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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15889
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92974
Type	doctoral thesis
File Information	KANAZAWA_Ryo.pdf, この論文の全文

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

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

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

目次

1. 発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1 頁
2. 要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2 頁
3. 略語集・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・6 頁
4. 緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・7 頁
5. 第一章　ヒト化マウスの作成・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9 頁
   5-1. 緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9 頁
   5-2. 目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9 頁
   5-3. 方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9 頁
   5-4. ヒト化マウスを作成し、冷阻血時間によって graft survival が変化するかを検討する・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11 頁
      5-4-1. 背景・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11 頁
      5-4-2. 実験デザイン・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・12 頁
      5-4-3. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・12 頁
   5-5. BRG マウスにヒト皮膚を移植して拒絶が惹起されないか検討する・・・・・・12 頁
      5-5-1. 実験デザイン　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・12 頁
      5-5-2. 結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13 頁
   5-6. NSG マウスにヒトの皮膚を移植した後に抗 Gr-1 抗体を投与し、graft survival の延長を得られるかを検討する ・・・・・・・・・13 頁
      5-6-1. 実験デザイン・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13 頁
      5-6-2. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14 頁
         5-6-2-1. 抗 Gr-1 抗体投与前後での Flow cytometry 解析・・・・14 頁
         5-6-2-2. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14 頁
   5-7. BRG マウスにヒトの皮膚を移植し、生着が確認された後ヒトの PBMCs を投与し拒絶が惹起されるかを検討する・・・・・・15 頁
      5-7-1. 実験デザイン・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・15 頁
      5-7-2. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・15 頁
         5-7-2-1. BRG マウス末梢血中の $CD45^{+}$リンパ球構築率解析・・15 頁
         5-7-2-2. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・16 頁
   5-8. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・16 頁
6. 第二章　マウスアロ皮膚移植モデルでのメモリーT 細胞の存在及び冷阻血時間延長に伴うグラフト生存期間への影響の検討・・・・・・・・・18 頁
   6-1. 緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・18 頁

6-2. 目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・19 頁
6-3. 方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・19 頁
6-4. 予備実験：マウス皮膚移植モデルを確立する・・・・・・・・・20 頁
6-4-1. 実験デザイン・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・20 頁
6-4-2. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・20 頁
6-5. マウス皮膚移植モデルにおける冷阻血時間とグラフト生存期間との関係を検討する・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・20 頁
6-5-1. 方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・20 頁
6-5-2. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・20 頁
6-6. 皮膚移植モデルでメモリーT 細胞を作成する・・・・・・・・・21 頁
6-6-1. 実験デザイン・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・21 頁
6-6-2. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・21 頁
6-6-3. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・22 頁
6-6-4. 実験デザイン・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・22 頁
6-6-5. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・22 頁
6-7. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・23 頁
7. 第三章　マウス皮膚移植モデルにおける抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体の治療効果・・・・・・25 頁
7-1. 緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・25 頁
7-2. 目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・25 頁
7-3. 方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・25 頁
7-4. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・26 頁
7-4-1. 実験デザイン・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・26 頁
7-4-2. 抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体投与による T cell depletion 効果の解析・・・・・27 頁
7-4-3. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・27 頁
7-4-4. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・28 頁
7-5. 抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体至適投与量、投与時期の検討 ・・・・・・28 頁
7-5-1. in vitro での検討 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・28 頁
7-5-1-1. 方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・28 頁
7-5-1-2. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・29 頁
7-5-2. in vivo での検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・29 頁
7-5-2-1. 実験デザイン・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・29 頁
7-5-2-2. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・30 頁
7-6. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・30 頁

8. 第四章　早期 GILs の免疫学的挙動の検討・・・・・・・・・・・・・・31 頁
8-1. 緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・31 頁
8-2. 目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・31 頁
8-3. 方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・31 頁
8-4. GILs の解析 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・34 頁
8-4-1. Naïve 皮膚に存在するリンパ球の population 解析・・・・34 頁
8-4-2. GILs の population 解析 ・・・・・・・・・・・・・・・・35 頁
8-4-2-1. $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ T リンパ球数・・・・・・・・・・35 頁
8-4-2-2. $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ T リンパ球の割合・・・・・・・・36 頁
8-4-2-3. Naïve 皮膚 / GILs に存在する innate lymphocytes の解析
・・・・・36 頁
8-4-2-4. GILs の RNA analysis ・・・・・・・・・・・・・・・37 頁
8-5. GILs を含んだ皮膚グラフトを BRG マウスに再移植する・・・38 頁
8-5-1. 実験デザイン・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・38 頁
8-5-2. Graft appearance ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・38 頁
8-5-3. Intravenous labeling ・・・・・・・・・・・・・・・・・・39 頁
8-5-4. BRG マウスへのグラフトからの移入リンパ球による免疫構築
・・・・・39 頁
8-5-5. 構築リンパ球の MHC class I ・・・・・・・・・・・・・・39 頁
8-5-6. 構築リンパ球の population 解析・・・・・・・・・・・・・40 頁
8-5-6-1. T リンパ球の population 解析・・・・・・・・・・・・40 頁
8-5-6-2. $CD4^+$ memory phenotype ・・・・・・・・・・・・・・41 頁
8-5-6-3. $CD8^+$ memory phenotype ・・・・・・・・・・・・・・42 頁
8-5-7. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・43 頁
8-5-8. 拒絶されず長期生着を得た皮膚グラフトの Histology ・・43 頁
8-6. GILs を BRG マウスに adoptive transfer して構築させる・・・44 頁
8-6-1. 実験デザイン・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・44 頁
8-6-2. Adoptive transfer cell count ・・・・・・・・・・・・・・44 頁
8-6-3. Adoptive transfer したリンパ球の BRG マウスへの構築率
・・・・・45 頁
8-6-4. BRG マウス末梢血中に出現した T リンパ球の population 解析
・・・・・45 頁
8-6-4-1. 構築リンパ球の T リンパ球の population 解析・・・・45 頁
8-6-4-2. $CD4^+$ memory phenotype ・・・・・・・・・・・・・・47 頁
8-6-4-3. $CD8^+$ memory phenotype ・・・・・・・・・・・・・・48 頁

8-6-5. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**48** 頁
8-7. 小括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**49** 頁
8-8. Treg による拒絶抑制効果を検討する・・・・・・・・・・・・・**49** 頁
8-8-1. 実験デザイン・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**49** 頁
8-8-2. 抗 **CD25** 抗体による **Treg** 除去　・・・・・・・・・・・・**50** 頁
8-8-3. 抗 **CD25** 抗体による **BRG** への構築リンパ球内の **Treg** の除去
・・・・・**50** 頁
8-8-4. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**51** 頁
8-9. Day 3 のグラフトに保護効果のあるリンパ球が浸潤しているかを
検討する・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**52** 頁
8-9-1. 実験シェーマ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**52** 頁
8-9-2. 予備実験：**splenocytes** 投与量の決定・・・・・・・・・・**53** 頁
8-9-2-1. 実験シェーマ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**53** 頁
8-9-2-2. Splenocytes 移入後 **BRG** マウス末梢血中の **$CD3^+$**リンパ球
構築率・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**53** 頁
8-9-2-3. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**53** 頁
8-9-3. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**54** 頁
8-10. Day 5 の **GILs** がグラフトの存在により **anergy** になっているかを
検討する・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**54** 頁
8-10-1. 実験シェーマ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**54** 頁
8-10-2. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**55** 頁
8-11. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**55** 頁
9. 結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**60** 頁
10. 謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**61** 頁
11. 利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**62** 頁
12. 引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**63** 頁

1. 発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の論文に投稿中である

1. Ryo Kanazawa, Ryoichi Goto, Takuya Harada, Takuji Ota, Nozomi Kobayashi, Kazuaki Shibuya, Yoshikazu Ganchiku, Masaaki Watanabe, Masaaki Zaitsu, Norio Kawamura, Tsuyoshi Shimamura, Akinobu Taketomi.
   Early graft-infiltrating lymphocytes were not associated with graft rejection in a mouse model of skin transplantation.

本研究は以下の学会で発表した

1. Ryo Kanazawa, Ryoichi Goto, Takuji Ota, Kazuaki Shibuya, Yoshikazu Ganchiku, Masaaki Watanabe, Masaaki Zaitsu, Norio Kawamura, Tsuyoshi Shimamura, Akinobu Taketomi.
   The different immunological behavior of early graft infiltrating cells until 72 hours after murine skin transplantation.
   European Society for Organ Transplantation (ESOT); October 8th, 2021. Milan

2. 金沢 亮, 後藤 了一, 原田 拓弥, 巖築 慶一, 渡辺 正明, Forgioni Agustina, 川村 典生, 嶋村 剛, 武冨 紹信.
   マウス皮膚移植モデルを用いた移植早期に流入する graft infiltrating lymphocytes の免疫学的役割の解析.
   第 20 回日本免疫治療学会学術集会, 2023 年 6 月 10 日, 東京

3. 金沢 亮, 後藤 了一, 原田 拓弥, 巖築 慶一, 渡辺 正明, Forgioni Agustina, 川村 典生, 嶋村 剛, 武冨 紹信.
   マウス皮膚移植モデルを用いた移植早期に流入する graft infiltrating lymphocytes の免疫学的役割の解析
   第 59 回日本移植学会総会, 2023 年 9 月 21 日, 京都

2. 要旨

【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膵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。

3. 略語集

2-ME：2-Mercaptoethanol
B6：C57BL/6
BRG：C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$ Il2rγ$^{tm1.1Flv}$/J (Balb/c Rag2$^{-/-}$ γc$^{-/-}$)
CXCL9：CXC ligand 9
EDTA：Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS：Fetal Bovine Serum
FcR：Fc receptor
GAPDH：Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GATA3：GATA binding protein 3
GILs：Graft infiltrating lymphocytes
HE：Hematoxylin Eosin
HSC：Haematopoietic stem cell
IFN-γ：Interferon-gamma
IL：Interleukin
LAG3：Lymphocyte activation gene 3
MHC：Major Histocompatibility Complex
MST：Median survival time
NSG：NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NOD/SCID/IL2rg^{null})
PBMCs：Peripheral blood mononuclear cells
PD-1：Programmed death 1
RPMI-1640：Roswell Park Memorial Institute -1640
TCRβ：T cell receptor β
TIGIT：T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TNF-α：Tumor necrosis factor-α
Tcm：Central memory T cell
Tem：Effector memory T cell
Treg：Regulatory T cell
qRT-PCR：Quantitative real-time polymerase chain reaction

4. 緒言

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に伴い、微小環境における免疫の重要性が注目されている(Shiao, Ganesan et al. 2011, Balkwill, Capasso et al. 2012, Fridman, Pagès et al. 2012, Gajewski, Schreiber et al. 2013, Kim and Cantor 2014)。特に腫瘍の微小環境に存在する制御性 T 細胞(Regulatory T cell; Treg)や anergy $CD8^+$ T 細胞は、癌細胞が免疫系から逃れるための機序に重要な役割を持つことが明らかになってきた(Curiel, Coukos et al. 2004, Hiraoka, Onozato et al. 2006, Balkwill, Capasso et al. 2012, van der Leun, Thommen et al. 2020)。加えて、腫瘍に浸潤する T 細胞はナイーブ T 細胞、幹細胞様メモリーT 細胞、レジデントメモリーT 細胞など、様々な表現型を持つ混合集団で構成されていることも明らかになってきた(Savas, Virassamy et al. 2018, van der Leun, Thommen et al. 2020)。更に、Single-cell RNA 解析などの詳細な解析により、腫瘍微小環境内での T 細胞サブセットの分布が臨床の転帰と相関することが分かってきた(Savas, Virassamy et al. 2018)。

