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［全文の要約］ |
| Author(s) | 広瀬, 貴行 |
| Description | この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。<br>配架番号：2315 他 |
| 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/2115/66125 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Takayuki_Hirose_summary.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# 学　位　論　文（要約）

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)

2017 年 3 月

北　海　道　大　学

広　瀬　貴　行

# 学　位　論　文（要約）

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)

2017 年 3 月

北　海　道　大　学

広　瀬　貴　行

# 緒　　言

近年免疫抑制剤の発展により、臓器移植後の成績が著明に向上してきた。特に、腎移植においては、1978 年に cyclosporine、そして 1990 年に tacrolimus などの calcineurin inhibitor（CNI）の開発があり、1999 年に mycophenolate mophetil が、そして IL-2R に対するモノクローナル抗体である basiliximab が 2002 年に開発され、これらが導入免疫抑制剤として加わったことにより、前時代と比較して移植腎生着率の目覚ましい改善を認めている。一方で、半永久的な免疫抑制剤の内服が必要であり、腎毒性の問題や、レシピエントの主要な死因となっている感染症や悪性腫瘍などが免疫抑制剤内服の大きなリスクとなっている。また、慢性拒絶反応による移植腎喪失の問題においては、これらの薬剤では超長期的生着率の改善は得られておらず、十分な薬物療法と呼ぶにはまだ解決すべき課題が多い。2010 年以降になると、mammalian target of rapamycin 阻害剤である everolimus が新たな免疫抑制剤として採用され、従来の免疫抑制剤と併用することで、腎毒性を有する CNI の中止や減量に加え、抗腫瘍効果が期待された。しかし、CNI の中止や大幅な減量で拒絶反応の増加がみられたため、新規薬剤の登場によって従来の免疫抑制剤の標準的使用法が大きく変わることはなく、今日ではオプションの一つと位置付けられている。このため、10 数年以上にわたり、超長期的臓器生着率や、CNI 腎毒性、易感染性や悪性腫瘍発生のリスクなどの問題を解決するには至っていない。これらを解決するためには、免疫抑制剤を内服せずに長期の臓器生着を得ることが一番の究極的な目標であることは言うまでもない。その免疫寛容の誘導については、これまで様々な研究が報告され、その一部は既に臨床に応用されている。

免疫寛容については、中枢性免疫寛容と末梢性免疫寛容の 2 つに大別される。中枢性免疫寛容は、生後間もないマウスの胸腺を摘出後にドナー臓器を移植したり、骨髄移植により血液学的キメラを作ることで誘導される。骨髄移植を用いた免疫寛容誘導においては、骨髄非破壊的な前処置を行ってから造血幹細胞と腎臓を同時に移植することで、ドナー特異的な免疫学的寛容を得られることが、マウスだけでなく、サルの実験でも証明されている。この免疫寛容誘導法は、実際にヒトでも臨床応用が始まっており、免疫抑制剤を中止した後でも良好な移植腎機能が得られていることが報告されている。一方で、末梢性免疫寛容は、T 細胞への抗原提示などの際に、T 細胞活性化の signal 2 を担う CD80/86 副刺激分子のブロックによるアロ抗原特異的な T 細胞 anergy の誘導による、免疫寛容誘導法が報告されている。マウスでは、心移植モデルにおいてアロリンパ球と抗 CD154（CD40L）抗体を投与し、signal 2 をブロックす

