HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウス心移植モデルにおける移植後早期移植片浸潤細胞の免疫学的機能の変化に関する基礎的研究
Author(s)	巖築, 慶一
Description	配架番号：2519
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14055号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14055
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80983
Type	doctoral thesis
File Information	Yoshikazu_Ganchiku.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

マウス心移植モデルにおける移植後早期移植片浸潤細胞の

免疫学的機能の変化に関する基礎的研究

(The changes of immunological behavior during early phase graft infiltrating lymphocytes depends on the time after cardiac transplantation in mice)

2020 年 3 月

北　海　道　大　学

巖 築　　慶 一

学 位 論 文

マウス心移植モデルにおける移植後早期移植片浸潤細胞の

免疫学的機能の変化に関する基礎的研究

(The changes of immunological behavior during early phase graft infiltrating lymphocytes depends on the time after cardiac transplantation in mice)

2020 年 3 月

北　海　道　大　学

巖 築　　慶 一

目　　次

発表論文目録および学会発表目録　・・・・・・・・・・・・　1 頁

要旨　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　2 頁

略語表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　4 頁

緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　5 頁

方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　7 頁

結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　11 頁

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　24 頁

結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　28 頁

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　29 頁

利益相反　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　30 頁

引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　31 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である

1. Yoshikazu Ganchiku, Ryoichi Goto, Ryo Kanazawa, Takuji Ota, Kazuaki Shibuya, Yasutomo Fukasaku, Nozomi Kobayashi, Rumi Igarashi, Norio Kawamura, Masaaki Zaitsu, Masaaki Watanabe, Moto Fukai, Akinobu Taketomi
   The Functional Roles of Graft Infiltrating Lymphocytes during Early Phase Post-transplantation in Mice
   eLife, 投稿中

本研究の一部は以下の学会に発表した

1. 巖築 慶一、後藤 了一、金沢 亮、深作 慶友、川村 典生、財津 雅昭、渡辺 正明、嶋村 剛、武冨 紹信
   移植後早期グラフト浸潤細胞が拒絶、免疫寛容に及ぼす影響についての基礎的研究
   第 119 回日本外科学会定期学術集会、2019 年 4 月 18−20 日、大阪
2. Yoshikazu Ganchiku, Ryoichi Goto, Rumi Igarashi, Ryo Kanazawa, Kazuaki Shibuya, Yasutomo Fukasaku, Norio Kawamura, Masaaki Zaistu, Masaaki Watanabe, Akinobu Taketomi.
   Potential Alloreactivity of Early Phase Graft Infiltrating Lymphocytes in Murine Cardiac Transplantation Model.
   American Transplant Congress. 2019 年 6 月 1−5 日、Boston (U.S.A.)
3. Yoshikazu Ganchiku, Ryoichi Goto, Rumi Igarashi, Ryo Kanazawa, Kazuaki Shibuya, Yasutomo Fukasaku, Norio Kawamura, Masaaki Zaitsu, Masaaki Watanabe, Moto Fukai, Akinobu Taketomi.
   The Functional Alloreactivity *in Vivo* of Graft Infiltrating Lymphocytes in Early Phase Post-transplantation in mice.
   19th Congress of the Europiean Soiety for Organ Transplantation. 2019 年 9 月 15−18 日、Copenhagen (Denmark)
4. 巖築 慶一、後藤 了一、太田 拓児、金沢 亮、川村 典生、財津 雅昭、渡辺 正明、嶋村 剛、武冨 紹信
   移植後早期グラフト浸潤リンパ球の抗原特異性に関する基礎的検討
   第 55 回日本移植学会総会、2019 年 10 月 10−12 日、広島

要 旨

【背景と目的】
臓器移植における急性拒絶反応は T リンパ球を中心とした細胞性免疫により惹起され、移植片局所に浸潤したリンパ球の免疫学的活性が移植片の拒絶/寛容に重要な役割を果たす。移植後、ドナー抗原に特異的なリンパ球が活性化、成熟し移植片を拒絶するのに 7−10 日程度かかるとされるが、移植片には移植後速やかにリンパ球が浸潤する。この移植後早期の移植片浸潤リンパ球 (Graft Infiltrating Lymphocytes : GILs)の免疫学的機能、とりわけ抗原特異性の有無についてはこれまで明らかではなかった。動物実験による先行研究によると、移植直後から数日は GILs が直接拒絶反応に関与しない可能性が示唆されているが、これらの抗原特異性について解析を行った報告はこれまでなかった。本研究は、この移植後早期 GILs の免疫学的機能を、免疫不全マウスへのリンパ球の再構築という手法を用いることで可能とし、明らかにした。
【対象と方法】
臓器移植モデルとして、マウス心移植モデルを採用した。C57BL/6 マウスの心グラフトを BALB/c マウスの腹腔に異所性に移植し、移植後 72 時間および 120 時間の時点で移植片をレシピエントマウスより摘出、単核球を移植片より摘出し、解析を行った。まず、GILsの population、活性化マーカーの発現、細胞傷害性サイトカイン産生を Flow Cytometry で直接解析した。一移植片から採取できる GILs の細胞数は少数であり、同細胞をそのまま使用しての機能解析は困難であった。そこで、リンパ球系の細胞を持たない BALB/c Rag2$^{-/-}$ Il2γc$^{-/-}$ マウス (BRG マウス)に GILs を腹腔内投与、同マウス内に GILs による免疫システムの再構築を行った。移入後 10 週目に同マウスを用い ELISpot およびマウス心移植を行い、機能解析を行った。さらに、移植後 72 時間の心移植片を BALB/c マウスから摘出し、それを BRG マウスに直接再移植し、拒絶の有無を解析した。
【結果】
移植後 72 時間、120 時間いずれも、GILs はそのほとんどがレシピエント由来であった。120 時間で CD8$^+$ T 細胞優位な浸潤細胞数の増加をみとめたが、Naïve/Memory の比率は両者でほぼ同じであった。移植後 120 時間の GILs では、CD25, CD69, T-bet, Nur77 といったリンパ球の活性化マーカーの発現上昇を認めたが、72 時間での活性化マーカーの発現は異系、同系移植で有意差を認めなかった。炎症性・細胞傷害性サイトカインの産生増加を移植後 120 時間で認めたが、72 時間では同様に異系、同系で有意差を認めなかった。以上の結果からは、移植後 120 時間の GILs は活性化された集団であるが、72 時間では活性化されていないことが示唆された。さらに、移植片から抽出した単核球から CD3$^+$ GILs を sort し microarray を施行したが、免疫学的機能に関する遺伝子の発現では両者に有意差は認めなかった。続いて、抽出した移植片浸潤細胞を BRG マウスの

腹腔内に投与し、GILs の BRG マウスでの再構築を試みた。野生型マウスの脾細胞を腹腔内投与した予備実験では、投与後 2 週間で BRG マウスの末梢血に $CD3^+$リンパ球の出現を認めた。投与後 9-10 週目でリンパ球の再構築率がプラトーとなったため、10 週目でマウスを解剖、脾細胞でも十分量のリンパ球が再構築されるのを確認した。また、同マウスを用い ELISpot およびマウス心移植による機能解析を施行したところ、再構築するリンパ球のドナー抗原への曝露歴によって異なる免疫応答を示した。続いて、移植後 72 時間および 120 時間の GILsを用いて同実験を施行した。投与後 10 週目で再構築される脾臓内のリンパ球の割合は、腹腔内投与時の細胞数により変動を認めたが、いずれも CD44 陽性の memory phenotype のリンパ球が再構築された。また、$CD4^+Foxp3^+$Treg の再構築も認めた。再構築後の BRG マウスの脾細胞で IFN-γ ELISpot assay を施行、120 時間の GILsを再構築した BRG マウスではドナー抗原特異的な強力な IFN-γ 産生を認めたが、72 時間の GILsを再構築した BRG マウスではドナー抗原に対する IFN-γ 産生は微弱であった。続いて、再構築後の BRG マウスに対し、ドナー抗原と同種の心移植片を移植した。120 時間の GILs を再構築した BRG マウスは速やかに心移植片を拒絶した一方で、72 時間の GILsを再構築した BRG マウスでは移植後 100 日目でも移植片の拍動を続けており、脾細胞でのリンパ球の再構築率や抗原特異的な IFN-γ 産生能は移植前と移植後とで変化を認めなかった。さらに、移植後 72 時間の心移植片を、BALB/c レシピエントから摘出、そのまま BRG マウスに再移植したところ、移植片は拒絶されることなく拍動を続けた。再移植後 100 日目の心移植片には $CD3^+$リンパ球の浸潤を認め、脾細胞への $CD3^+$リンパ球の再構築を確認した。このことから、移植後 72 時間の GILsはドナー抗原に対し攻撃的な免疫機能を有さないと考えられた。

【考察】

BRG マウスへのリンパ球の投与により、投与したリンパ球による免疫システムが再構築され、再構築されたリンパ球の抗原特異性に依存した異なる免疫応答を示した。移植後 120 時間の GILs は活性化された population であり、BRG への再構築後も強力な抗原特異的な免疫応答を示したことから、ドナー抗原により感作されたリンパ球であると考えられた。一方で、移植後 72 時間の GILsの活性化は微弱で、抗原特異的な攻撃性も示さなかったことから、ドナー抗原に感作されていない集団と考えられた。移植直後に浸潤する抗原非特異的なリンパ球は特定の免疫機能を有している可能性があり、今後詳細な解明が期待される。

【結論】

移植後 120 時間の GILs は活性化されており、抗原特異的な細胞集団を含む一方で、移植後 72 時間後の GILs はレシピエント由来にも関わらず活性化は微弱で、抗原特異的な反応性も有さない集団であった。

略 語 表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである

Ag;	antigen
APC;	antigen presenting cells
BRG;	BALB/c $Rag2^{-/-}$ $Il2\gamma c^{-/-}$
ELISpot;	enzyme-linked immunospot assay
EvG;	Elastica van Gieson
Foxp3;	forkhead box protein P3
GILs:	graft infiltrating lymphocytes
IFN-γ;	interferon-gamma,
IL;	interleukin
KLRG;	killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1
MHC;	major histocompatibility complex
MLR;	mixed lymphocyte reaction
MST;	mean survival time
Nur77;	nuclear receptor subfamily 4 group A member 1(NR4A1)
T-bet;	Th1-specific T box transcription factor,
TCR;	T cell receptor
TNF-α;	tumor necrosis factor-alpha

緒　言

臓器移植における拒絶反応は T 細胞を中心とした細胞性免疫が主体となって惹起され、移植片局所でのリンパ球の免疫応答は移植片の拒絶・生着に非常に重要である。Kendal らは、皮膚移植モデルにて、免疫寛容を導入されたマウス皮膚移植片には制御性 T 細胞が浸潤しており、この制御性 T 細胞を選択的に皮膚移植片から除去すると移植片が拒絶されることを示し、移植片局所で制御性 T 細胞とエフェクターT 細胞とのバランスが拒絶・寛容に強く影響することを示した (Kendal et al., 2011; Zaitsu et al., 2017)。このため、移植片に浸潤するリンパ球 (Graft Infiltrating Lymphocytes; GILs)の免疫学的機能の解析は移植片での拒絶反応の有無の解析に重要である。一般に、細胞性免疫の成立には抗原提示細胞による二次リンパ組織での抗原特異的 T 細胞の活性化、成熟した抗原特異的 T 細胞の移植片への浸潤、移植片局所での免疫応答という過程を必要とする (Alegre et al., 2016; Wood and Goto, 2012)ため、一般にその成立には 7−10 日程度かかるとされている。一方、移植片には移植後 24 時間の時点でリンパ球の浸潤を認める (Schenk et al., 2008)。この 移植後 24 時間の早期 GILs は抗原特異的なリンパ球ではないと考えられている (Schenk et al., 2008)が、その免疫学的機能については明らかではない。移植後の $CD8^+$GILs が炎症反応の維持に作用しており (El-Sawy et al., 2004; Setoguchi et al., 2013; Su et al., 2014)、免疫応答の活性化に関与している可能性が示唆される一方、移植後 72 時間までのリンパ球が移植片に対し直接的な攻撃性を持たないとする報告もあり (Goto et al., 2013b; Li et al., 2012; Setoguchi et al., 2011)、その評価は一定しない。特に、移植後 72 時間の時点での GILs が潜在的に移植片を攻撃する能力を持つのか、すなわちドナー抗原特異的な細胞集団なのかはこれまで明らかではなかった(図 1)。

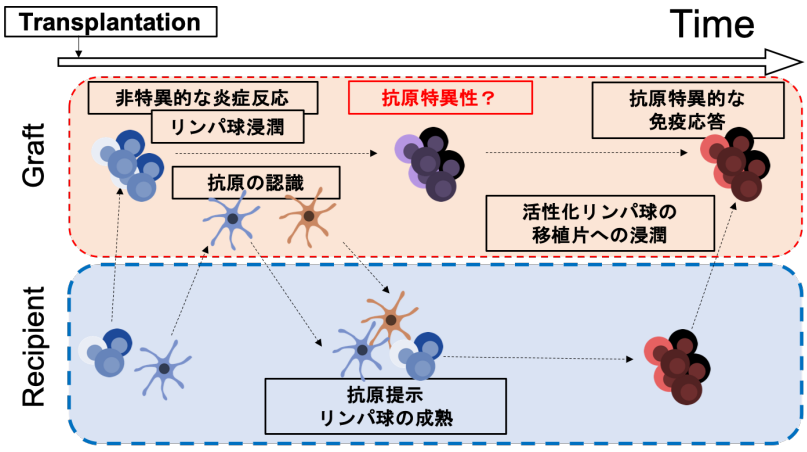


図1. 移植後早期の免疫応答
移植片には移植直後からリンパ球の浸潤を認めるが、その免疫機能、とりわけ抗原特異的な反応性の有無は明らかになっていない

GILs の機能解析、とりわけ抗原特異性の有無に関する解析にはいくつかの困難がある。一つに、移植片から得られる GILs は非常に少数であり (Christen et al., 2009)、Mixed lymphocyte reaction (MLR), ELISpot などの機能解析に十分な細胞数が得られない。また、周術期の移植片は非特異的な炎症反応により修飾を受け、抗原特異的な炎症反応を評価できていない可能性がある。そしてなにより、免疫応答は多数の細胞の相互作用が

