



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	早期グラフト浸潤細胞の特性を生かした免疫寛容プロトコール導入のための基礎的研究
Author(s)	太田, 拓児
Description	配架番号 : 2870
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16146号
Issue Date	2024-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16146
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93619
Type	doctoral thesis
File Information	OTA_Takuji.pdf



学 位 論 文

早期グラフト浸潤細胞の特性を生かした

免疫寛容プロトコール導入のための基礎的研究

(Studies on Induction of Therapeutic Protocol for
Immune Tolerance Utilizing the Characteristics of
Early Graft-Infiltrating Cells)

2024 年 9 月

北海道大学

太田 拓児

学 位 論 文

早期グラフト浸潤細胞の特性を生かした

免疫寛容プロトコール導入のための基礎的研究

(Studies on Induction of Therapeutic Protocol for
Immune Tolerance Utilizing the Characteristics of
Early Graft-Infiltrating Cells)

2024 年 9 月

北海道大学

太田 拓児

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.....	10 頁
考察.....	27 頁
結論.....	30 頁
謝辞.....	31 頁
利益相反	32 頁
引用文献	33 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として発表した

1. Takuji Ota, Ryoichi Goto, Takuya Harada, Agustina Forgioni, Ryo Kanazawa, Yoshikazu Ganchiku, Norio Kawamura, Masaaki Watanabe, Moto Fukai, Tsuyoshi Shimamura, Akinobu Taketomi
TCF1^{high} PD-1⁺ Ly108⁺ CD8⁺ T cells are associated with graft preservation in sensitized mice treated with non-Fc receptor-binding CD3 antibodies
Immunohorizons.2024 Apr 1;8(4):295-306.

本研究の一部は以下の学会に発表した

1. The efficacy of delayed aCD3F(ab')₂ treatment in sensitized allogeneic mouse heart transplantation.
Ota T, Goto R, Kanazawa R, Shibuya K, Ganchiku Y, Kawamura N, Watanabe M, Fukai M, Shimamura T, Taketomi A
American Transplantation Congress 2021 年 6 月 4-9 日
2. アロ感作マウスを用いた異所性アロ心移植に対する抗 CD3F(ab')₂ の効果の検討
太田拓児、後藤 了一、原田 拓也、Agustina Forgioni、巖築 慶一、川村 典生、渡辺 正明、深井 原、嶋村 剛、武富 紹信
第 122 回 日本外科学会学術集会 熊本 2022 年 4 月 14-16 日

要旨

【背景と目的】

臓器移植は末期臓器不全に対する最も有効な治療法だが、移植後の拒絶反応を制御するために免疫抑制剤が必要である。しかし、長期的な免疫抑制剤の使用は副作用を引き起こすため、ドナー特異的な免疫寛容の誘導法の開発が求められている。臓器移植後の免疫応答には直接経路と間接経路があり、移植片に早期浸潤するリンパ球はエフェクター細胞の浸潤に関与するが、拒絶を直接引き起こすには不十分である。免疫寛容の誘導には T 細胞の活性化制御が必要であり、抗 CD3 抗体による免疫寛容モデルが注目されている。α CD3F(ab')₂ を用いたマウスの移植モデルでは、投与時期を最適化することで移植片生着率が向上し、移植片浸潤細胞の特徴が明らかになってきた。しかし、ヒトではアロ抗原性を有したメモリー T 細胞が存在するため、マウスの免疫寛容プロトコルをそのまま適用することはできない。

本研究の目的は、ヒト生体により近い環境を再現するために、アロ抗原感作マウスに対して α CD3F(ab')₂ 免疫寛容プロトコルを検証し、より有効なプロトコルを開発することである。また、早期移植片浸潤リンパ球の役割を明らかにすることを目指している。

【方法】

実験動物はレシピエントマウスに雄の C57BL/6(B6)、ドナーマウスに雄の BALB/c を使用し、異所性心臓移植を行った。感作マウスは、ドナーマウスの皮膚をレシピエントマウスの体幹背側に移植し、8-12 週後に使用した。治療群は抗体 α CD3F(ab')₂ (Bio X cell) 50 μg を 5 日間静脈内投与した。治療のタイミングにより以下の治療プロトコルを用いた: Early プロトコルは移植前日から移植 3 日目。Delayed プロトコルは移植 3 日目から移植 7 日目。Day1 プロトコルは移植 1 日目から移植 5 日目。移植片生存の有無は移植片の拍動を体表からの触知、試験開腹にて評価した。移植片浸潤リンパ球(GIL)、脾細胞を精製しフローサイトメリーにて解析した。アロ抗原感作の方法は、ドナー皮膚の移植を行い、脾細胞の輸注、再移植を行った。移植後のドナー抗原刺激の反応性は IFN γ ELISpot で評価した。

【結果】

本研究では、マウス心臓移植モデルを用いて、α CD3F(ab')₂ 抗体療法の効果を検討した。まず、手技の習熟と安定化を図り、B6 マウスをレシピエント、BALB/c マウスをドナーとしたモデルを確立した。α CD3F(ab')₂ の投与により、naïve レシピエントにおいては移植片生存率の延長が得られ、特に移植後 3 日目から 7 日目まで投与した Delayed 群では、長期生存が得られた。Delayed 群の移植片では、PD-1⁺ TCF1^{high} CD8⁺ T 細胞の割合が高く、Ly108 陽性細胞の割合も有意に高かった。

次に、BALB/c マウスの皮膚または心臓を移植した B6 マウスを用いて、アロ抗原感

作レシピエントモデルを作成した。感作マウスでは、メモリーT細胞分画の増加とドナー抗原刺激によるIFN- γ 産生の促進が確認された。感作マウスに対する α CD3F(ab')₂療法の効果は、naïveマウスとは異なり、移植片生存期間の延長は限定的であった。

感作マウスの移植片浸潤細胞を検討したところ、TCF1^{low}PD-1⁺のCD8⁺T細胞が増加しており、このサブセットはT-betとEOMESの高発現を示した。また、感作マウスの移植片では、Granzyme B発現CD8⁺T細胞が有意に多く観察された。

最後に、感作マウスに対する α CD3F(ab')₂抗体療法の最適化を検討した。移植後1日目から投与を開始するDay1プロトコールにより、移植片生存期間が有意に延長した。Day1プロトコール群の移植片では、Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞の割合が有意に増加し、TCF1^{high}PD-1⁺CD8⁺T細胞ではLy108の割合が高かった。

【考察】

Naïveの条件下においてはDelayedプロトコールが移植片の長期生存を可能とし、移植28日目にはLy108⁺PD-1⁺TCF1^{high}CD8⁺T細胞の割合高かった。感作下ではDelayedプロトコールの同様の効果を得ることができなかったものの、Day1プロトコールは移植片生存を延長させた。感作下においては3日目の時点で細胞障害性CD8⁺T細胞が浸潤しており、強力なアロ反応を抑制することは難しい。8日目のGILにはDay1プロトコール群でLy108⁺PD-1⁺TCF1^{high}CD8⁺T細胞の割合が増加しており α CD3F(ab')₂によるT細胞のリモデリング効果が「疲弊」状態に誘導した可能性が示唆され、これにより移植片生存率が延長したと考えられた。

【結論】

感作条件下で α CD3F(ab')₂の移植後の投与時期によって、移植片におけるCD4⁺およびCD8⁺T細胞の表現型変化と関連して、同種移植片の温存を促進することを可能とする。

略語表

略語: 正式名称

CTV: CellTrace Violet™

EOMES: eomesdermin

Foxp3: forkhead box P3

GIL: graft infiltrating lymphocytes

PD-1: Program death 1

T-bet: T-boxed expressed in T cells

TCF1: T cell factor 1

TCR: T cell receptor

MLR: mixed lymphocyte reaction

MST: mean survival time

緒言

固形臓器移植後の生涯にわたる免疫抑制療法は、一般集団と比較して、悪性疾患、代謝性疾患、感染性疾患、心血管疾患などの様々な疾患の発生率を増加させる一因となっている(Acuna, S. A, 2018.)。移植後免疫寛容の誘導は、免疫抑制治療に伴う問題を克服するための理想的な治療法である。

移植後の免疫寛容の誘導は、CD8⁺ T 細胞の不応答性に起因した機能不全が関連する(Iwakoshi et al., 2010)、不応答状態の T 細胞は IL-2 を産生できず、抗原再刺激に対しても低応答性の状態となることが鍵となり、誘導方法はドナー特異的輸血下の CD154/CD40 共刺激経路の阻害などが移植動物実験モデルで報告されてきた()。抗 CD3 抗体を用いた誘導療法は、移植後の免疫寛容を獲得するための有効なアプローチと考える。過去に、臨床現場において抗 CD3 療法は難治性の移植片拒絶反応の治療に用いられたが(Cosimi et al., 1981)、抗 CD3 抗体が関与する重篤な infusion reaction が臓器移植における使用を妨げてきた。この重篤な副反応を解決するために、Fc 非結合型抗 CD3 抗体が開発された。Fc 非結合型抗 CD3 抗体には治療タイミングで治療効果が変わり、1 型糖尿病モデル(Chatenoud et al., 1994; Chatenoud et al., 1997)や自己免疫疾患モデル(Kohm et al., 2005)において発症後に抗 CD3 治療薬を投与することで、疾患に対してより高い効果を認めた。さらに、移植後の Fc 非結合型抗 CD3 抗体治療のタイミングを遅らせることで、移植片内の Foxp3⁺CD4⁺T 細胞と TGF- β を産生する疲弊化 CD8⁺ T 細胞のリンパ球サブセットが増加し、移植片の長期受け入れを促進することに成功した(Goto et al., 2013; You et al., 2012)。

Fc 非結合性抗 CD3 抗体の Delayed プロトコールによる寛容導入の成功の鍵は、移植片に浸潤するリンパ球の早期侵入を許容することと考えられる(Goto et al., 2013; You et al., 2012)。実際、移植後早期の移植片浸潤リンパ球(GIL)の免疫学的特徴は、アロ反応性リンパ球のそれとは異なり、移植片拒絶反応を引き起こさない。Schenk らは、マウス心臓移植後 3 日までに、記憶表現型を持つ活性化 CD8⁺ 移植片浸潤 T 細胞が観察されたことを報告している(Schenk et al., 2008)。これと同様に、当教室において、レシピエントと同系統の免疫不全マウスに、移植後 3 日目の心臓移植片をアロ再移植しても拒絶反応が起こらないことがわかった。再構成されたリンパ球を解析すると、記憶表現型を持つ CD8⁺ T 細胞からなり、GIL は移植後 3 日までは移植片拒絶反応に関与しないことを報告した(Ganchiku et al, 2021)。この結果は、これらの早期 GIL(移植後 3 日以前)には十分なアロ反応性 T 細胞が含まれていない可能性を示唆している。

最近、1 型糖尿病を対象とした第 2 相臨床試験で、Fc 改変ヒト化抗 CD3 抗体の有効性と安全性が実証された(Herold et al., 2019)。Fc 遺伝子組換え抗 CD3 抗体を用い

たこの有望な臨床試験は、移植後免疫寛容を促進するために早期の GIL を許容した治療戦略の臨床応用の可能性を示した。しかし、移植寛容を達成するために、実臨床では何十年も苦闘してきた。げっ歯類モデルで寛容誘導に用いられた治療プロトコールは、臨床の臓器移植では採用されなかったが、その理由は強力なメモリーT細胞の抵抗性である。Heeger らは、ELISpot アッセイで定量的にアロ反応性 T 細胞のサイトカイン産生を評価することで、移植前のアロ反応性メモリーT細胞の存在が臨床転帰の悪さと関連することを報告した(Heeger et al., 1999)。さらに、恒常的な増殖に基づく残存リンパ球サブセットのようなメモリーT細胞は、リンパ球除去療法後の共刺激経路の遮断による免疫寛容誘導プロトコールに対して抵抗性を獲得させると報告されている(Adams et al., 2003; Neujahr et al., 2006)。ドナー抗原によって活性化されたメモリーT細胞サブセットが関与する移植片拒絶反応を克服することは、実臨床の臓器移植における免疫寛容誘導を成功させる鍵と考えられている。特に、Fc 非結合 CD3 治療の Delayed プロトコールにおける最初にグラフトに浸潤する GIL は、メモリー細胞が存在する感作モデルにおいて移植片の運命を決定する可能性がある。本研究では、感作モデルにおける Delayed Fc 非結合抗 CD3 治療の有効性と、治療標的としての早期流入する GIL を含む同種反応性メモリーT細胞の特徴を検討した。

方法

マウス

ddY、C57BL/6 (B6、H2b)、BALB/c (H2d)、C3H/hej (C3H, H2k) の雄 7-8 週齢を日本 SLC より購入し、医歯薬研究棟 8 階小動物室にて飼育管理した。入室 1 週間後より実験に使用した。本研究で実施された動物実験は「北海道大学動物実験に関する規程」に則って、適切に行われた。