ることでドナー特異的免疫寛容誘導を得ることが報告されている。

末梢性免疫寛容の一つとして、ドナー特異的リンパ球輸注による免疫寛容誘導の報告があるが、詳細なメカニズムや、適切な細胞集団の特徴などについては、いまだ明らかとはなっていない。臓器移植後の感作や拒絶反応において中心的な役割を果たしている T 細胞の活性化においては、マクロファージや樹状細胞、そして B 細胞などの抗原提示細胞（APC）による T 細胞への抗原提示がまず必要であり、B 細胞が T 細胞へのアロ刺激を担っていることはよく知られている。B 細胞は APC としての役割を担っているだけではなく、分化段階や表面分子の表出、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。B 細胞は液性免疫において中心的な役割を果たしている一方で、自己抗原や外来抗原に対する T 細胞応答を制御しうる B 細胞が存在する。これらは制御性 B 細胞(Breg)としてこれまで様々なタイプが報告されてきた。IL-10 や TGF-β、IL-35 を分泌することで、Breg が tumor necrosis factor α産生性単球 や、IL-12 産生性樹状細胞、Th17 細胞、Th1 細胞、細胞傷害性 $CD8^+$T 細胞などへの炎症性細胞の分化を抑制し、さらに、制御性 T 細胞の誘導や、invariant NKT 細胞の維持に関与していると報告されている。この他に、FasL を発現した Breg や、Granzyme B を発現した Breg などがあり、盛んに研究が行われている。

Breg の一つとして、T 細胞を制御して免疫恒常性の維持や免疫寛容をもたらす重要な分子の一つである programmed death-ligand (PD-L) 1 および PD-L2 が B 細胞に発現していることが発見された。PD-L1 が免疫細胞や非免疫細胞を問わず幅広く様々な細胞に発現しているのに対し、PD-L2 の発現はマクロファージや樹状細胞などの APC に限定的なものと考えられている。さらに、APC として効果的に働く特有な B 細胞集団であるマウスの腹腔内 $CD5^+$B-1a 細胞のうち、50-70%には PD-L1 とともに PD-L2 が発現していることが明らかとなっている。この PD-L1/PD-L2 分子そのものの生理学的機能として、PD-1 を介して T 細胞の自己免疫反応を制御することが知られているものの、B-1a 細胞における PD-L1 と PD-L2 分子の機能及び役割はいまだ不明である。$PD\text{-}L1^+$B 細胞については、脾臓の $PD\text{-}L1^{hi}$B 細胞が濾胞性ヘルパーT 細胞の分化を抑制することで、T 細胞の分化や抗体産生を抑制していることが最近明らかになったが、まだ PD-L1 を発現した B-1a 細胞についての報告は少なく、今後解明されるべき点が非常に多い。一方で、腹腔内 B 細胞に発現している PD-L2 の機能については報告が少なく、自己免疫反応を抑制する一方で、T 細胞の分化を促進することが報告されており、様々な条件や環境下でその働きが異なることが示唆されており、未解明な部分が多い。さらに、PD-L1 と PD-L2 を共発現した B 細胞の機能についてはほとんど明らかになっていない。

このため、我々はPD-L1とPD-L2分子を共発現している独特なB細胞集団によるT 細胞のアロ応答の抑制効果の有無について研究を行った。本研究では、PD-L1$^{+}$/PD-L2$^{+}$ B-1細胞がアロ刺激に応答するT細胞を抑制し、抗体産生を抑制することを明らかにした。これらの特徴的なB-1細胞を用いたドナー特異的リンパ球輸注を移植前に行うことにより、臓器移植後のT細胞アロ応答を抑制し、免疫寛容を誘導できる新たな治療法の開発につながりうる研究である。

# 実　験　方　法

8-11 週齢の雌の Balb/c マウス及び C57BL/6 (B6) マウス、NOD/SCID IL2Rγ KO (NSG) マウスを以下の実験に用いた。広島大学動物実験規定に基づいて実施した。

## 細胞調整法

B 細胞フェノタイプの解剖学的スクリーニングとして、Balb/c マウスおよび B6 マウスの腹腔内 (PerC)、脾臓(SPL)、肝臓(liver)、骨髄(BM)、末梢血(PB)、頸部リンパ節(CLN)のリンパ球を採取した。SPL または PerC のリンパ球から、CD19 マイクロビーズを用いて autoMACS で細胞分離を行い、B 細胞を抽出した。PerC non-B 細胞は negative selection により同時に抽出した。B 細胞および non-B 細胞の純度は 95 %以上であることをフローサイトメトリー (FCM) で確認した。

Balb/c マウスから抽出した PerC B 細胞 $10\times10^6$ 個を抗 PD-L1 抗体 (10F.9G2, BioLegend, San Diego, CA, USA) および抗 PD-L2 抗体 (TY25, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) および、それぞれの isotype matched control 抗 IgG 抗体を添加し、30 分間 4℃でインキュベートした。

