

(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) 今年度は、移植肝浸潤リンパ球 (GILs) に焦点を絞って、 $CD3^+CD8^+CD86^+$ の T 細胞集団について、FCM を用いたより正確で、詳細に様々の細胞表面分子の発現を解析した。また、その結果に合わせた移植肝の免疫組織多重染色による確認の解析も行った。 $CD3^+CD8^+$ T 細胞表面の分子は CD86 以外、PD-1、LAG3、Tim-3、CD39 等疲弊 T 細胞に発現する分子が移植後 7 日目 (POD7) からの移植肝 GILs で明らかに増加していることがわかった。この細胞集団は新たな調節 T 細胞としての役割を果たすことが期待される。一方、移植肝内におけるドナー細胞・レシピエント浸潤細胞の時間・空間的な動態を免疫組織多重染色の解析では、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。T 細胞と MHC-II (I-A^b) 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。 $CD8^+CD86^+Tim-3^+$ でもあった事から CyTOF や FCM 解析で見いだしたユニークな CD8T 細胞集団が門脈領域に現れることが裏付けられた。現在、我々が $CD8^+$ T 細胞表面の CD86 分子を特異的に欠損させるマウスを作成することも進めている。 $CD8^+CD86^+$ T 細胞というユニークな T 細胞集団の移植後免疫寛容の誘導・維持に関わる機序について、肝移植モデルを用いて、この細胞集団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

今までの研究で、CD86 高発現 CD8⁺T 細胞は肝移植後自然寛容モデルで確認し、この CD8⁺CD86⁺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。今年度は引き続き、移植肝浸潤リンパ球 (GILs) に焦点を絞って、昨年度の研究で明らかにした GILs に多く存在する CD3⁺CD8⁺CD86⁺ の T 細胞集団について、FCM を用いたより正確で、詳細に様々の細胞表面分子の発現を解析した。また、その結果に合わせた移植肝の免疫組織多重染色による確認の解析も行った。

図 1 A で示されているように、CyTOF の tSNE 画像解析結果では、Naive マウス、同型 (Syn) 肝移植後、同種 (アロ) 肝移植後 (POD) 7、14、30、100 日目移植後各ポイントにおける CD3⁺CD8⁺T 細胞表面の分子は CD86 以外、PD-1、LAG3 等疲弊 T 細胞に発現する分子が移植後 7 日目 (POD7) からの移植肝 GILs で明らかに増加していることがわかった。また、この CD8⁺CD86⁺T 細胞集団は、主に GILs に出現し、脾臓細胞 (SPLs) より顕著に存在することを明らかにした (図 1 B)。

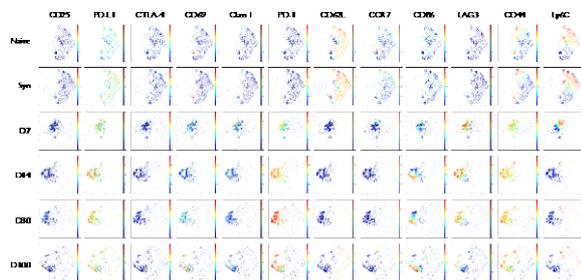


図 1A. 肝移植後各ポイントの GILs にある CD3⁺CD8⁺T 細胞発現表面分子の tSNE 解析結果

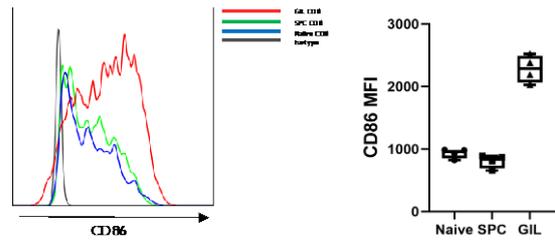


図 2B. GILs 中の CD3⁺CD8⁺CD86⁺細胞は SPLs より顕著に存在する

これらの所見は引き続き FCM の解析によってさらに詳細に確認を行なった。CD8⁺CD86⁺T 細胞上 CD86 の発現レベルを分け、その細胞表面発現する PD-1、TIM-3、CD39 等疲弊 T 細胞の関連分子を検討したところ、CD86 高発現する分画 (CD86^{high}) では、PD-1、Tim-3、CD39 等の発現は明らかに高発現していることがわかった (図 2)。この細胞集団は新たな調節 T 細胞としての役割を果たすことが期待される。