同様に臓器移植の分野においても、グラフト内微小環境における免疫バランスやリンパ球サブセットの構成がグラフトの保護、長期成績に影響することが報告されている(Zwang and Leventhal 2017)。マウスの皮膚移植モデルを用いた検討では、移植後免疫寛容を獲得したグラフト内の $CD4^+Foxp3^+$ Treg の存在が拒絶反応を引き起こすエフェクター細胞を常に監視・抑制することで、拒絶を回避していることが分かってきた(Kendal, Chen et al. 2011) 。更に、グラフト内の微小環境における免疫バランスが、免疫寛容の誘導にも重要であることが分かってきた(You, Zuber et al. 2012, Goto, You et al. 2013)。Goto らは、マウスの心移植前後から Fc 非結合性抗 CD3 抗体である抗 $CD3F(ab')_2$ 抗体を 5 日間投与すると、移植後早期のグラフトへのリンパ球の浸潤 (graft infiltrating lymphocytes; GILs) が抑制され、グラフト生存期間は延長するが、最終的に中央値 (median survival time, MST） 48 日で拒絶されてしまうことを報告した。一方で、抗 $CD3F(ab')_2$ 抗体を、グラフトへのリンパ球浸潤が生じた後の移植後 72 時間から 5 日間投与すると、グラフト内に Treg 有意な環境が形成され、グラフトの長期生存、すなわち免疫寛容状態が誘導されることを示した(Goto, You et al. 2013)。我々の研究室ではこの研究で示された移植後 72 時間以内の GILs の免疫学的役割に着目し、マウス心臓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(Ganchiku, Goto et al. 2021)。

本研究では、上記のマウス心移植モデルにおける移植後早期 GILs の役割を、

マウス皮膚移植モデルにおいて検討した。皮膚移植は心移植に比べて、免疫寛容誘導や拒絶反応の制御が困難であることが知られている (Chong, Alegre et al. 2013)。また、皮膚移植モデルにおいては心移植モデルでは困難なグラフトの再移植が比較的容易であり、再移植を利用した GILs の役割を検討することが可能である。これまでに我々が明らかにしてきた移植後早期の時間経過により異なる GILs の役割を更に詳細に解明することは、臨床の臓器移植における効率的な免疫寛容誘導の治療プロトコル開発に重要な知見を提供する可能性がある。また、この研究成果を発展させるために実施したヒト化マウスヒト皮膚移植モデルの確立、メモリーT 細胞の解析、抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体の治療効果についても記載する。

5. 第一章　ヒト化マウスの作成

5-1. 緒言

臓器移植後の拒絶反応や、グラフト保護効果の機序解析において、マウスやラットなどの小動物モデルが重要な研究ツールであることは論を待たない。しかし、これら小動物の免疫反応はヒトと全く同一では無いことから、研究結果がそのままヒトの臨床に応用できるとは限らない (Greiner, Rossini et al. 2001, Monk, Hargreaves et al. 2006)。そのため、比較的ヒトに近いサルなどの霊長類を用いた臨床前研究が必要となるが、倫理的問題や費用の問題がある。ヒト化マウスは比較的容易また安価にヒトの免疫系を免疫不全マウスに再現することで、生体内におけるヒト免疫反応の観察を可能にする研究ツールで、新規薬剤開発やヒトにのみ感染する微生物の研究、自己免疫疾患、移植免疫分野で用いられている (Kenney, Shultz et al. 2016)。NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NOD/SCID/IL2rg^{null}; NSG)マウスは T 細胞、B 細胞、NK 細胞を欠損した免疫不全マウスであるが、これまでの免疫不全マウスに比べて、高度に獲得免疫が排除されており、ヒト化マウスを高率に作成可能である (Shultz, Ishikawa et al. 2007, Pearson, Greiner et al. 2008, Legrand, Ploss et al. 2009)。これらのヒト化マウスを用いた移植実験モデルには、これまでヒト皮膚移植 (Murray, Petzelbauer et al. 1994, Murray, Schechner et al. 1998, Turgeon, Banuelos et al. 2003)、ヒト血管移植(Goto, Issa et al. 2013)を用いた方法論があるが、NSG マウスを用いたヒト化マウス移植モデルでは自然免疫、特にマウス Gr-1 陽性細胞の関与により拒絶が生じるといった問題が提起されている (Kirkiles-Smith, Harding et al. 2009)。また、ヒト化マウスに使用する胸腺がマウスであることから構築したヒト末梢血リンパ球（T 細胞）の機能が不十分で拒絶が生じないとする報告もある (Sagoo, Ali et al. 2011)。

5-2. 目的

ヒト化マウスヒト皮膚移植モデルを作成する。

5-3. 方法

<u>マウス</u>

NSG マウスは米国ジャクソン研究所 (Bar Harbor, ME, USA)から日本チャールズリバー (Yokohama, Japan)を介して購入し、北海道大学付属動物実験施設で北海道大学動物実験実施マニュアルに従い繁殖・飼育した。C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$ Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J (Balb/c Rag2$^{-/-}$ γc$^{-/-}$: BRG)マウスは米国ジャクソン研究所 (Bar Harbor, ME, USA)から購入し、北海道大学付属動物実験施設で北海道大学動物実験実施

マニュアルに従い繁殖・飼育した。全ての実験は北海道大学の動物実験委員会の承認を得て行われた(承認番号：22-0048)。

ヒト皮膚移植

あらかじめ氷を詰めた容器を準備し、苫小牧日翔病院形成外科で手術中に余剰皮膚を頂き、生理食塩水を入れたシャーレ内に入れ、上記容器内に入れて札幌まで輸送した。札幌到着後、ヒト皮膚は 1cm×1cm 程度にトリミングし、後日移植する皮膚は生理食塩水に浸し冷蔵庫内(4℃)で保管した。

NSG マウスにイソフルレンで麻酔をかけ、背部の剃毛を行い、1cm×1cm 程度皮膚を切除した。あらかじめトリミングしたヒト皮膚をマウスの皮膚切除部に乗せ、四隅とその間を縫い合わせることで固定した。また、グラフトを完全に密着させるため、グラフトに小さい穴を開けてグラフトと背中の間の空気を完全に逃がした。生理食塩水に浸したガーゼをグラフトの直上に置き、バンテージを巻いて固定した。バンテージは最低 1 週間巻き、途中バンテージが取れてしまった場合は再度巻き直した。バンテージ除去後、固定の糸を抜糸した。皮膚の状態は週に最低 3 回確認し、グラフトの 90%以上が壊死した時を拒絶と判定した。



図 1. グラフトの外観。(左) 移植直後、(右) 拒絶時

グラフトの写真を図 1 に示す。左の写真は移植時、右の写真は拒絶と判定した時の写真である。拒絶したグラフトは広範に色調が変化し、周囲から剥がれ、今にも脱落しそうになっている。

抗 Gr-1 抗体の投与

先行研究(Racki, Covassin et al. 2010)を参考に、InVivoMAb anti-mouse Ly6G/Ly6C (Gr-1) (clone RB6-8C5; BioXCell, Lebanon, NH, USA)を 4-5 日毎、もしくは 8-10 日毎に 100μg ずつ腹腔内投与した。抗体は観察期間中拒絶が確認されるまで、もしくはマウスが死亡するまで投与した。

採血及び Flow cytometry による解析

マウスの採血はヘマトクリット管 (As One Corporation, Osaka, Japan)を用い尾静脈より行った。マウスの末梢血は以下の抗体を冷蔵庫内(4℃)で 20 分間静置し染色した。染色後 FACS canto II (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)を用いて解析した。

マウス抗体リスト：CD69-FITC (H1.2F3)、CD11b-PE (M1/70)、CD3ε-PE-Cy7 (145-2C11)、Gr-1-APC (RB6-8C5) (いずれも BD Biosciences, San Diego, CA, USA)。

ヒト抗体リスト：CD3-FITC (UCHT1)、CD45-APC (H130)、CD19-V500 (HIB19) (いずれも BD Biosciences, San Diego, CA, USA)。また、死細胞は 7-AAD (BD Biosciences)を用いて除去した。

ヒト PBMCs の精製、BRG マウスへの投与

被験者より約 20ml の末梢血を採取し ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)入りの採血管で保存した。その後出来る限り速やかにフィコール液 (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan)を用いて PBMCs を分離した。分離した PBMCs に 1×PBS 溶液を足し、5.0×10^6 個/500μl に調整して BRG マウスに腹腔内投与した。

統計学的解析

Graft survival は Kaplan-Meier 曲線と log-rank 検定を用いて解析した。単一データ間での多重比較は、一元配置分散分析に続けて Tukey-Kramer 多重比較検定を用いて行った。2 群間の比較は Student の両側 t 検定を用いて行った。すべての実験において、$p<0.05$ で有意差ありとみなした。

データは Prism ソフトウェアプログラム、バージョン 8.4.3（GraphPad Software, San Diego, CA, USA）を用いて解析した。

5-4. ヒト化マウスを作成し、冷阻血時間によって graft survival が変化するかを検討する

5-4-1. 背景

ヒトの皮膚は苫小牧日翔病院形成外科で植皮手術を行った患者の余剰皮膚を使用したが、苫小牧から札幌まで約 75km 離れており、輸送に最低でも 2 時間程度の時間を必要とする。マウスの皮膚移植モデルは他の移植モデルと異なり数週間の冷阻血でも viable が残存するとの報告があるが(Billingham and Medawar 1951)、ヒト皮膚を用いた場合の検討が必要である。

5-4-2. 実験デザイン

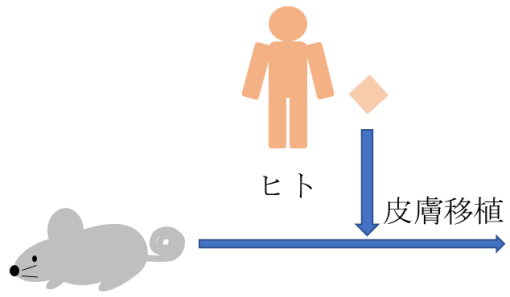


図 2. 実験シェーマ

実験のシェーマを図 2 に示す。ヒト皮膚を NSG マウスに移植した。移植までの時間は札幌到着直後 (冷阻血時間 6〜8 時間)、皮膚採取 48 時間後、皮膚採取 72 時間後とした。各々n=3 で解析した。

5-4-3. 結果

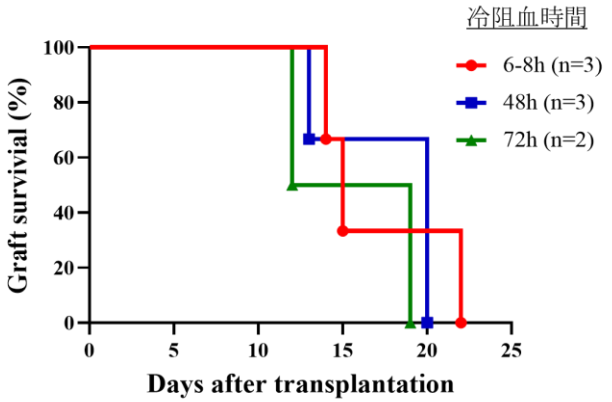


図 3. Graft survival. 赤線は冷阻血時間が 6-8 時間 (n=3)、青線は 48 時間 (n=3)、緑線は 72 時間 (n=2)を表している

Graft survival を図 3 に示す。皮膚採取 72 時間後の 1 匹は移植翌日に死亡した。冷阻血時間が 6-8 時間と 48 時間の間で明らかな差を認めなかった。72 時間と 6-8 時間、もしくは 48 時間の間では 72 時間の n 数が少ないため有意差を出せなかったが、同等の graft survival となる傾向を認めた。

5-5. BRG マウスにヒト皮膚を移植して拒絶が惹起されないか検討する

5-5-1. 実験デザイン

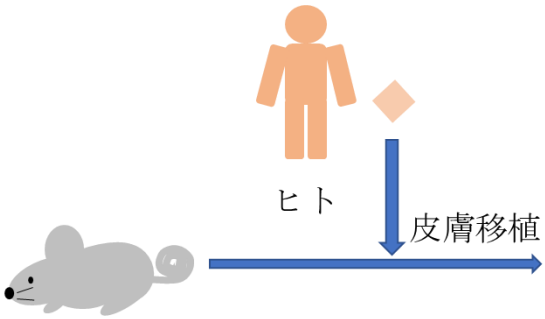


図 4. 実験シェーマ

実験のシェーマを図 4 に示す。BRG マウスにヒトの皮膚を移植した(n=3)。Control として NSG マウスにヒトの皮膚を移植した(n=3)

