



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 [全文の要約]
Author(s)	金沢, 亮
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：2823 他
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/2115/92409
Type	doctoral thesis
File Information	KANAZAWA_Ryo_summary.pdf



学位論文(要約)

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)

2024年3月

北海道大学

金沢 亮

学位論文(要約)

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)

2024年3月

北海道大学

金沢 亮

【背景と目的】

近年、癌治療における免疫チェックポイント阻害剤の顕著な効果が確認されたこともあり、微小環境における免疫担当細胞の役割や機能が注目されている。腫瘍の微小環境においては多くの表現型を持つ免疫集団で構成されているが、特に癌細胞の免疫からの逃避には、制御性 T 細胞や anergy T 細胞が関与していることが分かってきた。

臓器移植の分野でもグラフト内の微小環境を構成する T 細胞や、その免疫バランスによりグラフトの運命が決定される可能性がある。Goto らはマウスの心移植モデルにおいて、抗 CD3F(ab')₂ 抗体の投与時期を移植後 72 時間以降に遅らせることで長期に渡りグラフト保護効果が持続することを示した。我々の研究室ではこの 72 時間以内に浸潤するリンパ球 (graft infiltrating lymphocytes; GILs) に着目し、マウス心移植モデルにおいて移植後 72 時間までの GILs がグラフトの拒絶反応を引き起こさないこと、移植後 120 時間までの GILs はグラフトの拒絶反応を引き起こすことを明らかにした。

本研究の目的は、移植後早期 GILs の免疫学的役割について皮膚移植モデルを用いて解析することである。ヒト化マウス、免疫感作モデルも併用し、早期 GILs の挙動の多角的な解析の可能性も探究した。

【対象と方法】

第一章では免疫不全マウスとして NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NOD/SCID/IL2rg^{null}, NSG) マウス、もしくは C;129S4-Rag2^{tm1.1Flv} Il2rg^{tm1.1Flv}/J (Balb/c Rag2^{-/-} gc^{-/-}, BRG) マウスを使用し、ヒト末梢血から採取したリンパ球を構築し、これにヒト皮膚を移植するヒト化マウスヒト皮膚移植モデルの作成の可否を検討した。

第二章では C57BL/6 (B6) マウスの皮膚を Balb/c マウスに移植後、40~56 日後に再度皮膚移植を行う抗原感作モデルでメモリー T 細胞の誘導の有無を確認した。

第三章ではマウス皮膚移植モデルにおける抗 CD3F(ab')₂ 抗体の効果を確認した。

第四章では移植後 3、5、7 日目の GILs を単離して BRG マウスに移入し 10 週後に naïve B6 皮膚を移植する、もしくはグラフトを直接 BRG マウスに再移植することで、GILs の時間経過に伴う免疫学的役割の変化を解析した。

【結果】

第一章ではヒト皮膚グラフトを NSG マウスに移植しヒト皮膚移植モデルを作

成した。NSG マウスでは免疫不全マウスにも関わらず、ヒト皮膚は拒絶された。そこで、NSG マウスに存在している自然免疫を排除する目的で抗 Gr-1 抗体を投与すると、ヒト皮膚は長期生着が得られたが、半数のマウスは観察期間中に死亡した。一方、BRG マウスを用いたヒト皮膚移植は拒絶されず長期生着が得られた。更にこのヒト皮膚を移植した BRG マウスに移植後 35 日目にヒト末梢血から得られたリンパ球を構築するとヒト皮膚は拒絶された。このようにヒト皮膚の移植によるヒト化マウスモデルの作成に成功した。

第二章ではマウスアロ皮膚移植モデルを確立し、これを用いて冷阻血時間延長と抗原感作による拒絶反応促進効果について確認した。冷阻血時間延長の効果については、72 時間以内の冷阻血時間の違いではマウス皮膚グラフトの拒絶は促進されないことが分かった。抗原感作による拒絶の程度を初回移植後 40 または 56 日目の再移植にて確認したが、グラフト生存期間の短縮は観察されなかった。MHC fully ミスマッチ間のマウスアロ皮膚移植においては冷阻血時間、抗原感作でグラフト生存期間は短縮しないことが分かった。

第三章ではマウスアロ心移植モデルで長期生存効果が得られた移植後 3 日目からの抗 CD3F(ab')₂ 抗体を投与する治療プロトコルをマウスアロ皮膚移植モデルで検討したが、グラフト生存期間の延長効果は全くみられなかった。心移植で用いた抗 CD3F(ab')₂ 抗体の投与量を 3 倍に増量し、投与開始時期を変更して検討したが、グラフト生存期間の延長は認めなかった。