心臓移植

イソフルランを麻酔装置より吸入させ全身麻酔下に行った。まずドナーマウスを開腹し、腹部大動脈を小ハサミにて切開し、脱血を行った。速やかに IVC から 100 単位/ml のヘパリンナトリウム添加生食 1ml を投与し、心拍動下に灌流させた。十分灌流させた段階で頸椎脱臼にて安楽死を行った。次に開胸し、上下大静脈の結紮切離を行った。上行大動脈、肺動脈を剥離にて切離した。最後に気管、肺静脈を一括に結紮切離し摘出した。生食入りのセラムチューブに収納し氷冷した。

レシピエントマウスも同様に麻酔を行い開腹し、腹部大動脈と下大静脈をテーピングした。血管クリップにてクランプの後、腹部大動脈と下大静脈の前壁に吻合用の小孔を作成し、移植片の上行大動脈、肺動脈を 10-0 ナイロン糸にて各々連続縫合にて吻合を行った。移植片灌流後に止血を確認し閉腹した。

皮膚移植

アロ抗原感作させるために皮膚移植を行った。安楽死させたドナーマウス BALB/c より尻尾の皮膚を全周に採取し、1cm 角大にトリミングした。全身麻酔下にレシピエントマウスの C57BL/6 マウスの皮膚移植予定部の体幹皮膚を切離し、皮膚移植片を 7-0 非吸収糸にて 8 針で移植した。創部はガーゼで保護し、その上からテープを巻いて固定した。7-10 日を目安に抜糸した。

GIL の抽出

心臓移植片は、摘出時に血管内の血液と循環リンパ球を除外するために、十分な量の生理食塩水で灌流した。組織はハサミで細かく刻み、コラゲナーゼ IV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 5mg を加えた RPMI 1640 培地で消化した (37°C、5%CO₂)。消化した組織から 70 μ m のセルストレーナーを用いて単細胞懸濁液を分離した。リンパ球は、Lympholyte®-M (Cedarlane Laboratories Ltd., Burlington, Canada) を用いて懸濁液から精製した。

Mixed lymphocyte reaction (MLR)

レシピエント (C57BL/6)、ドナー (BALB/c)、3rd-party (C3H) を安楽死後に開腹にて脾臓を摘出し、生食入りのエッペンチューブに回収した。氷冷にてクリーンベンチに運搬し、ディッシュ内で 70 μ m セルストレーナー上に脾臓をすり潰した。PBS でディッシュ及びセルストレーナーを計 3 回洗浄し、15 ml となるように細胞懸濁液を回収した。遠心 (4°C、300G、5 分) を行い、上清を破棄。ペレットを 10 倍希釈 RBClysis buffer 1 ml を加え溶血処理を行った。遠心 (4°C、300G、5 分) の後に上清を破棄し、ペレットを懸濁した。細胞濃度を確認の後に、脾細胞ドナー (BALB/c) 脾細胞、3rd party (C3H) の脾細胞を各々の設定濃度の細胞数に調整した。Responder は CellTrace Violet™ (CTV, Thermo Fisher Scientific, Philadelphia, PA) に染色し、stimulator は 30Gy 照射した後に 4 日間共培養 (37°C、5%CO₂) を行った。

フローサイトメトリー

蛍光標識モノクローナル抗体で染色表面マーカーの染色は、精製した細胞を遠心、洗浄の後に表面抗体を添加し 4°C、20 分間にて染色した。使用した蛍光標識モノクローナル抗体は CD3 ϵ (145-2C11), CD4 (GK1.5), CD8a (53-6.7), CD25 (PC61), CD44 (IM7), CD62L (MEL-14), TCR- β (H57-597), EOMES (Dan11 mg), Foxp3 (FJK-16s), Granzyme B (NGZB), IFN-g (XMG1.2) PD-1 (J43), T-bet (4B10), TCF1 (S33-96) and Ly108 (330-AJ)。これらの抗体は BD Biosciences、Thermo Fisher Scientific より購入した。

核内染色は表面マーカー染色後に、Foxp3/Transcription factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific, Philadelphia, PA) を用いて 4°C で 30 分間細胞核内抗体染色を行い、その後 1×PBS で洗浄の後に使用した。細胞内サイトカイン染色は細胞を 10 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma, St. Louis, USA)、1 μ M ionomycin、2 μ l/2 ml brefeldin A (BD Pharmingen, San Diego, USA) で 4 時間刺激した後、Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (BD Bioscience) で透過処理し、4°C で 45 分間抗体染色を行い、その後 Permeabilization wash buffer で洗浄の後に使用した。フローサイトメーター (FACS Canto II, BD Biosciences) で収集したデータはソフトウェア FlowJo バージョン 10.8 (BD Biosciences) を用いて解析を行った。

細胞標識

精製した脾細胞に 5mM の CellTrace Violet™ (CTV, Thermo Fisher Scientific, Philadelphia, PA) を加え懸濁し、5 μ M とし恒温槽遮光 37°C に 20 分静置した。その後 RPMI1640 培地を加え反応を止め 5 分静置。遠心し上清を

破棄し、使用する細胞濃度に調整した。

ELISpot 解析

IFN- γ capture 抗体 (BD Biosciences) でコーティングした ELISpot MultiScreen Filter Plate (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) に単離精製したレシピエントの脾細胞を、ドナー、3rd party、レシピエント系統マウスの脾細胞と 24 時間共培養 (5%CO₂, 37°C) を行った。共培養後細胞を破棄し、二次抗体を加え 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。

免疫組織染色

パラフィン包埋された心臓グラフトの 10 μ m の切片をキシレンで脱パラフィン化、エタノールで脱水化を行った。賦活化は圧力調理機を用いて 150 秒間の加圧を行った。Blocking buffer (ナカライ) を加え室温 30 分安置した後、1 次抗体、抗 CD3 ϵ 抗体 (EPR20752, Abcam, Cambridge, UK) を 1000 倍希釈で加え 4°C で一晩染色を行った。スライドの洗浄後、ビオチン化二次抗体と Dako EnVision+System-Rabbit HRP (Agilent, Santa Clara, CA, USA) を付加し室温で 45 分静置し、3,3'-ジアミノベンジジンを加え発色させた。

統計学的解析

移植片の生存率の評価には Kaplan-Meier 法を用い、各群の比較には log-rank 検定を用いた。データは平均値 $\pm$ SD で示し、Prism バージョン 9.0

(GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて解析した。2 群の平均値の比較には Student の t 検定を用いた。0.05 未満の P 値は統計的有意とみなした。

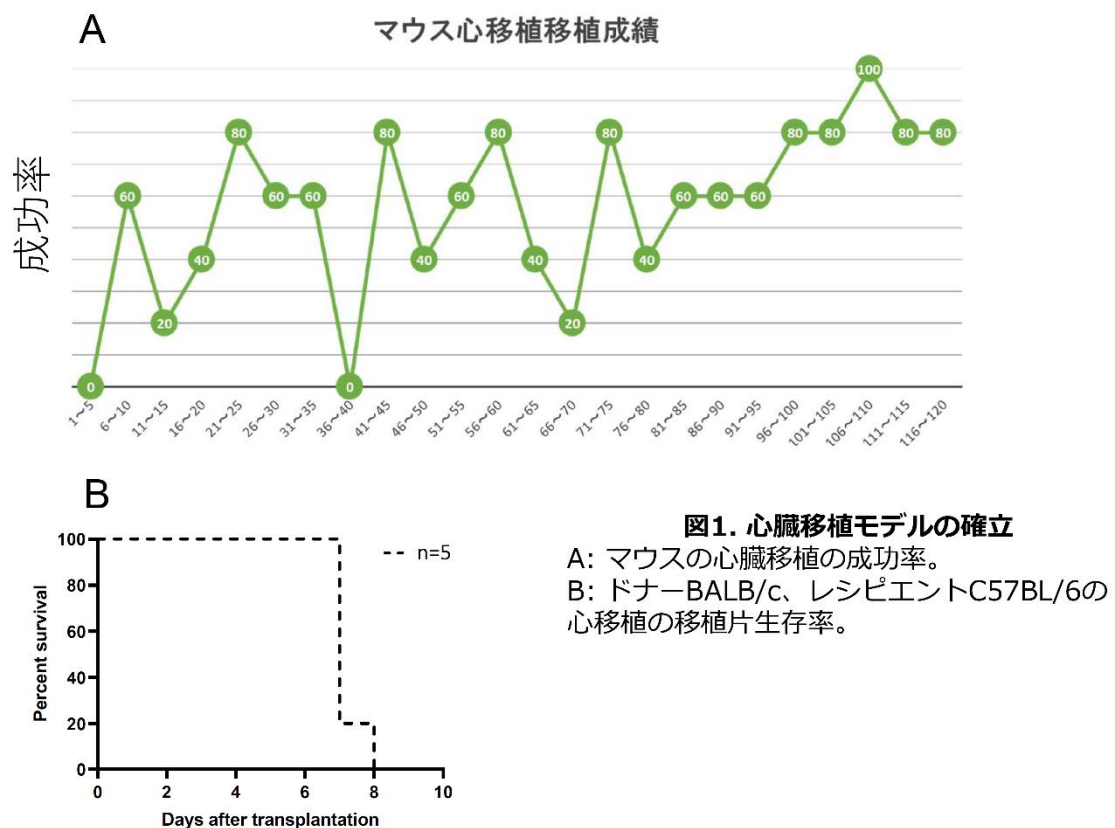
結果

マウス心臓移植モデルの作成

心臓移植モデルを作成にあたり、実験結果の信頼性を確保するために、移植手技の習熟と安定化を図った。手技の確立のため、最初の約20例ではマウスの体格が比較的大きいddYマウスを使用した。移植手技の成功は、1週間以上のレシピエントマウス生存と心臓移植片の拍動の持続とし、移植後観察を行った。100例の症例を重ねた段階で、成績は安定し、8割以上の成功率を達成した(図1.A)。本研究の心臓移植モデルのマウスの組合せは、免疫応答がより強いB6マウスをレシピエントとし、BALB/cマウスをドナーとした(Tanaka et al., 2004)。アロ移植において、移植後約7日で拍動が停止し、全例で拒絶が確認された(図1.B)。

既報において α CD3F(ab')₂は移植前ではなく、移植後の投与によりグラフト生存期

図1



間が延長することが示されている(You et al., 2011; Goto et al., 2013)。既報ではB10(H2b)からCBA(H2k)への移植であった(Goto et al., 2013)が、本研究では上述の通り、より免疫応答の強いB6をレシピエントに用いた心臓移植で検討した。まず α CD3F(ab')₂の効果の検証を行った(図2.A)。未治療群では、BALB/c心臓移植片はすべてB6レシピエントマウスで速やかに拒絶された(n=5、生存期間中央値(MST)

7 日、破線、図 2B)。術前 1 日目から術後 3 日目まで、 α CD3F(ab')₂ を毎日 50 μ g 5 日間連続静脈内投与 (Early プロトコル) すると、移植片の生存期間は延長したが、すべての移植片は最終的に拒絶された (n=5、MST=38 日、青線、p=0.0016 vs 未治療群、図 2B)。一方、 α CD3F(ab')₂ を術後 3 日目から 7 日目まで連続 5 日間、毎日 50 μ g 静脈内投与 (Delayed プロトコル) すると、移植片の長期生存が促進され、5 つの移植片のうち 4 つが 100 日以上機能した (n=5、MST>100 日、赤線、p=0.0007、vs Early 群、図 2B)。以上より naïve レシピエントにおいては、Early 群と Delayed 群ともに移植片生存率の延長が得られ、Delayed 群では 5 匹中 4 匹で 100 日以上の長期生存が得られた。

図2

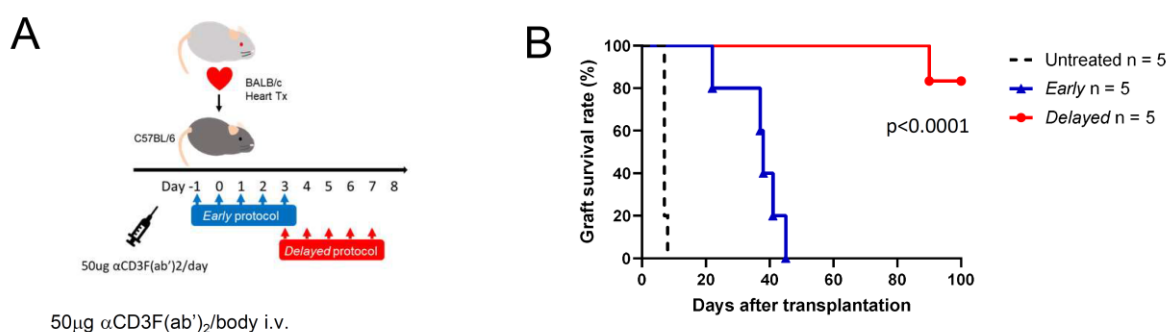


図2. α CD3F(ab')₂の非感作マウス心臓移植の効果

A: 治療プロトコルの概要図。

B: Earlyプロトコル（青三角、実線、n=5）とDelayedプロトコル（赤丸、実線、n=5）で α CD3F(ab')₂を投与したマウスと未治療（黒、点線、n=5）の心臓移植片の生存率。

