

論文の内容の要旨

論文題目 臍帯血 T 細胞免疫寛容の細胞分子学的機序の検討

氏名 武藤 浩司

背景

新生児は他の年代と比較して重症感染症に罹患しやすく、また罹患した際の進行が早いことから、免疫応答の弱さが疑われる。その一方で、成人では life-threatening な疾患である TSS (toxic shock syndrome) と同じ黄色ブドウ球菌産生のスーパー抗原により引き起こされる新生児 TSS 様発疹症 (NTED : neonatal TSS like exanthematous disease: NTED) や、新型コロナウイルス感染症など炎症性サイトカインが関わるある種の感染症では成人より重症化しづらい傾向も知られている。正常な妊娠期間中においても、胎児と母体は臍帯を通して、抗原となりうる異物の暴露を互に行い合うが、拒絶反応を起こすことなく共存している。このように新生児や胎児は単に免疫応答が弱いのではなく、生理的に免疫寛容の傾向にあることが疑われる。

今回の研究は、このような胎児・新生児の免疫寛容の仕組みを探究するため、臍帯血中のヘルパー T 細胞 (CD4+ T 細胞)、特に臍帯血のヘルパー T 細胞の大部分を占める Naïve CD4+ T 細胞に注目した。また先行実験で使用され、臨床面では NTED の原因であるスーパー抗原の一種の TSST-1 (toxin shock syndrome toxin-1) を reagent として用い、in vitro での TSST-1 刺激に対する臍帯血と成人末梢血の差異を観察し、免疫寛容に関わる現象の有無について評価を行う方針とした。

方法

対象症例

正期産の健常新生児を対象、健康成人例をコントロールとし、基本的に可能な限り臍帯血と成人末梢血は同時に行った。臍帯血の除外基準は、内臓奇形・染色体異常合併例のほか、母体及び胎児の免疫機能に影響を与えることが懸念される例である。

検体回収～細胞刺激

採血は全例実験担当者が、臍帯及び胎盤娩出後すぐに、臍帯静脈より臍帯血を採取し、ヘパリン入り真空採血管に分注した。

比重遠心分離法で単核球を回収し、その後、磁気ビーズ分離法で Naïve T 細胞と抗原提示細胞として用いる CD14+ monocytes を回収した。Naïve T 細胞と CD14+ monocytes を 3:1 で混合し、細胞濃度を 1×10^6 cells/ml に培養液で調整し、最終的に TSST-1 を 10 ng/ml にな

るように混合した。培養液は L-グルタミン、フェノールレッド含有の RPMI1640 に、10% FBS とストレプトマイシン、ペニシリンを混合したものをを用いた。37°C, CO₂ 濃度は 5% とし CO₂ インキュベーター内で培養を開始した（一次刺激）。TSST-1 刺激を 3 日間行い、ソーティングで回収した TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞を recombinant IL-2 で 4 日間拡大培養した。その後細胞を回収し anti-CD3/CD28 beads で再度刺激を行なった（二次刺激）。

刺激に対する細胞の変化の評価

一次刺激および二次刺激の所定の時間で細胞と培養上清を回収し、解析を行なった。

フローサイトメトリーでは細胞表面マーカーを評価したほか、細胞膜透過・固定処理を行なって FOXP3 / TCR Vbeta2 の染色を行い、CellTrace Violet を用いて、細胞増殖の評価を行なった。またフローサイトメトリーを用いて一次刺激後の活性化した TCR Vbeta2+ CD4+ T 細胞のソーティングを行なった。

培養上清は凍結保存し、後日 Bio-plex 200 システムを用いて、対象サイトカイン（IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17A, IFN- γ , GM-CSF, TGF β 1）の測定を行なった。

RNAseq の解析にあたっては、まず RNeasy Micro Kit® (QIAGEN) を用いて RNA の抽出を行い、抽出後は検体の一部で RNA の濃度及び純度の測定を行い、RNAseq での解析に十分であることを確認した。その後、150 bp, pair end の条件で NovaSeq 6000 によって次世代シーケンシングを行った。RNA-seq の解析パイプラインにより処理し、最終的に転写物のカウントデータを得た。カウントデータは R 及び GSEA software で二次解析を行った。発現変動遺伝子の解析には R の edgeR パッケージを使用した。

結果

予備実験) TSST-1 刺激後の Vbeta2+ CD4+ T 細胞の回収方法の検討

TSST-1 刺激を受けた Vbeta2+CD4+T 細胞では、刺激後数時間以降は、Vbeta2+陰性となるが、細胞表面上の CD3 と TCR が複合体を作り細胞内部に移行することを利用し、CD4+ T 細胞と同定される細胞の中で、(CD3- Vbeta2-)から(CD3+ Vbeta2+)にわたる部分を「本来の Vbeta2+ CD4+ T 細胞」として回収する手法を新たに開発した。RNAseq のデータを用いた TCR Vbeta 鎖のレバトア解析および、rIL-2 による拡大培養後のフローサイトメトリー解析により、この新手法で高純度の目的細胞を回収可能なことを証明した。