第四章では、マウスアロ皮膚移植後早期の GILs の役割を明らかにする目的で、B6 の皮膚を Balb/c に皮膚移植後 3、5、7 日目の GILs を BRG マウスに移入し、GILs が十分構築された 70 日目に同系統の B6 の皮膚移植を行い、このアロ皮膚移植グラフトのグラフト生存期間を確認した。移植後 5 日または 7 日目の GILs で構築した BRG マウスは全例でグラフトを早期に拒絶した。一方、3 日目の GILs で構築した BRG マウスはグラフトを拒絶せず、全例長期生着した。また GILs をグラフトから抽出しないで、グラフトそのものをそのまま BRG マウスに再移植し、移植後の微小環境も含めて BRG マウスに構築すると、移植後 7 日目のグラフトは全例で早期に拒絶されたが、5 日目のグラフトの半数は長期生着した。また、3 日目のグラフトのほとんどが拒絶されず長期生着した。この 3 日目のグラフトは長期生着するが、B6 皮膚移植グラフトとアロの関係性にある Balb/c の免疫担当細胞が BRG に構築されており、Balb/c 由来のアロリンパ球が B6 皮膚グラフトの生着を許容する理由として、制御性 T 細胞の関与を検討した。3 日目に摘出した皮膚グラフトを再移植した BRG マウスに抗 CD25 抗体を投与したが、皮膚グラフトは拒絶されなかった。さらに、3 日目の GILs の拒絶への関与を調べる目的で、naïve Balb/c マウスの脾細胞を BRG マウスに構築し、3 日

目に採取したアロ皮膚グラフトを BRG マウスに再移植した。しかし、再移植グラフトは対照群と比較して拒絶までの期間に差を認めなかった。加えて、Anergy、exhaustion がこのグラフト生着に関与する可能性も考え、5 日目に摘出した皮膚グラフトを BRG に再移植した後、長期生着をした BRG マウスに抗 PD-1 抗体を投与したが、グラフトの拒絶は惹起されず生着したままであった。

【考察】

第一章では既報と同様にヒト化マウスの作成を試み、作成可能であった。しかし、NSG マウスを用いたヒト化マウスは抗 Gr-1 抗体投与により約半数のマウスが死亡した。今後更なる改善が必要である。

第二章では既報と同様の方法でメモリー T 細胞の作成を試みたが、作成出来なかった。皮膚移植ではランゲルハンス細胞などの innate cell の影響が強いこと、Balb/c が Th2 優位の免疫応答をするため拒絶の実験に不利であることなどが原因として考えるが、さらなる検討が必要である。

第三章ではアロ心移植または睥島移植モデルで効果が得られた抗 CD3F(ab')₂ 抗体による免疫寛容プロトコルを皮膚移植モデルで検討した。しかし、拒絶反応の抑制効果は全く得られなかった。抗体投与時期や投与量を変更しても拒絶反応は抑制できなかった。皮膚移植は innate cell の関与が強いことが影響している可能性が考えられた。

第四章では移植後日数によって GILs の免疫学的挙動が異なることを明らかにした。これは我々の教室で以前に心臓移植モデルで認めた結果(Ganchiku, Goto et al. 2021)と同様の結果であった。興味深いことに 5 日目の GILs 単独ではグラフトに対する攻撃性を持ち、全例拒絶されるが、グラフト組織と共に再移植した場合 5 日目の採取したグラフトは半数が長期生着した。グラフトの存在により GILs が持続的にドナー抗原に曝露されることで、anergy の状態になっている可能性が考えられた。既報の anergy が免疫寛容の機序となっているモデルでは、抗 PD-1 抗体を投与することで anergy 状態が解除されグラフトの拒絶が惹起される(Baas, Besancon et al. 2016)。同様の抗 PD-1 抗体を投与したが、グラフトの長期生存はキャンセルされなかった。また、3 日目の GILs は拒絶を惹起しないが、心移植モデルを用いた実験で制御性 T 細胞が重要であると報告されている(Goto, You et al. 2013)。しかし、皮膚移植モデルを用いた本検討では抗 CD25 抗体を用いた実験で制御性 T 細胞は重要な役割を果たしておらず、さらに naïve リンパ球を移入した実験でグラフト保護効果を持つリンパ球が重要でないようであり、Single cell RNA 解析などを用いて解明する必要がある。

【結論】

皮膚移植モデルを用いて GILs の拒絶反応を引き起こす時期を検討したが、我々が以前報告した心移植モデルと同様の結果であった。さらに、皮膚再移植モデルは、GILs 単独での再構築モデルとグラフトに対する拒絶反応が一部異なる挙動を示し、グラフト組織の存在により GILs は異なる免疫反応を示す可能性を示唆している。また、3 日目の GILs はグラフトに対し拒絶反応を促進することが出来ないにもかかわらず、3 日目からの抗 CD3F(ab')₂ 抗体の投与は、心臓移植モデルでグラフトの長期生着を誘導する結果と対照的に、皮膚移植モデルではグラフトの生着に影響を与えなかった。これらの知見は、移植後早期 GILs に関する新規性を持った知見であり、臨床での臓器移植に対する免疫抑制剤投与のタイミングを決めるエビデンスの一助となると考える。