



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 [論文内容及び審査の要旨]
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
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78279
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yoshikazu_Ganchiku_abstract.pdf, 論文内容の要旨



(様式 9)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏 名 巖 築 慶 一

学 位 論 文 題 名

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)

【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 日程度かかることとされるが、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】

灌流臓器移植モデルとして、マウス心移植モデルを採用した。同モデルは顕微鏡手術の手技を要し、技術の取得に時間を要した。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、コラゲナーゼ処理と比重遠心により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。続いて、GILs の活性化を解析するために、移植片から CD3⁺ T 細胞を cell sorter で sort し、microarray を施行した。1 移植片から採取できる GIL 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、リンパ系の細胞を持たない BALB/c Rag2^{-/-} Il2^{γc/-} マウス(BRG マウス)に GILs を腹腔内投与により移入し、再構築を試み、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 時間の GILs 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上昇を 120 時間で認めたが、72 時間では同様に異系同系での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、両者の活性化の違いをさらに解析するために移植片から抽出した単核球から sort した CD3⁺ GILs に対し microarray を施行。代謝、細胞分裂に関する遺伝子の発現上昇を 120 時間 GILs で認めたが、免疫学的機能に関する遺伝子に関して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 マウスに腹腔内投与し、GILs の BRG マウスでの再構築を試みた。WT 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⁺リンパ球が出現、10 週間で 5%程度のリンパ球の再構築を認めた。投与後 10 週目でリンパ球の再構築率がプラトーになったため、同週でマウスを解剖、脾細胞でも充分量のリンパ球が再構築されるのを確認した。また、同マウスを用い機能解析を試みたところ、ELISPOT assay および、心移植が可能であり、再構築するリンパ球の抗原への曝露歴で異なる免疫応答を示した。この結果から BRG マウスへの腹腔内投与によるリンパ球の再構築が可能であり、限定的ではあるが再構築されたリンパ球の機能解析が可能であると結論し、同実験を移植後 72 時間および 120 時間の GILs を用いて施行した。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、120 時間で CD8 優位であり、その殆どが CD44 陽性の memory phenotype であった。また、CD4⁺Foxp3⁺Treg も同時に再構築された。IFN- γ ELISPOT assay を施行した結果、120 時間の GILs を再構築された 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 を再構築された 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、GILs の再構築されたマウスに対し、ドナー抗原と同種の心移植片を移植した。その結果、72 時間の GILs を再構築された BRG マウスでは移植片を拒絶しなかった一方、120 時間の GILs を再構築された BRG マウスは速やかに心移植片を拒絶した。この結果からは 120 時間の GILs はドナー抗原特異的な攻撃性を有する集団であると考えられた。72 時間の GILs を再構築された BRG マウスでは移植後 100 日目でも移植片の拍動は保たれており、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。このことから、72 時間の GILs は抗原特異的な免疫応答を示さない集団であることが示唆された。これを検証するため、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。

【結論】

本研究から、移植後 72 時間の GILs と 120 時間の GILs とは免疫学的に異なる機能を有する集団である可能性が強く示唆された。すなわち、移植後 72 時間後の GILs は活性化されておらず、抗原特異的な反応性も有さない集団であると考えられる一方、120 時間の GILs は抗原特異的に活性化された集団であると考えられた。