5-5-2. 結果

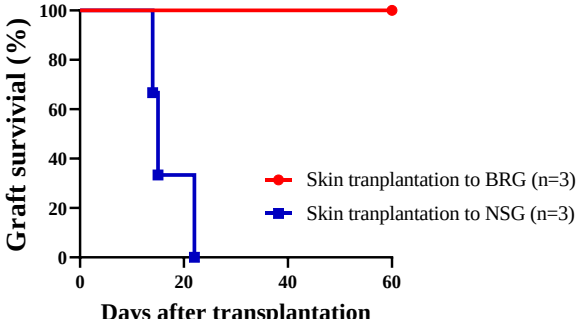


図 5. Graft survival。赤線が BRG マウスへの移植 (n=3)、青線が NSG マウスへの移植 (n=3)を表している

Graft survival を図 5 に示す。全ての BRG マウスは 60 日以上拒絶されず生着したままであった。NSG マウスは全例拒絶された(中央値：15.0 日)

5-6. NSG マウスにヒトの皮膚を移植した後に抗 Gr-1 抗体を投与し、graft survival の延長を得られるかを検討する

5-6-1. 実験デザイン

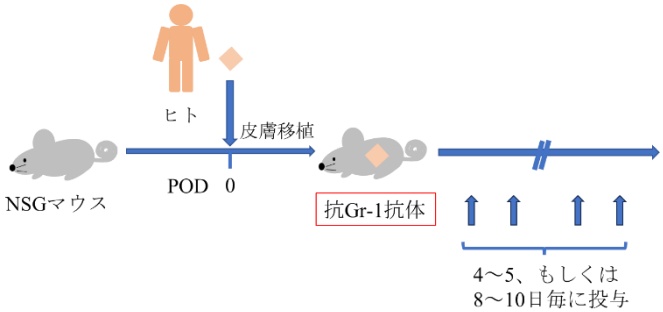


図 6. 実験シェーマ

実験のシェーマを図 6 に示す。NSG マウスにヒト皮膚移植を行ったあと、4-5 日毎、もしくは 8-10 日毎に抗 Gr-1 抗体を投与した。抗体は死亡、もしくは拒絶が確認されるまで投与した(各々n=2)。Control として抗 Gr-1 非投与群を n=4 で作成した。

5-6-2. 結果

5-6-2-1. 抗 Gr-1 抗体投与前後での Flow cytometry 解析

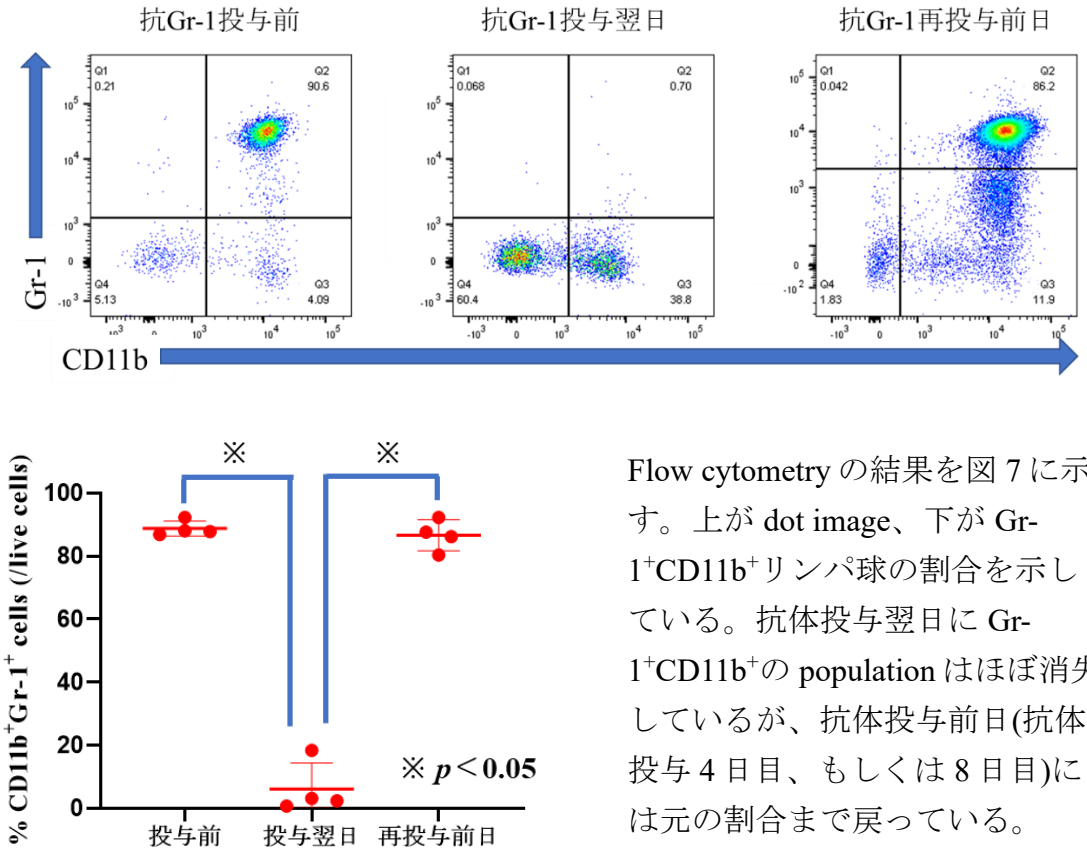


図 7. Flow cytometry. (上) dot image、(下) $CD11b^{+}Gr\text{-}1^{+}$細胞の割合

Flow cytometry の結果を図 7 に示す。上が dot image、下が Gr-$1^{+}CD11b^{+}$リンパ球の割合を示している。抗体投与翌日に Gr-$1^{+}CD11b^{+}$の population はほぼ消失しているが、抗体投与前日(抗体投与 4 日目、もしくは 8 日目)には元の割合まで戻っている。

5-6-2-2. 結果

表 1. Graft survival

抗Gr-1抗体	Graft survival (日)
4-5日毎に投与 (n=2)	※45, ＞60
8-10日毎に投与 (n=2)	※11, ＞60
非投与 (n=4)	18, 20, 23, 27

Graft survival の結果を表 1 に示す。抗 Gr-1 抗体を投与した 4 匹のうち 2 匹は観察期間中に死亡 (table 内の※)したが、観察期間中明らかなグラフトの拒絶所見は認めなかった。生存した 2 匹はいずれも 60 日以上拒絶所見を認めず、グラフトの長期生着が得られていた。

5-7. BRG マウスにヒトの皮膚を移植し、生着が確認された後ヒトの PBMCs を投与し拒絶が惹起されるかを検討する

5-7-1. 実験デザイン

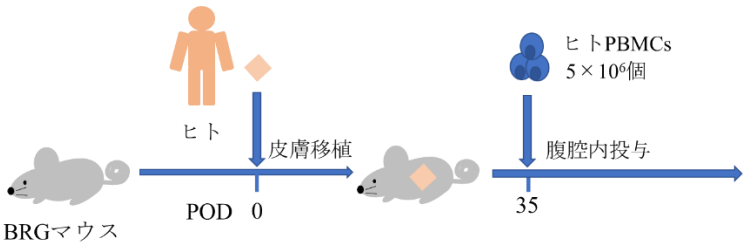


図 8. 実験シェーマ

実験シェーマを左に示す。過去の報告 (Issa, Hester et al. 2010)を参考に、BRG マウスにヒトの皮膚を移植した後、35 日後に別のヒトから精製した PBMCs を 5×10^6 個腹腔内投与した。実験は 3 回行い、計 7 匹のマウスに対し解析を行った。

5-7-2. 結果

5-7-2-1. BRG マウス末梢血中の CD45⁺リンパ球構築率解析

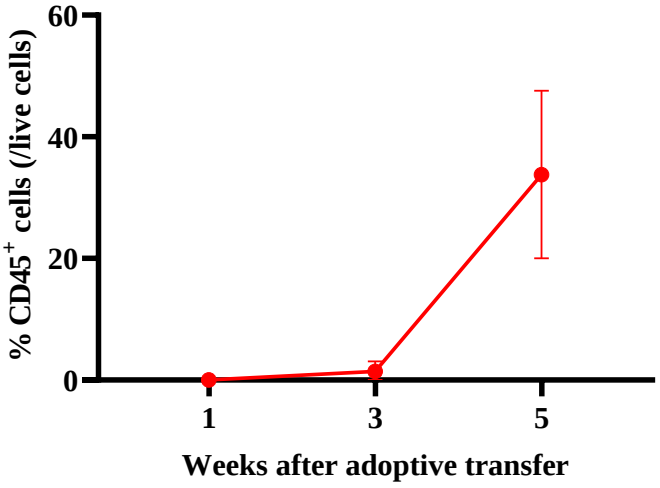


図 9. CD45⁺リンパ球の再構築率

ヒト PBMCs 移入後、BRG マウスの末梢血中に存在するヒト由来 CD45 陽性細胞の割合を経時的に示した図を図 9 に示す。移入後 3 週まではヒト由来 CD45 陽性細胞は再構築されていないが、移入後 5 週で急激に CD45 陽性細胞が再構築されている。

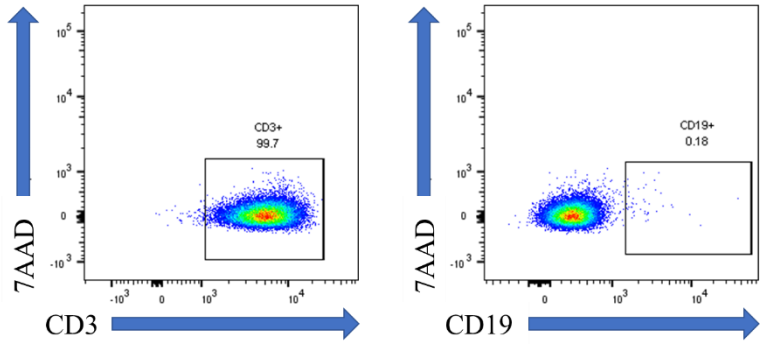


図 10. 構築リンパ球の T リンパ球 /B リンパ球解析.
(左) $CD3^+$ T リンパ球、(右) $CD19^+$ B リンパ球

PBMCs 移入 5 週後の BRG マウス末梢血中に存在する $CD3^+$、もしくは $CD19^+$の population を図 10 に示す。BRG マウスに構築されているヒトリンパ球はほぼ $CD3^+$T 細胞である。

5-7-2-2. 結果

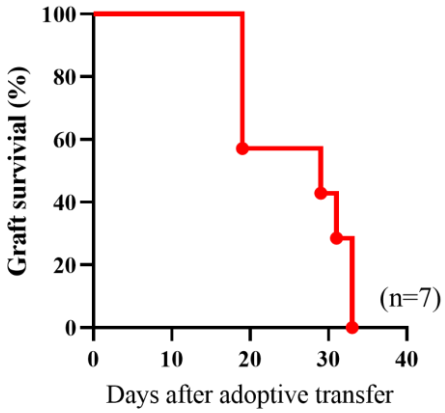


図 11. Graft survival

ヒト PBMCs 投与後の Graft survival を図 11 に示す。全例拒絶され、Graft survival の中央値は 29.0 日だった。既報 (Issa, Hester et al. 2010)では PBMCs 投与後のグラフトは全例拒絶されており、同等の結果を得た。

5-8. 考察

本研究では、ヒト皮膚移植ヒト化マウスモデルとしてNSGマウスおよびBRGマウスを用いて検討した。NSG マウスおよび BRG マウスはいずれも T 細胞、B 細胞、NK 細胞を欠く免疫不全マウスであるが、ヒト皮膚移植モデルにおいて NSG マウスはリンパ球の構築無しで移植後拒絶を惹起する一方、BRG マウスは移植後のグラフトの拒絶が起こらず、ヒト上皮構造は保たれことが報告されている (Kirkiles-Smith, Harding et al. 2009)。本研究では上記既報と同様の結果が確認された (実験 5-4-3、5-5-2)。また、NSG マウスにヒト皮膚を移植するとグラフト内に Gr-1 陽性のマウス由来細胞が高レベルで浸潤しており(Kirkiles-Smith, Harding et al. 2009)、この浸潤細胞はグラフトを拒絶させると報告されている。さらに NSG マウスでヒト皮膚移植を行い、レシピエントの Gr-1 陽性細胞を抗 Gr-1 抗体の反復投与により枯渇させることでグラフトへ浸潤する Gr-1 陽性細胞