28 日目に Early または Delayed プロトコルで処置したレシピエントマウスから得た GIL と脾細胞の特徴を分析し、制御性 T 細胞または別のリンパ球サブセットが移植片の生存に関与しているかを解析した。Baas らが報告(Baas et al., 2016)している CD8⁺ T 細胞の PD-1 発現と、今回新たに T 細胞疲弊化の評価として TCF1 の発現を解析・検討した。脾臓と移植片における Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ T 細胞の割合と数には、2 つの治療群間で有意差はなかった (図 3A)。PD-1⁺ TCF1^{high} CD8⁺ T 細胞の割合は、Early 群と比較して、Delayed 群の移植片で有意に高率であった (図 3B)。このサブセットの特徴を調べると、Delayed 群では Ly108 細胞の割合が有意に高率であった (図 3C)。さらに、移植後 28 日目において、Delayed 群のマウスはドナー抗原特異的な

IFN- γ 産生が減少していた個体が多かったものの、2 群間に有意差を認めなかった (図 3D)

図3

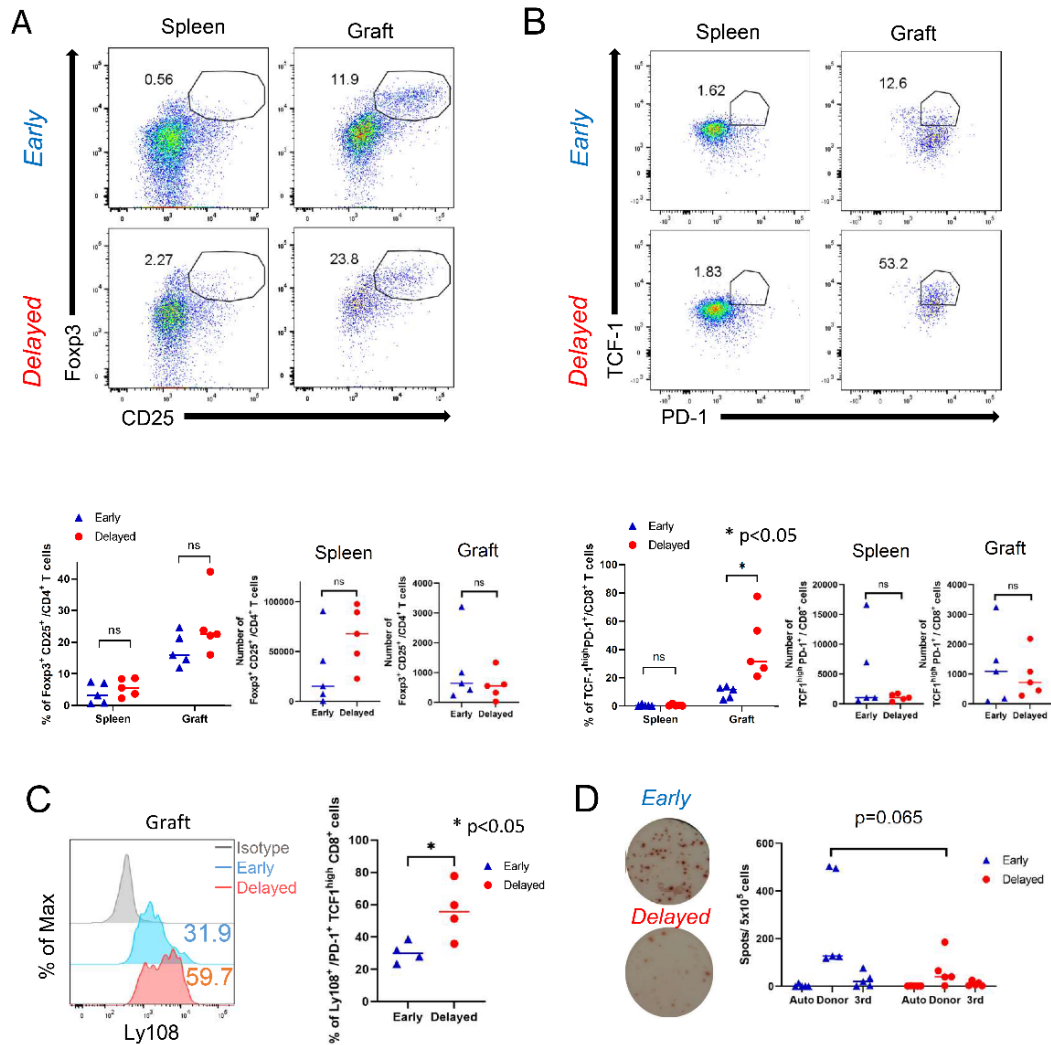


図3. α CD3F(ab')₂治療群の心臓移植28日後の脾細胞及び移植片浸潤細胞のフローサイトメトリーの結果

Early (青三角、実線、n=5) およびDelayed (赤丸、実線、n=5) α CD3F(ab')₂治療群において、移植28日後に心臓移植片および脾臓から得られたリンパ球を分析した。

- A. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ T細胞の割合と細胞数
- B. TCF1^{high} PD-1⁺ CD8⁺ T細胞の割合と細胞数
- C. TCF1^{high} PD-1⁺ CD8⁺ T細胞のLy108発現の割合
- D. 移植28日目のIFN- γ ELISpot assayの結果

これらの所見は先行研究(Goto et al., 2013)に類似していた。移植後 100 日目の移植片の組織学的所見では、Delayed 群では心筋組織間に線維化組織を認めるものの、CD3ε⁺ GIL の数は少なく観察された(図 4)。

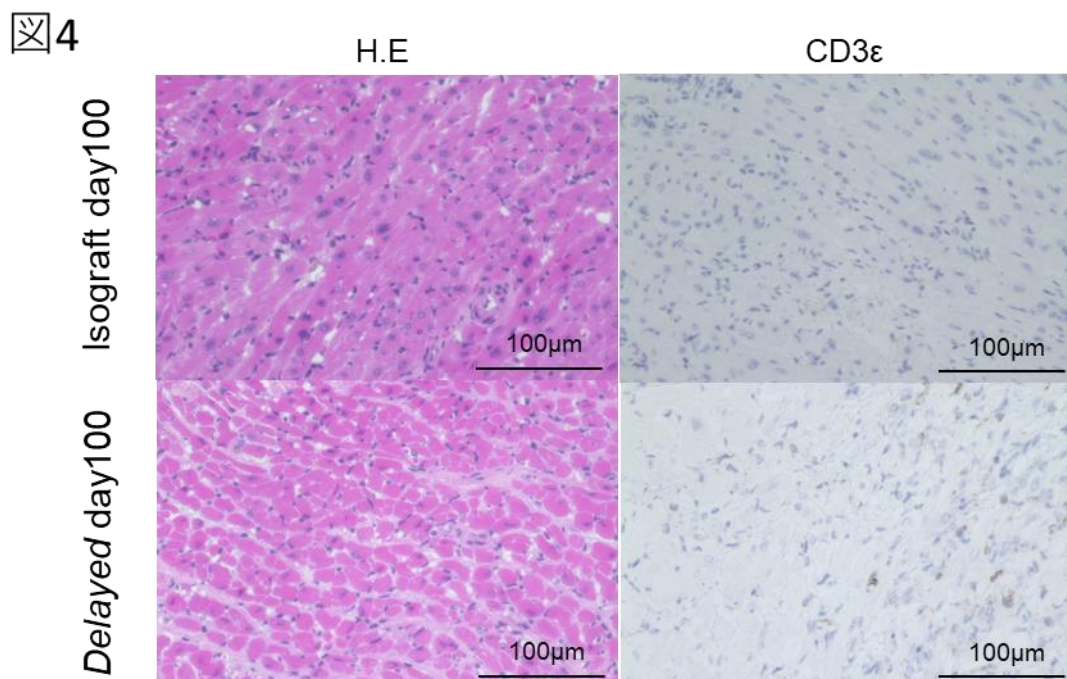


図4. αCD3F(ab')₂治療群により長期生存が得られた移植片の病理組織
αCD3F(ab')₂ Delayedプロトコールを行った移植後100日目に得られた移植片の病理組織像(400×)。ヘマトキシリン・エオジン(左列)およびビオチン化抗マウスCD3ε抗体(右列)で染色した。

アロ抗原感作レシピエントマウスへのαCD3F(ab')₂の効果の検討

BALB/c から B6 の皮膚移植または心移植 8-12 週の脾細胞を精製し、フローサイトメトリーにて T 細胞のメモリー分画の検討を行った(図 5A)。CD4⁺(上段、図 5B)および CD8⁺ T 細胞(下段、図 5B)において、CD44^{high} CD62L^{low} サブセット(エフェクター T 細胞: Tem)および CD44^{high} CD62L^{high} サブセット(セントラルメモリー T 細胞: Tcm)の割合は、心移植後の CD4⁺ Tcm を除き、naïve マウスと比較して有意に増加していた(図 5B)。さらに、心臓または皮膚移植により感作したマウスから得た脾細胞では、naïve マウスから得た脾細胞と比較して、ドナー抗原刺激に対する IFN-γ 産生が有意に増加した(図 5C)。以上の結果より、ドナー皮膚または心臓の移植いずれにおいても、ドナー抗原に対するメモリー T 細胞の生成が促進されたと考えられた。

図5

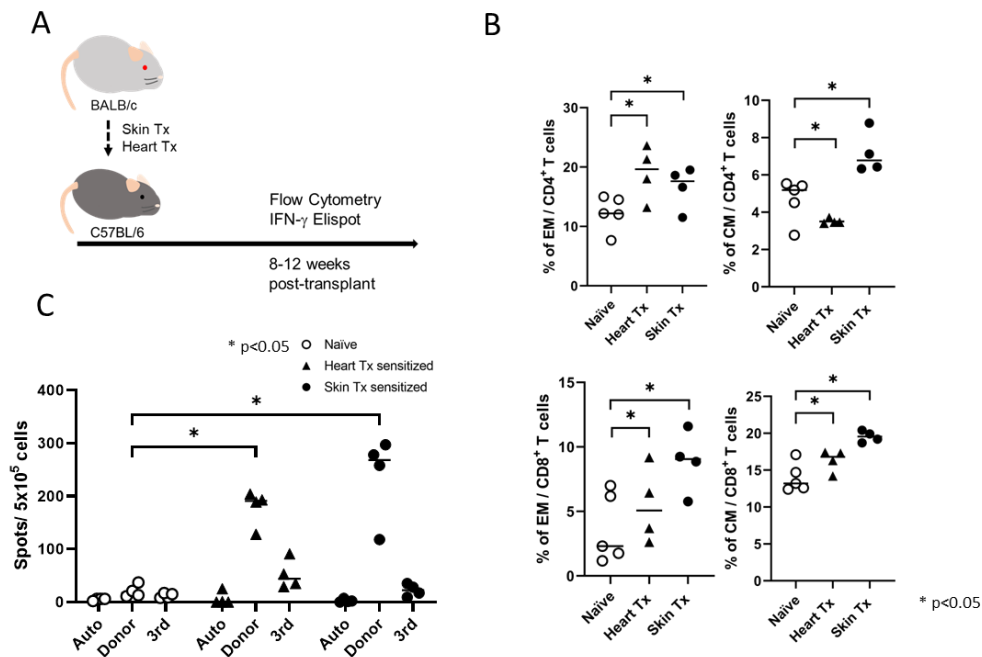


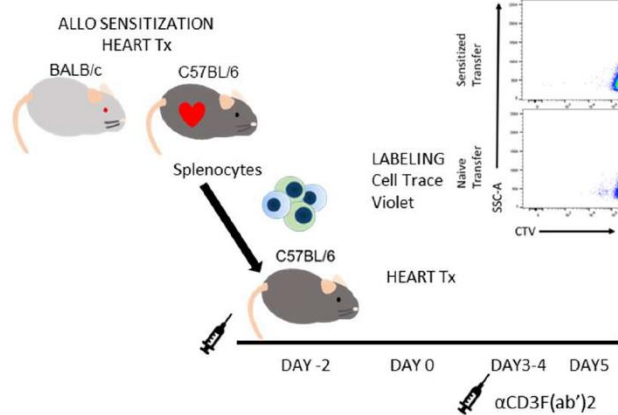
図5. 心臓、皮膚移植後のレシピエントマウスの脾細胞の解析

- A. 実験の概略図。C57BL/6マウスにBALB/cの心臓または皮膚を移植した。8～12週間後、マウスの脾細胞をフローサイトメトリーおよびIFN-γ ELISpot assayで分析した。
- B. 皮膚または心臓移植後8-12週目の脾臓におけるCD4⁺T細胞（上段）とCD8⁺T細胞（下段）の両方におけるCD44^{high} CD62L^{low}サブセット（Tem）とCD44^{high} CD62L^{high}サブセット（Tcm）の割合。*p<0.05。
- C. ELISpot Assay。ドナー抗原に対するINF-γ産生は、心臓または皮膚移植後8-12週目に分析した。

