HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウス皮膚移植モデルを用いた移植後早期に流入するグラフト浸潤細胞の免疫学的挙動に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	金沢, 亮
Description	配架番号：2823
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15889号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92408
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KANAZAWA_Ryo_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　金沢　亮

審査担当者
主査　清野　研一郎　教授
副査　北條　慎太郎　准教授
副査　外丸　詩野　准教授

学 位 論 文 題 名

マウス皮膚移植モデルを用いた移植後早期に流入するグラフト浸潤細胞の免疫学的挙動に関する研究
(Studies on the immunological behavior of early graft-infiltrating lymphocytes in a mouse model of skin transplantation)

申請者はマウス皮膚移植モデルを用いて、移植後早期より浸潤するリンパ球 (Graft Infiltrating Lymphocytes; GILs) の免疫学的機能について検討を行った。まず、本研究を今後発展させるために有用と考えた実験結果を報告し、NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) マウスに対するヒト皮膚移植はグラフトの拒絶を引き起こすが抗 Gr-1 抗体により拒絶能がキャンセルされる可能性があること、C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$ Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J (BRG) マウスに対するヒト皮膚移植ではグラフトは拒絶されないが、ヒトリンパ球を構築することで拒絶が惹起されることを示した。さらに皮膚移植モデルにおいて、抗原感作後のグラフト生存期間短縮は認めないこと、72 時間以内の冷阻血はグラフト生存期間に影響しないこと、抗 CD3F(ab)'$_2$ 抗体投与によるグラフト生存期間短縮効果を認めないことを報告した。GILs の機能解明に行った実験として、マウス皮膚移植モデルを用い、① FACS や RT-PCR による直接解析、② グラフト再移植モデル、③ GILs 移入モデルを行ったことを説明した。移植 3 日目以降の皮膚グラフトにレシピエント由来のリンパ球が存在しているが、7 日目の GILs は拒絶能力を持つこと、5 日目の GILs はグラフトの有無により拒絶能が変化するが Anergy の関与は示せなかったこと、3 日目の GILs は拒絶反応に関与しないが制御性 T 細胞 (Regulatory T cells ; Treg) やグラフト保護効果を持つリンパ球の関与を示せなかったことを報告した。

審査にあたり、まず副査の外丸准教授より、心移植モデルから皮膚移植モデルに変更することの利点について質問があり、申請者は皮膚移植モデルで拒絶の制御が難しく、より厳しい条件下で結果を示せたことが利点であると回答した。さらに心移植モデルは技術的に再移植が困難であり、皮膚移植モデルは再移植の解析に有利であると回答した。次に future plan として Single cell RNA 解析を述べたが、どのように sampling を行うかという質問があった。回答者は target 遺伝子の候補を述べたが、グラフト内のリンパ球の数が少なく、sampling の調整が難しく、申請者は細かい手順に関しては検討中であると回答した。さらに長期生着したグラフトの途中経過を病理学的に検討したか質問があり、申請者は途中経過については検討していないと回答した。

次に副査の北條准教授より、移植後 3 日目の GILs の function は何かと質問があり、申請者は拒絶を促進する能力がなく、拒絶に関与していない可能性があると回答した。次に、

特に移植後 3 日目の GILs の数は少ないが、BRG マウスへの構築率は 3 日目、5 日目、7 日目で変わりなく、GILs の機能が経時的に変化していることを確認し、具体的にリンパ球の種類がどのように変化しているかとの質問があった。申請者は memory についても検討したが、明確なリンパ球の種類の変化については示せなかったと回答した。そこでどのリンパ球を target にしているかとの質問があり、申請者は元の実験が抗 CD3F(ab)'$_2$ 抗体を用いた実験でありまず T cell 系を target にしていること、さらに皮膚移植では innate 系が強く働くため innate 系も合わせて対応する必要があると回答した。さらに innate 系は T cell 系への抗原提示を行うのが主であり、抗 CD3F(ab)'$_2$ 抗体を用いた実験で graft survival の短縮は得られなかったが、抗 Gr-1 抗体を使った実験系は行っていないか、また innate 系の細胞が直接 graft を攻撃するかとの質問があり、申請者は抗 Gr-1 抗体を使った実験は次の実験として検討していたこと、innate 系の細胞が直接 graft を攻撃するかについての知見は持っていないと回答した。次に抗 Gr-1 抗体投与により死亡した原因について指摘され、申請者は死亡したマウスで体重の急激な減少はなかったことを説明し、元々T cell、B cell、NK cell をほとんど持たない免疫不全マウスに innate 系も落としたため感染があった可能性や、抗 Gr-1 抗体再投与前に Gr-1 陽性細胞の数は投与前より増加することより cytokine storm が惹起された可能性があると回答した。また、抗 CD3F(ab)'$_2$ 抗体や抗 Gr-1 抗体に使用した clone は FACS 抗体と同様かの質問があり、いずれも同じであるが抗 CD3F(ab)'$_2$ 抗体は TCR β も合わせて染めているため CD3 陽性 T 細胞の depletion が示せること、抗 Gr-1 抗体は FACS の結果だけでは depletion か blocking かは区別出来ないが、Gr-1 陽性の population が消失していることから抗 Gr-1 抗体投与により graft survival の延長が得られたと回答した。最後に学位論文の修正点について指摘があった。

最後に、主査の清野教授より、GILs の結果と直接結びつかなかったが、ヒト皮膚移植など並行して行った実験は今後医学博士として有用な経験になると助言された。次に皮膚移植モデルで抗 CD3F(ab)'$_2$ 抗体を用いた実験結果を報告した文献があるか質問があり、申請者は心移植や膵島移植では認めるが皮膚移植での報告は知る限りないと回答した。次に抗 CD3F(ab)'$_2$ 抗体の臨床利用に対する確認がなされ、申請者は 1 型糖尿病で予防効果は示されているが、移植分野での報告はまだないと回答した。次に 3 日目以降の GILs はいずれもレシピエント由来であり、拒絶に対する能力は異なるが、数が異なることを指摘し、申請者は数に関しては実験が間に合わず limitation として挙げ、次の実験系として 7 日目の GILs を 1/100、5 日目の GILs を 1/10 に減らして同程度の数にして検討すると回答した。次に本研究でわかった本質は何かを問われ、申請者は皮膚移植モデルも心移植モデルと同様に移植後日数に応じ拒絶能力が変化すると回答した。心移植モデルの結果と異なる点を指摘され、申請者は心移植では anergy の結果はないと回答した。また、5 日目の再移植モデルで半数が長期生着を得たが、そもそも GILs に拒絶する能力がないため anergy T 細胞や Treg を落としても結果が出なかったのではないかとの指摘があり、申請者は GILs 移入モデルでは 5 日目の GILs を移入したグラフトは全例拒絶されており、拒絶する能力があるがグラフトの存在によりその能力を失う機序が simple な理論であると回答した。最後に exhaustion marker を測定したかについて質問があり、申請者は検討してないため、今後の課題であると回答した。

この論文は、マウス皮膚移植モデルにおいて GILs の機能的役割は移植後日数により変化することを示した点において高く評価され、並行して行った実験と合わせ今後の移植後の免疫抑制に対する strategy に寄与することが期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。