数が減り、グラフトの拒絶が惹起されず長期生着を得られるとの報告もある (Racki, Covassin et al. 2010)。この抗 Gr-1 抗体を投与した NSG マウスにヒト PBMCs を投与すると、ヒト皮膚グラフトにヒト CD4 陽性、またはヒト CD8 陽性 T 細胞が浸潤し、ヒト皮膚グラフトを拒絶すると報告されている (Racki, Covassin et al. 2010)。我々の検討でも同様にヒト皮膚移植をした NSG マウスに抗 Gr-1 抗体を投与することで、グラフトの生着が得られた（実験 5-6-2-2）。N が少ないため追加での確認が必要ではあるが、抗 Gr-1 抗体の投与間隔を既報よりも 2 倍に長く(8-10 日毎) しても長期生着が得られた。一方で、Gr-1 抗体を投与した 4 匹中 2 匹が観察期間中に死亡し、原因として自然免疫系の過剰な抑制の可能性や、抗 Gr-1 抗体投与後に Gr-1 陽性細胞が投与前より増加する現象も観察されたことから、自然免疫の rebound による過剰反応が関与した可能性もある。今後更なる検討が必要である。

BRG マウスは NSG マウスと同様、B 細胞、T 細胞、NK 細胞を欠損した免疫不全マウスである。しかし、ヒト造血幹細胞 (haematopoietic stem cell; HSC)を NSG マウス、BRG マウスに投与すると、いずれのマウスもヒト由来の T 細胞、B 細胞、NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞が生着するが、NSG マウスは BRG マウスよりもヒト造血幹細胞や、ヒト T 細胞が有意に高率に生着する (Brehm, Cuthbert et al. 2010)。このようにヒト免疫の構築には NSG マウスが優位であることが知られている (Shultz, Ishikawa et al. 2007, Kirkiles-Smith, Harding et al. 2009)。一方で、ヒト皮膚移植においては、マウス自然免疫により拒絶が惹起される NSG マウスと異なり、BRG マウスでは拒絶が生じることなく生着する (Issa, Hester et al. 2010)。このことから、ヒト皮膚移植モデルにおいては BRG マウスが NSG マウスよりも有利であると考えられる。

本研究でも同様に BRG マウスにヒト皮膚を移植すると拒絶反応が生じることなく生着した（実験番号 5-5-2）。更にこのヒト皮膚を生着したマウスに、別のヒト PBMCs を移入すると、移入後 5 週間でヒト PBMCs（主にヒト CD3 陽性 T 細胞）がマウス末梢血に確認でき (実験 5-7-2-1)、ヒト皮膚グラフトも中央値 29 日で拒絶された (実験 5-7-2-2)。以上の結果から、BRG マウスを使用したヒト皮膚移植モデルの作成が可能で、今後の臨床に向けた検討が期待できる。

6. 第二章　マウスアロ皮膚移植モデルでのメモリーT 細胞の存在及び冷阻血時間延長に伴うグラフト生存期間への影響の検討

6-1. 緒言

近年の免疫学の発展に多大な貢献を果たしている近交系マウスは、その遺伝子が解明されていること、遺伝子操作が比較的容易で、多くの利用可能な遺伝子改変マウスが存在していること、既に多くの疾患モデルが開発されていること、マウスの抗原をターゲットとした抗体の多彩さなどから、免疫学的機序解析、in vivo の動物実験に多用されている。しかし、いわゆる野生に存在するマウスと異なり、実験用マウスは病原体フリーの環境で飼育されており、多くの抗原に暴露されながら生活しているヒトと異なる (Beura, Hamilton et al. 2016)。即ち、ヒトにおいては抗原感作後の多くのメモリーT 細胞の存在から、マウスで有効な治療法も効果が得られないことがあると報告されている (Valujskikh, Pantenburg et al. 2002, Zhai, Meng et al. 2002, Wu, Bensinger et al. 2004)。また、これらメモリーT 細胞は、臓器移植の臨床における急性および慢性拒絶反応に重要な役割を持つことも報告されている (Heeger, Greenspan et al. 1999)。加えて、実験用マウスを用いたマウス心移植モデルにおいても、ドナー反応性 $CD8^+$メモリーT 細胞が移植後 24 時間以内にグラフトに浸潤し、グラフト微小環境を形成すると報告されている (Schenk, Nozaki et al. 2008)。このようにメモリーT 細胞の機能、またその制御は重要であり、マウス移植モデルにおける抗原感作後の拒絶反応の観察や、その制御の検討が必要である。

臓器移植において、臓器を摘出して、レシピエントの体内で血流を再開するまでの阻血時間、特に体外で冷却し保存している時間を冷阻血時間と呼ぶが、この冷阻血時間が延長すると血流再開後にグラフトが働かない primary nonfunction の頻度が高くなり、移植後拒絶反応が増強すると報告されている (Feng, Goodrich et al. 2006, Segev, Kucirka et al. 2008, Braat, Blok et al. 2012)。マウスを用いた実験でも心アロ移植モデル、血管アロ移植モデル、肝アロ移植モデルで冷阻血時間の延長によりグラフト生存期間が短縮することが報告されている (Gong, Huang et al. 2013, Goto, Issa et al. 2013, Wang, Hu et al. 2013, Datta, Devaney et al. 2017)。しかし、皮膚移植モデルにおいては、冷阻血時間によるグラフト生存期間短縮効果はよく分かっていない。マウス皮膚移植モデルにおいては、ドナーマウスの尾からレシピエントマウス 4-5 匹分の皮膚を採取することが出来る。順に移植すると、最後に使用する皮膚は最初に移植したマウスと 2 時間程度の冷阻血時間の違いができる。このことから、マウス皮膚移植モデルの基礎実験として冷阻血時間延長とグラフト生存期間延長との関連を検討す

る必要があると考えた。

6-2. 目的

1. 抗原感作後のメモリーT 細胞存在下でのマウス皮膚移植アログラフト生存期間を観察する。
2. 冷阻血時間の延長がマウス皮膚移植アログラフト生存期間に与える影響を検討する

6-3. 方法

マウス

週齢 8-12、雄の Balb/c (H-2^d) もしくは C57BL/6 (B6, H-2^b) マウスを使用した (Japan SLC,、Hamamatsu、Japan)。いずれのマウスも抗原フリーな環境下で飼育された。全ての実験は北海道大学の動物実験委員会の承認を得て行われた(承認番号：22-0048)。

皮膚移植

B6 マウスの尾から皮膚を採取し 0.7-1cm^2 角にトリミングした。1 匹のマウスから 4-5 匹分のグラフトが作成でき、グラフトは生食を入れたシャーレの中に浸し、移植までの間 on ice で保存した。Balb/c マウスにイソフルラン（ヴィアトリス、米国）で麻酔をかけ、グラフトをマウスの背中に移植した。グラフトは四隅とその間の計 8 箇所を 7-0 monofilament (Covidien, Minneapolis, MN, USA) を用い縫合固定した。グラフトの直上に生食で湿らせたガーゼを乗せ、バンテージを巻いて固定した。手術 7 日後にイソフルランで麻酔をかけた後バンテージを除去し、固定糸は抜糸した。グラフトが完全に脱落するまで週に最低 3 回グラフトの状態を確認した。拒絶の判定はグラフトが 90%以上壊死した時とした。

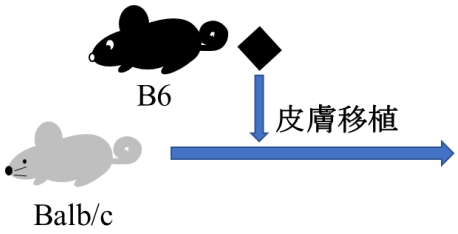
統計学的解析

Graft survival は Kaplan-Meier 曲線と log-rank 検定を用いて解析した。単一データ間での多重比較は、一元配置分散分析に続けて Tukey-Kramer 多重比較検定を用いて行った。2 群間の比較は Student の両側 t 検定を用いて行った。すべての実験において、$p<0.05$ で有意差ありとみなした。

データは Prism ソフトウェアプログラム、バージョン 8.4.3（GraphPad Software, San Diego, CA, USA）を用いて解析した。

6-4. 予備実験：マウス皮膚移植モデルを確立する

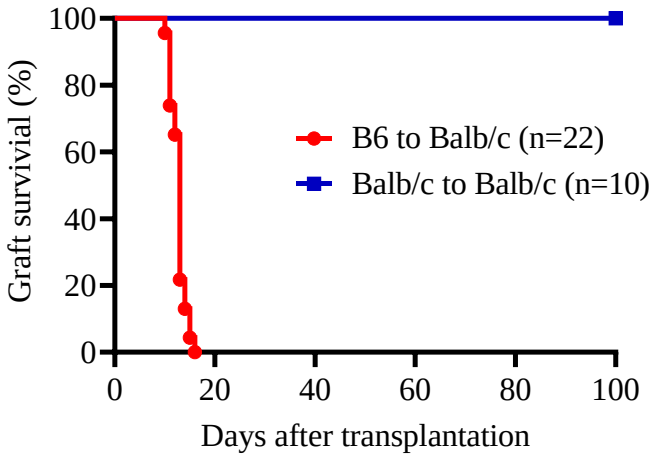
6-4-1. 実験デザイン



実験のシェーマを図 12 に示す。Balb/c をレシピエント、B6 をドナーとして皮膚移植を行った (n=22)。Control としてレシピエント、ドナーいずれも Balb/c で皮膚移植を行った (n=10)。

図 12. 実験シェーマ

6-4-2. 結果



Graft survival を図 13 に示す。Syngeneic 移植では全例拒絶されず長期生着を得たが、アロ移植では全例拒絶された(中央値：13.0 日)。アロ移植での survival 日数は既報と同等であった(Cerny, Ramseier et al. 1988)。

図 13. Graft survival. 赤線がアロ移植 (B6 to Balb/c, n=22)、青線が syngeneic 移植 (Balb/c to Balb/c, n=10)を表している

6-5. マウス皮膚移植モデルにおける冷阻血時間とグラフト生存期間との関係を検討する

6-5-1. 方法

B6 の尾から皮膚を採取し 1cm 角にトリミングを行った。直後に移植する皮膚以外は生理食塩水を入れたシャーレ内入れ密閉した後、移植するまでの間冷蔵庫内(4℃)で保存した。移植までの時間は採取後 4 時間、24 時間、72 時間とし、各々n=4 とした。

6-5-2. 結果

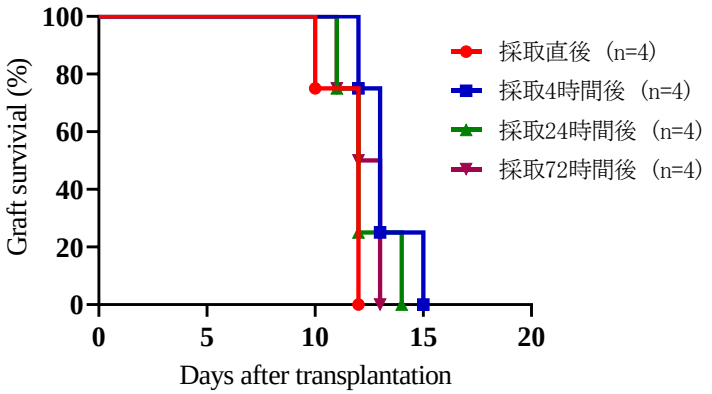


図 14. Graft survival. 赤線が冷阻血時間ほぼ 0 (n=4)、青線が冷阻血 4 時間 (n=4)、緑線が冷阻血 24 時間 (n=4)、紫線が冷阻血 72 時間 (n=4)での移植結果を示している

各々の冷阻血時間での Graft survival を図 14 に示す。少なくとも 72 時間以内の冷阻血時間は graft survival に影響しないことが確認された。

6-6. 皮膚移植モデルでメモリーT 細胞を作成する

6-6-1. 実験デザイン

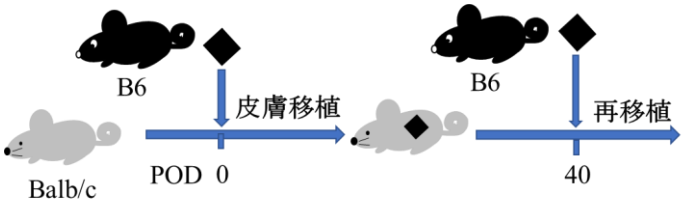


図 15. 実験シェーマ

既報(Cerny, Ramseier et al. 1988) は初回移植後 35 日目でメモリー細胞が作られていることを参考に、B6 の皮膚を Balb/c に移植し、40 日後に B6 の皮膚を再移植した。シェーマを図 15 に示す。再移植の皮膚は初回移植と同じ場所に移植する群(n=6)と対側に移植する群 (n=2)に分けて検討した。

