

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：30-20

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。本年度は、シングル細胞レベルにおける遺伝子発現解析に先立ち、マウス肝臓、心臓移植モデルを作製した。血液生化学的な指標、病理学的所見と、血液中および移植臓器内の細胞集団の経時的な変化についての解析を行った。効率的な標的細胞の絞り込みとシングル細胞の分取を行うために、マウス肝移植モデルに関して、マスサイトメトリー (Cytometry by Time-of-Flight: CyTOF®) 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を行った。今後、これらの結果を踏まえ、移植後の同定された個別の免疫細胞を FCM 解析によって確認を行う予定である。これらの研究によって、免疫寛容誘導機序解明ならびに誘導方法の確立が期待される。

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、シングル細胞レベルにおける遺伝子発現解析に先立ち、マウス肝臓、心臓移植モデルを作製した。血液生化学的な指標、病理学的所見と、血液中および移植臓器内の細胞集団の経時的な変化についての解析を行った。また、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、マウス肝移植モデルに関して、マスサイトメトリー (Cytometry by Time-of-Flight: CyTOF®) 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。

1) マウス肝臓、心臓移植モデルの作製については、雄 C57BL/6 (B6, H-2K^b) および C3H (H-2K^d) マウス(体重 25–30 g)を三協ラボ(株)より購入した。B6 マウス心臓または肝臓をドナー臓器として採取し、心臓については C3H レシピエントマウスに異所性、肝臓については同所性にて同種(アロ)移植を行った。移植後、血液生化学的な指標、病理学的所見と、血液中および移植臓器内の細胞集団の経時的な変化についての解析を行

った。その結果、マウスアロ肝臓移植モデルは免疫抑制無しでドナー臓器の永久生着が認められた。血液生化学的解析においても、肝臓逸脱酵素の、一過性の上昇に続いて下降が見られた。病理学的所見も肝臓逸脱酵素の動きと連動して、炎症像の進展に続く退縮が確認された。血中の各免疫細胞集団も、拒絶反応に連動して、細胞傷害性リンパ球の増加がみられたが、拒絶反応を乗り越えた後は、減少・収束した。一方、マウスアロ心臓移植モデルにおいては、肝臓移植モデルとは異なり、増加した拒絶反応は低下することなく、ドナー臓器は拒絶された。

今回用いたマウス肝臓、心臓移植モデルでは、それぞれ移植臓器に対する拒絶反応が誘導されているが、肝臓移植においては、移植後拒絶反応の退縮・収束を経過して、自然的に寛容状態が誘導され、心臓移植においては、拒絶反応が継続する、質の異なる拒絶反応、免疫寛容を解析する可能で、有用な実験系であることを示した。

2) シングル細胞レベルでの細胞表面抗原の網羅的な解析については、効率的な標的細胞の絞り込みとシングル細胞の分取を行うために、マスサイトメトリー (Cytometry by Time-of-Flight: CyTOF[®]) を用いて解析を行った。マウス肝移植後 14 日目 (POD14)、30 日目 (POD30) にサンプルを採取し、脾臓細胞 (SPC) および肝臓浸潤リンパ球 (GIL) を分離精製した後、Fluidigm 社の約 30 種類の抗体にて染色を行った結果、SPC と GIL の各マーカーに対してシングル細胞レベルでの細胞表面抗原の網羅的な発現プロファイルを明らかにした (図 1)。

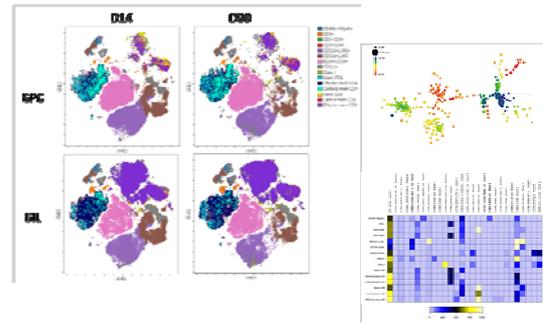


図 1. 肝移植後 POD14、POD30 での SPC と GIL の異なる細胞集団。

また、viSNE 画像による解析では、移植拒絶反応における免疫細胞集団の主要な機能として考えられていた CD3 陽性集団における分布の違いがわかった (図 2)。

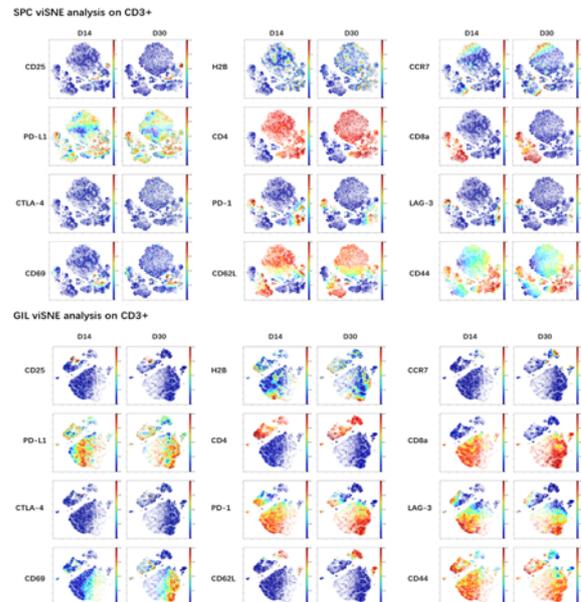


図 2. CD3 陽性集団の T 細胞機能マーカーの発現パターン。

次に、CD3 陽性集団中のメモリー T 細胞を FCM により解析を行った (図 3)。組織特異的なメモリー T 細胞である CD3+CD8+CD69+ 細胞集団が、POD30 の GIL において増加することを見出した。さらに、CD4 陽性細胞集団の CCR7 発現しているセントラルメモリーの T 細胞サブセットは、POD14 と POD30 の間で異なることがわかった。

FACS analysis

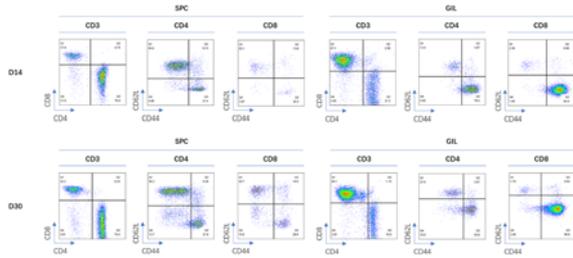


図3. CD3 陽性集団のセントラルメモリーの T 細胞サブセット解析

次年度は正常マウス、肝臓移植後早期である POD7、晩期である POD100 時点でのマウス SPC および GIL の CyTOF 解析を行い、マウス肝移植における免疫細胞の動的変化を明らかにして行く予定である。さらに、これらの結果を踏まえ、移植後の免疫細胞を FCM 解析によって同定すると共に、その機能や移植免疫寛容に関する役割の確認を行う。これらの研究によって、免疫寛容誘導機序解明ならびに誘導方法の確立を期待したい。

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。