経時的に変化するものであり、特定の時間でのその瞬間での機能を記録するのは非常に難しい。そのため、これまでに GILs の抗原特異性について間接的に機能を示唆するような研究は多数見られるが、それを直接解析した報告はなかった。本研究では、リンパ系免疫細胞を有しない免疫不全マウス (Kenney et al., 2016)に GILs を移入して同マウスに GILs の免疫系を再構築し、抗原特異的な攻撃性を解析する動物実験モデルを考案した。再構築されたマウスの機能解析を行うことにより、GILs の抗原特異的な反応性を解析し、移植後 72 時間と 120 時間の GILs の免疫学的な違いを検証した。

方 法

・マウス

C57BL/6、BALB/c、C3H、C;129S4-Rag2tm1.1Flv Il2rgtm1.1Flv/J (BALB/c Rag2$^{-/-}$ γc$^{-/-}$: BRG)マウス (Song et al., 2010)を実験に使用した。C57BL/6, BALB/c, C3H は日本 SLC から 8 週齢のものを購入し、医歯学研究棟 8 階にて飼育した。BRG マウスは Breeder Pair を米国のジャクソン研究所より購入し、当学動物実験施設にて維持、繁殖させたものを実験に使用した。また、本研究における動物実験は「北海道大学動物実験に関する規程」を遵守しながら施行した。

・マウス心移植モデル

まず、臓器移植モデルとして、マウスの心移植系を採用した。同モデルは灌流臓器移植モデルとして一般的な実験系であり、拒絶反応の有無を移植臓器の拍動の有無の触知という、簡便かつ非侵襲的な方法で評価することができる利点がある。また、心移植片は異所性に移植されることから、グラフト不全状態が全身状態に影響しない、すなわちグラフト不全によりレシピエントが死亡することがない。そのため、臓器移植の免疫応答を解析する動物実験モデルとして理想的である。

手術はすべてイソフルラン吸入による全身麻酔下に行った。まず、ドナー個体から心移植片を摘出した。開腹したマウスの腹腔動静脈を切断し脱血、同時に下大静脈からヘパリン加生理食塩水を投与し全身の灌流を行った。灌流後に上下大静脈を結紮切離、上行大動脈および肺動脈は結紮せず切離、残った血管を一括して結紮切離し移植片を摘出した。摘出した心移植片は腹腔内に異所性に移植した。すなわち、腹腔大動脈および腹部下大静脈を露出しクランプの上切開、移植片の上行大動脈と腹部大動脈とを、肺動脈と下大静脈とをそれぞれ 10―0 ナイロンの端側吻合で吻合した。吻合後クランプを解除し還流させ、止血を確認の上 4-0 ないし 5-0 の縫合糸を用いて2層で閉腹した。移植後 1 日 1 回腹部を触診し拍動の有無を確認、拍動停止日を拒絶日と判定した。

本研究ではレシピエントマウスとして、Balb/c マウスを、ドナーとして、異系移植：C57BL/6 を、同系移植：Balb/cをそれぞれ使用した。

・移植片浸潤単核球の抽出

移植後のマウスから移植片を摘出した。まず、全身麻酔下にレシピエントマウスを開腹。小腸を頭側に避け、移植片を露出、周囲の癒着を可及的に剥離、動静脈の吻合部を露出した。腹部動静脈の頭側をクランプし、動脈吻合部の直下のレシピエント側の大動脈からヘパリン加生理食塩水を注射し腹部の移植片を還流した。灌流中に下大静脈の吻合部の尾側を切開し脱血した。移植片の右心房が透明になるまで灌流を行い、動静脈吻合部の移植片側直上で動脈、肺動脈を切離し、移植片を摘出した。

摘出した移植片は左心室内血栓を可及的に除去し 2mm 大に細切し、コラゲナーゼ IV 5 mg を加えた RPMI1640 培地で CO_2 5%、37℃、30 分間静置した。その後 70 μm セルストレイナー (Corning)でグラフトを濾して単細胞とし、Lympholyte M (Cedarlane Laboratories)で比重遠心を行い、中間層を単核球として回収した。

・脾臓細胞の抽出

全身麻酔＋頸椎脱臼でマウスを安楽死させ、腹部正中切開にて開腹した。胃および小腸をマウス右側へ避け脾臓を露出。胃脾間膜および脾門部の血管を切離し、脾臓を摘出した。摘出した脾臓を 70 μm セルストレイナー上ですりつぶして単細胞とし、RBC lysis buffer (Thermo Fisher)で溶血、洗浄し精製した。

・フローサイトメトリー

脾臓細胞、末梢血細胞、移植片浸潤単核球は蛍光標識モノクローナル抗体で染色を行い、フローサイトメーター (FACS Canto II, BD Biosciences)で解析を行った。すなわち、生成した単核球に蛍光標識されたモノクローナル抗体を付加し、4℃、30 分で静置、洗浄し解析した。本実験で使用したモノクローナル抗体は以下の通りである; 抗マウス CD3ε (clone 145-2C11), CD4 (GK1.5), CD8a (53-6.7), CD25 (PC61), CD44 (IM7), CD45 (30-F11), CD62L (MEL-14), CD69 (H1.2F3), KLRG1 (2F1), Nur77 (12.14), T-bet (4B10), GATA3 (L50-823), RORγt (Q31-378), Foxp3 (FJK-16s), H-2Kb (AF6-88.5.5.3), H-2Kd (SF1-1.1.1), IFN-γ (XMG1.2), TNF-α (MP6-XT22), Granzyme B (NGZB)および Perforin (S16009A) (これらはいずれも BD, Thermo Fisher, BioLegend から購入した)。死細胞は 7-AAD (BD)を用い、すべての解析で除外された。T-bet, GATA3, RORγt, Foxp3 および Nur77 の核内染色では細胞表面染色の後に Thermo Fisher の Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Kit により Fix/Permeabilization を行った後に抗体を付与した。IFN-γ, TNF-α, Granzyme B および Perforin の細胞質内サイトカイン染色では、解析前に 2 時間 Monensin (BD)存在化に静置 (CO_2 5%、37℃)し、その後細胞表面染色、Cytofix/Cytoperm solution (BD)による Fix/Permeabilization の上で抗サイトカイン抗体を付与した。

・Cell sorting

単離した移植片浸潤単核球に抗マウス CD16/32 抗体 (TruStain FcX, BioLegend)を加え 5 分静置、これに抗マウス CD3 抗体 (REA641, Miltenyi Biotec)および 7-AAD を付加し 20 分静置した。この検体から FACS Aria III (BD)を用いて 7-AAD^{-}CD3ε^{+} 細胞を選別した。

・マイクロアレイ解析

ソートしたリンパ球から RNeasy mini kit (QIAGEN)を用いて RNA を抽出し、凍結した状態でマイクロアレイ解析に提出した。得られた RNA 量は微量でありリニア増幅を含めた cDNA 作成、解析、生データの抽出は DNA チップ研究所に外注した。cDNA は Agilent Sure Print G3 Mouse GE v2 8x60K Microarray (G4858A; 074809)とハイブリダイズし、Agilent SureScan G4900DA で解析された。取得されたデータは GeneSpring ver. 14.9.1 で標準化された。

・細胞の BRG マウスへの移入、再構築

単離した単核球を RPMI1640 200 μl に懸濁し、BRG のマウスに腹腔内注射した。組織の摘出から細胞の精製、マウスへの投与までは、全ての実験で 3 時間以内に行われた。腹腔内注射されたマウスは注射 1 週間後から週 1 回尾静脈から血液を採取され、リンパ球の再構築率を解析した。採取された血液を RBC lysis buffer にて溶血した後に、CD3 陽性リンパ球の割合をフローサイトメトリーにて解析した。

・ELISpot 解析

単離精製した脾臓細胞を、放射線照射したドナー/3rd party/自己の脾臓細胞とともに IFN-γ capture 抗体で予めコーティングした ELISpot MultiScreen Filter Plates (Millipore)上で 24 時間培養 (5% CO_2, 37℃)した。共培養後 24 時間で細胞を破棄、二次抗体を付加し streptavidin-ALP で発色させ、プレート上に発現したスポット数を ImmunoSpot software (Cellular Technology Limited)でカウントした。

・病理組織学的解析

心移植片は拒絶時あるいは移植後 100 日目に摘出され、ホワイトティッシュコート (U.I.化成)に包埋し−80℃に凍結された。クライオスタット (ライカ)で 5 μm の厚さの切片を作成しスライドグラスに貼付。ヘマトキシリン・エオジン染色および Elastica van Gieson (EvG)染色を施行した。作成した切片はマリノールで封入し、光学顕微鏡 (BZ-X800, キーエンス)で観察、撮影した。

・免疫組織化学

10 μm の凍結切片を作成し、4％パラホルムアルデヒドで 15 分間固定した。非特異的結合のブロックのためブロッキングワンヒスト (ナカライ)を添加し 30 分静置した。抗マウス CD3ε一次抗体 (clone: EPR20752, SIGMA)を添加し 4℃で一晩静置。Dako EnVision+ system-Rabbit HRP (Agilent)を添加し室温で 45 分静置の後、DAB (Cell Signaling Technology)を添加し発色させた。光学顕微鏡で観察し、陽性細胞の有無を確認した。

・統計

取得したデータはプリズム第 7.0 版 (GraphPad Software)で解析された。有意差は Student's *t* test にて比較した。移植片の生存はカプランマイヤー法で解析、log-rank test で解析した。サンプルサイズは過去の文献および予備実験、先行実験の結果から判断した。p 値 0.05 未満を有意差有りと判断した。

結　果

1.　GILs は 72 時間から 120 時間で I 型免疫への分化･活性化を認める

まず、当教室ですでに確立しているマウス心移植系の手術手技を取得した。移植片の拒絶期間において当教室での先行データ、文献的な報告と同等の成績 (MST: 7-10 日)を得られることを確認した (図 2A)。続いて同モデルを用い、GILs の population の経時的変化を解析した。すなわち、移植片をレシピエントマウスから摘出し単核球を精製、フローサイトメトリーにてその population を解析した。本研究は移植後 72 時間の GILs の免疫学的活性を解析するものであるため、解析対象を 72 時間に。Negative control として同時間の同系移植 (Balb/c→Balb/c)を、Positive control としてすでに活性化された GILsを選択することとした。GILs 抽出と FACS 解析の練習を兼ねた予備実験 (移植後 24, 48. 72, 120, 168 時間)の 結果、移植後 120 時間以降で単核球数の増加を認め (図 2B)、炎症反応を反映すると考えられたことから、移植後 120 時間以降が positive control として適当と判断した。また、移植後 168 時間では解剖時に心筋細胞の壊死を多数認め、心筋細胞の壊死の少ない 120 時間の移植片が解析に適当であると考え、同時間を positive control とした。

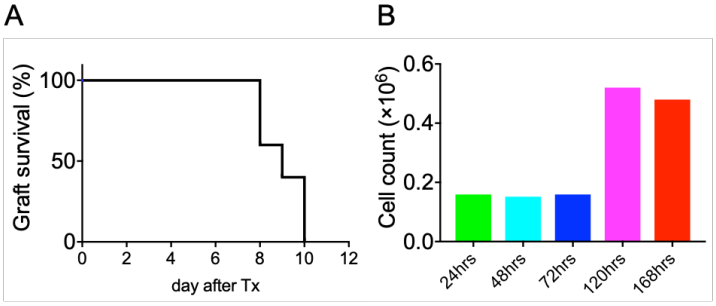


図2 マウス心移植系の確立と移植片摘出時間の設定
C57BL/6→Balb/cの心移植を施行した。移植片を移植後24, 48, 72, 120, 144時間後にそれぞれ摘出し、得られた移植片浸潤細胞数をカウントした。
(A) 移植片の生存期間。
(B) 移植片浸潤細胞の細胞数の推移

単核球数は移植後 120 時間で著明な増加を認めたが、72 時間では異系、同系で有意差は認めなかった (図 3A)。リンパ球の由来を MHC-class I 分子で解析したところ、移植後 72 時間の時点でほぼすべての GILs がレシピエント由来 ($H\text{-}2K^{d+}$)であった(図 3B)。リンパ球の比率では 120 時間で $CD8^+$リンパ球の割合が増加していたが、CD44、CD62L の発現による Naïve/Memory の population を解析したところ、72 時間、120 時間でその比率はほぼ同数であった (図 3C)。続いて、ヘルパーT 細胞の population を、Th1, Th2, Th17 の key transcription factor である T-bet, GATA3, RORγt の発現で解析した。その結果、72 時間では異系、同系で各因子の発現に有意差を認めなかったが、120 時間では T-bet 陽性リンパ球の有意な増加を認め (図 3D)、I 型免疫の活性化が示唆された。続いて、移植片における CD4 陽性制御性 T 細胞の活性化を CD25、Foxp3 で解析、移植後 120 時間で $CD4^+CD25^+Foxp3^+$T 細胞の増加を認めたが、同時に $CD25^+Foxp3^-$活性化 T 細胞の増加も認め、CD25+細胞中の Foxp3 陽性率は移植後 72 時間と