6-6-2. 結果

表 2. Graft survival. 同部位に 6 例移植したが、4 例拒絶前に脱落したため 2 例のみの結果となった

移植部位	Graft survival（日）
初回移植と同部位に移植	14、10
初回移植と対側の背中に移植	11、10

Graft survival を表 2 に示す。同側に移植した 6 例のうち、4 例が拒絶を確認する前に脱落してしまった。拒絶が確認された 2 例と、対側の背中に移

植 した 2 例の graft survival を表 2 に示す。同側、対側いずれの graft survival も初回移植での graft survival (6-4-2 参照)と明らかな差を認めなかった。

6-6-3. 考察

既報(Cerny, Ramseier et al. 1988)を参考に B6 の皮膚を Balb/c に移植し、40 日後に B6 の皮膚を再移植する実験を行ったが、予想に反し再移植時の graft survival は初回移植と明らかな差を認めなかった。上記実験デザインの改善案として以下の点を考えた。

① 同側の再移植では 6 例中 4 例とかなりの割合で生着が得られなかった。初回手術と同じ部位に再移植したため、グラフト床に強力な炎症が起きており、グラフトが生着することが出来なかった可能性がある。

② 再移植までの日数を既報の 35 日を参考にやや長めの 40 日と設定したが、他の論文では 42 日(Jones, Carvalho-Gaspar et al. 2006)や 60 日(Ji, Shen et al. 2011)としているものがあり、40 日では十分なメモリーT 細胞が作れなかった可能性がある。

以上を踏まえ、下記のような研究計画を立てた

6-6-4. 実験デザイン

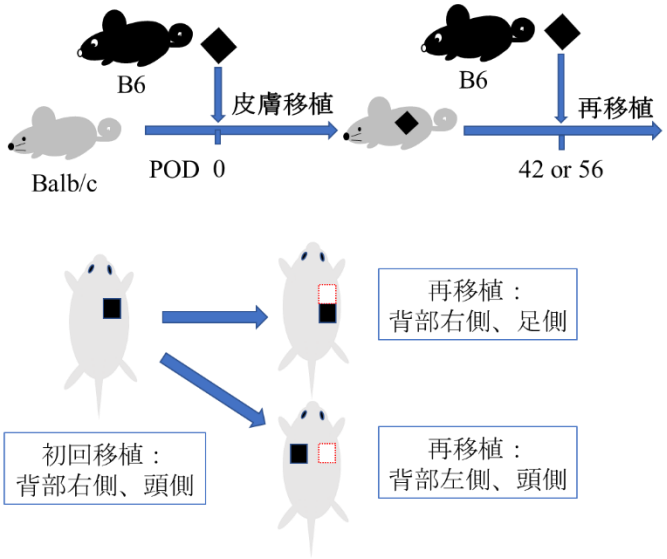


図 16. 実験シェーマ

実験のシェーマを図 16 に示す。初回手術から再移植までの期間は 42 日、もしくは 56 日とした。また、初回手術は右側頭側の背中に行い、再手術は同側の場合初回手術部位より尾側に移植して初回手術部位と重ならないようにした。対側の場合は初回手術と同じ高さで移植を行った。各々 n=3 で解析を行った。

6-6-5. 結果

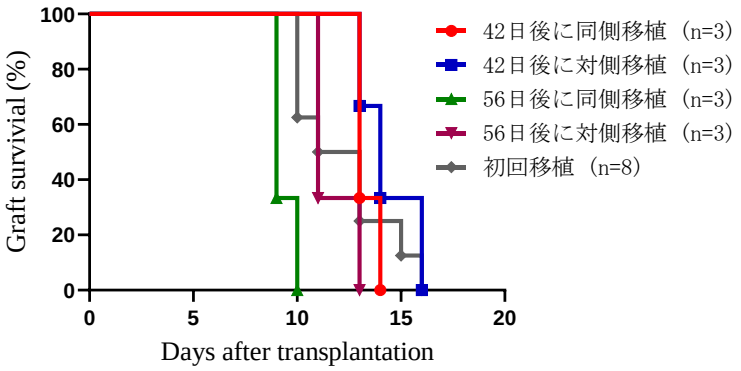


図 17. Graft survival. 赤線が 42 日後に同側 (n=3)、青線が 42 日後に対側 (n=3)、緑線が 56 日後に同側 (n=3)、紫線が 56 日後に対側 (n=3)、灰色線が初回移植 (n=8)を表している

Graft survival を図 17 に示す。42 日後に再移植した群は同側、対側いずれも初回移植と graft survival に有意差を認めなかった。56 日後に再移植した群は対側に移植した場合は初回移植と graft survival に有意差を認めなかったが、同側に移植した場合は初回移植より graft survival は短縮した($p<0.05$)。そのため、初回移植から 56 日後に同側に再移植する群を 4 例追加して検討を行った。

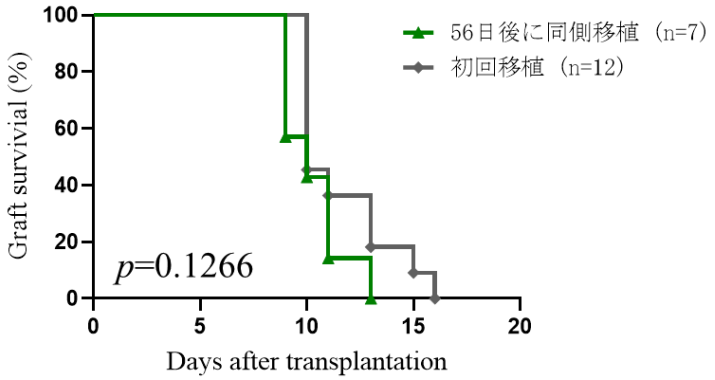


図 18. 追加検討後の Graft survival. 緑線が 56 日後に同側 (n=7)、灰色線が初回移植 (n=12)を表している

追加後の graft survival を図 18 に示す。追加検討後の graft survival は初回移植の graft survival と明らかな差を認めなかった($p=0.1266$)

6-7. 考察

臓器移植の分野において免疫抑制剤無しで、移植グラフトが生着する免疫寛容の誘導は究極の目標である。メモリーT 細胞は臓器移植における拒絶を惹起させることが知られており、心移植や膵島移植でのマウスモデルにおいてメモリーT 細胞がグラフトに浸潤することで拒絶が惹起されることが確認されている (Jones, Brook et al. 2010, Xia, Chen et al. 2010)。同様に、皮膚移植モデルでも感作後の graft survival は、感作前の graft survival より短縮すると報告されている (Minamimura, Sato et al. 2008)。先述したヒト化マウスや、後述する GILs の構

築モデルへの応用を考え、BRG マウスと同系統の Balb/c をレシピエント、B6 をドナーとしてメモリーT 細胞の作成を検討することとした。予想に反し、メモリーT 細胞作成後の皮膚移植は作成前と比較して graft survival の短縮は認められなかった（6-6-5.参照）。Balb/c マウスは B6 マウスと比較して Th2 優位の免疫応答が起こりやすく (Mosmann and Coffman 1989)、メモリーT 細胞が作られても拒絶が惹起されにくいマウス系統であることが原因であるかもしれない。今後の計画として IFN-γ ELISPOT などの functional assay でメモリーT 細胞作成後の機能が亢進していることや、マウスの strain を逆(レシピエント：B6、ドナー：Balb/c)にして検討する必要があると考える。

7. 第三章　マウス皮膚移植モデルにおける抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体の治療効果

7-1. 緒言

臓器移植において抗 CD3 抗体 (clone: OKT3)は拒絶を強力に抑制できるため、他の免疫抑制剤で拒絶のコントロールが出来ない症例に対し使用されてきた。しかし、この抗体の激烈な infusion reaction により INF-γ、IL-2、TNFα などの放出が惹起されるサイトカインストームの発症から(Abramowicz, Schandene et al. 1989, Chatenoud, Ferran et al. 1989)、本抗体製剤は 2011 年製造中止となった。これらのサイトカイン放出はマクロファージや単球などの Fc receptor (FcR)が抗 CD3 抗体の Fc 部と結合することで生じることから、新規抗体薬として Fc 部分を修飾した抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体や non-binding FcR 抗 CD3 抗体が開発された。臓器移植においてこれらの薬剤はまだ認可されていないが、I 型糖尿病患者に non-binding FcR 抗 CD3 抗体の治験が行われており、抗体治療の安全性、I 型糖尿病の発症予防や治療効果が示されている (Herold, Bundy et al. 2019, Perdigoto, Preston-Hurlburt et al. 2019)。いずれ移植分野での臨床応用が期待される。

マウスの臓器移植モデルでは抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体を用いた免疫寛容誘導プロトコル作成が試みられており、心臓移植、膵島移植、心筋前駆細胞移植に対し免疫寛容の誘導が得られた (You, Zuber et al. 2012, Goto, You et al. 2013, Calderon, Prot et al. 2016)。興味深いことに、いずれの移植モデルにおいても移植前、もしくは移植直後より抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体を投与した場合にはグラフト生存期間の延長は得られるものの、最終的に拒絶される。これに対し、移植後しばらくしてから抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体を投与するとほとんどが拒絶されず免疫寛容が誘導される。一方で、マウス皮膚移植における抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体の効果は分かっていない。

7-2. 目的

マウス皮膚移植モデルに対する抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体の治療効果を検討する

7-3. 方法

<u>マウス</u>

週齢 8-12、雄の Balb/c (H-2^d) もしくは C57BL/6 (B6, H-2^b) マウスを使用した (Japan SLC,、Hamamatsu、Japan)。いずれのマウスも病原微生物のいない環境下で飼育された。全ての実験は北海道大学の動物実験委員会の承認を得て行われた(承認番号：22-0048)。

<u>皮膚移植</u>

B6 マウスの尾から皮膚を採取し 0.7-1cm^2 角にトリミングした。1 匹のマウスから 4-5 匹分のグラフトが作成でき、グラフトは生食を入れたシャーレの中に浸し、移植までの間 on ice で保存した。Balb/c マウスにイソフルレンで麻酔をかけ、グラフトをマウスの背中に移植した。グラフトは四隅とその間の計 8 箇所を 7-0 monofilament (Covidien, Minneapolis, MN, USA)を用い固定した。グラフトの直上に生食で湿らせたガーゼを乗せ、バンテージを巻いて固定した。手術 7 日後にイソフルレンで麻酔をかけた後バンテージを除去し、固定糸は抜糸した。グラフトが完全に脱落するまで週に最低 3 回グラフトの状態を確認した。拒絶の判定はグラフトが 90%以上壊死した時とした。

採血及び Flow cytometry による解析

マウスの採血はヘマトクリット管 (As One Corporation, Osaka, Japan)を用い尾静脈より行った。マウスの末梢血は以下の抗体を冷蔵庫内(4℃)で 20 分間静置し染色した。染色後 FACS cantoII (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)を用いて解析した。

Anti-CD3ε-PE (145-2C11)、anti-CD4-APC-H7 (GK1.5)、anti-CD45-FITC (30-F11)、anti-TCRb-PE-Cy7 (H57-597)(以上全て BD Biosciences San Diego CA USA)、anti-CD8a-eFluor506 (53-6.7) (Thermo Fisher Scientific Waltham MA USA)。死細胞は 7-AAD (BD Biosciences)を用いて除去した

抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体の投与

抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体 (clone 145-2C11 BioXCell Lebanon NH USA)に 1×PBS を加え計 200ml になるよう調整した。マウスの尾静脈をドライヤーの温風を当てて十分拡張させた後、薬剤を静脈内に注入した。

統計学的解析

Graft survival は Kaplan-Meier 曲線と log-rank 検定を用いて解析した。単一データ間での多重比較は、一元配置分散分析に続けて Tukey-Kramer 多重比較検定を用いて行った。2 群間の比較は Student の両側 t 検定を用いて行った。すべての実験において、p<0.05 で有意差ありとみなした。

データは Prism ソフトウェアプログラム、バージョン 8.4.3（GraphPad Software, San Diego, CA, USA）を用いて解析した。

