HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	PD-L1/PD-L2を共発現したマウスB-1細胞によるT細胞のアロ応答抑制に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	広瀬, 貴行
Description	配架番号：2315
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12574号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66124
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Takayuki_Hirose_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　広瀬貴行

学 位 論 文 題 名

PD-L1/PD-L2 を共発現したマウス B-1 細胞による T 細胞のアロ応答抑制に関する研究
(Studies on Inhibition of Alloreacitve T Cells by PD-L1/PD-L2-expressing B-1 Cells in Mice)

【背景と目的】B 細胞は抗原提示細胞（APC）の一部を担っているだけではなく、分化段階や細胞膜表面分子の表出、生物学的機能などにより様々なサブセットに分類され、その中には免疫応答を制御する集団がある可能性がある。本研究において、我々はアロ応答性 T 細胞を標的に制御性 APC としてはたらくマウス B 細胞サブセットの免疫制御機能について研究を行った。

【対象と方法】Balb/c マウス及び C57BL/6（B6）マウスの腹腔内(PerC)・脾臓・肝臓・骨髄・末梢血・頸部リンパ節の B 細胞フェノタイプをフローサイトメトリー（FCM）で解析した。脾臓 B 細胞、PerC B 細胞、または PerC non-B 細胞を Balb/c マウスから採取し、それぞれ B6 マウスに静注した。静注後の血清を Balb/c マウスの脾細胞に添加し、抗 Balb/c 抗体を FCM で評価した。次に、T 細胞に対するアロ応答抑制能を評価するため、細胞移入から 2 週間後に B6 マウス脾細胞を採取しこれを responder とし、Balb/c マウス脾細胞を stimulator としてリンパ球混合試験（MLR）を行った。さらに、Balb/c マウスの腹腔内 B 細胞に抗 PD-L1/PD-L2 抗体を添加した後に B6 マウスに移入し、2 週後に同様に MLR を施行した。続いて、同様の PerC B 細胞移入モデルを用い、細胞移入から 2 週間後に Balb/c マウスをドナーに異所性心移植を行い、移植心の生着期間を評価した。さらに、Balb/c マウスに放射線照射を行い、B6 マウスから骨髄細胞と同時に脾臓 T 細胞を移植し、移植 1・4 日後に naïve Balb/c マウスの腹腔内および脾臓 B 細胞を移入し、急性移植片対宿主症候群（aGVHD）抑制効果について検討した。

【結果】抗原提示能と細胞死誘導分子を同時表出する MHC class $II^+CD80^+CD86^+PD\text{-}L1^+PD\text{-}L2^+$ B 細胞サブクラスが腹腔内 B 細胞に多く存在することがわかった。さらに、サブセット毎にフェノタイプ分析をすると、$PD\text{-}L2^+$ B 細胞の割合は PerC および肝臓 B-1a 細胞で特に高発現していた。脾臓 B 細胞及び PerC non-B 細胞移入後の細胞移入から 3・4 週後には腹腔内 B 細胞移入群で抗 Balb/c-IgG 抗体が上昇していたが、PerC B 細胞移入群では抗体価の上昇はみられず他の 2 群と比して有意差を認めた。同様に細胞移入後の MLR では $CD4^+$及び $CD8^+$ T 細胞の stimulation index（SI）が脾臓 B 細胞及び PerC non-B 細胞移入群に比べて有意に低下しており、T 細胞アロ応答の抑制効果を認めた。抗 PD-L1/PD-L2 抗体を添加してから PerC B 細胞の移入を行うと、$CD4^+$及び $CD8^+$ T 細胞の SI は抗体添加しなかった群に比べて著明に上昇しており、免疫抑制効果の消失が確認された。PerC B 細胞移入後に心移植を施行した場合、生着期間中央値は 9.5 日間（移入なし群：7 日間）であり、有意な臓器生着期間の延長は認めなかった。aGVHD モデルを用いた実験では、細胞移入なしの群に比べて脾臓および PerC B 細胞移入群は生存期間が長期化した個体もあったが、有意な生存期間の延長は認めず、細胞移入による aGVHD 抑制効果は得られなかった。

【考察】ドナー特異的リンパ球輸注（DLI）単独療法や、DLI と他の薬剤との併用療法を

用いて、移植前にドナー抗原に暴露されることでドナー特異的低応答が誘導されることがこれまでいくつも報告されてきた。アロ抗原性をもったドナー細胞のサブセットが抗ドナー細胞免疫応答の抑制に重要だとするいくつかの報告があるものの、コンセンサスを得るには至っていない。我々は、Balb/c マウスの SPL B 細胞を B6 マウスの尾静脈に投与すると、抗 Balb/c 抗体の著明な産生増加が起き、アロ刺激による T 細胞応答が増強されることを示した。それとは対照的に、PD-L1 と PD-L2 を共に発現した B-1a 細胞を含む Balb/c マウスの PerC B 細胞を B6 マウスに投与した場合では、抗 Balb/c 抗体産生の著明な抑制と、アロ刺激に対する T 細胞応答の有意な抑制効果が得られた。PD-L1 及び PD-L2 分子に対する抗体を用いた実験では、アロ PerC B 細胞に発現した PD-L1 と PD-L2 のいずれの分子も、アロ刺激に対する T 細胞応答の抑制に必要であることが示された。したがって、腹腔内の PD-L1^{+}PD-L2^{+} B-1a 細胞には抗ドナーアロ免疫応答を抑制するアロ抗原による DLI に用いるのに最適な集団である可能性がある。これらの結果から、生体内での T 細胞アロ応答を抑制し、臓器移植や aGVHD において免疫寛容の誘導を試みたものの、本実験では有意な効果を得るにはいたらなかった。

【結論】アロ PerC B 細胞は MHC class II^{+} CD80^{+} CD86^{+} PD-L1^{+} PD-L2^{+} B-1a 細胞を含んでおり、同種アロ刺激に反応する T 細胞を抑制する能力を有している可能性があることが示唆された。