



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒト化マウスモデルを用いた生体肝移植後レシピエントのアロ抗原反応における新規解析法の検討 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	深作, 慶友
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14268号
Issue Date	2020-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/79424
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yasutomo_FUKASAKU_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 深作 慶友

学 位 論 文 題 名

ヒト化マウスモデルを用いた生体肝移植後レシピエントのアロ抗原反応における新規解析法の検討

(Novel immune assay of allo-reactivity for living donor liver transplant recipients by using humanized mouse model)

【背景と目的】

臓器移植における移植後レシピエントの免疫状態を観察し、適切な免疫抑制療法の調整をするための指標となる解析法は未だ確立されておらず、特に免疫抑制剤の減量、中止の可否を判断し得る Biomarker は分かってない。既報の移植後レシピエントに対する免疫状態モニタリングはレシピエント T 細胞のドナー抗原に対するアロ反応をリンパ球混合反応 (MLR)により評価し、一定の有用性が示されている。しかし、これらはモニタリング時点での免疫抑制剤の効果を判定する指標であり、免疫抑制剤を減量、中止した際のドナー抗原に対する反応を予測、評価できるものではない。ヒト化マウスモデルはヒト免疫細胞を免疫不全マウスに再構築することで、ヒト免疫を解析できるツールとして新規薬剤や臓器移植における拒絶反応のメカニズム解析に用いられている。我々は、肝移植後レシピエントの末梢血単核球 (hu-PBMC)を NSG マウスに再構築し、免疫抑制剤から一時的に離脱させたヒト化マウスを作成した。このヒト化マウスから hu-PBMC を分離し、アロ反応を評価することで、免疫抑制剤のない状態のレシピエント本来の免疫状態を観察する新たな解析法を確立することを目的とした。

【対象と方法】

健常者 (n=5)と、生体肝移植後レシピエント (n=14)のうち免疫抑制療法中の症例(On IS 群: n=10)と免疫抑制剤中止できている症例(Off IS 群: n=4)のそれぞれよりヒト末梢血リンパ球 (hu-PBMC) を採取し、 2.5×10^6 個を 2.0Gy 放射線照射した NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm/Wjl}/Sz (NOD/SCID/IL2r γ ^{null}; NSG) マウスの腹腔内に投与した (hu-PBMC-NSG モデルの作成)。hu-PBMC 投与 21 日後に NSG マウス末梢血/脾/骨髄より hCD45⁺リンパ球を分離し、hCD45⁺リンパ球分画を Flow cytometry で評価した。また hCD3⁺T 細胞のドナー、3rd party 抗原に対するアロ反応を MLR で評価し、それぞれ NSG マウスに再構築する前の hu-PBMC(Fresh PBMC)と再構築した後の hu-PBMC (hu-PBMC-NSG)で比較した。

【結果】

健常者、On IS 群、Off IS 群間の Fresh PBMC の hCD45⁺リンパ球分画に有意差は無かった。

また、全ての症例で hu-PBMC-NSG の作成に成功し、再構築後の hCD45⁺リンパ球分画は全群で hCD3⁺T 細胞が $86.3 \pm 1.8\%$ (n=19) と優位に再構築され、hCD3⁺リンパ球の再構築は数%であった。hu-PBMC-NSG における hCD3⁺T 細胞では、特に CD45RA⁺CD62L^{lo} effector memory T 細胞 (T_{EM})、CCR6⁺CXCR3⁺ Th1 細胞が優位な分画となった。また、hu-PBMC-NSG における再構築後の hCD3⁺T 細胞は CD3/CD28 刺激には Fresh PBMC と同等に強い反応を示す一方で、アロ抗原に対するリンパ球増殖反応は全群で Fresh PBMC より有意に増幅された ($p < 0.05$)。更に移植後レシピエントにおいては、On IS 群で 10 例中 2 例の hu-PBMC-NSG のドナー抗原に対するリンパ球増殖反応が、3rd party 抗原に対する反応と比較して強く観察された。この 2 例は臨床経過で拒絶反応を繰り返す高リスク症例であった。一方、Off IS 群では、全例で Fresh PBMC と hu-PBMC-NSG においてドナー抗原に対する反応が 3rd party 抗原に比べて特異的に抑制されている donor-specific hyporesponsiveness が観察され、hu-PBMC-NSG でもドナー特異的反応抑制が維持されていた。この Off IS 群と同等の donor-specific hyporesponsiveness は On IS 群においても 10 例中 4 例で観察された。この 4 例の臨床経過は拒絶反応のエピソードが Off IS 群と同様に少なく、免疫抑制剤が減量できる可能性が示唆された。

【考察】

hu-PBMC を NSG マウスに投与、再構築することで、hCD45⁺リンパ球は抗原非依存性に hCD3⁺T 細胞、特に CD45RA⁺CD62L^{lo} T_{EM}、CCR6⁺CXCR3⁺ Th1 という拒絶反応に重要な役割を担う細胞に置き換わり、同時にアロ抗原への反応性の増幅を獲得することを明らかにした。これらの変化は、免疫不全マウスに hu-PBMC を投与する際に起こる homeostatic proliferation により引き起こされると考えられる。また、Fresh PBMC、hu-PBMC-NSG を用いた MLR より、各レシピエントのドナー抗原への反応性と臨床経過との比較検討から、On IS 群における急性拒絶反応の高リスク症例、免疫抑制剤が減量できる可能性のある症例が示唆され、Off IS 群では donor-specific hyporesponsiveness が hu-PBMC-NSG でも維持されることを明らかにした。このことから本研究で採用したヒト化マウスモデルは、hu-PBMC 再構築後もドナー特異的反応が維持され、免疫抑制療法中の生体肝移植後レシピエントにおいては免疫抑制剤を減量、もしくは中止した後アロ反応性を T_{EM}、Th1 という急性拒絶反応に関与する細胞に焦点を当てて観察し得るモデルである可能性がある。しかし、免疫寛容に関わるとされる T_{REG} は本研究では関連を示唆することはできなかった。今後、さらなる症例の積み重ねと詳細な解析により免疫抑制剤調整の指標の一つとして、実臨床応用が期待できる。

【結論】

NSG マウスを用いたヒト化マウスモデルによる新規免疫状態解析法は生体肝移植後レシピエントのアロ反応性を増強させ、免疫抑制剤のない状態のドナー特異的なアロ反応を拒絶反応により関与する T_{EM}、Th1 に焦点を当てて詳細に観察し得る。本研究結果と臨床経過の詳細な検討が、各レシピエントの免疫抑制剤調整の指標の一つとして有用である可能性がある。