7-4. 結果

7-4-1. 実験デザイン

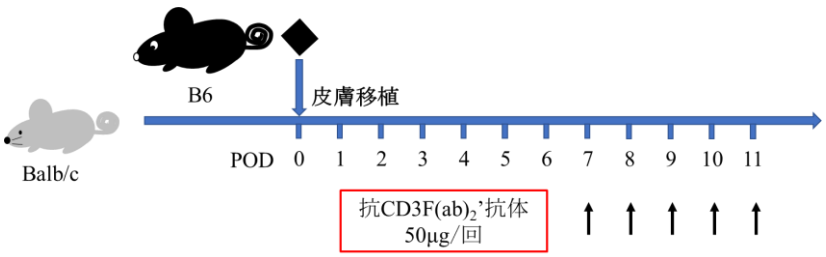


図 19. 実験シェーマ

実験シェーマを図 19 に示す。皮膚移植後 7～11 日目に 50μg/200μl に調整した抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体を投与した。

7-4-2. 抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体投与による T cell depletion 効果の解析

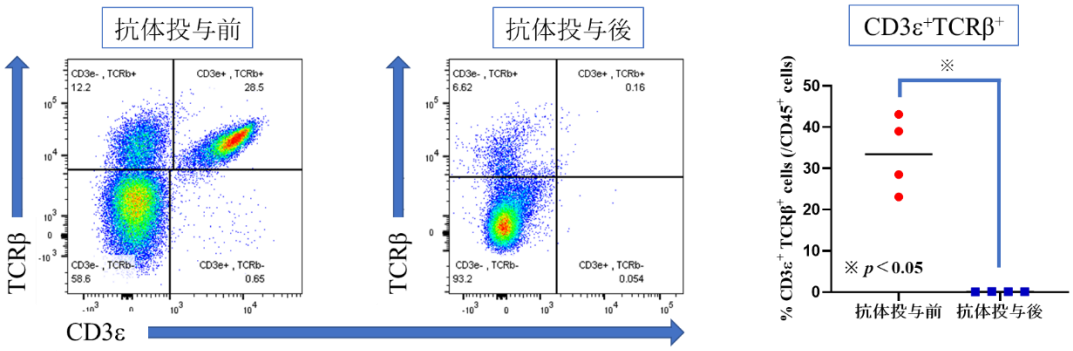


図 20. 抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体投与前後の Flow cytometry. (左) dot image, (右) CD3ε$^+$TCRβ$^+$の population (n=4)

抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体投与前後でのマウス末梢血を flow cytometry により解析した結果を図 20 に示す。抗体投与前に見られた CD3ε$^+$TCRβ$^+$の population は消失し、CD3ε$^-$TCRβ$^-$の population の頻度が増加している。以上より、抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体投与によって CD3 陽性 T 細胞の消失が起きていることが確認された。

7-4-3. 結果

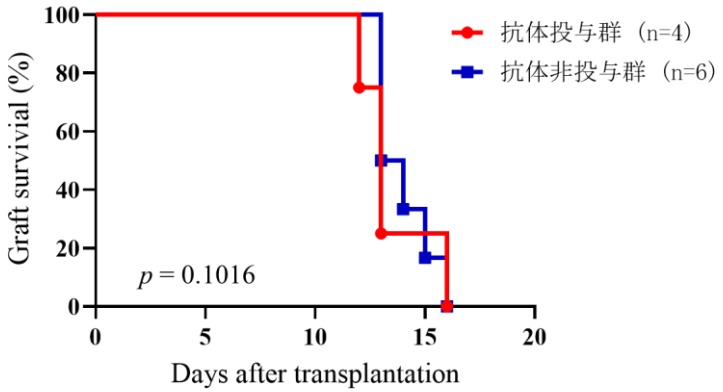


図 21. Graft survival. 赤線が抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体投与群 (n=4)、青線が抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体非投与群 (n=4) を表している

抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体投与による Graft survival の結果を図 21 示す。抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体投与によって明らかな graft survival の延長は認められなかった。

7-4-4. 考察

先述した先行研究(You, Zuber et al. 2012, Goto, You et al. 2013, Calderon, Prot et al. 2016)を参考に 7-4-1. のような研究デザインを立てた。7-4-2 で示した通り CD3 陽性 T 細胞は抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体投与によって消失したが、予想に反し graft survival の延長は認められなかった。この原因として、以下の 2 点を検討した。

① 抗体投与量が不十分である：末梢血での CD3 陽性 T 細胞は抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体投与によって消失することは確認されたが、グラフト内の CD3 陽性 T 細胞を消失するにはさらなる量が必要である可能性がある

② 抗体投与時期が遅すぎる：マウス皮膚移植モデルにおいて、レシピエントのリンパ球がグラフトに浸潤するためにはグラフトとの間に新生血管が構築される必要がある。この新生血管のネットワーク構築に要する期間は 5〜6 日と報告されている(Steinmuller 1984)。7 日目から抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体を投与してもすでに拒絶を惹起するリンパ球がグラフトに浸潤している可能性がある。

7-5. 抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体至適投与量、投与時期の検討

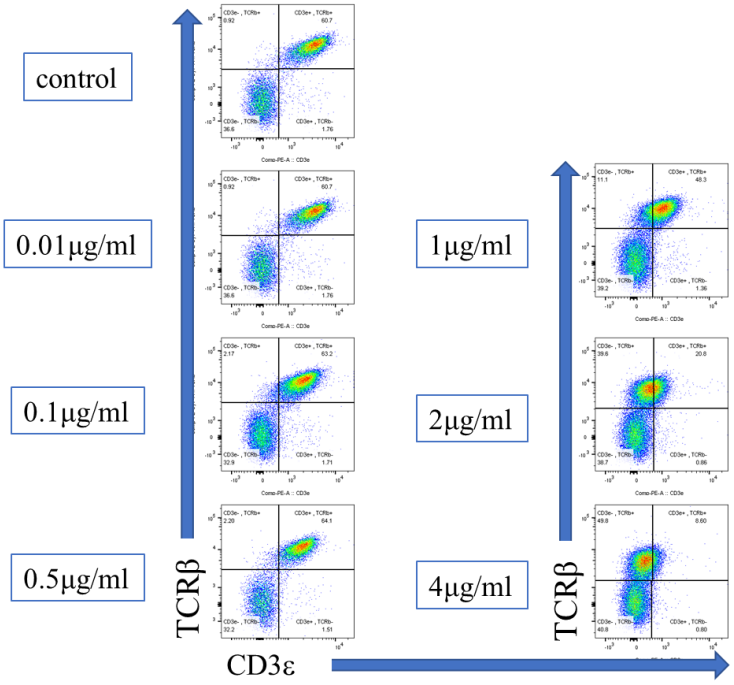
7-5-1. in vitro での検討

7-5-1-1. 方法

Balb/c マウスの脾細胞を精製し、medium (Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 + 10% Fetal Bovine Serum (FBS) + 1% Penicillin/Streptomycin + 2-

Mercaptoethanol (ME))で 5×10^5 個 / 100 µl となるように調整し 100 µl ずつ 96-well plate 上に散布した。先述の抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体を上記 medium で最終濃度が 0.01、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0 µg/ml になるよう調整し上記 plate 上に散布した。培養時間は 24 時間とし、抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体の Control として抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体を加えていない well も作成した。培養後 7-3. で用いた抗体を添加し、FACS canto II (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)を用いて解析した。

7-5-1-2. 結果

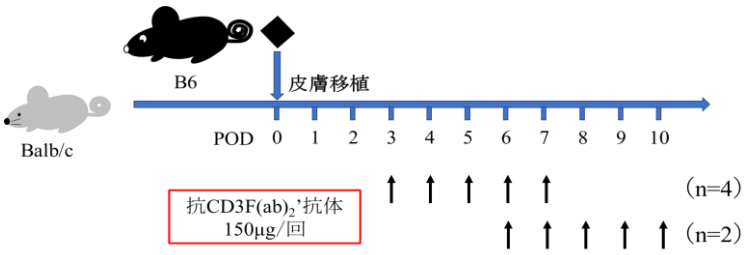


各濃度での $CD3\varepsilon^+TCR\beta^+$ の population を示した flow cytometry の結果を図 22 に示す。濃度依存的に $CD3\varepsilon^+TCR\beta^+$ の population は減少しているが、$TCR\beta^+$ 全体の割合は変化しておらず、blocking 作用を示している。

図 22. 各濃度での $CD3\varepsilon^+TCR\beta^+$ の population 解析

7-5-2. in vivo での検討

7-5-2-1. 実験デザイン



実験シェーマを図 23 に示す。抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体の投与量を 150 µg/回に増量し、投与期間は移植後 3〜7 日目 (n=4)、もしくは 6〜10 日目 (n=2)とし graft survival を検証した。

図 23. 実験シェーマ

7-5-2-2. 結果

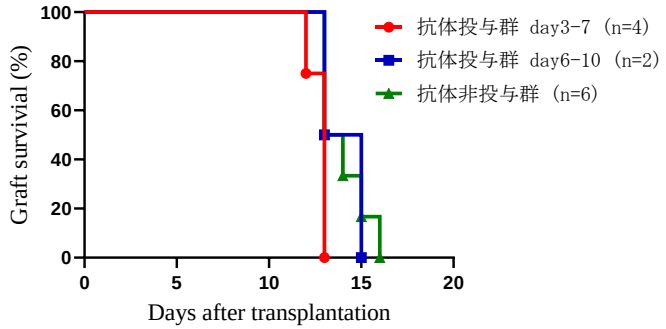


図 24. Graft survival. 赤線が抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体を移植 3-7 日目に投与した群 (n=4)、青線が抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体を移植 6-10 日目に投与した群 (n=2)、緑線が抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体非投与群 (n=6)を表している

Graft survival を図 24 に示す。抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体の投与量を増やした上で抗体投与期間を 3〜7 日目と早い時期に投与しても、6〜10 日目に投与しても、明らかな graft survival の延長は認めなかった。

7-6. 考察

マウスの皮膚移植モデルは心移植、膵島移植、心筋前駆細胞移植と異なり、抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体のみではグラフト生存期間の延長効果が得られなかった。CD3 陽性 T 細胞の消失効果は確認された（実験 7-4-2）が、皮膚移植モデルでは CD3 陽性 T 細胞以外のリンパ球の拒絶への関与の割合が大きい (McFarland and Rosenberg 2009, Chong, Alegre et al. 2013) ことから、拒絶の制御が十分でなかった可能性がある。成熟顆粒球やマクロファージの表面抗原として知られる Gr-1 抗原に対する抗 Gr-1 抗体を投与すると、マウス皮膚移植モデルでも拒絶反応抑制効果が得られることが報告されている(Jones, Brook et al. 2010)。今後、抗 Gr-1 抗体を CD3F(ab')$_2$ 抗体に組み合わせることでグラフト生存期間延長効果が得られる可能性がある。

8. 第四章　早期 GILs の免疫学的挙動の検討

8-1. 緒言

第 3 章で述べた通り、マウスの心移植直後に抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体を投与すると、移植後早期にグラフトへのリンパ球の浸潤 (graft infiltrating lymphocytes; GILs)が妨げられ、早期の拒絶反応が抑制されグラフト生存期間は延長するが、長期のグラフト保護効果は無く最終的に拒絶される。一方、抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体を移植後 72 時間から投与すると、移植後早期のグラフトへのリンパ球の浸潤が許容され、その結果グラフト長期保護効果、即ち免疫寛容が誘導される (Goto, You et al. 2013)。我々は最近、マウス心臓移植モデルにおいて、移植後 72 時間までの GILs はグラフトの拒絶反応を促進しないが、移植後 72 時間から 120 時間までの GILs はグラフトの拒絶反応を促進することを報告した (Ganchiku, Goto et al. 2021)。同様に、ラットの心臓を用いた再移植モデルでは、移植後 5 日目に再移植されたグラフトは慢性移植血管症を発症したが、3 日目に再移植されたグラフトは慢性移植血管症を発症しなかった (Kitagawa-Sakakida, Tori et al. 2000)。