Balb/c マウスから採取した PerC リンパ球に CD19-fluorescein isothiocyanate (FITC)抗体と PD-L2-phycoerythrin (PE) 抗体を添加し、30 分間 4℃でインキュベートした。これらの細胞を FACSAria (BD Pharmingen)で $CD19^+PD\text{-}L2^+$細胞をソートし、PD-L2 陽性 B 細胞を抽出した。抽出した細胞の純度が 95%以上であることを FCM で確認した。すべての細胞培養は 5 % FBS、2 mM L-glutamine、100 U/ml penicillin-streptomycin 及び 50 μM 2-ME を添加した RPMI 1640 medium を用いた。

## フローサイトメトリー解析

SPL、PerC、liver、BM、CLN 及び PB から分離した単核球に下記の蛍光標識抗体を添加した。PD-L1- PE (MIH5; BD Pharmingen)、PD-L2-PE (TY25; BD Pharmingen)、FasL-PE (MFL3; BD Pharmingen)、CD80-PE (16-10AI; BD Pharmingen)、CD86-PE (GL1; BD Pharmingen)、CD4-PE (L3T4; BD Pharmingen)、CD5-PE-Cy7 (53-7.3; BioLegend)、CD8a-PE (53-6.7; BD Pharmingen) 、CD8a-PE-Cy7 (53-6.7; BD Pharmingen) 、CD11b-APC-Cy7 (M1/70; BD Pharmingen) 、CD19-FITC (1D3; BD Pharmingen) 、IgM-allophycocyanine (APC) (II/41; BD Pharmingen)、TRAIL-PE (N2B2; eBioscience, San Diego, CA, USA)、IA/IE-PE(M5/114.15.2; BD Pharmingen)。アイソタイプコントロール

は次の抗体を用いた; マウス免疫グロブリン G (IgG) 2a,k-PE、ハムスター IgG1,λ1-PE-Cy7、マウス IgG2a,k-FITC、マウス IgG1-APC、マウス IgG1-APC-Cy7、ラット IgG2a,k-Biotin。採取した細胞は 0.5- 1.0×$10^6$ 個/tube に調整し、staining medium に懸濁して上記の各蛍光標識抗体を添加し、30 分間 4℃でインキュベートし染色後、staining medium で洗浄した。

FCM 解析では、死細胞染色試薬 7-AAD を添加後、FACSCanto II（BD Biosciences）を用いて測定した。carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester （CFSE）染色を用いたリンパ球混合試験（CFSE-MLR）では FACSCalibur （BD Biosciences）を使用した。得られたデータは解析用ソフトウェア FlowJo（FlowJo LLC, Ashland, OR, USA）で解析した。

## B 細胞移入

Balb/c マウスから PerC または SPL B 細胞、または PerC non-B 細胞を抽出し、それぞれ 10×$10^6$ 個を B6 マウスの尾静脈に静注し、細胞移入を行った。2 週間後にレシピエントの脾細胞を採取し、後述する CFSE-MLR による解析を行った。また、細胞移入から 4 週後まで毎週レシピエントから採血し血清を分離し、FCM によるアロ抗体測定に使用した。

## アロ抗体測定

Balb/c マウス脾細胞を用いた間接蛍光染色により抗 Balb/c 抗体を FCM で検出し解析した。B6 マウスの血清を Balb/c マウスの脾細胞 0.5×$10^6$ 個と 1 時間, 4℃で incubation させ、下記の抗体をそれぞれ添加し、30 分間 4℃で incubation し、FCM で解析した ; IgM –FITC (R6-60.2; BD Pharmingen)、IgG-FITC(Poly4060; BioLegend)、IgG1 mAb-Biotin (A85-1; BD Pharmingen) 、 IgG2a/2b-Biotin (R2-40; BD Pharmingen) 、 IgG3-Biotin(R40-82; BD Pharmingen) 。これに、CD19-PE (1D3; BD Pharmingen)を同時に添加し、Balb/c マウスの脾臓 B 細胞に表出している非特異的 IgM や IgG の検出を取り除いた。CD19 陰性細胞中の median fluorescence intensity（MFI）を算出し、Balb/c 特異的抗体の定量評価に用いた。

