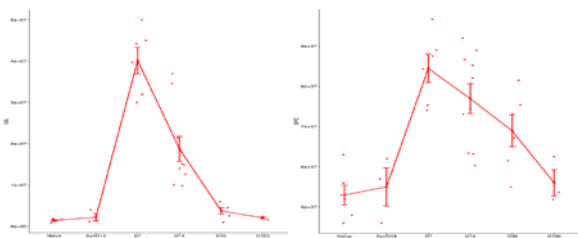


図 1. 肝移植後 GILs (左) と SPCs (右) 経時的の変化。

CyTOF の結果で、viSNE 画像の解析から、移植後各ポイントにおける CD3<sup>+</sup>T 細胞集団の明らかな分布の違いが観察された (図 2)。

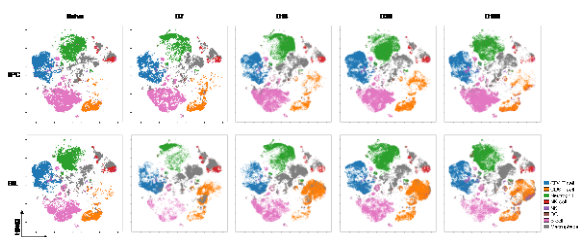


図 2. 肝移植後経時的に GILs と SPCs の各細胞集団の tSNE 解析。

それをさらに分析したところ、驚くべきことに、CD8<sup>+</sup>T 細胞で、CD86 分子発現している CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> の細胞集団が、移植後 7 日目 (POD7) の移植肝 GILs で明らかに増加して

いることがわかった (図 3)。

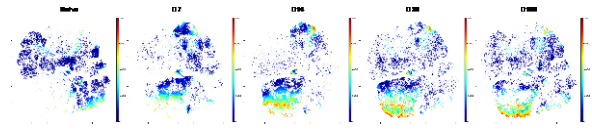


図 3. GILs 中 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> 細胞集団が顕著に増加した。

CD86 は、樹状細胞 (DC)、マクロファージ、B 細胞などの APC で主に発現する共刺激分子で、CD8<sup>+</sup>T 細胞での CD86 の高発現は今まで報告がほとんどない。さらにその集団の細胞を解析したところ、この CD8<sup>+</sup>T 細胞は、CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CD69<sup>+</sup> の組織レジデントメモリタイプ (T<sub>RM</sub>) であることが示され、この細胞集団が POD100 まで移植肝に存続することがわかった (図 4)。

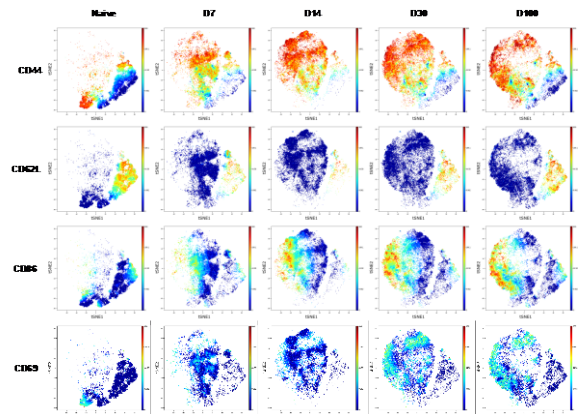


図 4. CD8<sup>+</sup>T 細胞は、CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CD69<sup>+</sup> の組織レジデントメモリ T 細胞 (T<sub>RM</sub>) である。

また、この CD8<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>T 細胞集団は、主に GILs に出現し、脾臓細胞にはあまりなかった。さらに、これらの所見は FCM の解析によっても確認できた。

CD86 は APC の中心的な共刺激分子として知られているが、CD86 高発現 CD8<sup>+</sup>T 細胞は我々の肝移植後自然寛容モデルで確認したことは、この CD8<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>T 細胞集団は肝移植寛容

の誘導・維持に重要な役割を果たすと推測した。CD86の場合、CTLA-4に対してCD28よりも10~20倍高い親和性がある。ナイーブT細胞でのCTLA-4発現レベルは著しく低いことが知られており、活性化後のT細胞は著しく増加する。CTLA-4は抑制シグナルとして、活性化T細胞の調節に重要な役割であることから、CD8<sup>+</sup>T細胞に発現したCD86とCTLA-4の相互作用は、CD28との結合と比較してはるかに強力である。特に、活性化T細胞が密集する拒絶反応が起きている炎症部位では、CD8<sup>+</sup>T細胞に発現するCD86は、活性化T細胞に発現するCTLA-4と相互作用することで新たな調節T細胞としての役割を果たすことが期待される。