マウス皮膚移植モデルでは、皮膚グラフトに存在するドナー由来の T 細胞が免疫不全マウスで構築され、移植後の免疫寛容の誘導に中心的な役割を果たすとの報告がある (Anderson and Matzinger 2001)。一方で移植後早期 GILs の皮膚移植における役割は分かっていない。また、皮膚移植は心移植と比較して再移植が容易であり、移植後早期のグラフト微小環境そのものを免疫不全マウスに再移植するモデルの導入により新たな知見が得られる可能性がある。

8-2. 目的

マウス皮膚移植モデルにおける早期 GILs の免疫学的役割を解明する

8-3. 方法

<u>マウス</u>

8-12 週齢の雄の Balb/c (H-2^d) もしくは C57BL/6 (B6, H-2^b) マウスを使用した (Japan SLC,、Hamamatsu、Japan)。いずれのマウスも病原微生物のいない環境下で飼育された。C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$ Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J (Balb/c Rag2$^{-/-}$ gc$^{-/-}$ sBRG)マウスは米国ジャクソン研究所 (Bar Harbor, ME, USA)から購入し、北海道大学付属動物実験施設で北海道大学動物実験実施マニュアルに従い繁殖・飼育した。全ての実験は北海道大学の動物実験委員会の承認を得て行われた (承認番号：22-0048)。

<u>皮膚移植</u>

B6 マウスの尾から皮膚を採取し 0.7-1cm^2 角にトリミングした。1 匹のマウス

から 4-5 匹分のグラフトが採取可能で、グラフトは生食を入れたシャーレの中に浸し、移植までの間 on ice で保存した。Balb/c マウスにイソフルレンで麻酔をかけ、皮膚グラフトをマウスの背部に移植した。グラフトは四隅とその間の計 8 箇所を 7-0 monofilament (Covidien, Minneapolis, MN, USA)を用い縫合固定した。グラフトの直上に生食で湿らせたガーゼを乗せ、バンテージを巻いて固定した。手術 7 日後にイソフルレンで麻酔をかけた後バンテージを除去し、固定糸は抜糸した。グラフトが完全に脱落するまで週に最低 3 回グラフトの状態を確認した。拒絶の判定はグラフトが 90%以上壊死した時とした。

皮膚再移植

B6 皮膚グラフトを Balb/c に移植後 3、5 又は 7 日目に皮膚グラフトを採取し、BRG マウスの背部頭側に移植した。レシピエントの皮膚や血液の混入を避けるため、グラフトの 4 辺を約 1mm トリミングし、生着面の血液は綿棒を用いて可能な限り取り除いた。移植の方法や拒絶の判定は上記皮膚移植時と同様に行った。

マウスの採血及び Flow cytometry

マウスの採血はヘマトクリット管 (As One Corporation, Osaka, Japan)を用い尾静脈より行った。リンパ球の絶対数は counting beads (CountBright^{TM} plus absolute counting beads, C36950; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, USA)を用いて計測した。マウスの末梢血は以下の抗体を冷蔵庫内 (4℃)で 20 分間静置し染色した。染色後 FACS canto II (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)を用いて解析した。使用した抗体の詳細は以下の通り：anti-CD3ε-PE (145-2C11), anti-CD4-APC-H7 (GK1.5), anti-CD11b-PE (M1/70), anti-CD11c-FITC (N418), anti-CD25-PE (PC61), anti-CD40-FITC (3/23), anti-CD44-APC (IM7), anti-CD45-FITC (30-F11), anti-CD80-PE (16-10A1), anti-CD86-PE (GL1), anti-F4/80-Pacific Blue (T45-2342), anti-TCRβ-PE-Cy7 (H57-597) (以上全て BD Biosciences, San Diego, CA, USA)。Anti-CD3ε-Alexa Fluor488 (145-2C11), anti-CD8a-eFluor506 (53-6.7), anti-CD62L-PE-Cy7 (MEL-14), anti-H2K^{b}-PE-Cy7 (AF6-88.5.5.3), anti-H2K^{d}-eFluor450 (SF1-1.1.1) (以上全て Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)。Anti-CD19-APC (6D5) (BioLegend San Diego, CA, USA)。死細胞は 7-AAD (BD Biosciences)を用いて除外した。

GILs の精製

皮膚グラフトを採取し、滅菌した鋏を用いて約 1 mm^2 の大きさに切断し、

medium (Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 + 10% Fetal Bovine Serum (FBS) + 1% Penicillin/Streptomycin + 10%コラゲナーゼIV)下に 37℃、5％CO_2 の条件で静置した。30 分後グラフトを 70 μm セルストレーナー上で 10ml シリンジを用いて潰した後、遠心 (300G、4℃、5 分)、洗浄した。さらに 35 μm セルストレーナーに通し、1×PBS に懸濁した後、懸濁液は flow cytometry による解析、または BRG マウスへ腹腔内投与した。

Intravenous labeling

皮膚グラフトに血液の混入がないことを確認するため、末梢血中の循環リンパ球を標識する Intravenous labeling 法で評価した (Anderson, Mayer-Barber et al. 2014, Ruscher and Hogquist 2018)。PE 標識抗 CD45 抗体 (1μg)をマウスの尾静脈より静脈注射し、3 分後皮膚グラフトと心臓血を採取した。各サンプルからリンパ球を精製し flow cytometry を用いて解析した。

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

皮膚グラフトの messenger RNA (mRNA)の発現レベルの定量を qRT-PCR を用いて測定した。皮膚グラフトを冷凍した状態で粉状に破砕し lysis buffer に溶解した後、TissueRuptor (Qiagen, Valencia, CA)を用いて均質化した。RNA の抽出は PureLink RNA Mini Kit (ThermoFisher, Carlsbad, CA)を用い、逆転写は ReverTra Ace (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いた. TB Green Premix Ex Taq™ II (Takara Bio Inc, Shiga, Japan)を混和した後 qRT-PCR は StepOnePlus (ThermoFisher)を用いて行った。ハウスキーピング遺伝子には GAPDH を用いた。以下に使用したプライマーを記載する。

Target	Sequence (forward)	Sequence (reverse)
IFN-γ	5'-TTCTTCAGCAACAGCAAGGC-3'	5'-GCTCATTGAATGCTTGGCG-3'
Granzyme B	5'-AGAACAGGAGAAGACCCAGC-3'	5'-ACAGCTCTAGTCCTCTTGGC-3'
Perforin	5'-GAGAATGTGCTCCTGTCCAC-3'	5'-GGAGACCTGTCACAAGAACC-3'
IL-2	5'-CGGCATGTTCTGGATTTGAC-3'	5'-TCATCATCGAATTGGCACTC-3'
TNF-α	5'-CGAGTGACAAGCCTGTAGCC-3'	5'-GGTTGTCTTTGAGATCCATGC-3'
T-bet	5'-GAATGATGGAGAGCCAGAGG-3'	5'-ATCTCTGCGTTCTGGTAGGC-3'
EOMES	5'-CAGTTCATCGCTGTGACGG-3'	5'-ATCGTAGTTGTCCCGGAAGC-3'
FoxP3	5'-CTATGCCACCCTTATCCGATG-3'	5'-TCTGAAGTAGGCGAACATGC-3'
TIGIT	5'-CCTGAAGGTCCAAGAAAGCTC-3'	5'-CAAATGAGTCCCAGCACAGC-3'
PD-1	5'-CAGAAGGCCGGTTTCAAGG-3'	5'-AGTGTCGTCCTTGCTTCCAG-3'
LAG3	5'-CCTTTGGCTTTCACTGGTGG-3'	5'-CCCATCTCCGTCTCCAGTTC-3'
CD3	5'-CAAGCCTGTGACCCGAGG-3'	5'-CAGAATACAGGTCCCGCTGG-3'
CD4	5'-CCAGGTCTCGCTTCAGTTTG-3'	5'-CAAAGTATTGTTGAGCTGAGCC-3'
CD8	5'-CCTTCTGCTGTCCTTGATCATC-3'	5'-TTCCTGTCTGACTAGCGGC-3'
GATA3	5'-TGGAGGAGGAACGCTAATGG-3'	5'-GGGTCTGGATGCCTTCTTTC-3'
IL-10	5'-CCTGTGAAAATAAGAGCAAGGC-3'	5'-AGATGTCAAATTCATTCATGGCC-3'
GAPDH	5'-TACACTGAGGACCAGGTTG-3'	5'-CTGTAGCCGTATTCATTGTC-3'

CD25 発現制御性 T 細胞及び PD-1 陽性細胞の除去

再移植後 70 日目以降の $CD4^+CD25^+Foxp3^+$リンパ球および $PD\text{-}1^+$リンパ球を in vivo で除去するため、それぞれ 200 μg の抗 CD25 抗体（clone PC61.5.3; BioXCell, Lebanon, NH, USA）および 250 μg の抗 PD-1 抗体（clone CD279; BioXCell）を 2 回腹腔内投与した。

統計学的解析

Graft survival は Kaplan-Meier 曲線と log-rank 検定を用いて解析した。単一データ間での多重比較は、一元配置分散分析に続けて Tukey-Kramer 多重比較検定を用いて行った。2 群間の比較は Student の両側 t 検定を用いた。$p<0.05$ で有意差ありとした。

データは Prism ソフトウェアプログラム、バージョン 8.4.3（GraphPad Software, San Diego, CA, USA）を用いて解析した。

8-4. GILs の解析

8-4-1. Naïve 皮膚に存在するリンパ球の population 解析

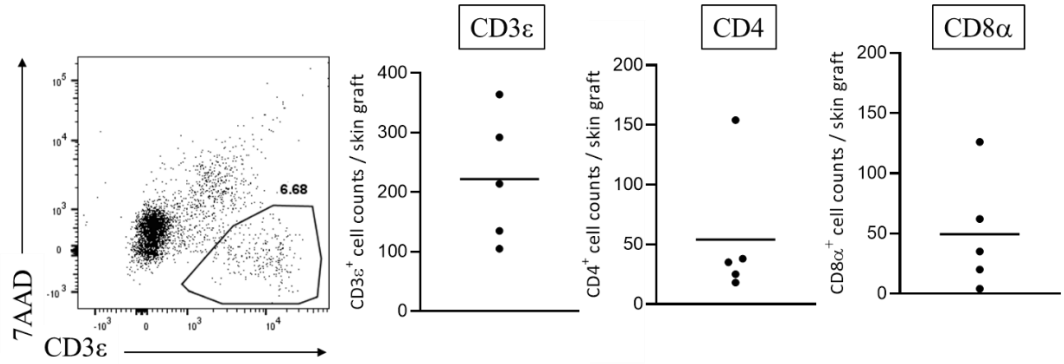


図 25. Naïve 皮膚の population 解析. (左) $CD3^+$のドットプロットイメージ、(右) Naïve B6 の尾の皮膚に含まれる CD3 / CD4 / CD8 陽性リンパ球数（それぞれ異なるマウス毎にプロット）

Naïve B6 の尾の皮膚に含まれる T 細胞を解析した結果を図 25 に示す。左は FACS の代表的なドットプロット イメージ、右は皮膚グラフトのあたりの CD3、CD4、CD8 陽性 T 細胞の数をそれぞれ異なる B6 マウス毎にプロットしグラフにしたものである。皮膚に含まれるリンパ球数は極めて少数であった ($CD3^+$: 222.0±96.3 cells、$CD4^+$, 54.0±50.5 cells; $CD8^+$ 49.4±42.8 cells)。

8-4-2. GILs の population 解析

8-4-2-1. $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ T リンパ球数

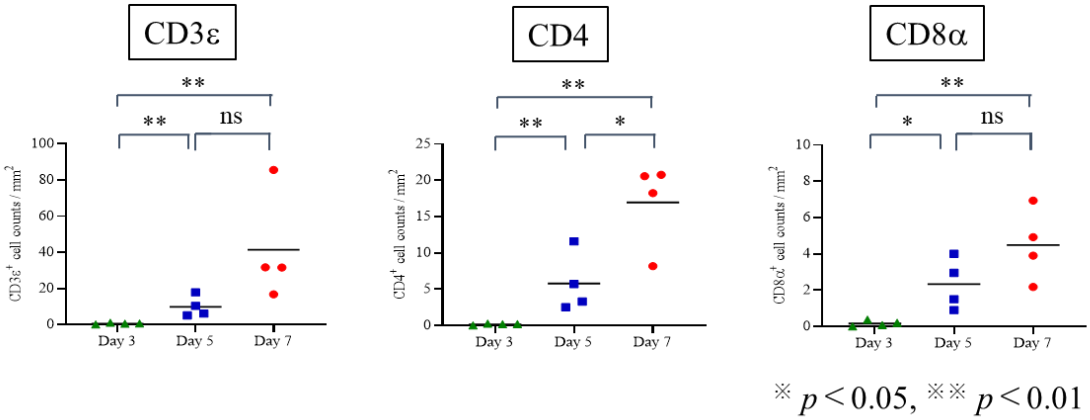


図 26. グラフト 1mm^{2}辺りの CD3/CD4/CD8 リンパ球数

B6 の皮膚グラフトを Balb/c マウスに移植した後、グラフト 1mm^{2}辺りに含まれる GILs の細胞数を図 26 に示す。Day 7 は Day 5 のおよそ 5 倍、Day 5 は Day 3 のおよそ 15 倍の $CD3^+$リンパ球を含んでいた。