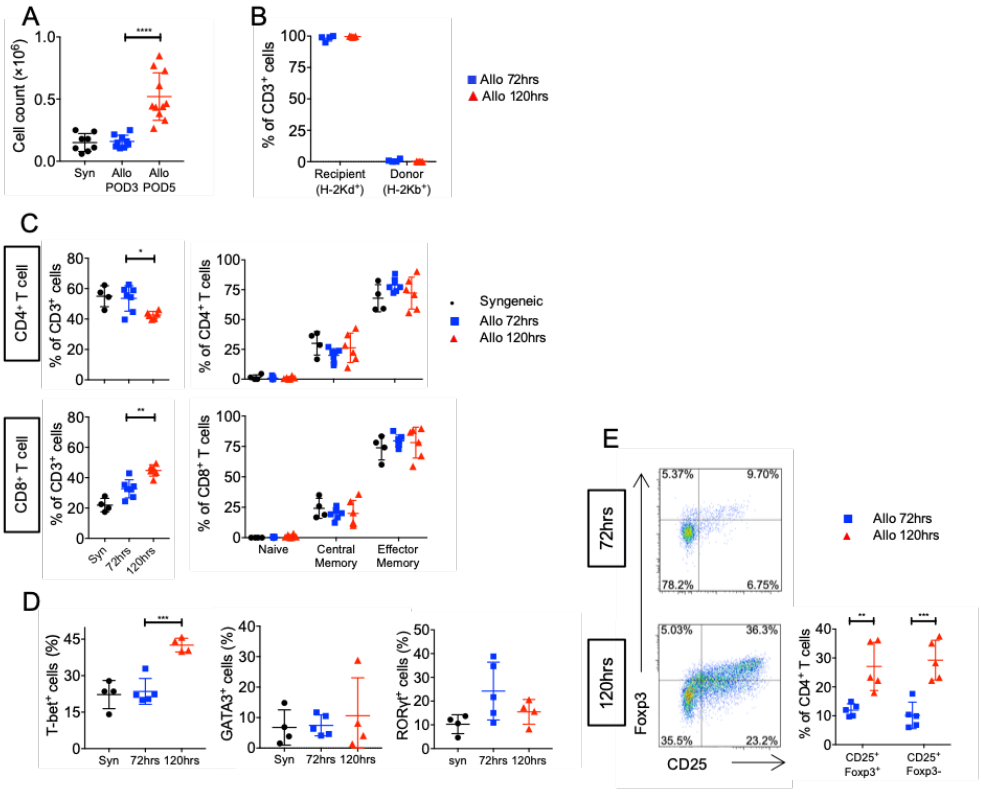


図3 早期移植片浸潤リンパ球のpopulation解析

心移植片を移植後72時間および120時間に摘出し、コラゲナーゼ処理、比重遠心で単核球を摘出、フローサイトメトリーでpopulation解析を行った。

(A) 抽出された単核球数
(B) $CD3^+$細胞のMHC class I発現
(C) CD4/CD8陽性T細胞の比率および、それぞれのNaïve/Memory population
(D) $CD4^+$ helper T(Th)細胞のkey transcription factorであるT-betv(Th1), GATA3 (Th2), RORγt (Th17)の発現
(E) CD25, Foxp3発現レベル

各実験ではそれぞれ少なくとも4回の独立した実験を施行した。統計学的有意差はStudent's t-testで施行、$p<0.05$を有意差ありと判定した。
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001,****p<0.0001

120 時間とで差を認めなかった (図 3E)。そのため、移植後 120 時間での $CD4^+CD25^+Foxp3^+$T 細胞の増加は、レシピエントの免疫応答がグラフト保護的に作用しているというよりは、免疫応答全体の活性化に伴う増加と考えられた。以上の結果から、移植後 72 時間と 120 時間とでは $CD4^+$ T 細胞の Th1 への活性化に差があることが示唆されたが、population でその差を見出すのは困難で あった。

2. GILs は移植後 72 時間から 120 時間の間で活性化される

実験 1 の結果からは、移植後 72 時間ではリンパ球が活性化されておらず、120 時間では活性化されている可能性が示唆された。実際、CD25 の活性化は $CD4^+$ T 細胞のみならず $CD8^+$T 細胞にも認めた (図 4A)。そこで、$CD4^+$、$CD8^+$ T 細胞両者の活性化マーカーとして

知られている CD69 (Cibrian and Sanchez-Madrid, 2017), T-bet (Pritchard et al., 2019)の活性化をフローサイトメトリーで解析した。移植後 72 時間では CD69, T-bet 両者の活性化は異系同系で有意差を認めなかったが、移植後 120 時間では CD69 陽性、T-bet 陽性細胞ともに有意な増加を認めた (図 4A)。これらの活性化マーカー陽性細胞のうち、T 細胞受容体 (TCR)刺激により活性化された population の有無を調べるため、Nur77 の発現を解析した。Nur77 は詳細な機能が明らかとなっていない orphan transcription factor の一つであり、TCR 刺激によりその発現が上昇することが知られている (Ashouri and Weiss, 2017; Au-Yeung et al., 2014; Moran et al., 2011)。この Nur77 は 120 時間の GILsのうち CD69⁺Tbet⁺で特異的に発現が亢進しており、同集団が TCR 刺激により活性化されたものであることが示唆された (図 4B)。CD69⁺Tbet⁺ 細胞集団は移植後 120 時間で有意な増加を認めた一方、移植後 72 時間では異系同系ともにわずかな出現に留まり、移植後 120 時間の移植片には TCR 刺激を受け活性化されたリンパ球が浸潤して

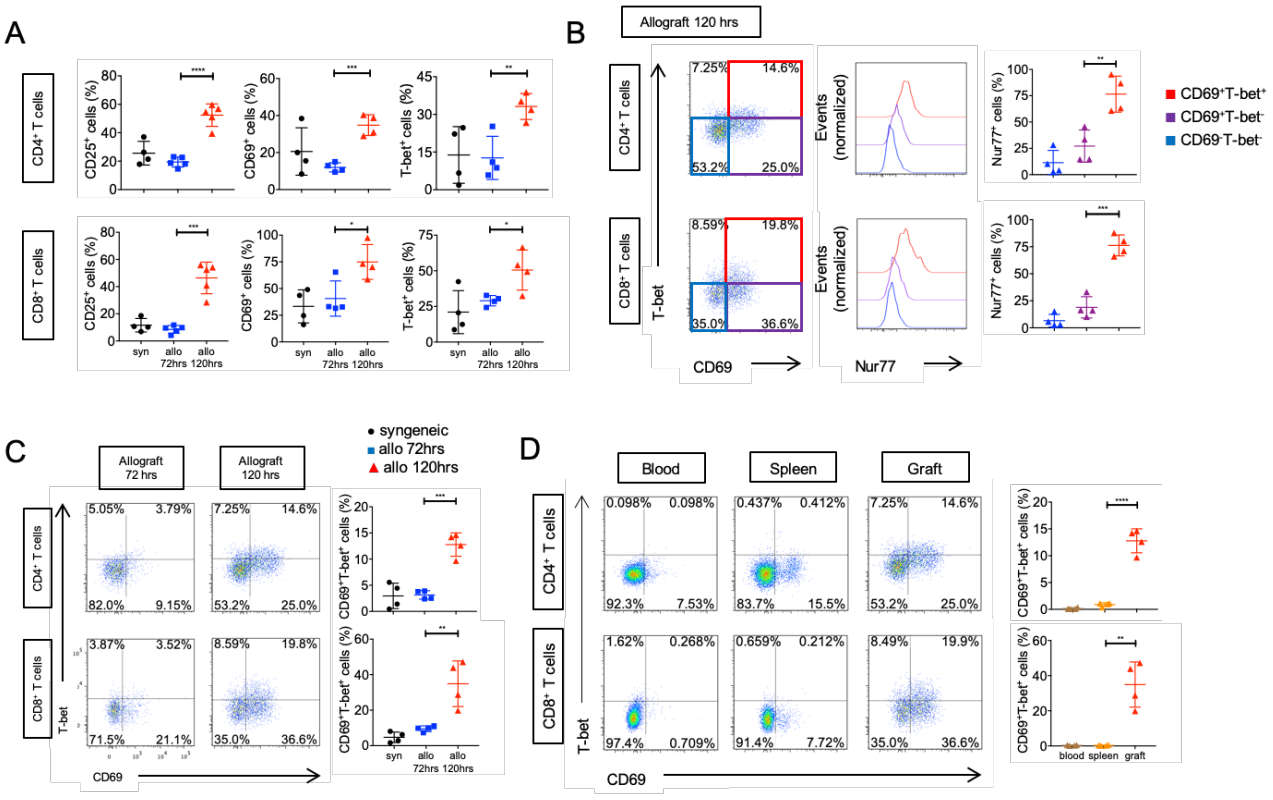


図4 早期移植片浸潤リンパ球の活性化ステータス

同系(黒丸)、72時間(青四角)、120時間(赤三角)のGILsの活性化ステータスをフローサイトメトリーで解析した

(A) CD4⁺T細胞(上段)、 CD8⁺T細胞(下段)のCD25, CD69およびT-betの発現

(B) CD69, T-bet発現レベルによるNur77発現の違い

(C) CD69⁺T-bet⁺T細胞の割合

(D) 移植後120時間での各臓器のリンパ球のCD69, T-betの活性化ステータス

各実験ではそれぞれ少なくとも4回の独立した実験を施行した。統計学的有意差はStudent's t-testで施行、p<0.05を有意差ありと判定した。

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001,****p<0.0001

いるのに対し、72 時間の時点では TCR 刺激による活性化リンパ球が移植片に浸潤していない可能性が示唆された (図 4C)。また、同個体の血液および脾臓細胞の CD69、T-bet 活性は移植片と比較し低値であり、活性化されたリンパ球は移植片に局在していると考えられた (図 4D)。続いて、CD8⁺リンパ球の細胞傷害性サイトカインである IFN-γ、TNF-α、Perforin、Granzyme B の産生を検討したところ、120 時間の GILs で IFN-γ、Perforin、Granzyme B の産生が 72 時間とくらべ有意に増加しており、細胞傷害性 CD8⁺ T 細胞の存在が示唆された (図 5A)。この細胞傷害性サイトカインの産生は、移植片特異的な現象であった (図 5B)。一方で、最終分化した細胞傷害性 CD8⁺T 細胞のマーカーである KLRG1 の発現は 72 時間、120 時間で同様であり (図 5C)、移植後 120 時間では移植片局所での炎症反応は認めるものの、浸潤するリンパ球は最終分化していないと考えられた。

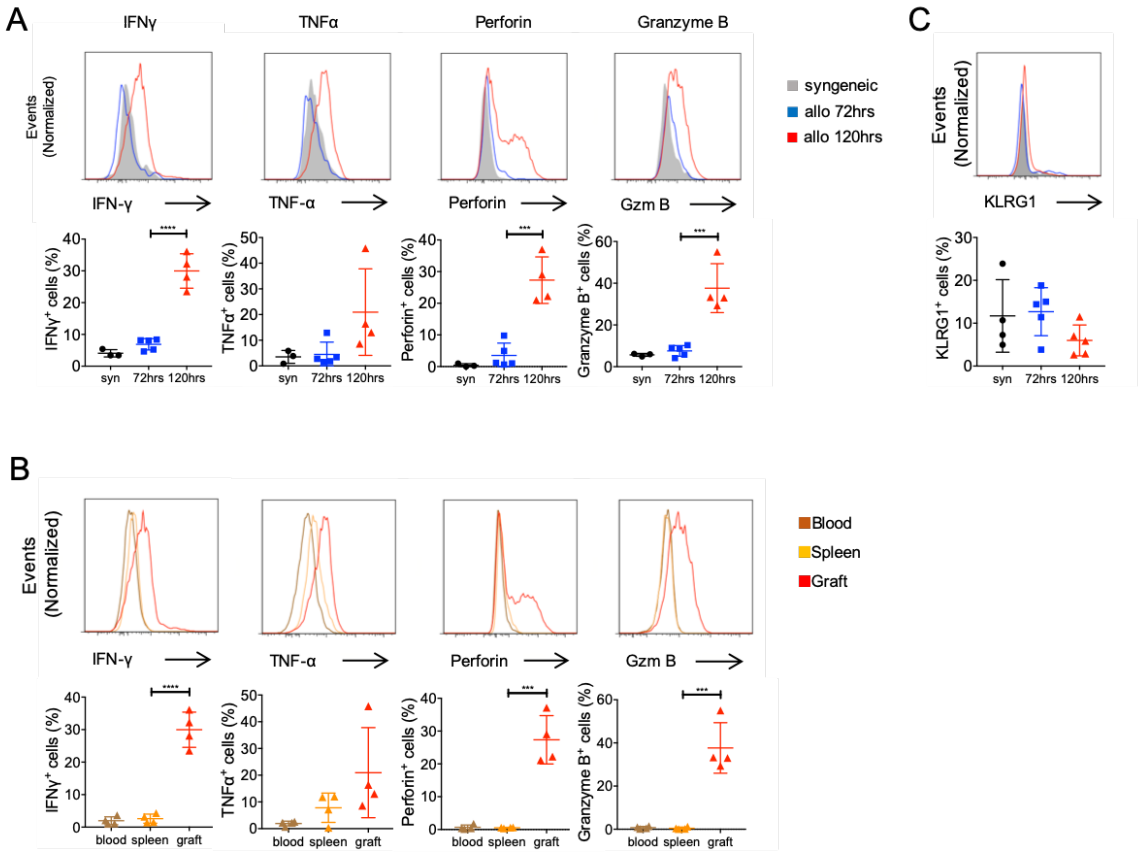


図5 早期移植片浸潤CD8⁺リンパ球の細胞傷害活性

採取し、精製したリンパ球にMonensinを混合し、2時間静置(5% CO2, 37℃)。その後細胞内の細胞傷害性サイトカイン産生をフローサイトメトリーで解析した