アロ抗原感作の方法として既報を参考に(Liang et al., 2010; Wu et al., 2008)、移植後マウスの脾細胞を精製し移入する方法または、同一ドナーからの再移植を行う方法論を検討した。レシピエントの B6 マウスに BALB/cマウスの心臓を移植し、移植 8 週以降に脾臓を採取した。精製した脾細胞を B6 レシピエントマウスの移植 2 日前に静脈内輸注した。移入した細胞がグラフト内に浸潤しているかどうかを確認するために、Cell Trace Violet(図 6A)を用いて移入細胞の標識を行った。まず、レシピエントマウスに移入する細胞数の検討を行った。本研究では、移入する細胞数を 5×10^6 個、 10×10^6 個、 15×10^6 個の 3 群に分け、グラフト生着期間を最も短縮させる細胞数を採用することとした。 15×10^6 個の細胞数を移入した群でグラフトサバイバルが有意に短縮した(図 6B)。

図6

A



B

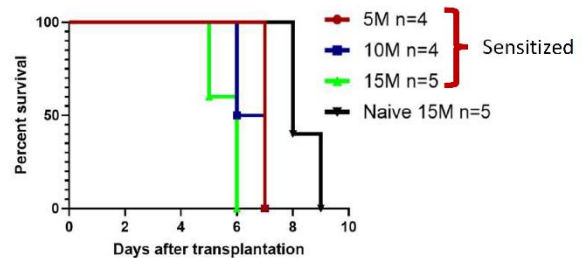


図6. 細胞移入感作マウスの移植片の生存曲線

A. 実験の概略図

B. BALB/cの心臓移植で感作したB6から採取した脾細胞を、他のB6レシピエントに輸注し、BALB/cの心臓移植した移植片を輸注細胞数で比較した。

移入する細胞数に依存してレシピエントのアロ反応性が増強することは報告されている(Honjo et al., 2006)。このモデルに対して α CD3F(ab')₂ の効果の検証を行った。Naïve マウスで長期グラフトサバイバルが得られた Delayed プロトコールとの比較を行ったところ、Delayed 群の 5 匹中 3 匹で 100 日以上長期生存が得られた(図 7)。

図7

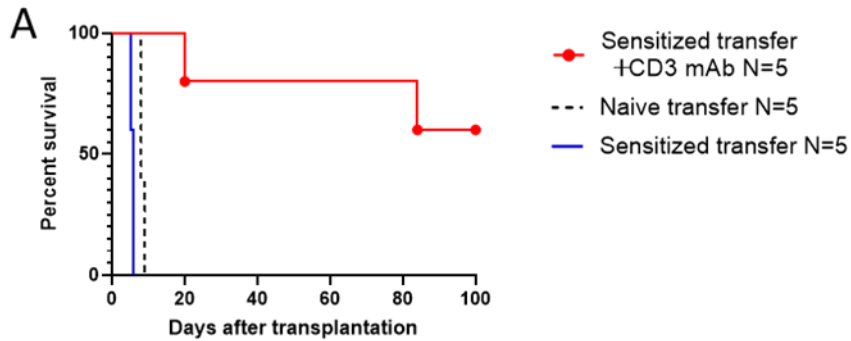


図7. 脾細胞移入マウスに対する α CD3F(ab')₂治療の効果
 感作脾細胞輸注+Delayedプロトコール群(赤丸、実線)、
 Naïve脾細胞輸注群(黒、点線)、感作脾細胞輸注群(青、実線)の移植片の生存曲線を示す。

移入した細胞が移植片の拒絶反応に影響を与えているのか、GIL 中に移入細胞の有無について検討を行った。移植前に輸注した脾細胞は移植 3 日目においても少数であるがグラフト内に存在していることがわかった(図 8A)。しかし、移植 5 日目においては感作マウスの GIL においても $CD3\epsilon^+ TCR\beta^+$ の減少を認め除去が起きていた(図 8B)。

8

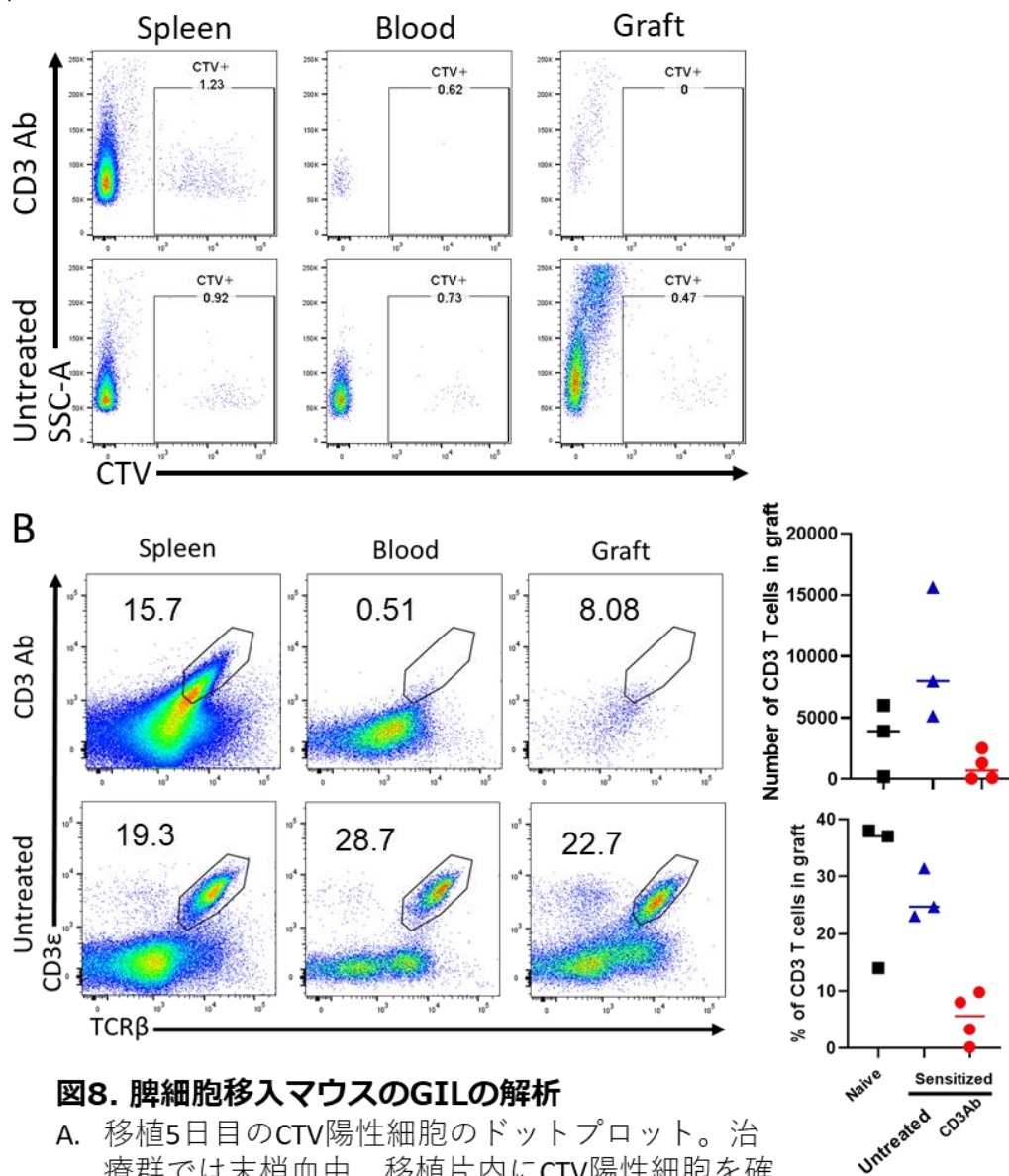


図8. 脾細胞移入マウスのGILの解析

- 移植5日目のCTV陽性細胞のドットプロット。治療群では末梢血中、移植片内にCTV陽性細胞を確認できない。
- 移植5日目のGILのフローサイトメトリーの結果 (CD3ε陽性細胞の割合と数)。治療群ではT細胞の浸潤が抑制されている。

長期生存が得られたマウスの 100 日目の GIL において制御性 T 細胞の存在をフローサイトメトリーで解析した。100 日目の GIL には細胞数自体が少ないものの、 $\text{Foxp3}^+ \text{CD25}^+ \text{CD4}^+$ T 細胞の存在は確認することができた(図 9)。

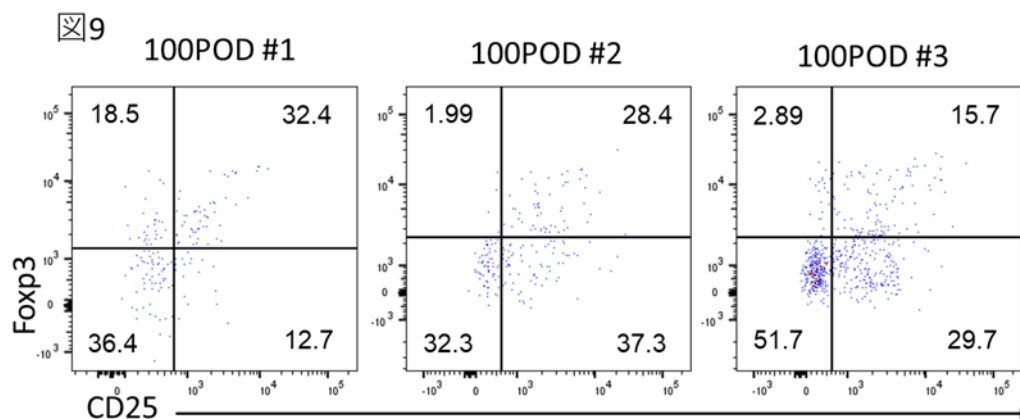


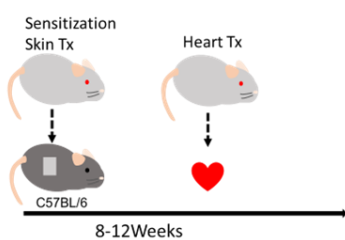
図 9. 脾細胞移入マウスの $\alpha\text{CD3F(ab')}_2$ 治療群において長期生存が得られた3個体の GILの解析

以上より、細胞移入によるアロ感作では、 $\alpha\text{CD3F(ab')}_2$ Delayed プロトコールにより移植片の長期生存が得られた。この結果は、標識に用いた CTV の細胞毒性の影響は無視できない。一方でセントラルメモリーCD8T細胞が移植片生着に保護的効果があると報告もある(Krupnick et al., 2014). $\alpha\text{CD3F(ab')}_2$ がアロ感作レシピエントに有効であることを示すにはより強力なアロ感作レシピエントで調べる必要があると考えた。

そこで、皮膚移植による感作後に心臓の再移植モデルで検討を行った(図 10A)。既報と同様に、BALB/c 心移植片の拒絶反応は感作群で有意に促進された(MST 5 日、 $p=0.0002$ vs Naïve 群、図 10B)(Wu et al., 2008)。

図 10

A



B

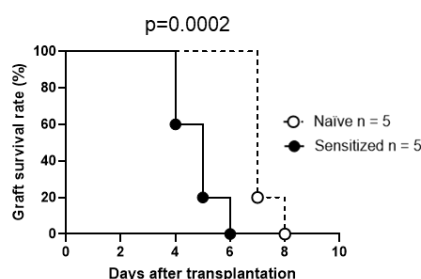


図 10. 感作マウスに対する心臓再移植の移植片生存曲線

A. 実験の概略図。

B. Naïveマウス(白丸、点線)と感作マウス(黒丸、実線、MST 5日、 $p=0.0002$ v.s Naïve群)の移植片生着率。

実験は、1群あたり5匹のマウスを用いて、少なくとも3回独立して行われた。

さらに、移植後 3 日目の感作マウスでは、移植片の組織所見でも $CD3\epsilon^+$ 細胞が多数観察された(図 11A および B)。フローサイトメトリーで解析すると $CD3\epsilon^+$ GIL の数が有意に増加していた(図 11C)。

