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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　　広瀬　貴行

主査　教授　清野　研一郎
審査担当者　副査　准教授　北村　秀光
副査　准教授　森松　組子
副査　教授　村上　正晃

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)

臓器移植において、ドナーリンパ球輸注 (DLI) によりアロ応答性 T 細胞の低応答や免疫学的寛容の誘導が報告されてきたが、どのような細胞集団が DLI に効果的なのかは明らかになっていない。B 細胞は様々な機能や特性を持った抗原提示細胞であり、DLI に用いるには理想的であると考えられる。我々は、アロ応答性 T 細胞に対する抗原提示能を有し、免疫寛容を誘導し得る B 細胞集団についてマウスを用いて評価した。Balb/c マウスの各臓器の 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。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、中でも特に B-1a 細胞に多く存在することがわかった。Balb/c マウスの脾臓および腹腔内 B 細胞を C57BL/6（B6）マウスに静注し、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）で T 細胞のアロ応答を評価した。腹腔内 B 細胞移入群の T 細胞の分裂増殖が脾臓 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。さらに、抗 PD-L1/PD-L2 抗体を添加してから腹腔内 B 細胞の移入を行うと、T 細胞の分裂増殖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。続いて、腹腔内 B 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うと、有意差はないものの生着期間の延長傾向を認めた。腹腔内 B 細胞は MHC class II^+ $CD80^+$ $CD86^+$ $PD\text{-}L1^+$ $PD\text{-}L2^+$ 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おり、DLI に有用で免疫学的寛容を誘導し得る可能性があることが示唆された。

審査にあたり、まず副査の北村秀光准教授から $PD\text{-}L1^+PD\text{-}L2^+$B 細胞の分化誘導方法について質問があり、申請者は $PD\text{-}L1^+PD\text{-}L2^+$B 細胞を多く含む B-1a 細胞を分化誘導する方法があるのでこれを用いて同様のフェノタイプの確認ができれば有効な可能性があると答えた。また、臨床への応用方法について質問があり、申請者はヒトでの腹腔内 B 細胞のフェノタイプの研究はほとんどされていない一方で、ヒト末梢血中にマウス B-1a 細胞類似の細胞が存在しているという報告があり、この細胞が同様のフェノタイプを持っていることが確認できれば臨床応用できる可能性があると答えた。副査の森松組子准教授から抗 PD-L1/PD-L2 抗体の両方を添加した方がそれぞれ単独で投与した場合より T 細胞のドナー応答が低下していた理由について質問があり、申請者は本実験で T 細胞の増殖が著明に増加した個体が

あり差が出にくくなっている可能性が原因として考えられるため、抗体投与の濃度を調整することで相乗効果が確認できる可能性があると答えた。また、腹腔内に抑制性 B 細胞が存在する意義について質問があり、申請者は外来抗原と接触しやすい部位にあることから外来抗原に対する過剰反応を抑えるためホメオスタシスの維持の一役を担っていることが推察されると答えた。副査の村上正晃教授からは、背景で述べられた骨髄移植を用いた免疫学的寛容誘導法について質問があり、現在臨床で既に応用されているものの日本では未承認の薬剤が使用されていると答えた。また、一般的な DLI において有効な細胞や機序について質問があり、申請者は抗原提示細胞が担っていると考えられているものの明らかになっておらず効果も不十分なことから薬剤を併用する手法が発展してきた経緯があると答えた。主査の清野研一郎教授からは投与した B 細胞はすぐに拒絶されると考えられるが放射線照射などの前処置について、また、投与した B 細胞の生存期間について質問があり、申請者は B 細胞は投与後すぐに拒絶されると思われるがレシピエント T 細胞に抗原提示すると同時に PD-L1/PD-L2 分子を提示することで、T 細胞がドナー細胞に対して Anergy や Apoptosis となることでドナー応答が低下するという機序が考えられるため、B 細胞の生存期間は本研究では確認していないものの、B 細胞の生存期間よりも T 細胞との接触が重要なのではないかと考えられると答えた。PD-L1 または PD-L2 ノックアウトマウスの使用、CD80/CD86 のブロッキングについて質問があり、申請者はいずれも試したいと考えてはいたものの未施行であると答えた。

本研究は B-1 細胞によるユニークな免疫抑制の可能性を調べたものであり、そこで得られた知見は移植免疫学にとって重要な情報を提供した。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。