(A) 同系(黒), 72時間(青), 120時間(赤)のGILsの細胞傷害性サイトカイン産生量

(B) 移植後120時間のマウスの各臓器での細胞障害性サイトカイン産生量

(C) GILsのKLRG発現量

各実験ではそれぞれ少なくとも3回の独立した実験を施行した。統計学的有意差はStudent's t-testで施行、$p<0.05$を有意差ありと判定した。

$p<0.001$,*$p<0.0001$

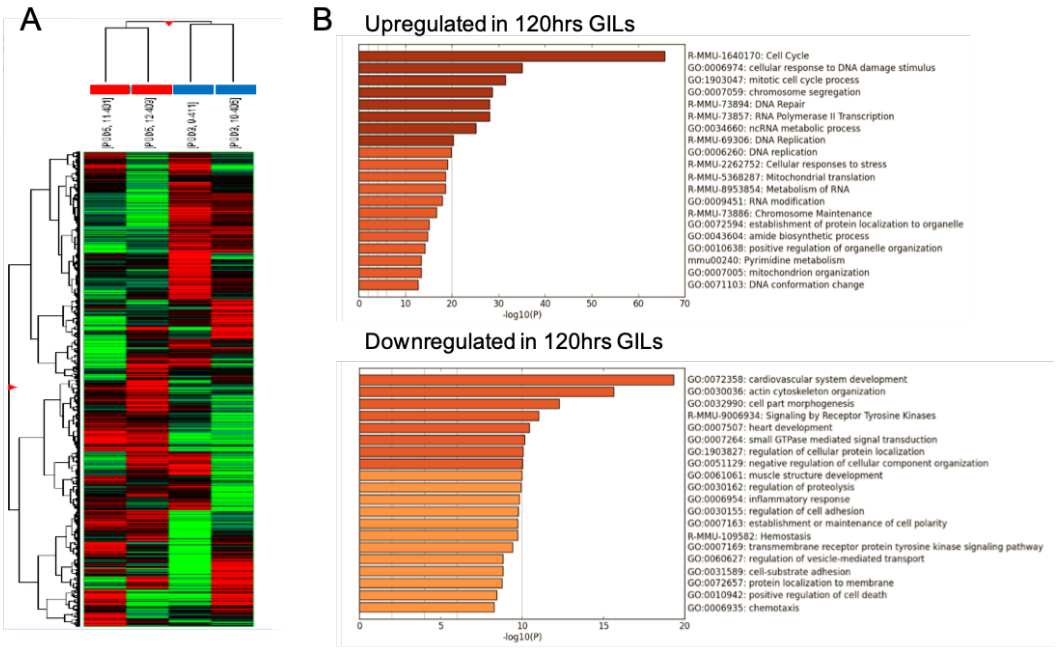


図6 早期移植片浸潤リンパ球のmicroarray解析
移植片から採取した単核球から、cell sorter(FACS aria III)でCD3⁺細胞を単離、そのまま同細胞からmRNAを抽出しmicroarray解析を施行した
(A) 階層的クラスタリング結果。72時間: 青, 120時間 :赤
(B) GO termsによるエンリッチメント解析結果

さらに、リンパ球の活性化状態を詳細に調べるために、リンパ球の遺伝子発現の解析を試みた。すなわち、移植片浸潤単核球から cell sorter を用い CD3 陽性細胞を単離し、同細胞から mRNA を抽出、microarray 解析を行った。1 検体から単離できたリンパ球は $1.0 \pm 0.2 \times 10^4$ 個 (n=11)と極小数であった。階層的クラスタリングで移植後 72 時間と 120 時間で層別化された (図 6A)。エンリッチメント解析の結果、組織修復、細胞周期、エネルギー代謝に関する項目を中心に 2 群間で有意差を認め、120 時間の GILs の活性化傾向を反映しているものと考えられたが、免疫学的機能に関する項目では有意差を認めなかった (図 6B)。この結果は、これまでのフローサイトメトリーの結果から、リンパ球が非常に雑多な集団であり、検体全体の活性化傾向を解析する qPCR および microarray を行うには解析する細胞の純度が低く、一定の傾向を持つ集団として解析を行うことができなかったためと考えられた。上記の問題に対する解決策として single cell RNAseq (Papalexi and Satija, 2018)が考慮されたが、費用の問題から断念した。以上の結果から、移植後 120 時間の GILs では TCR 刺激から活性化されたリンパ球が移植片に浸潤している可能性が強く示唆されたが、72 時間の GILs は異系・同系で活性化に有意差がなく、活性化に乏しい集団であると考えられた。

3. リンパ球の抗原特異的な免疫応答は免疫不全マウスに再構築される

これまでの実験で、移植後 72 時間の GILs と 120 時間の GILs とで活性化状態が異なることが明らかになったが、これらの GILs のドナー抗原に対しての免疫応答性については不明であった。さらに、この移植後 72 時間と 120 時間の GILs が同一の集団であり、活性化により細胞傷害性が獲得されるのか、それとも 72 時間から 120 時間の間に細胞傷害性を有するリンパ球が新たに浸潤してくるのか、明らかではなかった。これらの疑問を解明するには機能解析が必要と考えられたが、得られる細胞数が非常に少数であるため、直接機能解析を行うのは困難であった。そこで、ヒト化マウスモデル (De La Rochere et al., 2018; Kenney et al., 2016; Shultz et al., 2012)を参考にし、免疫不全マウスへのリンパ球の免疫の再構築を試みた。すなわち、リンパ球を有しない免疫不全マウスにリンパ球を投与することで、投与されたリンパ球が投与されたマウス内で定着し、免疫系が再構築されると仮説した (図 7A)。

まず、予備実験として移植を受け 60 日以上経過した BALB/c マウス (Stimulated 群)および移植を受けていないマウス (Naive 群)の脾臓細胞を $5x10^5$ 個ずつ、免疫不全マウス(BALB/c $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$: BRG マウス)に腹腔内投与し、再構築の有無を調べた。投与 1 週後から週 1 回、尾静脈から血液を採取し、フローサイトメトリーにて血中の $CD3^+$細胞の割合を測定したところ、移植後 2 週目から $CD3^+$細胞の出現を認め、経時的に増加、9 週目でプラトーに達した (図 7B)。10 週目に同マウスの脾臓細胞でのリンパ球の population を解析したところ、脾臓でも良好なリンパ球の再構築を認め (図 7C)、腹腔内投与によるリンパ球の再構築が可能であることを確認した。また、脾臓に再構築されたリンパ球の CD4/8 比は Naïve, Stimulate 両群で有意差を認めなかった (図 7D)。また、再構築されたリンパ球はほぼ全てが CD44 陽性の memory phenotype であったが、両群で再構築の傾向に有意差は認めなかった (図 7D)。BRG マウス再構築後に採取できた脾臓細胞の細胞数は $2x10^6$ 個を超えており、機能解析 可能と考えられた。In vitro 解析として IFN-γ ELISpot を施行。移植後 BALB/c マウスの 脾細胞を再構築した BRG マウス(Stimulated 群)で、有意差はないがドナー抗原特異的な IFN-γ 産生を認めた (図 7E)。更にこの再構築したマウスに対しマウス心移植を施行、Stimulated 群でドナー抗原と同一系統の移植片の拒絶を認めた (図 7F)。一方、Naïve 群のリンパ球を投与し再構築したマウスでは、ELISpot 解析でのドナー特異的な IFN-γ 産生、心移植でのドナー抗原への拒絶反応のいずれも認めなかった (図 7E, F)。なお、リンパ球を再構築していない BRG マウスにドナー心移植を行うと、移植片は拒絶されなかった。以上の結果から、リンパ球の BRG マウスへの移入により同マウスにリンパ球が定着し、ドナー抗原に感作されたことのあるリンパ球がドナー抗原に対する免疫応答を示したと考えられた。すなわち、抗原特異性を有するリンパ球の免疫応答性が同マウスに再構築され、リンパ球の抗原特異性の解析が可能なモデルと考えられた。

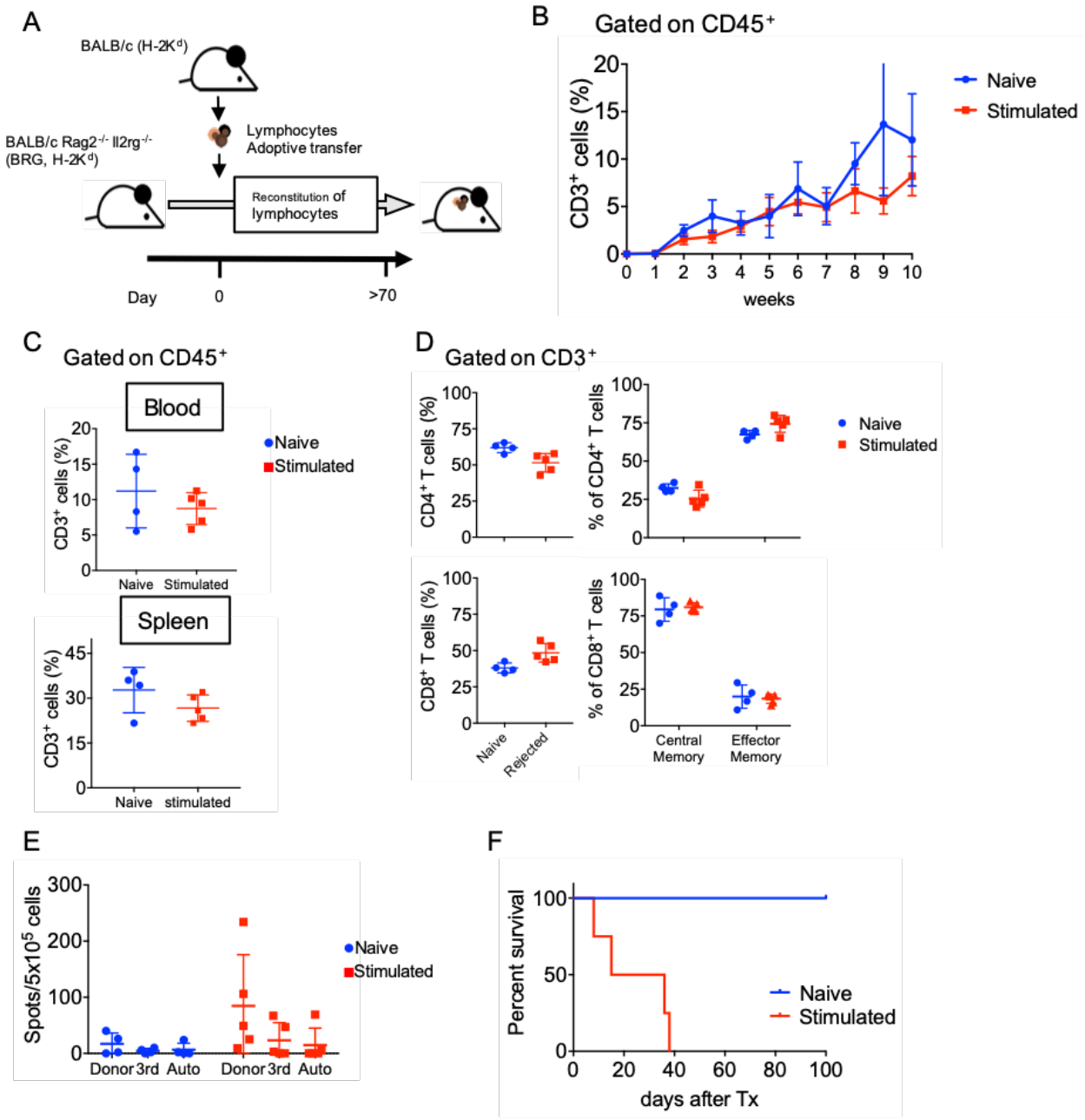


図7 脾臓細胞のBRGマウスへの再構築

B6マウス心移植を受け、拒絶後60日以上経過したマウス(Stimulated群)と移植を受けていないマウス(Naïve群)の脾臓細胞を免疫不全マウス(Balb/c Rag2-/-γc-/- : BRGマウス)へ腹腔内投与し、リンパ球のBRGマウスへの再構築の有無を調べた

(A) 実験の概要
(B) 尾静脈から採取した末梢血中のCD3$^+$細胞の再構築率
(C) 投与10週後での末梢血中および脾臓細胞中のCD3$^+$細胞の再構築率
(D) 脾臓細胞でのCD3$^+$細胞のpopulation
(E) IFNγ-ELISPOT解析結果。リンパ球投与10週後のBRGマウスの脾臓細胞を用いてIFNγ ELISPOT解析を施行した。
(F) 投与10週目のBRGマウスにB6心移植を施行した。心移植片の生存期間

各実験ではそれぞれ少なくとも2回の独立した実験を施行した。統計学的有意差はStudent's t-testで判定、$p<0.05$を有意差ありと判定した(各実験で両者に有意差は認めなかった)

4. BRG マウスに再構築させた GILsは、異なる免疫学的応答を示す

上記の腹腔内投与モデルを用い、移植後 72 時間の GILs と 120 時間の GILs の免疫系を再構築することにした。すなわち、単離した GILs を BRG に腹腔内投与し、再構築を試みた (図 8A)。腹腔内投与後、1 週間毎にマウス末梢血中の $CD3^+$細胞の再構築率を確認したが、再構築率は良好であった (図 8B)。腹腔内投与時の自然免疫系細胞の混入を避けるために、cell sorter で sort した $CD3^+$細胞のみの再構築も試みたが、$CD3^+$細胞のみの投与では投与後 4 週目で再構築が得られなかった (data not shown)。再構築がプラトーに達すると考えられる投与 10 週目に再構築後の population 解析および機能解析を施行した。BRG マウスの脾臓細胞における GILs の再構築率は、移植後 72 時間と 120 時間とで有意差を認めなかった (図 8C、左 2 群, p=0.23)。CD4/CD8 の比率に関しては、移植後 120 時間の GILsで $CD8^+$T 細胞優位の再構築を認めた。この CD4/8 比の差は腹腔内投与時の細胞数が両者で異なる (図 3A)ことに起因すると考えられたため、120 時間の GILsの腹腔内に投与する細胞数を 72 時間の GILsの投与細胞数と同数に減量して投与し再構築を試みた (減量投与群)。その結果、減量投与群の CD4/CD8 比は 72 時間と同様であり (図 8C)、$CD8^+$T 細胞の BRG マウスでの再構築率は腹腔内投与時の細胞数に依存すると考えられた (図 8C)。再構築された T 細胞はほぼ全てが CD44 陽性の memory phenotype であり (図 8D)、$CD4^+CD25^+Foxp3^+$制御性 T 細胞の再構築も確認された (図 8D)。移植後 120 時間の GILs で $CD8^+$ T 細胞での central memory T 細胞の増加を認めたが、120 時間 GILs を減量して再構築した群 (120h GILs-reduced)では 72 時間と同様の $CD8^+$ central memory の割合を示し (図 8D)、BRG マウスへの腹腔内投与時の細胞数が再構築する細胞集団の割合に影響していると考えられた。

