

論 文 要 旨

Transplantation Tolerance: Allo-recognition and Regulatory T Cells

〔 移植と免疫寛容：抗原特異的識別と制御性 T 細胞の関係性 〕

富田 祐介

【本 Thesis のテーマ】

本 Thesis は、末梢性免疫寛容メカニズムに関して、特に**抗原特異的制御と 制御性 T 細胞 (Tregs) ・ 形質転換増殖因子 β (TGF β)** および**インターロイキン (IL) 35 の発現が移植臓器の長期生着に重要な因子であるのか**に焦点を当て、**自験例を中心として移植免疫寛容誘導を論じる。**

【序論及び目的】

1. 移植医療の残された課題

移植医療は末期臓器不全を根治する唯一の治療法である。一方で、ドナー不足と免疫抑制剤の内服の必要性の2点は世界的に大きな課題として残されている。日本の腎臓移植は8割以上を生体移植が占めるものの、年間1600症例と欧米と比べ極端に少なく、ドナーの不足は深刻である。一方で、免疫抑制剤の永続的な使用については、拒絶反応を予防するためには必要不可欠であるものの、重症感染症の発症や、移植臓器への毒性が重要な問題となり、長期生着率は改善していないのが現状である。

2. 免疫寛容の重要性と制御性 T 細胞 (Tregs) ・ 制御性サイトカインの役割

免疫抑制剤の永続的な使用を回避する手段として、本論文の主眼であるドナー特異的な免疫寛容の導入が考えられている。免疫寛容とは、ドナーと臓器のレシピエントが永続的な免疫抑制療法を行わないにも関わらず、免疫学的に平衡状態が保たれ、お互いを非自己と認識しない状態と定義される。免疫寛容の導入方法には1次リンパ組織（骨髄や胸腺）で行う中枢性と2次リンパ組織（脾臓や末梢リンパ節）で行う末梢性に大きく分けられる。この免疫寛容の導入・維持のために Tregs (Foxp3 陽性 CD4 T 細胞) が特に重要であることが報告されている。Tregs は、先天的に胸腺内に存在する tTregs と後天的に末梢性に生成される pTregs に分類される。tTregs は内在性の Tregs であり、自己抗原の制御に関与し、自己免疫疾患の発症の予防に貢献していると考えられている。一方で、pTregs は、後天的に末梢性に生成され、その中でもドナーの臓器に居住している数少ない pTregs が、臓器移植によりレシピエント側に移動し、作用することで免疫寛容が誘導される。特に、ドナーおよびレシピエントの双方向への抑制 (bi-directional regulation) が免疫寛容には重要ではないかと考えられている。

従来、IL10 や TGF β に代表される制御性サイトカインは、免疫応答抑制因子として研究されてきた。しかし、IL10 は Th0 細胞に代表される non-Tregs により生成されることが報告されるが、TGF β について解明は十分ではない。また近年、T 細胞に発現する免疫反応を制御する因子の一つとして Tregs により生成される IL35 が注目されている。IL35 や TGF β に代表される制御性サイトカインは、臓器移植においてドナー・レシピエント間の免疫反応を制御し、移植臓器の長期生着に貢献する因子になり得る可能性がある。

【抗原特異的制御と Tregs ・ TGF β および IL35 の発現が移植臓器の長期生着に重要な因子であるのかの検討】

(Transplantation Direct. 2 (5). E73. 2016)

(目的) マウスの免疫寛容モデルを用いて、Tregs ・ TGF β および IL35 の発現頻度を経時的に比較・検討することによって、これら制御性因子の発現移植臓器の長期生着に貢献し得るのかについて明らかにする。加えて、2次リンパ組織と移植可能な臓器である肝臓（非リンパ組織）での発現の違いを分析することによって、Tregs ・ TGF β および IL35 の臓器局在性を明らかにする。

(方法) 1. ドナー特異的な免疫寛容導入の方法と評価

マウスに免疫寛容を導入する方法として、ドナー特異的リンパ球輸注 (DST) と抗 CD154 阻害薬によって B6・C57BL/6 (H2^b)マウスに免疫導入療法を行った。免疫寛容の誘導の有無については、研究室で確立されている trans-vivo delayed type hypersensitivity (tv-DTH) assay で評価した。