## CFSE-MLR 解析

細胞移入から 2 週間後にレシピエントである B6 マウスの脾細胞を採取し、5 μM CFSE （Molecular Probes: Eugene, OR）で標識し、細胞培養液で懸濁し、responder として用いた。naïve な Balb/c マウスの脾細胞に 30 Gy の radiation を行い、これを stimulator とした。responder と stimulator をそれぞれ 4×$10^6$ 個ずつを 24-well プ

レートで共培養した（37℃、5 %$CO_2$、暗所）。4 日後に細胞を回収し、CD4-PE, CD8a-PE 抗体で染色し、FCM を用いて解析した。解析方法は下図の式に基いて算出した。

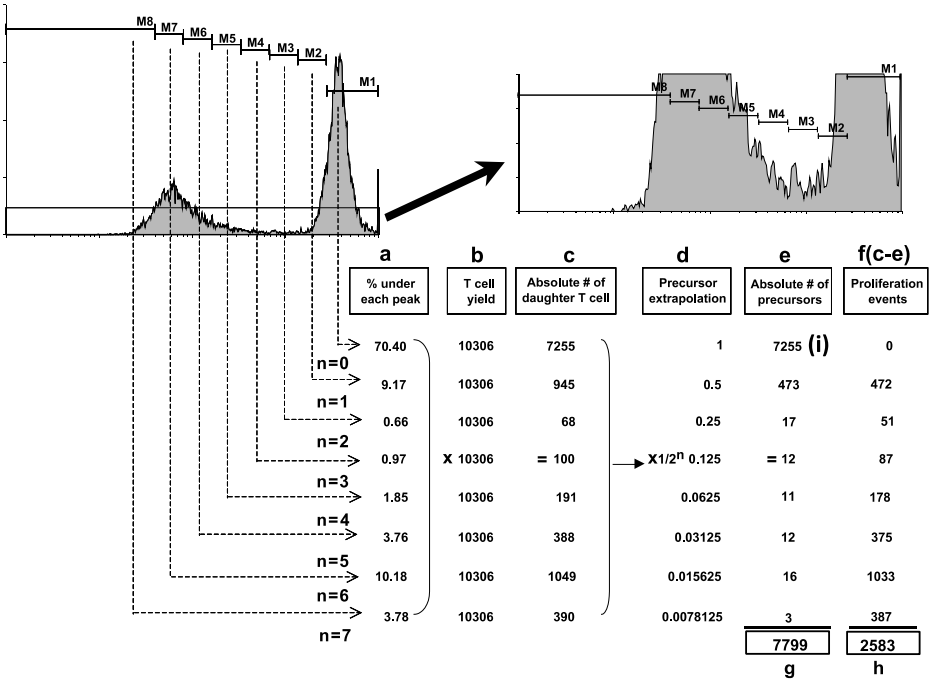


図 1.CFSE-MLR 試験の解析手法. 各 well から採取した細胞を FCM で解析し、CD4 陽性または CD8 陽性細胞について、CFSE 強度をヒストグラムで示し、8 つの分裂段階に区分した。分裂指数（mitotic index = h/g）を求め、responder のみで培養した場合の分裂指数を 1 とし、アロ stimulator と培養した時の mitotic index の比を stimulation index として算出した。また、precursor frequency は(g – i)/g により計算した。

## aGVHD モデル作成

B6 マウスから脾細胞を採取し、auto MACS で T cell isolation kit を用いて T 細胞を抽出した。これを $1\times10^6$ 個と大腿骨・腓骨より採取した骨髄細胞 $5\times10^6$ 個を 8 Gy 放射線照射した Balb/c マウスに尾静脈注射し、急性移植片対宿主症候群（aGVHD）モデルを作成した[37]。骨髄移植翌日と 4 日後に naïve Balb/c マウスから採取し、抽出した PerC または脾臓 B 細胞を $1\times10^6$ 個尾静脈から投与した。B 細胞投与を行わない群をコントロールモデルとした。骨髄移植後、生存率を連日、体重変化を含む GVHD scoring 評価を週に 2 回行った。GVHD scoring は、下記の通りに行った[38]。