BRG マウスに再構築後はいずれの GILs も機能解析を実施可能な細胞数が回収されたため、IFN-γ ELISpot 解析によるドナー抗原に対する反応性を観察した。移植後 120 時間の GILs を再構築した BRG マウスから回収したリンパ球は、非常に強いドナー抗原特異的な IFN-γ 産生を認めた一方、72 時間の GILs のドナー抗原に対する IFN-γ 産生は微弱で、3rd party 抗原、auto 抗原に対する反応との間に有意差を認めなかった (図 9A)。更に、GILs を再構築させた BRG マウスに対しドナー抗原と同一系統のマウスの心移植片を移植し、拒絶反応の有無を解析した。その結果、移植後 120 時間の GILs を再構築した BRG マウスは心移植片を速やかに拒絶した (図 9B、Mean Survival Time; MST 5.83 日、n=6)。一方、移植後 72 時間の GILs を再構築した BRG マウスでは移植片は拒絶されなかった (MST>100 日、n=5)。72 時間の GILs を再構築した BRG マウスは移植後 100 日目に解剖したが、その際に心拍動を直視で確認した。移植片の病理組織学的検討では、移植片の心筋構造は保たれており、EvG 染色で動脈内腔の軽度肥厚と周囲組織の線維化を認めた。また、CD3 陽性リンパ球の心筋内への浸潤を認めた (図 9C)。移植後

120 時間の GILs で認めた非常に強い抗原特異的な免疫応答は、再構築に用いる GILs を減量した群でも同様であり (図 9A, B)、腹腔内投与時の細胞数は再構築後の免疫応答の強さに影響を与えないと考えられた。以上より、移植後 72 時間の GILs の抗原特異的な免疫応答が生じない、または微弱である理由は再構築に用いた細胞数が少ないためではないと考えられた。

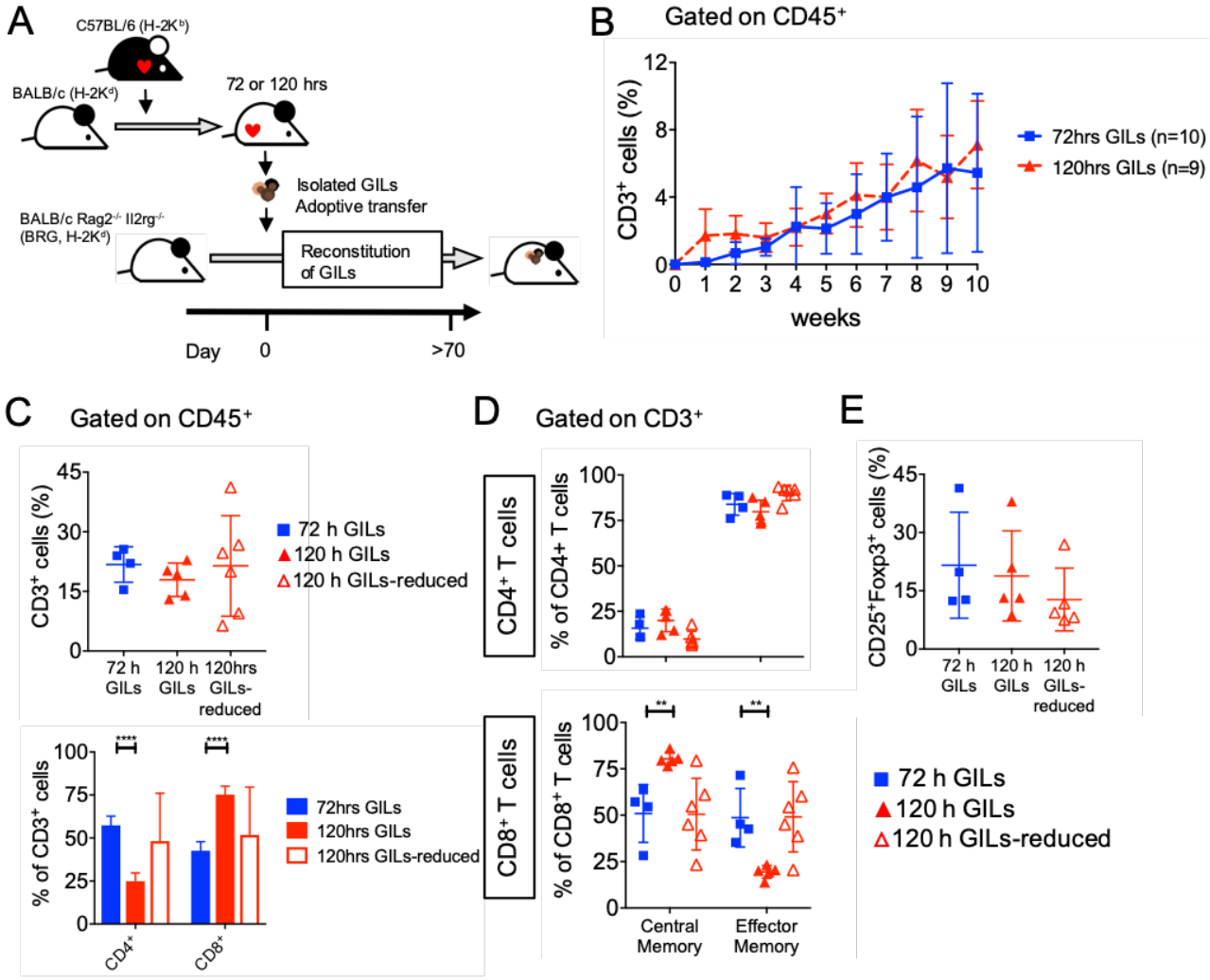


図8 GILsはBRGマウスへ良好に再構築される

B6マウス心移植片を移植後72時間および120時間で摘出し単核球を精製、免疫不全マウス (BALB/c Rag2$^{-/-}$γc$^{-/-}$: BRGマウス)へ腹腔内投与した。120 h GILs-reduced: 120h GILsを72 h GILsと同数に減量して腹腔内投与した群

(A) 実験の概要

(B) 尾静脈から採取した末梢血中のCD3$^+$細胞の再構築率

(C) 投与10週後での脾臓細胞中のCD3$^+$細胞の再構築率、CD3$^+$細胞中のCD4/8比

(D) 脾臓細胞でのCD3$^+$細胞のCD44, CD62L発現。CD44^{hi}CD62L^{hi}: Central memory, CD44^{hi}CD62L^{lo}: Effector Memory

(E) 脾臓内CD4$^+$ T細胞中のCD25, Foxp3発現

各実験ではそれぞれ2回の独立した実験を施行した。統計学的有意差はStudent's t-testで施行、$p<0.05$を有意差ありと判定した。**$p<0.01$, ****$p<0.0001$.

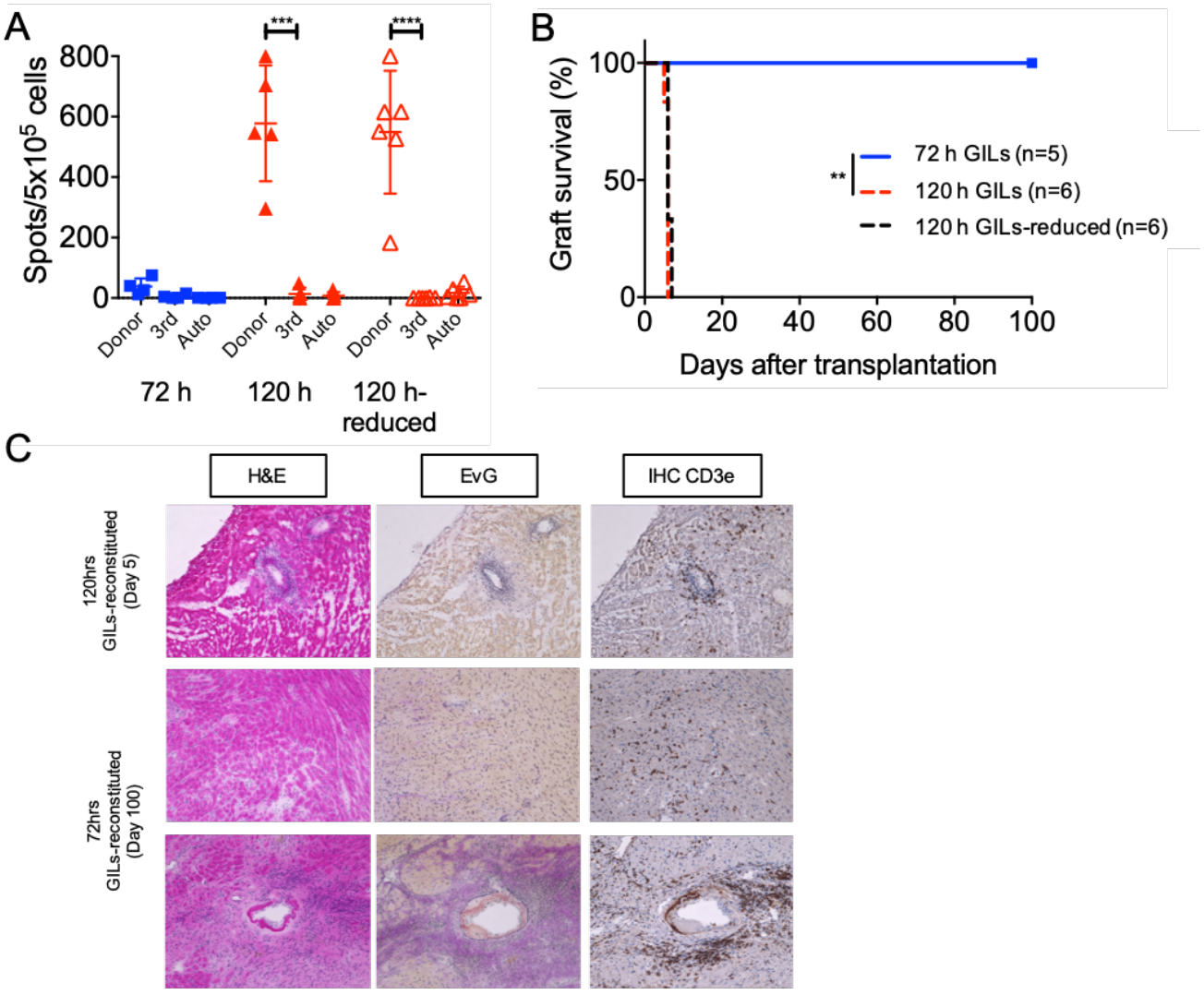


図9 120時間のGILsを構築されたBRGマウスはアロ抗原特異的な免疫応答性を示すが、72時間のGILsはアロ抗原に強い反応性を示さない

移植後72時間および120時間のGILsを再構築したBRGマウスで機能解析を施行した

(A) IFNγ ELISPOT解析。BRGマウスから採取した脾臓細胞5x10^{5}個を放射線照射した Donor(C57BL/6), 3rd(C3H), Auto(BALB/c)の脾臓細胞と共培養、24時間後のIFNγ産生をELISPOT解析で評価した。

(B) マウス心移植結果。投与10週目のBRGマウスにC57BL/6心移植を施行した。

(C) 拒絶時(120時間)あるいは移植後100日目(72時間)に心移植片を摘出し、病理組織学的解析を施行した。

各実験ではそれぞれ2回の独立した実験を施行した。ELISPOT解析の統計学的有意差はStudent's t-testで、心移植片の生存期間はLog-rank testでそれぞれ判定し、$p<0.05$を有意差ありとした。
**$p<0.01$, ***$p<0.001$.

さらに、同マウスの脾臓細胞を用いて population 解析および ELISpot 解析を施行し、移植前の再構築状態と比較した。その結果、$CD3^+$T 細胞の再構築率、CD4/8 比率は移植の前後で同じであった (図 10A)。CD4、CD8 それぞれの memory phenotype の分布も大きな変化を認めず(図 10B)、$CD4^+CD25^+Foxp3^+$制御性 T 細胞の割合も移植の前後で同様であった (図 10B)。更に、IFN-γ ELISpot 解析でも、ドナー抗原に対する微弱な IFN-γ 産生は移植の前後で同様であり (図 10C)、再構築されたリンパ球の活性がドナー抗原への暴露の影響で変化していないと考えられた。