一方、移植肝内・脾臓におけるドナー由来細胞・レシピエント由来浸潤細胞の時間・空間的な動態を免疫組織多重染色により解析を行った。その結果、図1で示された移植肝(GILs)、脾臓(SPCs)の数の結果と合致しているように、免疫細胞の浸潤はPOD7より顕著に認められ、POD14をピークに、POD30では大きく減少した。図5で示したように、CyTOF及びFCMで見つけてCD86高発現CD8<sup>+</sup>T細胞は、移植肝の免疫組織多重染色においても確認できた。

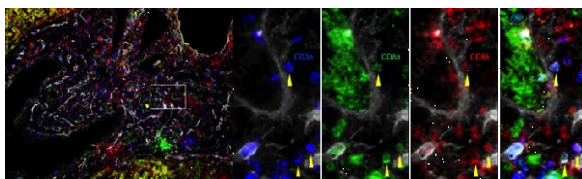


図5. 移植肝でのCD86高発現CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞の免疫組織多重染色。

さらに、免疫組織多重染色により解析では、浸潤部位はPOD7では類洞領域に広くびまん性に分布するのに対し、POD14では多くの細胞が門脈領域に集積した。また、蛍光多重染色によりPOD14における門脈域浸潤

細胞群の同定を行ったところ、T細胞とMHC-II (I-A<sup>k</sup>)陽性細胞に大別され、T細胞の多くにPD-1の発現を認めた。一方、そのリガンド分子であるPD-L1, PD-L2発現細胞を解析したところ、PD-L1はPOD7ではドナー類洞血管内皮細胞、POD14では門脈領域の宿主浸潤細胞に発現するのに対し、PD-L2は両日共に後者の細胞にのみ認められた。PD-L1<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup>細胞はMHC-II<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup>で、その多くはCD11cに陽性を示した(図6)。以上の結果より、移植肝における免疫寛容誘導機構の一因として、制御性抗原提示細胞(樹状細胞、マクロファージ)による免疫チェックポイント分子を介した細胞浸潤局所におけるT細胞制御の可能性が示唆された。

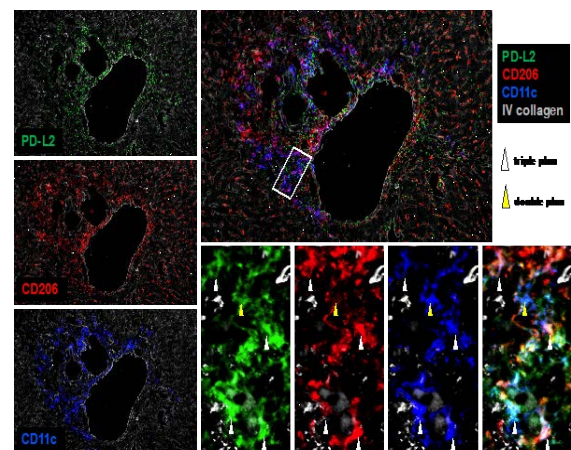


図6. 移植肝でのPD-L1<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup>高発現MHC-II<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup>細胞の免疫組織多重染色。

今後、CyTOF解析で示された免疫寛容に關与するCD86分子発現するCD8<sup>+</sup>T細胞、制御性抗原提示細胞(樹状細胞・マクロファージ)の経時的(移植後7, 14, 30, 100日)、或いは移植肝臓内の分布等について、FCM及び免疫染色(IHC)によって、検討を行う。さらに、発現分子の特異的な抗体を用い、或いは特異的分子欠損するマウスを作成して、これら細胞の機能を検証したい。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

動物実験については、当施設の実験動物指針に則して行い、動物愛護の観点に十分配慮して実験を行った。動物愛護の観点にも配慮し、実験に用いる動物は最低限とすると共に、出来る限 *in vitro* の系で代用するように心がけた。

一方、人権の保護および法令等の遵守への対応について、今後移植患者の血液の採取・解析は、倫理委員会に申請する予定で、その承認を得た上、研究を進める予定である。