骨髄移植後の臨床GVHD評価法□

| 基準□ | グレード0□ | グレード1□ | グレード2□ |
|---|---|---|---|
| 体重減少□ | <10%□ | >10%□to□≦25%□ | >25%□ |
| 姿勢□ | 正常□ | 休止時のみ背中を丸める□ | 背中を丸めながら□動く□ |
| 活動性□ | 正常□ | 軽度から中等度の低下□ | 刺激時以外動かず□ |
| 毛並み□ | 正常□ | 軽度から中等度の低下□ | 重度の低下□ |
| 皮膚状態□ | 正常□ | 四肢や尻尾の鱗屑□ | 明らかな脱毛□ |

## 統計学的解析

データは平均±標準誤差で示した。統計解析ソフト GraphPad Prism (San Diego, USA)を用いて Student's *t* 試験によって統計学的解析を行った。全ての解析において、*p* 値が 0.05 未満において有意差ありと判断した。

# 実　験　結　果

## B 細胞フェノタイプの解剖学的スクリーニング

Balb/c マウスにおいて、PerC B 細胞の PD-L1、PD-L2、CD80、CD86 が著明に高発現していた。また、これらのフェノタイプの陽性細胞率の平均値はそれぞれ、88.9 %、48.0 %、84.3 %、35.6 %であり、他臓器に比べて有意に高値であった。なお、MHC class II はいずれの臓器でもほぼ全ての B 細胞に発現しており、FasL, TRAIL についてはいずれの臓器でも発現レベルは低かった。

B6 マウスでも同様に解析を行った結果、B 細胞における PD-L1（83.6 %）、PD-L2（28.4 %）、CD80（73.9 %）、CD86（40.0 %）の陽性率は他臓器に比べて有意に高く、Balb/c マウスと同様の傾向であることが確認できた。この結果から、腹腔内の B 細胞には、細胞死誘導分子の PD-L1, PD-L2 を共発現し、かつ共刺激分子を発現した集団が多く存在することが示唆された。

さらに、SPL、PerC、liver の各 B 細胞サブセットにおける免疫抑制性分子の発現について解析を行った。SPL B 細胞は辺縁帯 B 細胞、濾胞性 B 細胞、B-0 細胞で構成されており、IgM と CD21 の発現の違いにより分類される。また、PerC および liver B 細胞は、CD5 と CD11b の発現の差異により B-1a、B-1b および B-2 細胞に分類される。一般的な性質を持つ B-2 細胞とは異なり、B-1a および B-1b 細胞が自然免疫を担うことは広く知られているものの、B-1a 細胞と B-1b 細胞の機能的差異については未だ明らかにされていない点が多い。本解析の結果、PerC B-1a 細胞と liver B-1a 細胞は PD-L1、PD-L2、CD80、CD86 を他のサブセットに比して有意に高率に発現していた。これらの B 細胞は T 細胞への抗原提示に効果的な分子を表出しており、かつ、細胞死誘導分子を発現していることから、アロ抗原を認識する T 細胞に対して免疫寛容誘導能を有している可能性があることが示唆された。

## PD-L2$^{+}$B 細胞の移入後の局在とフェノタイプ安定性

次に、腹腔内に特徴的に存在する PD-L2$^{+}$B 細胞の局在性とフェノタイプの安定性について検討を行った。T 細胞、B 細胞、NK 細胞、cytokine signal を欠損した NSG マウスに、Balb/c マウスより抽出した PD-L2$^{+}$B 細胞を尾静脈に投与し、1 週後および 2 週後に PerC、SPL、BM、PB、CLN のリンパ球を採取し、B 細胞および免疫抑制性分子の発現について検討した。1 週後、2 週後とも、B 細胞は PerC のみに存在し、その他の臓器ではほとんど認めなかった。また、唯一認めた PerC B 細胞では、PD-L1、PD-L2、CD80、CD86 が高い発現率で維持されていた。PD-L2$^{+}$B 細胞は、腹腔内に局在し、フェノタイプを少なくとも 2 週間維持していることがわかった。