本実験) 上清サイトカイン評価

一次刺激後は IL-2 の産生に臍帯血(CB)・成人末梢血(APB)の有意差は見られなかったが、二次刺激後には CB で有意な IL-2 産生低下を認め、Naïve T 細胞自体に CB と APB の機能差があると考えられた。

一方で、IL-2 以外のサイトカインについては明確な差は見られず、抑制性サイトカインの

IL-10, TGF- β 1 が CB で産生低下するなどの現象もなかった。

本実験) フローサイトメトリー評価

細胞表面染色で一次刺激 72 時間後を対象に CCR7, CD45RA, CD45RO, CD28, PD-1, CD25 などの染色を試みた。CB と APB で特有の傾向は見られたものの、CB が免疫寛容をきたしやすいという仮説を支持する現象は見られなかった。

一方で、刺激前に CellTraceViolet 染色を行い、細胞固定処理後に FOXP3/TCRVbeta2 を行なった例では、複数の時点で CB に有意な FOXP3 の発現上昇と旺盛な細胞増殖が確認された。

本実験) RNAseq

RNAseq の対象の細胞は TCR Vbeta2+ CD4+T 細胞であり、予備実験に記載した新手法のソーティングロジックでソーティングを行なった。抽出された RNA が十分に高濃度であることを確認した。2020 年に一次刺激前、一次刺激 6 時間、一次刺激 24 時間の 3 時点を対象とした合計 45 サンプルの解析を行い、続いて 2021 年に一次刺激 72 時間後、二次刺激前、二次刺激 24 時間後の 3 時点を対象とした合計 22 サンプルの解析を行なった。

クラスタリング解析を行い、2020 年施行分は全サンプル解析対象とすること、2021 年施行分は 1 サンプルが明確な外れ値であり、それを除いて以降の解析を行うこととした。

まずは CB、APB それぞれにおいて刺激群と非刺激群（あるいは刺激前群）の二群間比較を行なった。一次刺激、二次刺激ともに、CB、APB どちらにおいても発現変動遺伝子 (DEG: differentially expressed gene) の機能は、各種エンリッチメント解析 (GO: gene ontology, KEGG, Reactome) によると細胞増殖に関わる遺伝子が多く、CB と APB の間に重複する DEG は非常に多かった。また、各時点で CB と APB の二群間比較を行ったところ、刺激後に DEG は免疫関連の遺伝子が多かった。

次に CB と APB の GSEA (gene set enrichment analysis) による二群間比較を MSigDB (Molecular Signature Database) の C7: immunologic signature gene sets に登録されている gene set を用いて行った。Normalized ES, false detective rate, p-value などランク付けされたなかで今回の実験と関連のありそうな項目を探したところ、GSE25087 の合計 8 つの gene set が該当した。これらの gene set は、2010 年の Science 誌で報告された、「ヒト胎児の 18~22 週のヒト胎児の制御性 T 細胞 (CD3+ CD4+ CD25 bright) と Naïve T 細胞 (CD3+ CD4+ CD45RA+ CCR7+ CD27+) および健康成人の同 2 種の細胞を対象にマイクロアレイを用いて比較したもの」である。本実験の刺激前の CB と APB サンプルの二群間比較では、胎児と成人の Naïve T 細胞を比較した gene set の 2 種 (発現上昇と低下) について、非常に強いエンリッチがあり、本実験の CB の Naïve T 細胞も在胎 20 週の胎児の Naïve T 細胞と非常に似た遺伝子発現を持つことが示唆された。一方で、一次刺激後に CB は胎児および成人の制御性 T 細胞に発現が多い gene set の 2 種について、強いエンリッチがありその関連は二次刺激後にまで続く

ことがわかった。

考察・結論

本研究では臍帯血と成人末梢血の Naïve T 細胞もスーパー抗原に対する刺激は異なり、臍帯血は制御性 T 細胞への分化傾向があると疑われることを、フローサイトメトリーでの FOXP3 の評価、RNAseq での GSEA などの結果から示した。また臍帯血が制御性 T 細胞への変化を起こしやすい原因としては、臍帯血と肝臓での造血が主体の胎児血の関連があることも GSEA の結果から考えられる。

一方で、抑制性サイトカインの産生については有意差がないこと、二次刺激後には機能面の評価が行えないこと、制御性 T 細胞への分化と IL-2 産生低下の関連がわからないことなどの限界もあった。

今後、今回見られた現象の更なる解析と臨床との関連を探っていきたい。