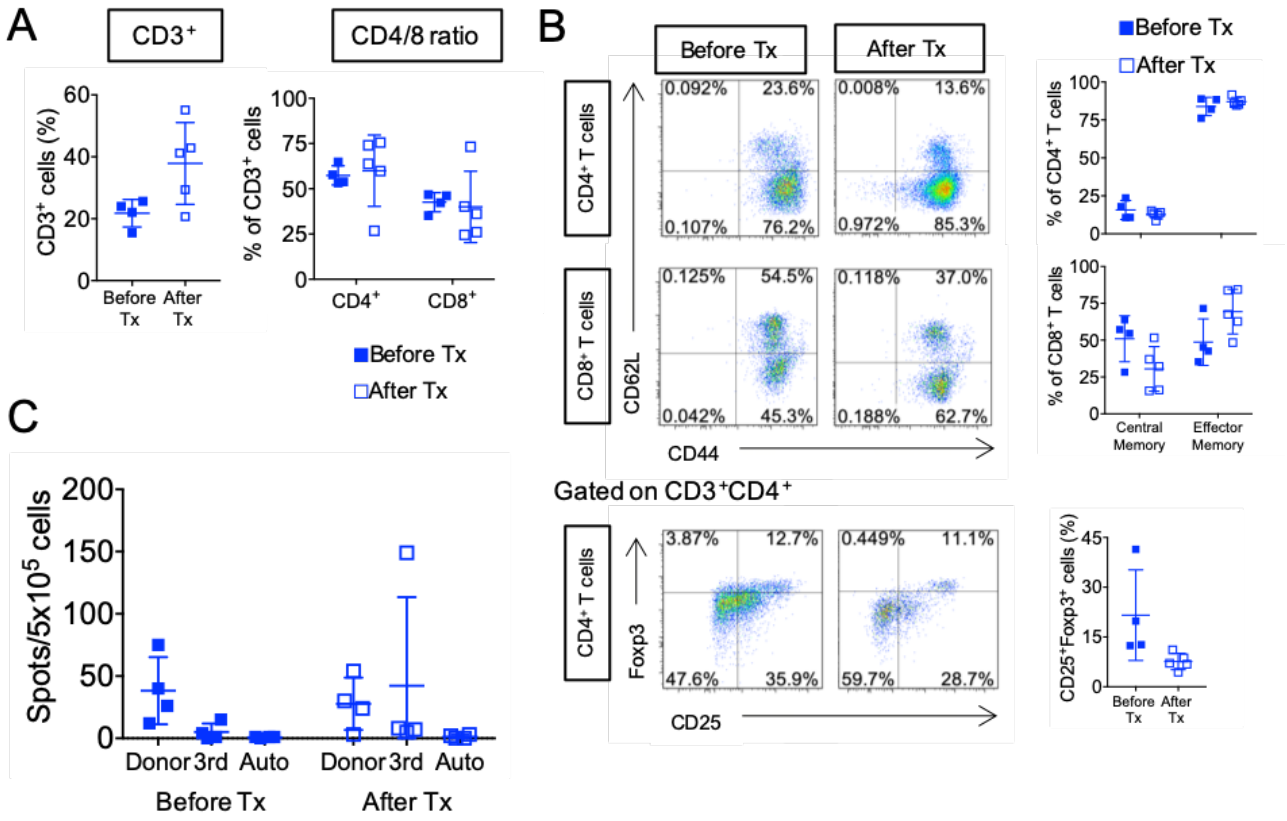


図10 72時間のGILsは心移植による抗原への暴露後もpopulationや反応性は変化しない
移植後72時間のGILsを再構築したBRGマウスへの心移植の前後での脾臓細胞のpopulationおよびIFNγ ELISPOTでの反応性を解析した
(A) 脾臓細胞中の$CD3^+$細胞の再構築率、$CD3^+$細胞中のCD4/8比
(B) 脾臓細胞での$CD3^+$細胞のCD44, CD62Lおよび$CD4^+$T細胞中のCD25, Foxp3発現。
$CD44^{hi}CD62L^{hi}$: Central memory, $CD44^{hi}CD62L^{lo}$: Effector Memory
(C) IFNγ ELISPOT解析結果。BRGマウスから採取した脾臓細胞$5x10^5$個を放射線照射したDonor(C57BL/6), 3rd(C3H), Auto(BALB/c)の脾臓細胞と共培養、24時間後のIFNγ産生をELISPOT解析で評価した
各実験ではそれぞれ2回の独立した実験を施行した。統計学的有意差はStudent's t-testで判定し、$p<0.05$を有意差ありとした (各実験で両者に有意差は認めなかった)

5. 移植後 72 時間の GILs は微小環境を維持しても抗原特異的な活性を示さない

前項で、移植後 120 時間の GILs が BRG マウスへの再構築後に急速な免疫応答を示す一方で、72 時間の GILs が BRG マウスへの再構築後にドナー抗原に対し微弱な反応しか示さないことが明らかとなった。しかし、移植片から GILs を抽出する過程で、リンパ球の活性を変化させている可能性が排除できなかった。すなわち、コラゲナーゼへの暴露や比重遠心が GILsの免疫学的活性に影響を与える可能性や (Rissiek et al., 2014; Stark. et al., 2018)、抗原を除去し細胞間相互作用を中断させることによるドナー抗原への応答性減弱の可能性 (Hugues et al., 2004; Katzman et al., 2010; Miskov-Zivanov et al., 2013)に配慮する必要があると考えた。そこで、免疫細胞の微小環境をできるだけ維持したまま BRG マウスへ GILs を移入する方法として、心再移植モデルを考案した(図 11A)。本モデルでは、まず初回の心移植を行い、移植後の任意のある時点で移植片をレシピエントから摘出する。摘出した移植片は、そのまま BRG マウスの腹腔内に再度移植した。同モデルでは移植片が移植後の炎症反応により組織が硬化、脆弱化しており、BRG マウス自体の脆弱性も併せて技術的に非常に困難な手技であった。移植後 72 時間の移植片の再移植の成功率は最終的に 80%程度となったが、120 時間の移植片の再移植は更に困難であり、成功例は得られなかった。また、仮に成功したとしても、移植片自体の損傷がかなり強い状態での移植であり、移植後の拍動停止の原因が免疫学的要因のみに限定できないと考え、最終的に 120 時間の移植片の再移植は実験系として不適切と判断した。

移植後 72 時間の移植片は、再移植後、拒絶されることなく拍動を続けた (図 11B, MST>100, n=6)。マウスは移植後 100 日目に解剖され、心拍動を確認した。病理組織学的に移植片の心筋構造は保持されていることと、血管内皮の肥厚と周囲の線維化が確認された (図 11C)。また、免疫組織化学染色により移植片への CD3 陽性細胞の浸潤を認めた。再移植後の BRG マウス脾臓内には GILs が再構築されており、CD4/CD8 はほぼ同数の再構築率であり、CD4 が effector memory 優位、CD8 が central memory 優位と、移植後 72 時間の GILs の再構築の時と同様の傾向を認めた(図 11D)。ELISpot 解析ではドナーと 3rd party で微弱な IFN-γ 産生を認め、Auto とは有意差を 認めたが、Donor, 3rd 間で IFN-γ 産生はほぼ同等であった(図 11E)。以上から、72 時間の GILs は、抗原に持続的に暴露された状態でも十分な反応性を示さず、抗原特異的な免疫応答性を有していないと考えられた。

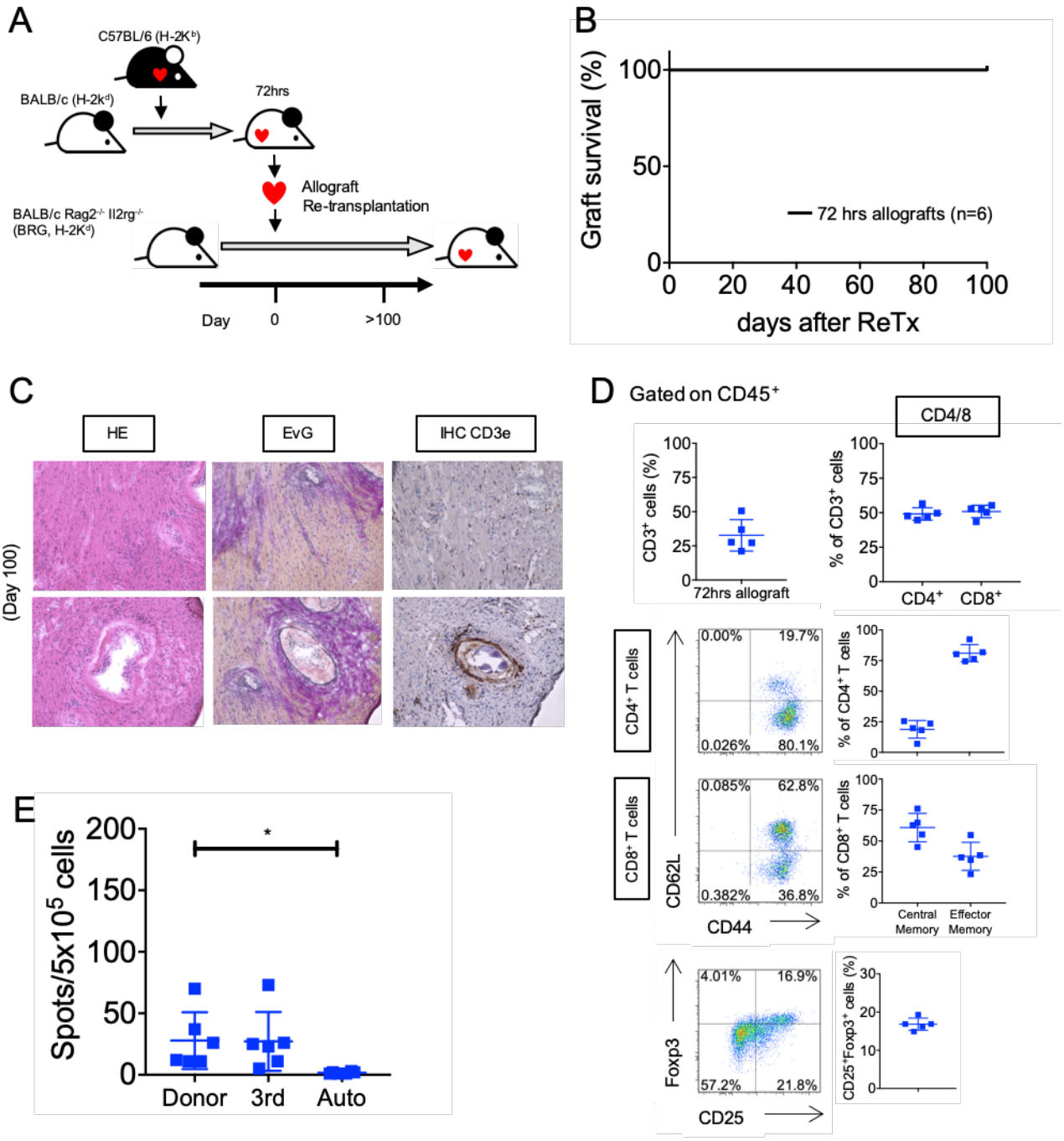


図11 移植後72時間の心移植片はBRGマウスへ再移植すると拒絶されずに長期間心拍動を維持する

BALB/cマウス移植後72時間のC57BL/6心移植片を1stレシピエントから摘出し、BRGマウスへと再移植し、拒絶反応の有無を解析した

(A) 実験の概要
(B) 移植片の生着期間
(C) 再移植後100日目の心移植片の病理組織学的所見
(D) 再移植後100日目のBRGマウスの脾臓細胞のリンパ球の再構築率とpopulation
(E) IFNγ ELSIPOT解析結果

各実験ではそれぞれ2回の独立した実験を施行した。ELISPOT解析の統計学的有意差はStudent's t-testで判定し、$p<0.05$を有意差ありとした。*$p<0.05$

考 察

臓器移植後のレシピエントにおいて、リンパ球が抗原特異的な攻撃性を有するかどうかは、免疫抑制剤の適切な使用において重要な問題である。すなわち、抗原特異性を有するリンパ球は急性拒絶反応を惹起するために免疫抑制治療が必要である一方、抗原特異性を有しないリンパ球に対しての免疫抑制治療は必須ではない。そのため、移植後早期におけるドナー抗原特異的なリンパ球がいつ出現するかは、適切な免疫抑制剤の開始時期の決定に重要である。ドナー抗原特異的な免疫応答は T 細胞受容体を介した抗原提示と共刺激とによる活性化・成熟を必要とし (Ford, 2016)、移植直後の GILs は抗原特異的でないと考えられるが、移植後早期に移植片に浸潤する T 細胞の免疫学的活性がどのように変化するかについてはこれまで明らかではなかった。本研究では、マウス心移植系を用いて早期 GILs の免疫機能、とりわけ抗原特異的な反応性の有無について解析を行った。その結果、移植後 120 時間の GILs は T-bet, Nur77 といった活性化マーカーの発現上昇を認め、細胞傷害性サイトカイン (IFN-γ, Perforin, Granzyme B)の産生増加を伴った活性化された集団であった。さらに、BRG マウスに再構築された移植後 120 時間の GILs はドナー抗原に対し強力な抗原特異的な免疫応答を示し、同細胞が抗原特異的に活性化された集団であることが示された。一方、移植後 72 時間の GILs は多くがレシピエント由来の memory T 細胞であったが、活性化に乏しい状態であり、BRG マウスへの再構築後もドナー抗原特異的な免疫応答は微弱であった。以上から、GILs は移植後 72 時間と 120 時間とで異なる免疫学的活性を有する集団であることが示された。すなわち、移植後 120 時間の GILs はドナー抗原特異的に活性化され、移植片を拒絶する細胞集団であるのに対し、72 時間の GILs は免疫学的な活性化に乏しく、ドナー抗原特異的な免疫応答性に乏しい集団であると考えられた。

T 細胞の活性化を示すマーカーは複数報告されており、T 細胞受容体シグナルの活性化に関わるマーカーもいくつか報告されている。T-bet は、$CD4^+$ Th1 T 細胞の key transcription marker であるのみならず、活性化 $CD8^+$ effector T 細胞のマーカーとしての有用性が報告されており (Pritchard et al., 2019)、Naïve $CD8^+$ T 細胞の抗原提示による活性化、Effector T 細胞への分化において T-bet の発現が重要な役割を果たす (Kallies and Good-Jacobson, 2017)。本実験では早期活性化マーカーの一つである CD69 を発現した細胞の中に、T-bet を強く発現する細胞集団と弱い発現の細胞集団とを認めた。抗原提示を受けた T 細胞は short lived effector T 細胞と memory precursor T 細胞とにそれぞれ分化し (Youngblood et al., 2017)、short lived effector T 細胞で T-bet 発現が上昇する (Joshi et al., 2007)。120 時間で増加を認めた $T\text{-}bet^+$ T 細胞は抗原提示により活性化された short lived effector T 細胞である可能性が示唆された。Nur77 は TCR からのシグナル伝達の下流に存在する転写因子であり、その機能の詳細は明らかに

なっていないが、胸腺細胞の成熟 (Cunningham et al., 2006)に重要とされている。成熟 T 細胞となってからも、TCR 刺激により発現が上昇すると報告され (Ashouri and Weiss, 2017; Au-Yeung et al., 2014)、TCR を介したリンパ球の活性化を反映すると考えられる。本研究でも、$CD69^{+}T\text{-}bet^{+}$ T 細胞で Nur77 の発現亢進を認め、同集団が抗原提示により活性化された population である可能性が強く示唆された。移植後 120 時間で活性化された effector T 細胞が移植片に浸潤していることは細胞傷害性サイトカイン産生の増加からも推測されるが、short lived effector T 細胞のマーカーである KLRG1(Herndler-Brandstetter et al., 2018)の発現は 120 時間でも僅かであり、同集団はまだ最終分化に至っていない集団であるとも考えられた。