## アロ B 細胞移入によるアロ抗体産生抑制

次に、PD-L1/PD-L2 陽性細胞を発現した腹腔内 B 細胞の機能的解析を行った。Balb/c マウスの PerC B 細胞または、SPL B 細胞、PerC non-B 細胞を抽出し、それぞれ $10\times10^6$ 個を B6 マウスに投与し、細胞移入モデルを作成した。１週毎に採血を行い、血清中のアロ抗体を Balb/c マウスの脾細胞に吸着させ、FCM で定量評価を行った。SPL B 細胞のレシピエントでは、１週後に抗 Balb/c IgM が増加し、その後まもなく低下した。一方で、PerC の B 細胞や non-B 細胞のレシピエントではこのような変化は認めなかった。SPL B 細胞と PerC non-B 細胞のレシピエントでは、抗 Balb/c IgG 値が上昇し、２週後でプラトーに達していたのに対し、PerC B 細胞レシピエントの IgG 値の上昇は軽度認めたものの、前者２群に比して有意に低かった。続いて、抗 Balb/c IgG のサブクラス解析を行った。IgG2a/2b は SPL B 細胞および、PerC non-B 細胞のレシピエントで有意に上昇していたが、PerC B 細胞のレシピエントでは低値のままでクラススイッチは認められなかった。よって、アロ PerC B 細胞の静注により、アロ抗原の感作を回避できたことが示された。

## アロ B 細胞移入によるアロ応答性 T 細胞抑制

同様の細胞移入モデルを用いて、細胞移入から 2 週間後に脾細胞を採取し、Balb/c マウスの脾細胞を stimulator に用いて CFSE-MLR による解析を行い、T 細胞のアロ応答を評価した。SPL B 細胞および PerC non-B 細胞を移入した群では stimulation index(SI)が高く、アロ応答の亢進を認めた。一方で、PerC B 細胞では SI がこれら 2 群に比べて有意に低く、アロ反応性 T 細胞の増殖抑制を認めた。また、precursor frequency (PF)は各群で有意差を認めなかった。よって、PD-L1 および PD-L2 を高発現している PerC B 細胞移入により、T 細胞のアロ応答が抑制されたと考えられた。

## 抗 PD-L1/PD-L2 抗体添加したアロ B 細胞移入によるアロ応答性 T 細胞抑制効果の消失

T 細胞アロ応答の抑制効果における、PerC B 細胞に発現した PD-L1 および PD-L2 の機能的な役割を、次に確認した。抗 PD-L1 抗体を添加した PerC B 細胞のレシピエントにおいて、抗 Balb/c $CD4^+$及び $CD8^+$T 細胞の SI がアイソタイプコントロール IgG 抗体のみを添加した PerC B 細胞のレシピエントに比べて有意に増強していた(図 9)。抗 PD-L1 抗体と抗 PD-L2 抗体の２つを同時に添加した PerC B 細胞のレシピエントにおいても、同様の結果が得られたが、相乗効果は得られなかった。また、抗 PD-L2 抗体を添加した PerC B 細胞のレシピエントでは、抗 Balb/c $CD4^+$及び $CD8^+$T 細胞の SI が最も高値であったが、抗 PD-L1 抗体を添加した PerC B 細胞レシピエントの SI との有意差を認めるには至らなかった。これらの結果と一致して、抗 PD-L1 および

抗 PD-L2 抗体を添加した PerC B 細胞のレシピエントでは、アイソタイプコントロール IgG 抗体を添加した PerC B 細胞のレシピエントに比べ、抗 Balb/c $CD4^+$及び $CD8^+$T 細胞の PF が有意に高値であった。これらの結果から、アロ抗原性 PerC B 細胞上に発現した PD-L1 と PD-L2 が、同種アロ刺激に対する T 細胞応答の抑制に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