図11

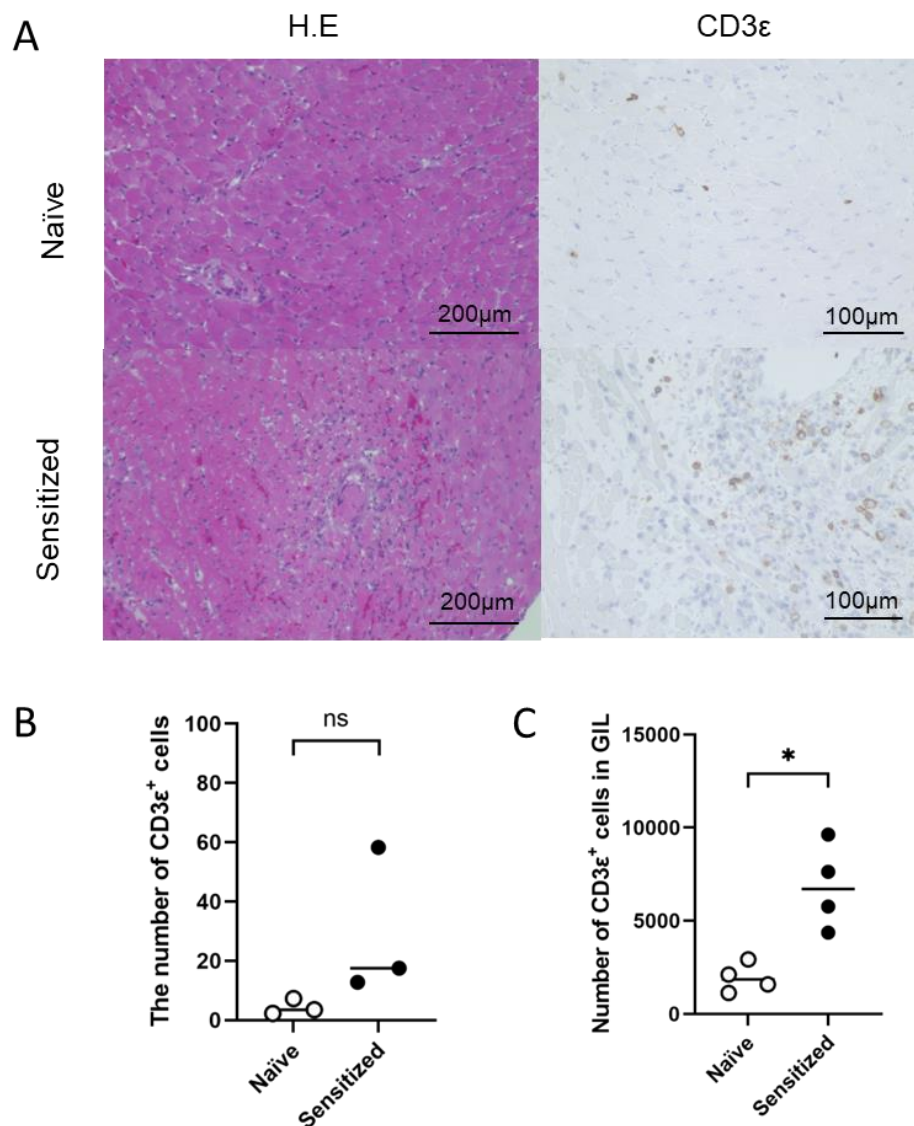


図11. アロ感作マウスの移植後3日目の移植片の解析

- A. 移植後3日目のnaïveマウス(上段)と皮膚感作マウス(下段)の移植片の組織病理学的画像。ヘマトキシリン・エオジン染色(200倍)およびビオチン化抗マウスCD3ε抗体(400倍)で染色した切片画像。
- B. 移植後3日目に、皮膚感作マウスの移植片内のCD3ε陽性細胞の1視野内(400倍)カウント数
- C. 移植後3日目に、皮膚感作マウスの移植片内のCD3ε陽性細胞のフローサイトメトリーの結果

移植後 3 日目の移植片拒絶反応は始まったばかりであったため、移植片拒絶反応の所見は明確ではなかった。しかし、8 日目の組織学的所見では、心移植片内に多

数の細胞浸潤を認め、移植片拒絶反応が観察された(図 12)。

図12

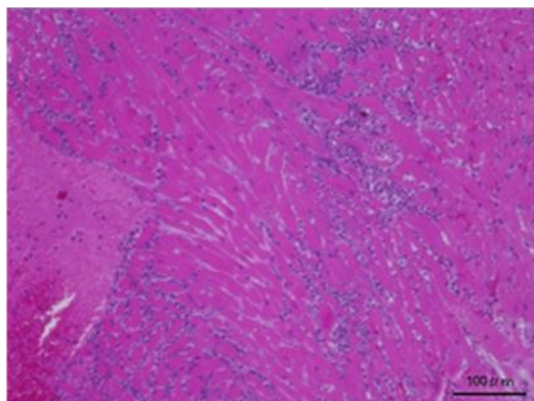


図12. アロ感作マウスの移植後8日目の移植片の病理組織画像(H.E染色)

これら結果は、ドナー皮膚感作が脾臓における T 細胞の記憶サブセットの分布を変化させ、ドナー抗原に対する免疫反応を亢進させて移植片の生存期間を短縮させたことを示している。抗 CD3 療法が感作レシピエントマウスにおける移植片の生存期間を延長するかどうかを調べるために、感作レシピエントマウスに α CD3F(ab')₂ Early プロトコルまたは Delayed プロトコルを採用した(図 13A)。Early プロトコルは感作レシピエントの移植片生存期間をわずかに延長し(n=5、MST=10 日、青線、p<0.01 vs. 感作群、図 13B)、一方、Delayed プロトコルは移植片生存期間の延長を促進できなかった(n=5、MST=5 日、赤線、p=0.313 vs. 感作群)。従って、感作マウスに対する α CD3F(ab')₂ 療法の影響は、naïve マウスで観察されたものとは同じではなかった。

図13

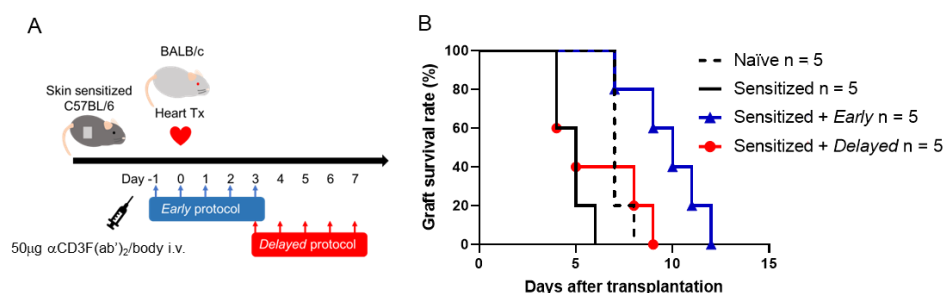


図13. 感作マウス心臓移植に対する α CD3F(ab')₂の効果

- A. 実験の概略図
B. Earlyプロトコル(青三角、実線、n=5)とDelayedプロトコル(赤丸、実線、n=5)で α CD3F(ab')₂を投与したマウスと感作未治療(黒、実線、n=5)、naïveマウス(黒、点線、n=5)の心臓移植片の生存率。

アロ感作マウスの移植片浸潤細胞の検討

アロ感作モデルでは、上述のように、これまでのプロトコルでは移植片の長期生存

を得ることができなかった。感作条件下では、naïve 条件下と比較して、移植後早期にアロ反応性 T 細胞が活性化され、移植片に浸潤すると考えられる。応答した記憶 T 細胞の特異的なマーカーを調べるために、移植直後に増殖した T 細胞集団の特徴を調べた。まず、放射線照射したドナー系統のマウス脾細胞と共培養した感作マウスから得られた T 細胞をフローサイトメトリーで解析した。感作マウスの脾細胞は、ドナー抗原の再刺激により増殖 CD8⁺ T 細胞の割合が有意に高かった (n=3-4, p=0.0069, vs. naïve 脾細胞、図 14A)。T 細胞の分化、成熟に関わる転写因子である TCF1 の違いについても解析したところ、感作脾細胞における増殖 CD8⁺ T 細胞は、TCF1^{low} PD-1⁺ という特異的な表現型を示した (図 14B)。

図14

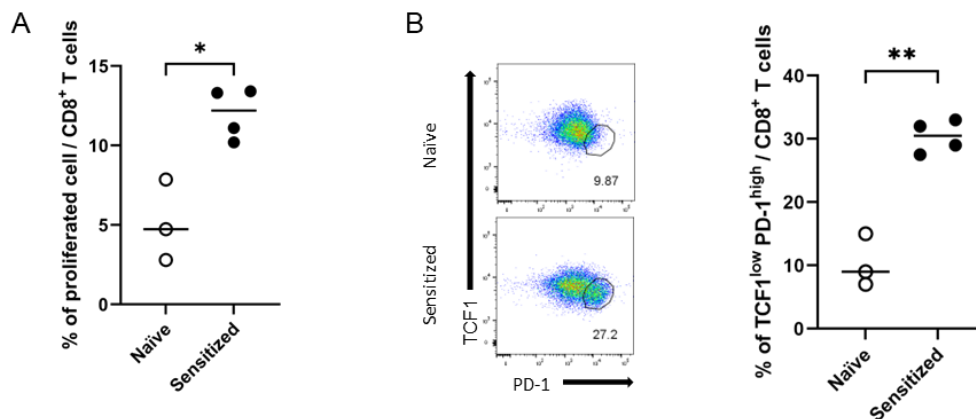


図14. アロ感作マウスの脾臓のTCF1発現

- A. MLRにおける感作マウスの増殖CD8⁺ T細胞の割合
 B. 増殖CD8⁺ T細胞におけるTCF1^{low}PD-1⁺の割合。感作群では、増殖CD8⁺ T細胞の割合と増殖CD8⁺ T細胞におけるTCF1^{low}PD-1⁺の割合(B)が有意に高かった(いずれの実験もn=3-4、p<0.01、*p<0.001、vs. Naïve群)。

In vivo においても同様の結果が得られるか、アロ感作マウスに同一ドナーの心移植を行い、移植後 3 日目の心移植片に含まれる CD8⁺ T 細胞を解析した。結果 TCF1^{low} PD-1⁺の集団が naïve マウスに比べて感作マウスで増加していた (図 15A)。このサブセットが、急性拒絶に関与するエフェクター細胞の可能性を考え、T-bet と EOMES の発現レベルを評価したところ、高発現を示し (図 15B)、このサブセットがエフェクター T 細胞の可能性が示唆された。

図15

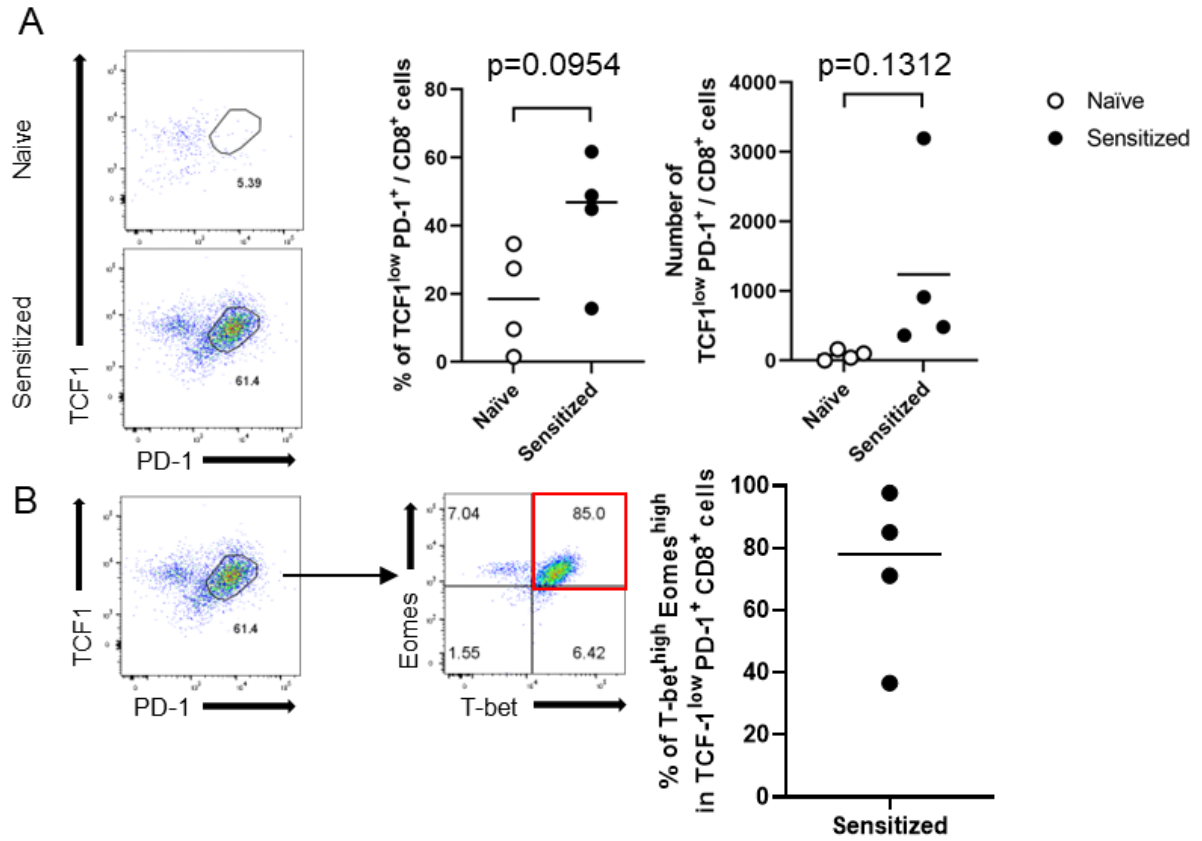


図15. アロ感作マウスのGILの解析

- A. 移植片内のCD8⁺ T細胞におけるTCF1^{low}PD-1⁺の頻度は、Naive群よりも高かった(n=4、p=0.0954、v.s Naive群)。
- B. TCF1^{low}PD-1⁺ CD8⁺ 細胞中のEomesかつT-bet陽性の割合