直接解析では、移植後 72 時間の GILs と 120 時間の GILs が、活性化において異なる集団であることが強く示唆されたが、抗原特異的な反応性の有無について明らかにすることはできなかった。リンパ球の抗原特異的な反応性の解析には一般的にリンパ球混合反応が行われ、解析する対象により、ELISA, ELISpot, ^{3}H-tymidine uptake, CFSE-MLR, 細胞内サイトカイン産生解析などが選択されるが、いずれの解析も responder に一定の細胞数を必要とし、直接解析により採取する GILs の細胞数では解析困難であった。また、手術により検体を作成するため 1 検体の作成に時間がかかるという実験の性質から複数匹のグラフトを併せて細胞数を確保する方法も非現実的であった。周術期の非特異的な炎症反応により、抗原特異的な免疫応答がマスクされる可能性も、直接採取した細胞の機能解析が困難である要因と考えられた。qPCR による解析も試みたが、少数細胞であることから解析する細胞の純度という問題がクリアできず、microarray では免疫学的な傾向を見出すのが困難であった。シングルセル解析を用いれば純度という問題を解決できる可能性はあった (Higdon et al., 2019; Michael J. T. Stubbington et al., 2017; Papalexi and Satija, 2018)が、実験費が高額となることから現実的ではないと判断した。さらに、マウス脳炎モデルにて、TCR 刺激により活性化、クローン増殖した effector $CD8^{+}$ T 細胞の攻撃対象が自己の病原体特異的な $CD4^{+}$ T 細胞であったとの報告 (Saligrama et al., 2019)からは、リンパ球のクローン増殖が必ずしもドナー抗原に対する反応性と相関せず、TCR 多型だけではドナー抗原特異性の判断は困難であることが示唆され、リンパ球混合反応や *in vivo* 解析が依然として重要であることを示している。そこで、我々は、この GILs の免疫系を、リンパ球を持たないマウスに移入し、免疫系を再構築することを試みた。近年はマウスの進歩により良好なリンパ球の再構築が得られるようになり (Kenney et al., 2016; Shultz et al., 2012)、ごく少数のリンパ球でも再構築が可能である。BRG マウスは BALB/c をバックグラウンドとする、リンパ系の免疫細胞を有さない重度免疫不全マウスである(Song et al., 2010)。ヒトリンパ球を移入して、in vivo での免疫応答を解析するヒト化マウスモデルで広く利用されており (Kenney et al., 2016; Nadig et al., 2010; Zaitsu et al., 2017)、少数の細胞の移入でも免疫応答の観察が可能である。本研究でも少数の

脾臓細胞および GILs を BRG マウスへ再構築させることが可能であり、ヒト化マウス同様、*in vivo*, *in vitro* 解析が可能であった。

少数のリンパ球が BRG マウスに移入すると、homeostatic proliferation を呼ばれる、抗原への暴露を必要としない過程でリンパ球が再構築される。リンパ球は IL-7 および IL-15 依存性に増殖を繰り返す (Jason T. White et al., 2015; White et al., 2017)。本研究でも GILs は移入後徐々に増加していき、血液中および脾臓にリンパ球が再構築された。再構築されたリンパ球は $CD8^+$ T 細胞の再構築率、とりわけ $CD44^+CD62L^+$ central memory T 細胞の再構築率に差を認めたが、homeostatic proliferation では、増殖開始時の細胞密度により増殖後の CD62L 陽性の割合が変化する (Badovinac et al., 2007; Polonsky et al., 2018)ため、移入に用いた細胞数の違いによって再構築率の差が生じたと考えられた。しかし、120 時間の GILs では、移入する細胞数とそれによる再構築後の central memory $CD8^+$ T cell の比率の差に関わらず、ドナー抗原に対する非常に強い免疫応答性は同等であったため、$CD8^+$ central memory T 細胞の比率は免疫応答性に影響を与えないと考えられた。また、homeostatic proliferation の過程で免疫応答が変化し、免疫寛容が阻害される可能性が指摘されている (Iida et al., 2013; Moxham et al., 2008; Schietinger et al., 2012; Wu et al., 2004)が、Homeostatic proliferation が収束すると免疫応答性は増殖前の状態に戻る (Miller et al., 2015; Schietinger et al., 2012)とされるため、再構築が完了してから機能解析を行うことで、免疫応答性の修飾を回避できると考えた。文献的には減少した白血球が元の数に戻るのに 90 日程度を要したという報告がある (Schietinger et al., 2012)が、本研究では末梢血中のリンパ球の再構築率が 9 週目以降でプラトーに達したことから、10 週目には homeostatic proliferation が収束すると考え、同週以降に機能解析を施行した。本研究では ELISpot およびマウス心移植にてドナー抗原に対する反応性を検証し、抗原への暴露歴の有無により異なる反応性が観察された。Homeostatic proliferation により再構築されたリンパ球は全てが memory phenotype であり、その抗原特異性は増殖の前後で保存されるとされる (Haluszczak et al., 2009; Jason T. White et al., 2015; White et al., 2017)。そのため、本モデルは memory T 細胞の抗原特異性の有無を解析することが可能であると考えられた。すなわち、再構築されたリンパ球は特異的な抗原に遭遇した場合に強い免疫応答を示す。移植後 72 時間の GILs を再構築した BRG マウスではドナー抗原に対する反応性は非常に微弱であり、同細胞集団はドナー抗原に対する抗原特異性を持たないと考えられた。

また、移植後 72 時間の GILs を再構築した BRG マウスは、ドナー抗原 (C57BL/6 心移植片)を拒絶しなかったが、移植後 100 日目の心移植片には腹腔内投与モデルおよび再移植モデルの双方で動脈内皮の肥厚および周囲組織の線維化を認めた。この所見は慢性拒絶に見られる所見に類似する (Goto et al., 2013a; Zhao et al., 2017)。移植片における慢性拒絶の機序の詳細は明らかになっていないが、マクロファージ (Goto et al.,

2013a; Wang et al., 2017; Wu et al., 2016; Zhao et al., 2017)などの自然免疫細胞による慢性炎症反応が病態生理に関わると考えられている。本実験では ELISpot 解析で ドナー抗原に対する微弱な IFN-γ 産生を認めており、移植片における慢性炎症の存在を 示唆していると考えられた。

本研究では移植後 72 時間の GILs は抗原特異性を持たない細胞と考えられた。炎症反応局所に集簇する、抗原特異性を持たないリンパ球は"Bystander T 細胞"と呼ばれ、近年その機能が注目されている。炎症反応の早期では、memory phenotype の $CD8^+$ T 細胞が炎症部位に速やかに浸潤し、炎症性サイトカインに反応し活性化する (Berg et al., 2003; Soudja et al., 2014; Soudja et al., 2012)。この反応は抗原認識とは関係なく惹起され、さらなる炎症反応の活性化に寄与しうると考えられている (Lauvau et al., 2016)。臓器移植では、移植後 24 時間以内にレシピエント由来の免疫細胞が移植片に浸潤 (Liu et al., 2016; Schenk et al., 2008)、自然免疫系が移植片を非自己と認識し、活性化された炎症反応を維持する (Dai et al., 2017; Oberbarnscheidt et al., 2014; Zecher et al., 2009)。移植後早期のリンパ球はこの自然免疫系により惹起された炎症反応により集簇していると考えられ、これらの "bystander T 細胞" が炎症反応の促進・維持に寄与し、ドナー移植片の拒絶を促進すると報告されている (Ishii et al., 2010; Oberbarnscheidt et al., 2014)。一方、臓器移植後に免疫抑制剤の投与を遅らせた場合に、拒絶反応に対する免疫抑制効果が強化されるという報告 (Dresske et al., 2003; Goto et al., 2013b; You et al., 2012)、移植後 3 日目の心移植片をヌードマウスに再移植すると移植片が拒絶されない (Li et al., 2012)という報告からは、移植後早期に移植片に浸潤しているリンパ球は抗原特異的な攻撃性を持たない可能性が示唆される。さらに、マウス臓器移植モデルでは、早期の移植片浸潤細胞の機能や移植片への浸潤を抑制すると、免疫寛容の誘導が阻害され (Goto et al., 2013b; Krupnick et al., 2014; Liu et al., 2011)、超早期の GILs は移植片保護的な作用を有している可能性もある。これらの知見から、早期移植片浸潤リンパ球には移植片の拒絶に関与する memory T 細胞と、免疫寛容誘導に関わる memory T 細胞とが混在していることが示唆される。他の病態モデルにおいては、bystander T 細胞が病態の悪化 (Kim et al., 2018)、病態進行の抑制 (Christoffersson et al., 2018)のいずれにも寄与しうるとの報告があり、移植免疫においても特定の働きを有する可能性が示唆される。移植片に対する抗原非特異的な memory T 細胞の免疫学的な役割については、今後の解明が期待される。

結　論

1. 本研究全体から得られた知見

・マウス心移植系において、移植後早期浸潤リンパ球は経時的変化により異なる免疫学的活性を示す

・移植後 72 時間の時点での GILs は活性化されておらず、ドナー抗原特異的な攻撃性を有しない細胞集団である可能性が示唆される

・移植後 120 時間の GILs は TCR 刺激により活性化された集団が含まれており、同集団は非常に強いドナー抗原特異的な攻撃性を有する

2. 本研究で得られた知見の意義

移植片に浸潤するリンパ球の免疫学的機能は、臨床的には免疫抑制剤の投与の要否に関わる。すなわち、移植片に浸潤しているリンパ球がドナー抗原特異的な攻撃性を有していない場合、免疫抑制は必須ではなくなる。本研究は、移植片浸潤リンパ球の抗原特異的な攻撃性が移植後 3 日から 5 日の間で獲得されることを明らかにし、移植後超早期の免疫抑制は必須ではない可能性を示した。臓器移植後の免疫抑制剤の開始時期については、明確な結論がまだ出ておらず、本研究で得られた知見は、免疫抑制の適切な開始時期の決定のための根拠の一つとなる。

3. 本研究で得られた知見からどのような研究が展開されうるか

本研究ではマウス心移植系における移植後 72 時間の GILs が抗原非特異的な細胞　集団である可能性を示した。考察で言及したとおり、抗原非特異的なリンパ球も何らかの免疫学的機能を有している可能性があり、今後はこれらの細胞の果たす役割の解明が期待される。特に、これらの細胞集団の浸潤が免疫寛容の誘導に必要である可能性が示唆されており、その機序の解明が今後の課題となる。

4. 今後の課題

本研究は臓器移植における適正な免疫抑制法の確立を目標とした研究の一部である。最終的な目標はヒト臨床臓器移植におけるより簡便かつ効果的な免疫寛容の導入である。本研究は抗原に感作されていない個体での免疫応答の機序を解明したが、ヒトへの応用には抗原感作済みの個体における早期の免疫応答の解析が必要である。抗原感作済みの個体に対しての免疫寛容の導入は未だ達成されておらず、今後の課題の一つとなる。

謝　辞

この場を借りて、指導的な立場で本研究の遂行に多大なる貢献をしていただいた、消化器外科学教室Ⅰ　武冨　紹信　教授および後藤　了一　助教に感謝を申し上げます。

また、本研究において非常に示唆的な議論と助言をくださった、九州大学　澤　新一郎教授、実験動物の繁殖、維持管理をして頂いた動物実験施設の土佐　紀子先生および職員の方々、実験において技術的な補助をしてくださった消化器外科学教室の皆様に感謝を申し上げます

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費(16K19884, 19K18047, 19K22646)の助成を受け行われたものです

利 益 相 反

本研究に開示すべき利益相反状態はない

引 用 文 献

Alegre, M.L., Lakkis, F.G., and Morelli, A.E. (2016). Antigen Presentation in Transplantation. Trends Immunol *37*, 831-843.

Ashouri, J.F., and Weiss, A. (2017). Endogenous Nur77 Is a Specific Indicator of Antigen Receptor Signaling in Human T and B Cells. J Immunol *198*, 657-668.

Au-Yeung, B.B., Zikherman, J., Mueller, J.L., Ashouri, J.F., Matloubian, M., Cheng, D.A., Chen, Y., Shokat, K.M., and Weiss, A. (2014). A sharp T-cell antigen receptor signaling threshold for T-cell proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A *111*, E3679-3688.

Badovinac, V.P., Haring, J.S., and Harty, J.T. (2007). Initial T Cell Receptor Transgenic Cell Precursor Frequency Dictates Critical Aspects of the CD8+ T Cell Response to Infection. Immunity *26*, 827-841.

Berg, R.E., Crossley, E., Murray, S., and Forman, J. (2003). Memory CD8+ T cells provide innate immune protection against Listeria monocytogenes in the absence of cognate antigen. J Exp Med *198*, 1583-1593.

Christen, T., Nahrendorf, M., Wildgruber, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Waterman, P., Shimizu, K., Weissleder, R., and Libby, P. (2009). Molecular imaging of innate immune cell function in transplant rejection. Circulation *119*, 1925-1932.

Christoffersson, G., Chodaczek, G., S., S., Ratliff, S.S., Coppieters, K., and von Herrath, M.G. (2018). Suppression of diabetes by accumulation of non–islet-specific CD8+ effector T cells in pancreatic islets. Sci Immunol *3*, eaam6533.

Cibrian, D., and Sanchez-Madrid, F. (2017). CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. Eur J Immunol *47*, 946-953.

Cunningham, N.R., Artim, S.C., Fornadel, C.M., Sellars, M.C., Edmonson, S.G., Scott, G., Albino, F., Mathur, A., and Punt, J.A. (2006). Immature CD4+CD8+ thymocytes and mature T cells regulate Nur77 distinctly in response to TCR stimulation. J Immunol *177*, 6660-6666.

Dai, H., Friday, A.J., Abou-Daya, K.I., Williams, A.L., Mortin-Toth, S., Nicotra, M.L., Rothstein, D.M., Shlomchik, W.D., Matozaki, T., Isenberg, J.S., *et al.* (2017). Donor SIRPα polymorphism modulates the innate immune response to allogeneic grafts. Sci Immunol *2*, eaam6202.

De La Rochere, P., Guil-Luna, S., Decaudin, D., Azar, G., Sidhu, S.S., and Piaggio, E. (2018). Humanized Mice for the Study of Immuno-Oncology. Trends Immunol

39, 748-763.

Dresske, B., Zavazava, N., Jenisch, S., Exner, B., Lenz, P., El Mokhtari, N.E., Kremer, B., and Faendrich, F. (2003). WOFIE synergizes with calcineurin-inhibitor treatment and early steroid withdrawal in kidney transplantation. Transplantation *75*, 1286-1291.