## アロ B 細胞による aGVHD 抑制効果

骨髄移植後の急性移植片対宿主症候群（aGVHD）はドナーT 細胞による宿主細胞へのアロ応答である。この aGVHD における、アロ PerC B 細胞による T 細胞アロ応答抑制効果について検証した。いずれの群でも体重は移植後すぐに低下するものの、1 週間を nadir に回復したのち、再度低下をたどっていた。GVHD score でも同様で、移植後すぐに上昇するものの、7 日後をピークに一旦低下したあと、再度上昇に転じた。生存曲線では、コントロール群はこれまでの報告と同様、10 日前に全例死亡（生存期間中央値 7 日間）している。一方、SPL B 細胞、PerC B 細胞投与群では、10 日前後に死亡する例が多いものの、中には 40 日程度まで生存した個体もあった。生存期間は中央値でそれぞれ 9 (7-41)日間、8 (7-40)日間であり、いずれにおいても有意な生存率延長は認めなかった。SPL B 細胞、PerC B 細胞を投与した群では各一例ずつのみ 40 日程度の長期生存を認めたが、統計学的な有意差は認めなかった。

# 考　察

これまで様々な Breg が報告されており、PD-L1$^{+}$B 細胞や PD-L2$^{+}$B 細胞についての報告はあるものの、PD-L1$^{+}$PD-L2$^{+}$B 細胞についての報告はほとんどない。我々は解剖学的に様々な臓器の B 細胞を解析した結果、PD-L1$^{+}$PD-L2$^{+}$B 細胞が naive な状態でマウス腹腔内 B-1a 細胞に特徴的に存在していることを発見した。また、MHC class II がほぼ全ての B 細胞に発現していることに加え、副刺激分子である CD80 と CD86 が高発現していることを示した。このことから、腹腔内 B-1a 細胞には抑制性分子を表出し、かつ、抗原提示能を有した集団が存在することを明らかにした。また、NSG マウスへの PD-L2$^{+}$B 細胞移入の実験において、移入された B 細胞は腹腔内のみに存在し、さらに PD-L1、PD-L2、CD80 及び CD86 の高発現が維持されていた。これは PD-L2$^{+}$B 細胞が self renewal すること、そして分化系統において最終段階にある成熟した細胞である可能性を示唆している。本研究では細胞移入後 2 週後までの解析しかできておらず、長期での細胞分布やフェノタイプの変化について、さらなる研究による解明が望まれる。

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な役割を果たしていることがこれまで示唆されているものの、コンセンサスを得るには至っていない¥。MHC class I ミスマッチモデルにおいて、ドナーB 細胞を投与してから移植することでドナー特異的皮膚移植片の生着期間が非 B 細胞投与に比べて延長したとする報告があり、ドナー特異的アロ皮膚移植片延長においてドナーB 細胞が果たす役割の重要性が示唆されている。一方で、MHC class I/II ミスマッチモデルにおいては、SPL B 細胞投与による免疫抑制効果は認められていない。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。また、SPL B 細胞や PerC non-B 細胞を投与した場合に IgG サブクラスのクラススイッチが起こるのに対し、PerC B 細胞を投与した場合では、クラススイッチが認められなかった。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 細胞は抗ドナー免疫応答を抑制するアロ抗原を用いた DLI に応用するのに最適な集団である可能性が

ある。

本研究から、B-1a 細胞に共発現した PD-L1 と PD-L2 はアロ免疫応答における重要な制御的役割を有している可能性があると考えられる。しかし、最初に PD-L2$^{+}$B 細胞を発見した Zhong らは、この新たな細胞集団は T 細胞を刺激し、T 細胞の分化や抗体産生を促進すると報告しており、本研究結果とは相反する結果である。この実験において彼らは、抗 PD-L2 抗体を用いて PD-L2$^{+}$B 細胞を抽出し、T 細胞と共培養するという方法で機能解析を行っている。ここで使用されている抗 PD-L2 抗体が PD-L2 分子のブロック抗体として作用する可能性があり、B 細胞上の PD-L2 の機能が明らかになってない現在、この方法では不適切であると我々は考えている。一方で、PD-L1$^{+}$PD-L2$^{+}$B-1a 細胞は PD-L1$^{+}$PD-L2$^{-}$B-1a 細胞とほとんど同じ表面マーカーを発現しており、PD-L2 の生理学的機能に干渉するおそれのある抗 PD-L2 抗体を使わずに PD-L2 陽性 B-1a 細胞を抽出するのは非常に困難である。したがって、この特徴的な B 細胞集団を移植前の DLI に適用するには、PD-L1$^{+}$PD-L2$^{+}$B-1a 細胞の抽出方法や分化誘導方法の確立が必要である。