2. 免疫寛容を導入した移植前マウスの経時的な組織摘出による Tregs や制御性サイトカインの発現評価

免疫寛容導入療法後のマウスの組織 (脾臓、リンパ節および肝臓) を経時的に摘出し、各々の組織よりリンパ球を抽出し、CD4 陽性 T 細胞をフローサイトメトリーにより分析した。CD4 陽性 T 細胞における Foxp3 陽性細胞・TGFβ陽性細胞・IL35 陽性細胞の発現頻度を調べた。フローサイトメトリーに適切な IL35 の抗体が希少なため、代わりに IL35 のサブユニットである Ebi3 の発現頻度を調べた。

(結果) 1. DST と抗 CD154 阻害薬の投与は、自己抗原に対しては一過性の抑制反応を示すに留まったが、ドナー抗原に対しては永続的な免疫寛容を導入した。

tv-DTH assay を用い、抗原に対する免疫応答性を測定した。治療 14 日後に自己抗原およびドナー抗原の抑制反応が出現し始めた。しかし、治療 35 日後には自己抗原の抑制反応は完全に消失し、ドナー抗原特異的な抑制反応を示した。サードパーティーに対しては、一貫して抑制反応は認めなかった。

2. 制御性サイトカインは DST と抗 CD154 阻害薬により導入されたドナー特異的制御に関与した。

治療 35 日後のリンパ球に抗 IL10 抗体・抗 TGFβ抗体・抗 IL35 抗体を加えるとドナー特異的抑制反応は解除された。しかし、コントロールである IgG 抗体、抗 IL4 抗体を加えても抑制は継続した。従って、治療 35 日後のドナー抗原に特異的な抑制反応に IL10・TGFβ・IL35 が関与していることが示された。

3. 制御性サイトカイン TGFβと IL35 は異なる特性を示した。

IL35 陽性 CD4 T 細胞の大部分は Foxp3 陽性の制御性 T 細胞であった。また、Foxp3/CD25 陽性細胞は 50%を示した。一方で、TGFβ陽性の CD4 T 細胞の 65-70%は Foxp3 陰性の非制御性 T 細胞であり、Foxp3/CD25 陽性細胞は 30%のみであった。これらのことより、TGFβ陽性細胞と IL35 陽性細胞は異なる Treg サブセットであることが示された。

4. 2 次リンパ節と移植可能な臓器 (肝臓) における Tregs・TGFβ・IL35 の発現

Foxp3/CD25 陽性の CD4 T 細胞は脾臓・リンパ節で経時的に増加した。IL35 陽性の CD4 T 細胞および TGFβ陽性の CD4 T 細胞も同様に増加した。また、増加の傾向は脾臓とリンパ節と同様であった。肝臓での Foxp3/CD25 陽性の CD4 T 細胞、IL35 陽性の CD4 T 細胞頻度は、2 次リンパ組織と比較し、約 10 分の 1 と少量であったものの経時的に増加した。TGFβ陽性の CD4 T 細胞は早期より (治療 14 日後より) 増加し始め、頻度も 2 次リンパ組織の約 3 倍と効率であった。以上より、IL35 陽性の CD4 T 細胞と TGFβ陽性の CD4 T 細胞は異なる臓器局在性を示した。

【新規性、結論】

制御性サイトカインである IL35 は自己免疫疾患や悪性腫瘍、動脈硬化症を制御していることがこれまで報告されているが、臓器移植との関連性についての報告はない。上記の“抗原特異的制御と Tregs・TGFβおよび IL35 の発現が移植臓器の長期生着に重要な因子であるのかの検討”の結果により、1) 移植臓器の長期生着には Tregs や制御性サイトカインが重要であること、2) 制御性サイトカイン TGFβと IL35 は異なる特性を示すこと、3) 制御性サイトカインがリンパ組織だけでなく肝臓でも増加していること、更に 4) 少なくとも移植一ヶ月前に治療を開始することでドナー特異的な制御性 T 細胞を導入し、ドナー抗原に対する免疫反応を抑制できる可能性が示唆された。 (新規性)

本研究で得られた結果は、移植免疫寛容誘導メカニズムにおける制御性サイトカインの局在ならびに特性を理解し、免疫寛容誘導の臨床応用で重要な寛容の指標となる Biomarker を確立する重要な基礎研究である (Thesis の重要性)。