El-Sawy, T., Miura, M., and Fairchild, R. (2004). Early T Cell Response to Allografts Occuring Prior to Alloantigen Priming Up-Regulates Innate-Mediated Inflammation and Graft Necrosis. Am J Pathol *165*, 147-157.

Ford, M.L. (2016). T Cell Cosignaling Molecules in Transplantation. Immunity *44*, 1020-1033.

Goto, R., Issa, F., Heidt, S., Taggart, D., and Wood, K.J. (2013a). Ischemia-reperfusion injury accelerates human antibody-mediated transplant vasculopathy. Transplantation *96*, 139-145.

Goto, R., You, S., Zaitsu, M., Chatenoud, L., and Wood, K.J. (2013b). Delayed anti-CD3 therapy results in depletion of alloreactive T cells and the dominance of Foxp3+ CD4+ graft infiltrating cells. Am J Transplant *13*, 1655-1664.

Haluszczak, C., Akue, A.D., Hamilton, S.E., Johnson, L.D., Pujanauski, L., Teodorovic, L., Jameson, S.C., and Kedl, R.M. (2009). The antigen-specific CD8+ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. J Exp Med *206*, 435-448.

Herndler-Brandstetter, D., Ishigame, H., Shinnakasu, R., Plajer, V., Stecher, C., Zhao, J., Lietzenmayer, M., Kroehling, L., Takumi, A., Kometani, K.*, et al.* (2018). KLRG1(+) Effector CD8(+) T Cells Lose KLRG1, Differentiate into All Memory T Cell Lineages, and Convey Enhanced Protective Immunity. Immunity *48*, 716-729 e718.

Higdon, L.E., Schaffert, S., Khatri, P., and Maltzman, J.S. (2019). Single cell immune profiling in transplantation research. Am J Transplant *19*, 1278-1287.

Hugues, S., Fetler, L., Bonifaz, L., Helft, J., Amblard, F., and Amigorena, S. (2004). Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. Nat Immunol *5*, 1235-1242.

Iida, S., Suzuki, T., Tanabe, K., Valujskikh, A., Fairchild, R.L., and Abe, R. (2013). Transient lymphopenia breaks costimulatory blockade-based peripheral tolerance and initiates cardiac allograft rejection. Am J Transplant *13*, 2268-2279.

Ishii, D., Schenk, A.D., Baba, S., and Fairchild, R.L. (2010). Role of TNFalpha in early chemokine production and leukocyte infiltration into heart allografts. Am J

Transplant *10*, 59-68.
Jason T. White, Eric W. Cross, Matthew A. Burchill, Thomas Danhorn, Martin D. McCarter, Eric W. Cross, Matthew A. Burchill, Thomas Danhorn, Martin D. McCarter, Hugo R. Rosen*, et al.* (2015). Virtual memory T cells develop and mediate bystander protective immunity in an IL-15-dependent manner. Nat Commun *7*, 11291.
Joshi, N.S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H.K., Urso, D.R., Hagman, J., Gapin, L., and Kaech, S.M. (2007). Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. Immunity *27*, 281-295.
Kallies, A., and Good-Jacobson, K.L. (2017). Transcription Factor T-bet Orchestrates Lineage Development and Function in the Immune System. Trends Immunol *38*, 287-297.
Katzman, S.D., O'Gorman, W.E., Villarino, A.V., Gallo, E., Friedman, R.S., Krummel, M.F., Nolan, G.P., and Abbas, A.K. (2010). Duration of antigen receptor signaling determines T-cell tolerance or activation. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 18085-18090.
Kendal, A.R., Chen, Y., Regateiro, F.S., Ma, J., Adams, E., Cobbold, S.P., Hori, S., and Waldmann, H. (2011). Sustained suppression by Foxp3+ regulatory T cells is vital for infectious transplantation tolerance. J Exp Med *208*, 2043-2053.
Kenney, L.L., Shultz, L.D., Greiner, D.L., and Brehm, M.A. (2016). Humanized Mouse Models for Transplant Immunology. Am J Transplant *16*, 389-397.
Kim, J., Chang, D.Y., Lee, H.W., Lee, H., Kim, J.H., Sung, P.S., Kim, K.H., Hong, S.H., Kang, W., Lee, J.*, et al.* (2018). Innate-like Cytotoxic Function of Bystander-Activated CD8(+) T Cells Is Associated with Liver Injury in Acute Hepatitis A. Immunity *48*, 161-173 e165.
Krupnick, A.S., Lin, X., Li, W., Higashikubo, R., Zinselmeyer, B.H., Hartzler, H., Toth, K., Ritter, J.H., Berezin, M.Y., Wang, S.T.*, et al.* (2014). Central memory CD8+ T lymphocytes mediate lung allograft acceptance. J Clin Invest *124*, 1130-1143.
Lauvau, G., Boutet, M., Williams, T.M., Chin, S.S., and Chorro, L. (2016). Memory CD8(+) T Cells: Innate-Like Sensors and Orchestrators of Protection. Trends Immunol *37*, 375-385.
Li, W., Bribriesco, A.C., Nava, R.G., Brescia, A.A., Ibricevic, A., Spahn, J.H., Brody, S.L., Ritter, J.H., Gelman, A.E., Krupnick, A.S.*, et al.* (2012). Lung transplant

acceptance is facilitated by early events in the graft and is associated with lymphoid neogenesis. Mucosal Immunol *5*, 544-554.
Liu, Q., Rojas-Canales, D.M., Divito, S.J., Shufesky, W.J., Stolz, D.B., Erdos, G., Sullivan, M.L., Gibson, G.A., Watkins, S.C., Larregina, A.T.*, et al.* (2016). Donor dendritic cell-derived exosomes promote allograft-targeting immune response. J Clin Invest *126*, 2805-2820.
Liu, X., Mishra, P., Yu, S., Beckmann, J., Wendland, M., Kocks, J., Seth, S., Hoffmann, K., Hoffmann, M., Kremmer, E.*, et al.* (2011). Tolerance induction towards cardiac allografts under costimulation blockade is impaired in CCR7-deficient animals but can be restored by adoptive transfer of syngeneic plasmacytoid dendritic cells. Eur J Immunol *41*, 611-623.
Michael J. T. Stubbington, Rozenblatt-Rosen, O., Aviv Regev, and Teichmann, S.A. (2017). Single-cell transcriptomics to explore the immune system in health and disease. Science *358*, 58-63.
Miller, M.L., Daniels, M.D., Wang, T., Chen, J., Young, J., Xu, J., Wang, Y., Yin, D., Vu, V., Husain, A.N.*, et al.* (2015). Spontaneous restoration of transplantation tolerance after acute rejection. Nat Commun *6*, 7566.
Miskov-Zivanov, N., Turner, M.S., Kane, L.P., Morel, P.A., and Faeder, J.R. (2013). The Duration of T Cell Stimulation Is a Critical Determinant of Cell Fate and Plasticity. Sci Signal *6*, ra97.
Moran, A.E., Holzapfel, K.L., Xing, Y., Cunningham, N.R., Maltzman, J.S., Punt, J., and Hogquist, K.A. (2011). T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. J Exp Med *208*, 1279-1289.
Moxham, V.F., Karegli, J., Phillips, R.E., Brown, K.L., Tapmeier, T.T., Hangartner, R., Sacks, S.H., and Wong, W. (2008). Homeostatic proliferation of lymphocytes results in augmented memory-like function and accelerated allograft rejection. J Immunol *180*, 3910-3918.
Nadig, S.N., Wieckiewicz, J., Wu, D.C., Warnecke, G., Zhang, W., Luo, S., Schiopu, A., Taggart, D.P., and Wood, K.J. (2010). In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo-expanded human regulatory T cells. Nat Med *16*, 809-813.
Oberbarnscheidt, M.H., Zeng, Q., Li, Q., Dai, H., Williams, A.L., Shlomchik, W.D., Rothstein, D.M., and Lakkis, F.G. (2014). Non-self recognition by monocytes initiates allograft rejection. J Clin Invest *124*, 3579-3589.

Papalexi, E., and Satija, R. (2018). Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity. Nat Rev Immunol *18*, 35-45.
Polonsky, M., Rimer, J., Kern-Perets, A., Zaretsky, I., Miller, S., Bornstein, C., David, E., Kopelman, N.M., Stelzer, G., Porat, Z.*, et al.* (2018). Induction of CD4 T cell memory by local cellular collectivity. Science *360*, eaaj1853.
Pritchard, G.H., Kedl, R.M., and Hunter, C.A. (2019). The evolving role of T-bet in resistance to infection. Nat Rev Immunol *19*, 398-410.
Rissiek, B., Danquah, W., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2014). Technical Advance: A new cell preparation strategy that greatly improves the yield of vital and functional Tregs and NKT cells. Journal of Leukocyte Biology *95*, 543-549.
Saligrama, N., Zhao, F., Sikora, M.J., Serratelli, W.S., Fernandes, R.A., Louis, D.M., Yao, W., Ji, X., Idoyaga, J., Mahajan, V.B.*, et al.* (2019). Opposing T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. Nature *572*, 481-487.
Schenk, A.D., Nozaki, T., Rabant, M., Valujskikh, A., and Fairchild, R.L. (2008). Donor-reactive CD8 memory T cells infiltrate cardiac allografts within 24-h posttransplant in naive recipients. Am J Transplant *8*, 1652-1661.
Schietinger, A., Delrow, J., J., Bason, R., S., Blattman, J., N., and Greenberg, P., D (2012). Rescued tolerant CD8 T cells are preprogrammed to reestablish the tolerant state. Science *335*, 723-727.
Setoguchi, K., Hattori, Y., Iida, S., Baldwin, W.M., 3rd, and Fairchild, R.L. (2013). Endogenous memory CD8 T cells are activated within cardiac allografts without mediating rejection. Am J Transplant *13*, 2293-2307.
Setoguchi, K., Schenk, A.D., Ishii, D., Hattori, Y., Baldwin, W.M., 3rd, Tanabe, K., and Fairchild, R.L. (2011). LFA-1 antagonism inhibits early infiltration of endogenous memory CD8 T cells into cardiac allografts and donor-reactive T cell priming. Am J Transplant *11*, 923-935.
Shultz, L.D., Brehm, M.A., Garcia-Martinez, J.V., and Greiner, D.L. (2012). Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. Nat Rev Immunol *12*, 786-798.
Song, J., Willinger, T., Rongvaux, A., Eynon, E.E., Stevens, S., Manz, M.G., Flavell, R.A., and Galan, J.E. (2010). A mouse model for the human pathogen Salmonella typhi. Cell Host Microbe *8*, 369-376.
Soudja, S.M., Chandrabos, C., Yakob, E., Veenstra, M., Palliser, D., and Lauvau, G. (2014). Memory-T-cell-derived interferon-gamma instructs potent innate cell activation for protective immunity. Immunity *40*, 974-988.

Soudja, S.M., Ruiz, A.L., Marie, J.C., and Lauvau, G. (2012). Inflammatory monocytes activate memory CD8(+) T and innate NK lymphocytes independent of cognate antigen during microbial pathogen invasion. Immunity *37*, 549-562.

Stark., R., Wesselink., T.H., Behr., F.M., Kragten., N.A.M., Arens., R., Koch-Nolte., F., Gisbergen., K.P.J.M.v., and Lier., R.A.W.v. (2018). TRM maintenance is regulated by tissue damage via P2RX7. Sci Immunol *3*, eaau 1022.

Su, C.A., Iida, S., Abe, T., and Fairchild, R.L. (2014). Endogenous memory CD8 T cells directly mediate cardiac allograft rejection. Am J Transplant *14*, 568-579.

Wang, Y.Y., Jiang, H., Pan, J., Huang, X.R., Wang, Y.C., Huang, H.F., To, K.F., Nikolic-Paterson, D.J., Lan, H.Y., and Chen, J.H. (2017). Macrophage-to-Myofibroblast Transition Contributes to Interstitial Fibrosis in Chronic Renal Allograft Injury. J Am Soc Nephrol *28*, 2053-2067.

White, J.T., Cross, E.W., and Kedl, R.M. (2017). Antigen-inexperienced memory CD8+ T cells: where they come from and why we need them. Nat Rev Immunol *17*, 391-400.

Wood, K.J., and Goto, R. (2012). Mechanisms of rejection: current perspectives. Transplantation *93*, 1-10.

Wu, C., Zhao, Y., Xiao, X., Fan, Y., Kloc, M., Liu, W., Ghobrial, R.M., Lan, P., He, X., and Li, X.C. (2016). Graft-Infiltrating Macrophages Adopt an M2 Phenotype and Are Inhibited by Purinergic Receptor P2X7 Antagonist in Chronic Rejection. Am J Transplant *16*, 2563-2573.

Wu, Z., Bensinger, S.J., Zhang, J., Chen, C., Yuan, X., Huang, X., Markmann, J.F., Kassaee, A., Rosengard, B.R., Hancock, W.W., *et al.* (2004). Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance. Nature Medicine *10*, 87-92.

You, S., Zuber, J., Kuhn, C., Baas, M., Valette, F., Sauvaget, V., Sarnacki, S., Sawitzki, B., Bach, J.F., Volk, H.D., *et al.* (2012). Induction of allograft tolerance by monoclonal CD3 antibodies: a matter of timing. Am J Transplant *12*, 2909-2919.

Youngblood, B., Hale, J.S., Kissick, H.T., Ahn, E., Xu, X., Wieland, A., Araki, K., West, E.E., Ghoneim, H.E., Fan, Y., *et al.* (2017). Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. Nature *552*, 404-409.

Zaitsu, M., Issa, F., Hester, J., Vanhove, B., and Wood, K.J. (2017). Selective blockade of CD28 on human T cells facilitates regulation of alloimmune responses. JCI Insight *2*.

Zecher, D., van Rooijen, N., Rothstein, D.M., Shlomchik, W.D., and Lakkis, F.G. (2009). An innate response to allogeneic nonself mediated by monocytes. J

Immunol *183*, 7810-7816.
Zhao, Y., Chen, S., Lan, P., Wu, C., Dou, Y., Xiao, X., Zhang, Z., L., M., He, X., Chen, W., *et al.* (2017). Macrophage subpopulations and their impact on chronic allograft rejection versus graft acceptance in a mouse heart transplant model. Am J Transplant *18*, 604-616.