PD-L1$^{+}$PD-L2$^{+}$B-1a 細胞を抽出せずとも、PerC B 細胞をそのまま静注することで、アロ刺激を回避し、さらにはアロ応答性 T 細胞の低応答を誘導できることを今回我々は示した。これらの結果から、生体内での T 細胞アロ応答を抑制し、aGVHD モデルにおいて免疫寛容の誘導を試み、実験を行った。aGVHD モデルにおいて、PerC B 細胞を移入しても体重変化や GVHD scoring、生存期間延長などいずれの評価項目においても有意な結果を得ることはできず、aGVHD 抑制効果は認められなかった。しかし、PerC B 細胞だけでなく、SPL B 細胞の移入によっても、生存期間を大幅に延長した個体を認めた。PerC B 細胞移入群については、PD-L1 および PD-L2 による T 細胞のアロ応答抑制が起きたことが理由として考えられる。一方、SPL B 細胞は PD-L2 の発現はほとんどないが、PD-L1 は 40-50%ほどに発現していることが本研究やこれまでの報告で示されている。今回の生存期間が延長した個体では、PD-L1$^{+}$ SPL B 細胞により T 細胞応答が抑制されたと推察することもできる。

抗 PD-L1 および抗 PD-L2 抗体を投与した実験において、抗 PD-L1/抗 PD-L2 抗体を同時に投与しても、抗 PD-L1 抗体または抗 PD-L2 抗体単独を投与した場合に比して、T 細胞アロ応答の増強は有意差なく、相乗効果は認めなかった。我々は、PerC B 細胞が PD-L1 だけでなく、PD-L2 を同時に発現していることが、T 細胞応答の抑制に効果的にはたらくと推測し、本研究を進めてきたがこれを裏付ける結果は得られなかった。この点について、今後さらなる研究をすすめ、明らかにしていく必要がある。

本研究では、PerC B 細胞による T 細胞アロ応答抑制効果があることを示したが、メカニズムの解明には至っていない。これらの機序として、第一に、PD-L1 や PD-L2 分子による、T 細胞の分化抑制や anergy、apoptosis が起きている可能性が考えられ

る。これらの証明には、抗 PD-1 抗体の T 細胞への添加、濾胞性 T 細胞や Th17 細胞など T 細胞のサブセット解析や、Annexin V を用いた apoptosis 解析などが必要と考えられる。第二に、従来報告されている Breg の特徴である IL-10 の分泌や、制御性 T 細胞の誘導の確認が必要である。Khan らは、脾臓 PD-L1$^{hi}$B 細胞の T 細胞分化抑制、抗体産生抑制においては、IL-10 分泌や制御性 T 細胞は関与していないと報告している。これらについて確認することで、従来の Breg とは異なるタイプの新たな Breg として注目すべき細胞集団であることが期待される。

臓器移植において、腎移植では、免疫抑制剤の発展により生着率の向上を得てきたが、超長期的予後や副作用の観点から解決すべき課題は多く、免疫寛容誘導法にかかる期待は大きく、その確立が強く求められている。本研究で明らかにした 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。これを移植前に投与することで、T 細胞アロ応答を抑制し、免疫寛容の誘導につなげることが期待される。PerC B 細胞は、naive な状態でこれらの特徴的なフェノタイプを表出しており、薬剤投与による分化や誘導を要しない。特に臨床応用する際に、薬物投与が不要であることは、一つのアドバンテージがあると考える。最終目標として、免疫抑制剤を用いずにドナー特異的な免疫寛容を誘導し、維持できる治療法の確立を目指して、さらなる研究に期待したい。