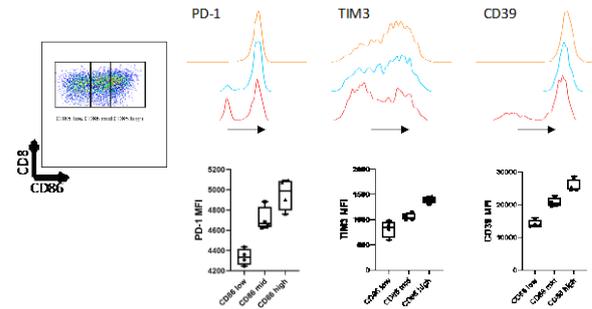


図 2. GILs 中 CD3⁺CD8⁺CD86⁺細胞の疲弊関連分子の FCM 解析結果

上記 CyTOF と FCM の解析結果に合わせて、移植肝内におけるドナー細胞・レシピエント浸潤細胞の時間・空間的な動態を免疫組織多重染色により解析も行った。その結果、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。ここで浸潤部位は 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^b) 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。さらに、蛍光4重染色によりPD-1陽性T細胞を詳細に解析したところ、図3で示されているように、CD8⁺CD86⁺ (図3A)、或いはCD8⁺Tim-3⁺ (図3B)でもあったことからCyTOFやFCM解析で見いだしたユニークなCD8T細胞集団が門脈領域に現れることが裏付けられた。

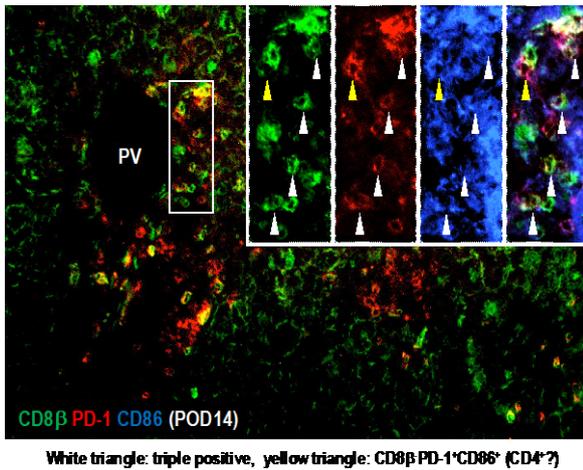


図3A. 移植肝でのCD86高発現PD-1⁺CD8⁺T細胞の免疫組織多重染色結果

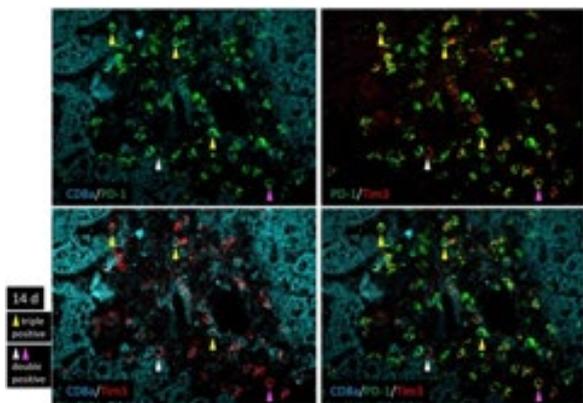


図3B. 移植肝でのCD86高発現Tim-3⁺CD8⁺T細胞の免疫組織多重染色結果

一方、PD-1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⁺PD-L2⁺細胞はMHC-II⁺CD206⁺F4/80⁻で、その多くはCD11cに陽性を示した。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4)。

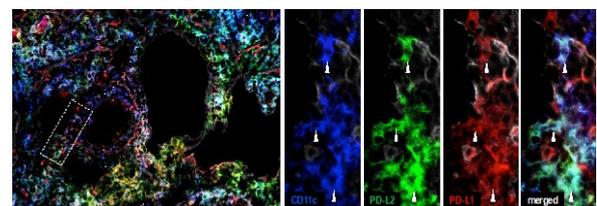


図4. 移植肝でPD-1のリガンド分子であるPD-L1、PD-L2発現するCD11c⁺抗原提示細胞の免疫組織多重染色結果

現在、これらCyTOF、FCMおよび免疫染色の結果を踏まえて、我々がCD8⁺T細胞表面のCD86分子を特異的に欠損させるマウスを作成することも進めている。CD8⁺CD86⁺T細胞というユニークなT細胞集団の移植後免疫寛容の誘導・維持に関わる機序について、肝移植モデルを用いて、更なる解析を行う予定です。

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。