



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 深作 慶友

主査 坂本 直哉 教授
審査担当者 副査 渥美 達也 教授
副査 豊嶋 崇徳 教授
副査 北村 秀光 准教授

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)

申請者は肝移植後レシピエント PBMC を用いてヒト化マウスを作成し、再構築した際の PBMC 細胞分画とアロ抗原反応の変化について検討した。まず、ヒト CD3 陽性 T 細胞、特にヒト CD8 陽性 T 細胞の有意な再構築と、T 細胞分画における effector memory T 細胞への変化、ヘルパー T 細胞分画における Th2 から Th1 への変化を示した。さらに再構築後にアロ抗原反応が増幅することを示した。肝移植後レシピエントの検討では、免疫抑制剤中止症例での donor-specific hyporesponsiveness の維持、免疫抑制剤投与中症例では、再構築後のアロ抗原反応における donor-specific hyporesponsiveness が見られる症例とドナー抗原に対して強い反応を認める症例があることを示し、レシピエントの免疫抑制剤のない免疫状態を模倣できている可能性を示した。

審査にあたり、まず副査の北村准教授より、肝移植後レシピエントでの自然経過で免疫寛容となる症例で、どのような細胞や免疫の関与が示唆されるかの質問があり、申請者は、TREG の関与や、肝臓の臓器特異性が示唆されるが、現時点で解明されていないと回答した。ヒト化マウス作成にあたり、PBMC を腹腔内投与とした理由について質問があり、投与手技の簡便さを考慮したと回答し、北村准教授より、投与経路によって再構築される細胞分画や質が異なる可能性について指摘があった。これに対して、静脈内投与でもヒト CD3 陽性 T 細胞が多く再構築されることは確認したが、それ以上の分画に関しての検討は行っていないと回答した。次に、アロ反応性を T 細胞増殖で評価を行っているが、同じ細胞集団でも機能や産生するサイトカインが異なる可能性に関する質問があり、肝移植後レシピエントにおける IFN γ 産生は、本研究の結果と矛盾しない結果を得たが、IL-10 産生は全ての症例でうまく産生を捉えることができなかったと回答した。また、肝移植後レシピエントでの移植前の免疫 profiling と、移植後での反応の差異についての検討に関する質問があった。これに対して、本研究は後ろ向き研究であり、移植前の免疫 profiling は施行しておらず、今後、前向き研究で検討していきたい項目の一つであると回答した。副査の渥美教授より、肝臓の拒絶反応は臓器特異的な反応であり、本研究のドナー PBMC を抗原とするこ

との意味について質問があった。これに対して、本来であればグラフト肝を抗原として用いるべきだが、実際にグラフト肝の採取は困難であり、MLR を用いたレシピエント免疫状態に関する先行研究で、実際に免疫抑制剤の減量に成功した報告があり、ドナーPPBMC で代用可能と考えたと回答した。また日本で多く施行されている生体肝移植であれば fresh な状態のドナー抗原として血液サンプルを採取しやすいためこのモデルを採用したと回答した。次に本研究の目的が、レシピエント PBMC の免疫抑制剤の wash out であれば、数日間の培養で免疫抑制剤の効果が消失する可能性について質問があった。これに対し、実際にレシピエント PBMC を数日間培養した後細胞分画を測定し、MLR を施行するモデルを検討したが、培養後には、生存する PBMC の量に個人差が生じやすく、生存しやすい分画だけが残る、結果も Fresh PBMC と比較して大きく異なるものとなり断念したと回答した。また、免疫抑制剤の減量プロトコルについての質問があり、現在、国際的には Banff Working Group のクライテリアが示されているが、自己免疫性疾患は除外されており、今回の研究とは異なるという回答をした。次に副査の豊嶋教授より質問があった。本研究ではドナー抗原に対する反応が弱かった T 細胞は deletion か、hypo によるものかわからず、ELISPOT 等で見るモデルを採用すればさらに詳細な検討が出来たのではないかと意見があった。それに対して、ELISPOT も施行したが、反応がうまく捉えられず断念したと説明した。さらに、アロ抗原存在下における T 細胞反応が deletion、もしくは exhaustion なのか、exhaustion であれば、アロ抗原存在下でカルシニューリン阻害薬がない状態を作り出すことで検討できる可能性があるという意見があった。本研究でも、アロ抗原がない状態でヒト化マウスを作成すれば、免疫抑制剤中止症例において、免疫寛容が崩れる可能性も考えていたが、結果のようにヒト化マウスに再構築後もドナー特異的抑制が維持され、この現象から研究を継続する方針となったことを説明した。最後に主査の坂本教授より質問があった。まずコントロールについて質問があり、MLR での positive control として CD3/CD28 抗原 beads、in vivo でのアロ反応評価では、negative control として PBS を投与したことを説明した。制御性 T 細胞 (T_{REG}) に関して、On IS 症例と比べ Off IS 症例で T_{REG} が多く、T_{REG} 誘導の差異が結果へと影響した可能性について質問があった。これに対して症例数を増やすことで明確な違いが出る可能性と再構築前後での比較では有意な傾向が見られなかったと説明した。また、本研究は臨床的な背景や経過が様々であり、より詳細な症例検討の必要性について指摘があり、本研究の結果を臨床に応用するために何が必要かについて質問があった。これに対して、症例数を増やし検討を続けることが必要で、さらに、実際に臨床応用するにはグラフト肝の状態や DSA の評価など総合的な評価が必要であると説明した。また、本研究では、臨床的に拒絶反応高リスク症例の発見に有用な可能性があることも説明した。最後に、学位論文の誤字についての指摘があった。

本研究は、臓器移植におけるレシピエントの免疫状態をヒト化マウスを用いて免疫抑制剤のない状態を模倣し、臨床的に免疫抑制剤の減量できる可能性について示唆した。実験モデルはやや荒削りで改善の余地を残すが、随所に創意工夫が見られ、得られた結果も従来の概念に一石を投じる、非常に興味深いものである。拒絶反応と副作用の発症を抑える臓器移植後の免疫抑制剤の調整は非常に重要な問題であり、本研究の成果は今後の臨床に大きな影響を与えられらる。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。