移植後3日目に浸潤するCD8⁺ T細胞のサイトカイン産生について感作群とnaïve群で検討を行った。IFN- γ の産生は群間で有意な差はなかったが(図16.A)、移植片では感作群において有意に多くのGranzyme B発現CD8⁺ T細胞が観察された(図16.B)。これらの結果から、感作マウスでは細胞傷害性CD8⁺ T細胞がより早期に移植片に浸潤したことが示唆された。移植後3日以内に浸潤したこれらのCD8⁺ T細胞は細胞傷害性を有しており、同種移植片の拒絶に関与する可能性があると考えられた。

図16

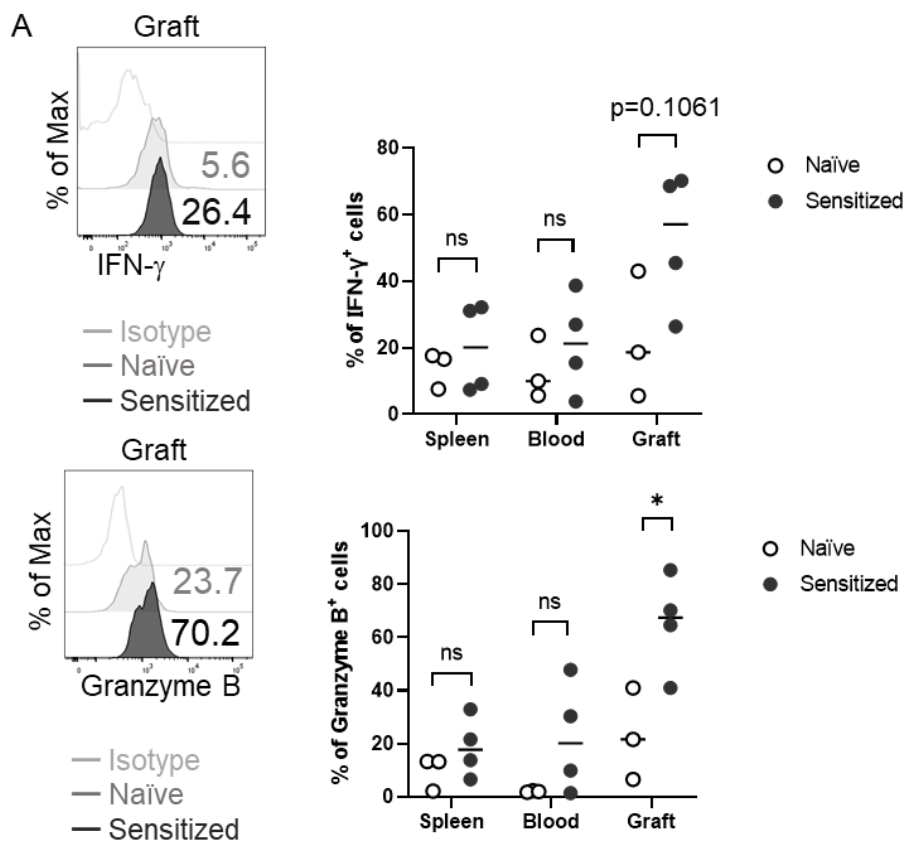


図16. 感作マウスのGILの細胞障害性マーカーの解析

- A. 移植後3日目の末梢血、脾臓、移植片におけるIFN- γ 産生CD8⁺ T細胞の割合
 B. 移植後3日目の末梢血、脾臓、移植片におけるgranzyme B発現CD8⁺ T細胞の割合

*p<0.05。各データは3-4回の独立した実験から得られた。

アロ感作マウスに対する α CD3F(ab')₂ 療法の最適化の検討

次に、治療効果を最大化するための投与時期の検討を行った。 α CD3F(ab')₂ は naïve マウスにおいて、移植後の投与が有効であったが、感作モデルでは Delayed 群に移植片生存の延長効果は認めなかった。この結果は、移植後 3 日目の時点で拒絶に関わる GIL がすでに存在していたことに矛盾しない。アロ感作後であっても、移植後早期に浸潤する細胞を許容したプロトコルが可能かについて、移植片の生存を促進するための抗 CD3 療法開始時期の有効性を分析した(図 17.A)。注目すべきことに、 α CD3F(ab')₂ の投与を 1 日目から開始する(Day1 プロトコル)と、移植片の生存期間が有意に延長した(n=5、p=0.001 vs. Delayed 群、図 17.B)。移植後 8 日目の GIL と脾細胞を分析したところ、移植片中の CD3⁺細胞の割合に 2 つの治療群間で有意差はなかった(図 17.C)。Naïve 条件下で検討した GIL 中の制御性 T 細胞、疲弊化 T 細胞が感作下においても移植片保護に関連があるのか調べた。移植片中の Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ T 細胞の割合は、Delayed プロトコル群と比較して、Day1 プロトコル群で有意に増加した(n=4、p=0.042、図 18)。

図 17

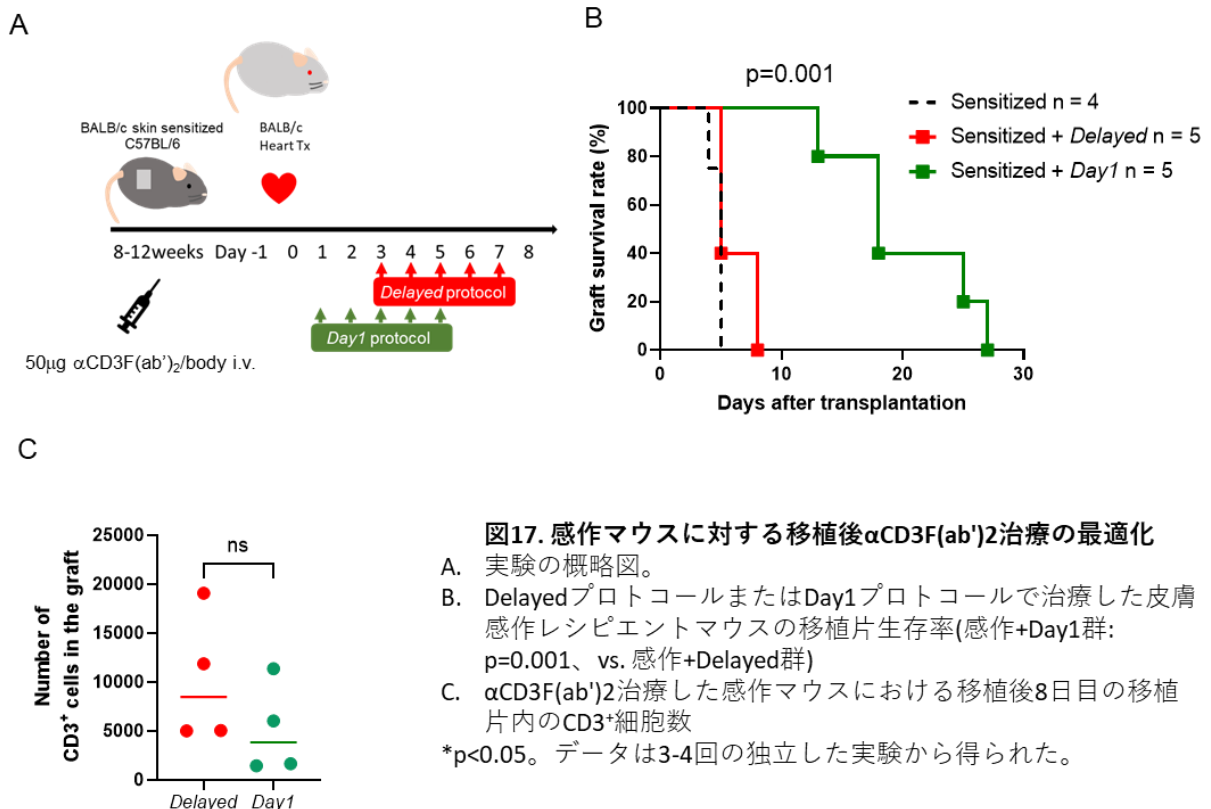


図18

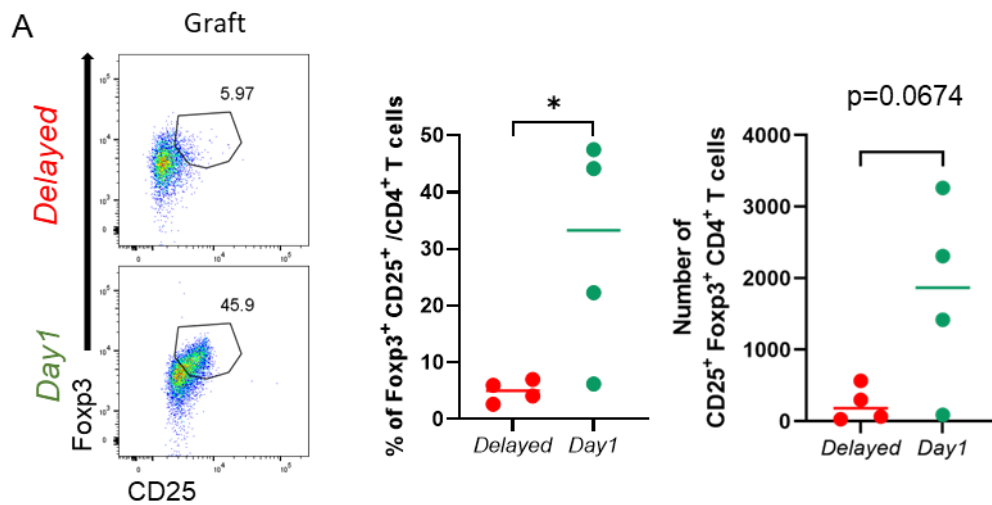


図18. α CD3F(ab')₂を投与した感作マウスにおける移植後8日目のGILのFoxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ T細胞の割合と細胞数
 *p<0.05。データは3-4回の独立した実験から得られた。

細胞数については2群間に有意差はなかったものの、アロ感作の条件下においても移植片内に制御性T細胞を誘導され、高い割合で存在していた。この結果は、制御性T細胞は抗体治療によるリンパ球除去作用やアポトーシスに対して抵抗性を有する特徴を示唆していると考えた。

さらに、TCF1^{high} PD-1⁺ CD8⁺ T細胞の割合は、両群間で同程度であった(図19.A)。さらに、この細胞集団は、1日目群ではLy108の割合が有意に高いという特徴を有していた(図19.B)。このように、Day1プロトコールはnaïve条件下と同様にGILの組成を移植片保護的なリンパ球サブセットに変化させ、感作条件下での移植片の生存期間の延長につながった。

