



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 [全文の要約]
Author(s)	巖築, 慶一
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2519 他
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/2115/78280
Type	doctoral thesis
File Information	Yoshikazu_Ganchiku_summary.pdf



学 位 論 文 (要 約)

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 (要 約)

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

【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 日程度かかると思われるが、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。これは、移植直後の GILs がごく少数であるために機能解析が困難であることに起因する。本研究は、この移植後早期 GILs の免疫学的機能の解析を、免疫不全マウスへのリンパ球を再構築する手法を用いることでその技術的困難を克服し、再構築されたリンパ球の抗原特異性を解析した。

【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。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 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、リンパ系の細胞を内在しない BALB/c Rag2^{-/-} Il2γc^{-/-} マウス (BRG マウス)に GILs を腹腔内投与し、同マウス内での免疫系の再構築を行った。移入後 10 週目に同マウスを用いて機能解析を施行した。すなわち in vitro の解析として ELISPOT を、in vivo の解析としてマウス心移植を行った。上記機能解析に加えて、BALB/c に移植した C57BL/6 心移植片を移植後 72 時間でレシピエントから摘出し、それを BRG マウスに再度移植する、心再移植モデルを施行し、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 はほぼすべて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。また、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、移植後 120 時間の GILs は活性化された集団であるが、72 時間の GILs は活性化に乏しい集団であることが示唆された。さらなる活性化の解析のために、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を認めなかった。この結果については、解析に使用した細胞集団の均一性が不十分であったことが原因と考えられた。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。まず、野生型マウスの脾細胞を腹腔内投与した予備実験を行い、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。CD3⁺リンパ球はその後増加傾向を示し、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。続いて、10 週目でマウスを解剖し、脾臓でのリンパ球の再構築率を解析、脾細胞でもリンパ球の良好な再構築を認め、採取されたリンパ球は、機能解析を行うのに十分な細胞数で

あることを確認した。リンパ球は CD4, CD8 とともに再構築され、全てが CD44⁺ memory phenotype であった。制御性 T 細胞の再構築も認めた。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アロ抗原への曝露歴によって異なる免疫応答を示した。すなわち、アロ抗原に感作されたリンパ球はアロ抗原に対して特異的な免疫応答性を示したが、感作されたことのないリンパ球はアロ抗原に対する免疫応答性を示さなかった。このことは再構築されたリンパ球は、再構築前の抗原特異性を保存していることが示唆された。続いて、移植後 72 時間および 120 時間の GILs を BRG マウスに投与し再構築・機能解析を試みた。投与した GILs は脾臓細胞を再構築したときと同様に投与後増加を認め、9-10 週目でプラトーに達した。投与後 10 週目で再構築される脾臓内のリンパ球は、腹腔内投与の際の投与細胞数により population の差を認めたが、CD44 陽性の memory phenotype であった。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 を施行したところ、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(C57BL/6)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、拒絶を認めなかった。移植後 100 日後の BRG マウスの脾細胞でのリンパ球の再構築率や ELISPOT assay での抗原特異的な 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。病理組織学的検索にて、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、脾臓への CD3⁺リンパ球の再構築を確認した。リンパ球の再構築された脾臓細胞を用いて ELISPOT assay を施行したところ、ドナー抗原特異的な免疫応答は確認されなかった。

【考察】

マウス心移植モデルにおける免疫応答性を解析した。直接解析では移植後 72 時間から 120 時間の間に GILs の活性が変化することが示唆されたが、抗原特異性の有無などの機能解析については再構築する細胞が少数であるため困難であった。そこで、免疫不全マウスへ GILs の免疫系を再構築するモデルを考案した。ヒト化マウスモデルの知見から、BRG マウスへリンパ球を投与することにより、投与したリンパ球がマウス内で再構築されること、再構築されたリンパ球が一定の免疫応答性を示すと考え、リンパ球再構築モデルを考案した。投与されたリンパ球は BRG マウスへ良好に再構築され、再構築された population の免疫記憶の有無により異なる免疫応答性を示したことから、再構築するリンパ球の抗原特異的な免疫応答性の再構築が可能なモデルであると考えられた。同モデルで GILs の再構築も可能であり、再構築されたリンパ球の機能解析の結果、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、アロ抗原により感作されたリンパ球であると考えられたが、72 時間の GILs は活性化に弱く、抗原特異的な攻撃性も示さなかったことからアロ抗原に感作されていない集団と考えられた。移植後 72 時間の GILs の免疫応答性については、再移植モデルでも検証を行った。すなわち抗原への暴露を含めた、微小環境を維持した状態で BRG マウスへ GILs を移入、再構築がされた場合でも、GILs はアロ抗原を拒絶せず、72 時間の GILs は移植片を直接拒絶する機能を有さないと考えられた。

移植直後に浸潤する抗原非特異的なリンパ球は **bystander T** 細胞の呼称で近年注目を集めている。この **population** は特定の免疫機能を有していると考えられ、今後詳細な解明が期待される。

【結論】

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。