図19

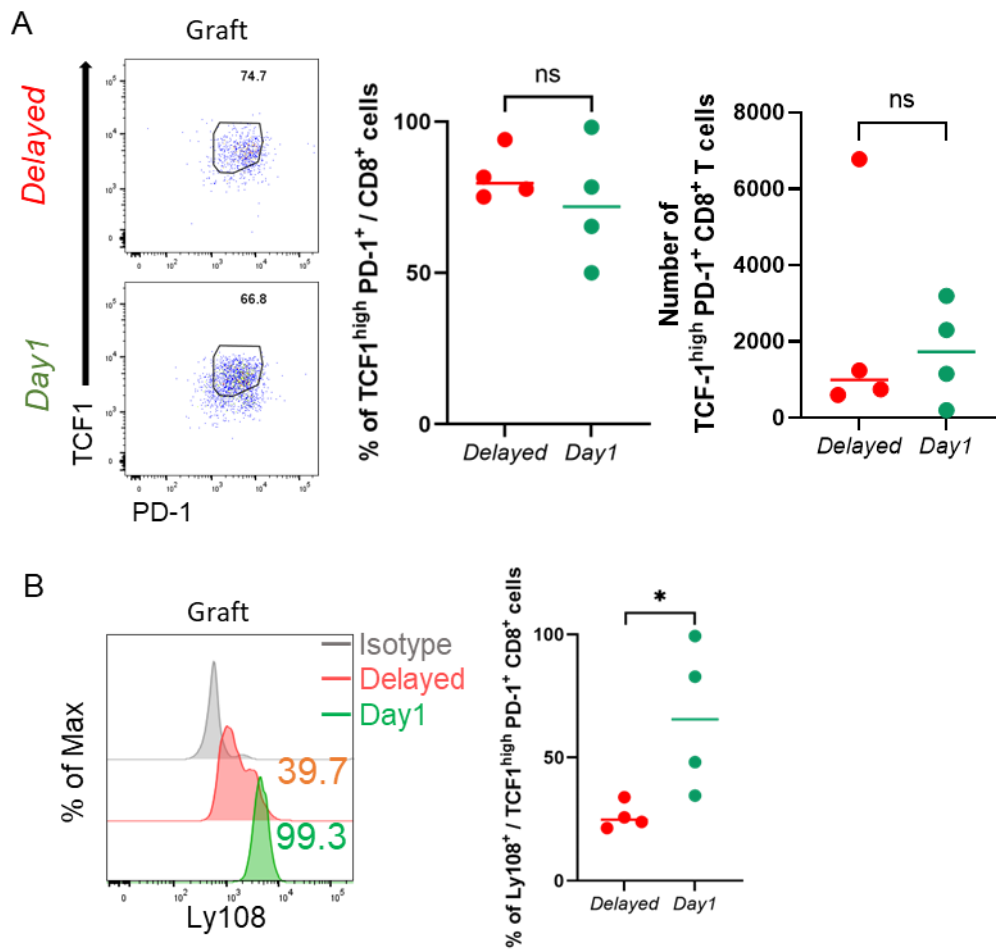


図19. αCD3F(ab')₂を投与した感作マウスにおける移植後8日目のGILの解析

A. TCF1高発現PD-1⁺ CD8⁺ T細胞の割合と細胞数

B. 感作+Day1群におけるLy108⁺ TCF-1^{high} PD-1⁺ CD8⁺ T細胞の割合は、感作+Delayed群よりも有意に高かった

*p<0.05。データは3-4回の独立した実験から得られた。

考察

α CD3F(ab')₂ は、NOD マウスを用いた自己免疫疾患モデルで利用されており、臨床試験では 1 型糖尿病の進行を抑える可能性が示されてきた(Herold et al., 2002; Herold et al., 2013; Keymeulen et al., 2005; Hagopian et al., 2013; Sherry et al., 2011)。げっ歯類の移植モデルにおいて、 α CD3F(ab')₂ の免疫学的効果は、FasL を介する経路を介して移植片対して攻撃性を有した活性化された CD8⁺ T 細胞を選択的に枯渇させ、移植片の長期生存を誘導することが報告されている(Penaranda et al., 2011; Baas et al., 2016)。本研究では、 α CD3F(ab')₂ の Delayed プロトコールが、アロ移植には厳しいマウスの組み合わせの場合でも、移植片生着を促進することが示された(図 2B)。さらに、ドナー感作マウスでは、従来の Delayed プロトコールと比較して、移植後 3 日以内に GIL の反応性と細胞障害性が上昇した。しかし、 α CD3F(ab')₂ の Delayed プロトコールを変更することで、効果は限定的ではあるが、感作条件下での移植片生存期間を延長することができた(図 13B)。 α CD3F(ab')₂ の Delayed プロトコールを用いた以前の研究では、心臓移植モデルにおいて移植片の生存期間を延長するのに重要な、移植片内の制御性 CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞の存在が明らかにされている(Goto et al., 2013)。制御性 CD4⁺ T 細胞は、アポトーシスや抗体治療の影響に対して抵抗性を示す性質を持ち(Penaranda et al., 2011; Minamimura et al., 2006; Qu et al., 2010; Chatenoud and Bluestone, 2007)、Foxp3 が FasL の発現を負に制御しているとされる(Weiss et al., 2011)。さらに、抗 CD3 療法は、CD8⁺および CD4⁺疲弊化 T 細胞に低応答性状態を維持させることが報告されており、移植片内の疲弊化 CD8⁺ T 細胞は、抑制性レセプターの発現と TGF β の産生によって移植片の保護効果を果たすとされている(Baas et al., 2016)。移植片内のこれらのリンパ球サブセットは同種反応性を抑制し、移植寛容の維持に不可欠な役割を果たしているとされる。CD3 治療によって促進される免疫寛容誘導の基礎となるメカニズムは、マウスの脾臓移植モデルにおいて、CTLA-4⁺ Foxp3⁺制御性 T 細胞および疲弊化 CD8 T 細胞と関連している(Besançon et al., 2017)。これらの知見と一致して、本研究では、naïve 条件下において、CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞と CD8⁺ TCF1^{high} PD-1⁺ T 細胞が Delayed プロトコール群で高い割合で存在していることが示された。これらの報告は、抗 CD3 療法が、制御性 T 細胞と疲弊化 T 細胞からなる免疫状態を調節することによって、移植片に保護的な環境を誘導し、その結果、移植片の長期生存を促進するという考えを支持するものである。

アロ反応性メモリー T 細胞は、特に臨床の場合において、移植寛容誘導の障壁となっている(Adams et al., 2003; Brook et al., 2006)。これまでの研究では、共刺激阻害薬を用いてこれらの問題を克服し解決しようと試みられてきた(Wu et al., 2008; Ayasoufi et al., 2013)。さらに、マウス抗胸腺細胞グロブリンを用いたリンパ球除去療

法では、アロ反応性メモリーT細胞が急速に回復するため、寛容誘導は困難であった(Ayasoufi et al., 2019)。これまでの研究で、メモリーT細胞は活性化やクローン増殖に共刺激経路のシグナルを必要としないことが示唆されている(Kaech and Ahmed, 2001)。このようにメモリーT細胞の反応の動態は明らかにされているものの、臨床的に適用できる戦略はまだ確立されていない。本研究では、 α CD3F(ab')₂の移植片内において保護環境を誘導する作用が、臓器移植におけるメモリー免疫反応を抑制するという仮説を立てた。 α CD3F(ab')₂は、T細胞を特定のサブセットにリモデリングする効果を持ち、ヒト化CD3モノクローナル抗体(テプリズマブ)を用いた1型糖尿病の臨床試験では、治療効果が最も良好であった被験者の末梢血中の機能不全CD8⁺T細胞は、EOMES、エフェクター分子、複数の抑制性レセプターの発現が増加しているという特徴が示された(Long et al., 2016)。さらに、このサブセットはテプリズマブによる治療後に拡大した。この所見は、抗CD3療法がCD8⁺T細胞の機能的応答を変化させるという考えを支持するものである(Long et al., 2016)。そこで本研究は、感作移植モデルにおいて、3日目に投与を遅らせた α CD3F(ab')₂プロトコルがこの効果を発揮するかどうかを検討した。その結果、移植後3日目から投与を開始するDelayedプロトコルは移植片拒絶反応を抑制することができず、感作マウスにおいて有益な効果を認めなかった。また、naïveマウスと感作マウスから得られた脾細胞の間で、抗原刺激後のCD8⁺T細胞の転写因子TCF1のアップレギュレーションに有意な差が観察された。すなわち、感作マウスの脾細胞では、naïve脾細胞から得られた脾細胞と比較して、増殖CD8⁺T細胞におけるTCF1の発現が有意に低かった(図11B)。特に、感作マウスの移植片では、TCF1^{low}のCD8⁺T細胞が増加していた。これまでの基礎研究(Zhou et al., 2010)や臨床研究では、TCF1はCD8⁺T細胞の分化を制御する重要な因子であることが示されている。さらに、TCF1のサイレンシングはエフェクター細胞の分化を決定する(Lin et al., 2016)。TCF1の発現が低いCD8⁺T細胞のサブセットは、エフェクターメモリー細胞に最も豊富に存在していたと報告されている(Kratchmarov et al., 2018)。慢性感染モデルでは、TCF1^{high}CD8⁺T細胞はTCF1^{low}CD8⁺T細胞へと最終分化する(Wu et al., 2016)。また、CD8⁺T細胞の機能はTCF1の発現レベルによって異なることが報告されている(Kratchmarov et al., 2018)。本研究は、感作マウスへのドナー抗原再刺激におけるTCF1の低発現が、CD8⁺T細胞におけるEOMESおよびT-betの高発現と相関することを見出した。EOMES⁺T-bet⁺CD8⁺T細胞は、急性細胞拒絶反応を引き起こすエフェクター機能と関連していると報告されている(Perez-Gutierrez et al., 2018; Gattinoni et al., 2009)。このことは、TCF1の発現が低いCD8⁺T細胞が、感作マウスにおける同種反応性と移植片拒絶反応に重要な役割を果たしていることを示唆している。さらに、これらのエフェクターT細胞を選択的に標的とする治療とDelayed CD3治療を併用することは、免疫寛容を誘導するための有望な戦略である可能性があると考えた。

本研究は、感作マウスにおいて、1 日目のプロトコールが、3 日目の Delayed プロトコール、および Early プロトコールよりも、移植片の生存を促進するのに効果的であることを示した。この結果(図 17B)は、 α CD3F(ab')₂ が病態の進行段階に依存して有益な効果を示すことから支持された(You et al., 2011)。これはまた、臨床における Fc 非結合型 CD3 治療の至適治療域を慎重に決定する必要があることを示唆している。

Naïve マウスでは、T 細胞がドナー抗原に対してプライミングされているが、移植片拒絶反応につながるような攻撃的な自己免疫反応がない、心臓移植後 3 日が有効な治療ウィンドウと考えられていた。当教室において以前、マウスの心臓移植モデルにおける移植後早期の GIL の機能に注目した(Ganchiku et al., 2021)。移植後 3 日目まで、GIL は移植片拒絶反応を促進する能力はなかった(Ganchiku et al., 2021)。さらに、移植後 24 時間以内に CD8⁺ T 細胞の移植片への浸潤が観察され(Schenk et al., 2008)、これらの CD8⁺ T 細胞は移植片内で増殖することができるが、T 細胞は移植片拒絶反応を直接的には媒介しないと考えられている(Setoguchi et al., 2013)。一方、感作条件下では、CD3 治療の治療時期を 3 日目より早く設定する必要がある。本研究は、Day1 プロトコールでも制御性 T 細胞に富む GIL が得られることを示した(図 18A)。これは初期の GIL の保存と関連している可能性がある。さらに、Day1 プロトコールが TCF1^{high} CD8⁺ T 細胞のリモデリングを誘導することを示したが、これは naïve な状況で Delayed プロトコールにより寛容を誘導したマウスのデータと同様であった(図 3B および 19A)。さらに、Ly108⁺ TCF1^{high} CD8⁺ T 細胞は、エフェクター細胞に分化できない疲弊した T 細胞の前駆細胞として同定された(Chen et al., 2021)。実際、TCF1^{high} CD8⁺ T 細胞は、Day1 プロトコールにおいても Ly108 を発現した(図 19B)。このことは、Day1 プロトコールが GIL を疲弊化した状態に移行させる可能性を示唆している。感作マウスにおける α CD3F(ab')₂ 治療の治療時期によって、治療プロトコールの有効性が異なることを明らかにした。移植片における TCF1^{high} PD-1⁺ Ly108⁺ CD8⁺ T 細胞と CD4⁺制御性 T 細胞の両方の増強が、有益な効果に関連している可能性がある。

結論

1. マウス心移植モデルにおいて、 α CD3F(ab')₂ の Delayed プロトコールは、免疫応答の強いマウス系統をレシピエントに用いた naïve 条件においても、レシピエントの移植片生着を促進させることを可能とする。過去に、同プロトコールで本研究のレシピエント、ドナーマウスの組合せの報告はなく、移植免疫研究で使用可能な移植実験モデルである。
2. ドナー皮膚または心臓の移植により、レシピエントのメモリーT 細胞分画が増加し、ドナー抗原刺激に対する IFN- γ 産生が促進され、皮膚移植でもレシピエントのアロ抗原感作は可能であった。
3. アロ感作の方法として細胞移入と皮膚再移植を行った。後者において、感作群で移植片の拒絶が有意に促進され、CD3 ϵ^+ GIL の数が増加するため、GIL の解析には有用であった。感作マウスに対する α CD3F(ab')₂ 療法の効果は、naïve マウスとは異なっていた。アロ感作下、すなわちアロ反応性メモリーT 細胞存在下に α CD3F(ab')₂ 療法を使用した報告はなく、移植片の生着には至らない結果ではあるが、知見としては重要であり、強力なメモリーT 細胞の反応を解析する上で有用な実験手法と考える。
4. 感作マウスにおいて、移植後早期に TCF1^{low}PD-1⁺ CD8⁺ T 細胞が移植片に浸潤する。この細胞集団は、T-bet と EOMES の高発現を有しており、急性拒絶に関わるエフェクター細胞と考えられた。同一細胞集団ではないが、感作マウスの 3 日目の GIL の CD8⁺T 細胞は Granzyme B を高発現しており、移植後拒絶反応の治療標的となるT細胞と考える。
5. 感作マウスにおいて、 α CD3F(ab')₂ の投与を移植後 1 日目から開始する Day1 プロトコールは、移植片の生存期間を有意に延長し、移植片内の PD-1⁺ TCF1^{high} Ly108⁺ CD8⁺ T 細胞の割合を増加させた。この細胞亜集団が移植片に対して保護的に関与した可能性が示唆され、機能的解析や誘導メカニズムについて今後の研究が期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々のご支援とご協力を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

まず、本研究の遂行と論文作成の全過程において、終始丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました消化器外科 I 教室教授 武富紹信 先生、講師 後藤了一 先生に心より感謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、実験機器の使用や実験方法について多大なるご協力をいただきました消化器外科 I 教室の皆様に熱く御礼申し上げます。

最後に、本研究の一部は日本学術振興科学研究費(19K22646)の助成を受けて行われました。ここに記して感謝の意を表します。

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

- Acuna, S. A. (2018) Etiology of increased cancer incidence after solid organ transplantation. *Transplant Rev (Orlando)* 32: 218–224.
- Adams, A. B., M. A. Williams, T. R. Jones, N. Shirasugi, M. M. Durham, S. M. Kaech, E. J. Wherry, T. Onami, J. G. Lanier, K. E. Kokko, et al (2003) Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest* 111: 1887–1895.
- Ayasoufi, K., H. Yu, R. Fan, X. Wang, J. Williams, and A. Valujskikh. (2013) Pretransplant antithymocyte globulin has increased efficacy in controlling donor-reactive memory T cells in mice. *Am J Transplant* 13: 589–599.
- Ayasoufi, K., D. B. Zwick, R. Fan, S. Hasgur, M. Nicosia, V. Gorbacheva, K. S. Keslar, B. Min, R. L. Fairchild, and A. Valujskikh. (2019) Interleukin-27 promotes CD8⁺ T cell reconstitution following antibody-mediated lymphoablation. *JCI Insight* 4.
- Baas, M., A. Besancon, T. Goncalves, F. Valette, H. Yagita, B. Sawitzki, H. D. Volk, E. Waackel-Enee, B. Rocha, L. Chatenoud, et al (2016) TGFbeta-dependent expression of PD-1 and PD-L1 controls CD8(+) T cell anergy in transplant tolerance. *Elife* 5: e08133.
- Besancon, A., M. Baas, T. Goncalves, F. Valette, H. Waldmann, L. Chatenoud, and S. You. (2017) The Induction and Maintenance of Transplant Tolerance Engages Both Regulatory and Anergic CD4(+) T cells. *Frontiers in immunology* 8: 218–218.
- Brook, M. O., K. J. Wood, and N. D. Jones. (2006) The impact of memory T cells on rejection and the induction of tolerance. *Transplantation* 82: 1–9.
- Chatenoud, L., E. Thervet, J. Primo, and J. F. Bach. (1994) Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 123–127.
- Chatenoud, L., J. Primo, and J. F. Bach. (1997) CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice. *J Immunol* 158: 2947–2954.
- Chatenoud, L., and J. A. Bluestone. (2007) CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 7: 622–632.
- Chen, Y., R. A. Zander, X. Wu, D. M. Schauder, M. Y. Kasmani, J. Shen, S. Zheng, R. Burns, E. J. Taparowsky, and W. Cui. (2021) BATF regulates progenitor to cytolytic effector CD8(+) T cell transition during chronic viral infection. *Nat Immunol* 22: 996–1007.

Cosimi, A. B., R. B. Colvin, R. C. Burton, R. H. Rubin, G. Goldstein, P. C. Kung, W. P. Hansen, F. L. Delmonico, and P. S. Russell. (1981) Use of monoclonal antibodies to T-cell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts. *N Engl J Med* 305: 308–314.

Ganchiku, Y., R. Goto, R. Kanazawa, T. Ota, K. Shibuya, Y. Fukasaku, N. Kobayashi, R. Igarashi, N. Kawamura, M. Zaitzu et al (2021) Functional roles of graft-infiltrating lymphocytes during early-phase post-transplantation in mouse cardiac transplantation models. *Transplant Int* 34: 2547–2561.

Gattinoni, L., X. S. Zhong, D. C. Palmer, Y. Ji, C. S. Hinrichs, Z. Yu, C. Wrzesinski, A. Boni, L. Cassard, L. M. Garvin et al (2009) Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8⁺ memory stem cells. *Nat Med* 15: 808–813.

Goto, R., S. You, M. Zaitzu, L. Chatenoud, and K. J. Wood. (2013) 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.

Hagopian, W., R. J. Ferry, Jr., N. Sherry, D. Carlin, E. Bonvini, S. Johnson, K. E. Stein, S. Koenig, A. G. Daifotis, K. C. Herold et al (2013) Teplizumab preserves C-peptide in recent-onset type 1 diabetes: two-year results from the randomized, placebo-controlled Protégé trial. *Diabetes* 62: 3901–3908.

Heeger, P. S., N. S. Greenspan, S. Kuhlenschmidt, C. DeJelo, D. E. Hricik, J. A. Schulak, and M. Tary-Lehmann. (1999) Pretransplant frequency of donor-specific, IFN- γ -producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J Immunol* 163: 2267–2275.

Herold, K. C., W. Hagopian, J. A. Auger, E. Poumian-Ruiz, L. Taylor, D. Donaldson, S. E. Gitelman, D. M. Harlan, D. Xu, R. A. Zivin et al (2002) Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 346: 1692–1698.

Herold, K. C., S. E. Gitelman, M. R. Ehlers, P. A. Gottlieb, C. J. Greenbaum, W. Hagopian, K. D. Boyle, L. Keyes-Elstein, S. Aggarwal, D. Phippard et al (2013) Teplizumab (anti-CD3 mAb) treatment preserves C-peptide responses in patients with new-onset type 1 diabetes in a randomized controlled trial: metabolic and immunologic features at baseline identify a subgroup of responders. *Diabetes* 62: 3766–3774.

Honjo, K., X. Yan Xu, J. A. Kapp, and R. P. Bucy (2004) Evidence for cooperativity in the rejection of cardiac grafts mediated by CD4 TCR Tg T cells specific for a defined allopeptide. *Am J Transplant* 4: 1762–1768.

Iwakoshi, N. N. (2000) Treatment of allograft recipients with donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody leads to deletion of alloreactive CD8 T cells and prolonged graft survival in a CTLA4-dependent manner. *J Immunol* 164: 512–521.

Kaech, S. M., and R. Ahmed. (2001) Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. *Nat Immunol* 2: 415–422.

Kohm, A. P., J. S. Williams, A. L. Bickford, J. S. McMahon, L. Chatenoud, J. F. Bach, J. A. Bluestone, and S. D. Miller. (2005) Treatment with nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody induces CD4⁺ T cell unresponsiveness and functional reversal of established experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 174: 4525–4534.

Kratchmarov, R., A. M. Magun, and S. L. Reiner. (2018) TCF1 expression marks self-renewing human CD8(+) T cells. *Blood Adv* 2: 1685–1690.

Krupnick, A. S., X. Lin, W. Li, R. Higashikubo, B. H. Zinselmeyer, H. Hartzler, K. Toth, J. H. Ritter, M. Y. Berezin, S. T. Wang et al (2014) Central memory CD8⁺ T lymphocytes mediate lung allograft acceptance. *J Clin Invest* 124: 1130–1143.

Liang, H., C. Liao, Z. Qi, C. Sha, B. Xie, J. Chen, J. Xia, Y. Wang, Q. Yao, and Y. Zhao. (2010) Rapamycin or tacrolimus alone fails to resist cardiac allograft accelerated rejection mediated by alloreactive CD4(+) memory T cells in mice. *Transpl Immunol* 22: 128–136.

Lin, W. W., S. A. Nish, B. Yen, Y. H. Chen, W. C. Adams, R. Kratchmarov, N. J. Rothman, A. Bhandoola, H. H. Xue, and S. L. Reiner. (2016) CD8(+) T Lymphocyte Self-Renewal during Effector Cell Determination. *Cell Rep* 17: 1773–1782.

Long, S. A., J. Thorpe, H. A. DeBerg, V. Gersuk, J. Eddy, K. M. Harris, M. Ehlers, K. C. Herold, G. T. Nepom, and P. S. Linsley. (2016) Partial exhaustion of CD8 T cells and clinical response to teplizumab in new-onset type 1 diabetes. *Sci Immunol* 1.

Minamimura, K., W. Gao, and T. Maki. (2006) CD4⁺ regulatory T cells are spared from deletion by antilymphocyte serum, a polyclonal anti-T cell antibody. *J Immunol* 176: 4125–4132.

Neujahr, D. C., C. Chen, X. Huang, J. F. Markmann, S. Cobbold, H. Waldmann, M. H. Sayegh, W. W. Hancock, and L. A. Turka. (2006) Accelerated Memory Cell

Homeostasis during T Cell Depletion and Approaches to Overcome It. *J Immunol* 176: 4632.

Penaranda, C., Q. Tang, and J. A. Bluestone. (2011) Anti-CD3 therapy promotes tolerance by selectively depleting pathogenic cells while preserving regulatory T cells. *J Immunol* 187: 2015–2022.

Perez-Gutierrez, A., D. M. Metes, L. Lu, S. Hariharan, A. W. Thomson, and M. B. Ezzelarab. (2018) Characterization of eomesodermin and T-bet expression by allostimulated CD8(+) T cells of healthy volunteers and kidney transplant patients in relation to graft outcome. *Clin Exp Immunol* 194: 259–272.

Qu, Y., B. Zhang, S. Liu, A. Zhang, T. Wu, and Y. Zhao. (2010) 2-Gy whole-body irradiation significantly alters the balance of CD4⁺ CD25[–] T effector cells and CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T regulatory cells in mice. *Cell Mol Immunol* 7: 419–427.

Sherry, N., W. Hagopian, J. Ludvigsson, S. M. Jain, J. Wahlen, R. J. Ferry, Jr., B. Bode, S. Aronoff, C. Holland, D. Carlin et al (2011) Teplizumab for treatment of type 1 diabetes (Protégé study): 1-year results from a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 378: 487–497.

Schenk, A. D., T. Nozaki, M. Rabant, A. Valujskikh, and R. L. Fairchild. (2008) Donor-reactive CD8 memory T cells infiltrate cardiac allografts within 24-h posttransplant in naive recipients. *Am J Transplant* 8: 1652–1661.

Setoguchi, K., Y. Hattori, S. Iida, W. M. Baldwin, 3rd, and R. L. Fairchild. (2013) Endogenous memory CD8 T cells are activated within cardiac allografts without mediating rejection. *Am J Transplant* 13: 2293–2307.

Tanaka, Y., H. Ohdan, T. Onoe, and T. Asahara (2004) Multiparameter flow cytometric approach for simultaneous evaluation of proliferation and cytokine-secreting activity in T cells responding to allo-stimulation. *Immunol Invest* 33: 309–324.

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

Weiss, E. M., A. Schmidt, D. Vobis, N. Garbi, K. Lahl, C. T. Mayer, T. Sparwasser, A. Ludwig, E. Suri-Payer, N. Oberle et al (2011) Foxp3-mediated suppression of CD95L expression confers resistance to activation-induced cell death in regulatory T cells. *J Immunol* 187: 1684–1691.

Wu, Z., Y. Wang, F. Gao, X. Shen, Y. Zhai, and J. W. Kupiec-Weglinski (2008) Critical role of CD4 help in CD154 blockade-resistant memory CD8 T cell activation and allograft rejection in sensitized recipients. *J Immunol* 181: 1096–1102.

Wu, T., Y. Ji, E. A. Moseman, H. C. Xu, M. Mangani, M. Kirby, S. M. Anderson, R. Hannon, E. Kenyon, A. Elkhouloun et al (2016) The TCF1-Bcl6 axis counteracts type I interferon to repress exhaustion and maintain T cell stemness. *Sci Immunol* 1.

Zhou, X., S. Yu, D. M. Zhao, J. T. Harty, V. P. Badovinac, and H. H. Xue (2010) Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity* 33: 229–240.