8-4-2-2. CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T リンパ球の割合

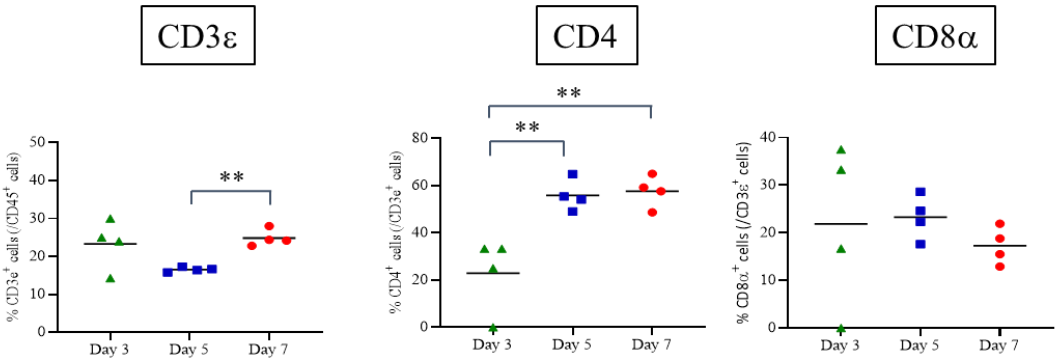


図 27. GILs 中に存在する CD3/CD4/CD8 リンパ球の割合

B6 の皮膚グラフトを Balb/c マウスに移植した後、皮膚グラフト内に含まれる CD3, CD4, CD8 陽性リンパ球の割合を図 27 に示す。Day 5 は Day 7 より $CD3^+$リンパ球の割合が有意に少なく（p<0.01）、Day 3 は Day 5, Day 7 より $CD4^+$リンパ球の割合が有意に少なかった（p<0.01）。

8-4-2-3. Naïve 皮膚 / GILs に存在する innate lymphocytes の解析

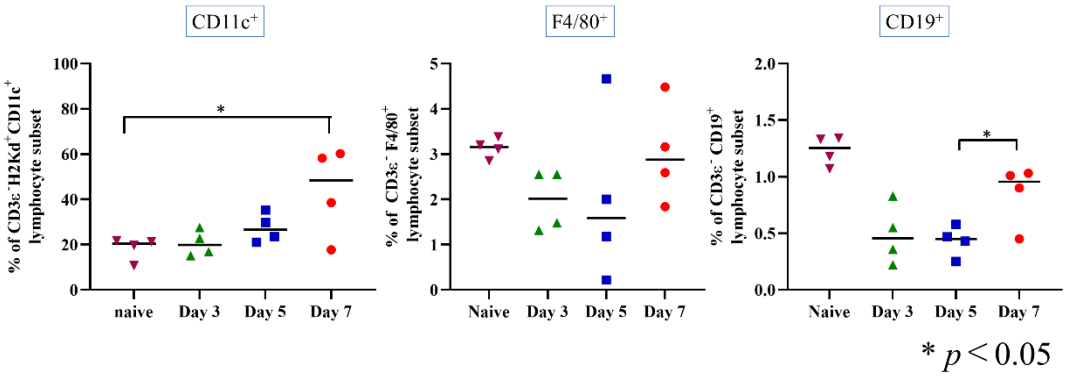


図 28. innate lymphocytes の解析. (左) $CD11c^+$ 樹状細胞、(中央) $F4/80^+$マクロファージ、(右) $CD19^+$ B リンパ球

B6 の皮膚グラフトを Balb/c マウスに移植した後、GILs の innate lymphocytes を解析した結果を図 28 に示す。移植後の日数が経過するにつれ $CD11c^+$ 樹状細胞や $CD19^+$ B リンパ球の割合が上昇する傾向を認め、day 7 の $CD11c^+$細胞、$CD19^+$細胞はそれぞれ、naïve、day 5 と比較して有意な増加が観察された。

8-4-2-4. GILs の RNA analysis

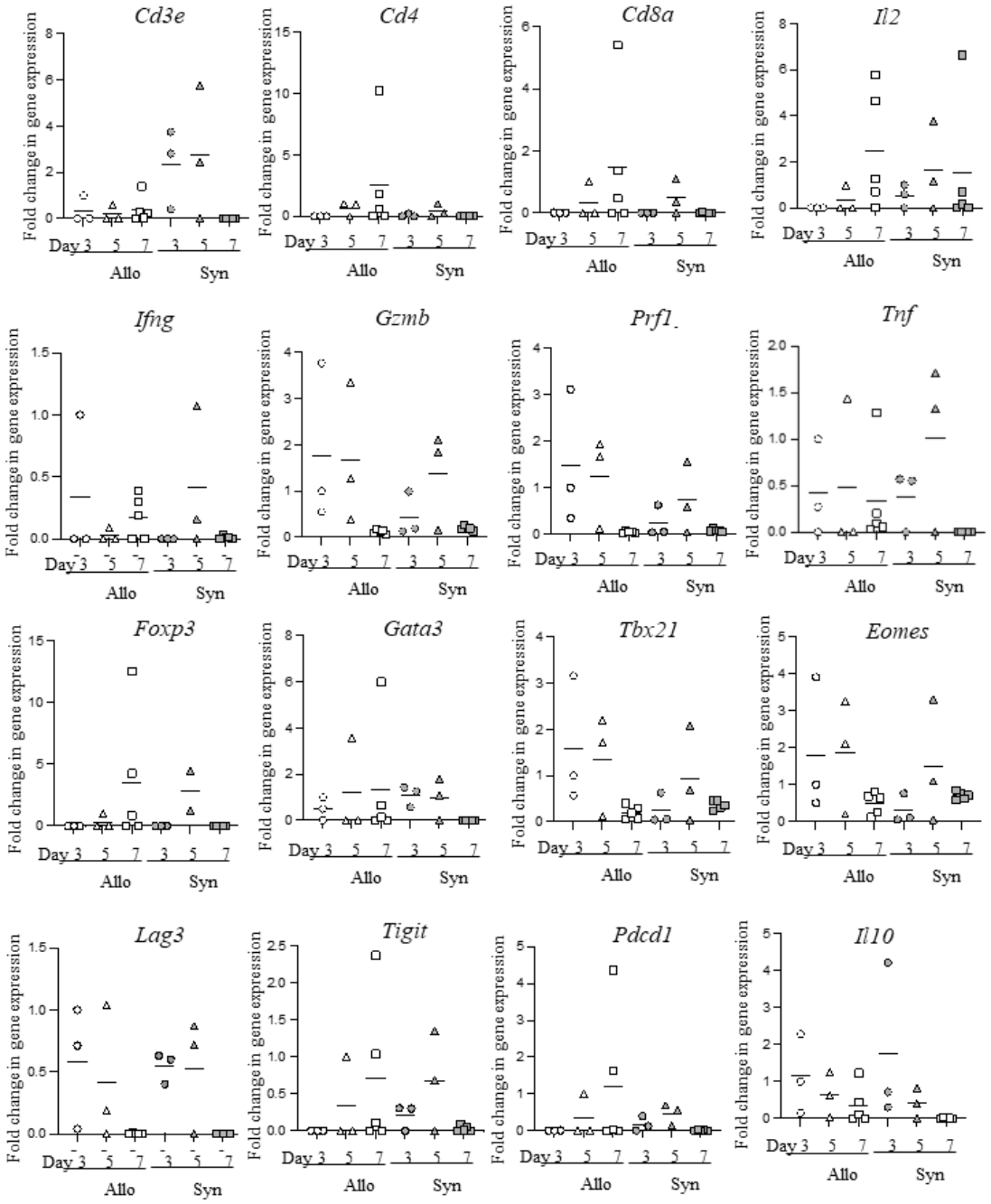


図 29. 皮膚グラフトの RNA 解析. Day 3 (n=3)、Day 5 (n=3)、Day 7 (n=5) で、各々アロ移植、syngeneic 移植での解析結果を示す

皮膚グラフトの qRT-PCR による解析結果を図 29 に示す。Cd4、Cd8、Il-2、Foxp3、Gata3、Tigit、Pdcd1 は移植後日数に従って発現量が増加する傾向を認

めた。

8-5. GILs を含んだ皮膚グラフトを BRG マウスに再移植する

8-5-1. 実験デザイン

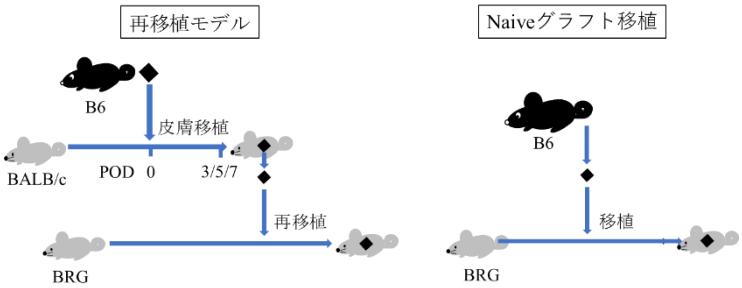
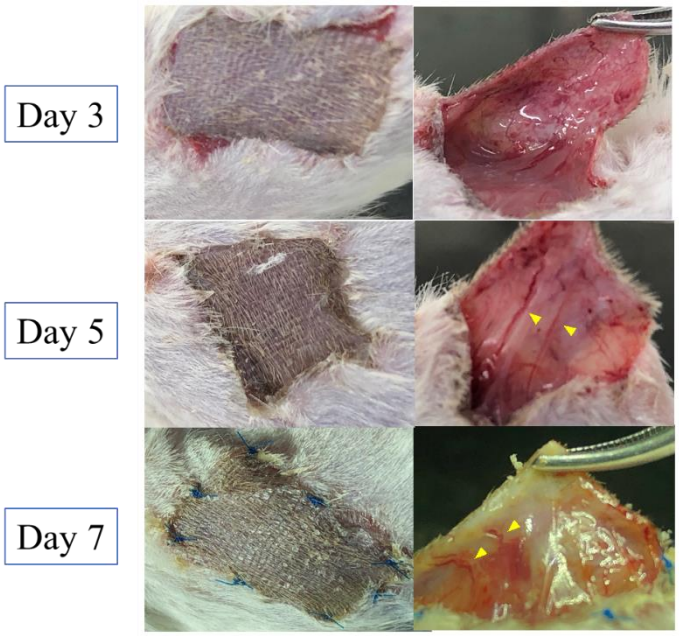


図 30. 実験シェーマ

GILs を含んだグラフトを直接 BRG マウスに再移植し、グラフトの微小環境を含め BRG マウスに構築させ、構築されたリンパ球が経時的にグラフトにどのように作用するかを検討した。実験のシェーマを図 30 に示す。B6 の皮膚を Balb/c に移植後、3、5 又は 7 日目にグラフトを採取し BRG マウスに再移植した。Control として、naïve B6 の皮膚グラフトを BRG マウスに移植した。

8-5-2. Graft appearance



初回移植 3 日後、5 日後、7 日後のグラフトを図 31 に示す。いずれの時期のグラフトも明らかな拒絶所見は認めなかった。初回移植 5 日後、7 日後には図 31 右列の代表的な写真の黄色の矢印頭に示すように皮膚グラフトへのレシピエント Balb/c からの新生血管の形成が観察される。

図 31. 移植後グラフトの状態. (左) バンテージを剥がした直後のグラフト外観、(右) グラフト床との間の様子. 新生血管を黄色の矢印頭で示した

8-5-3. Intravenous labeling

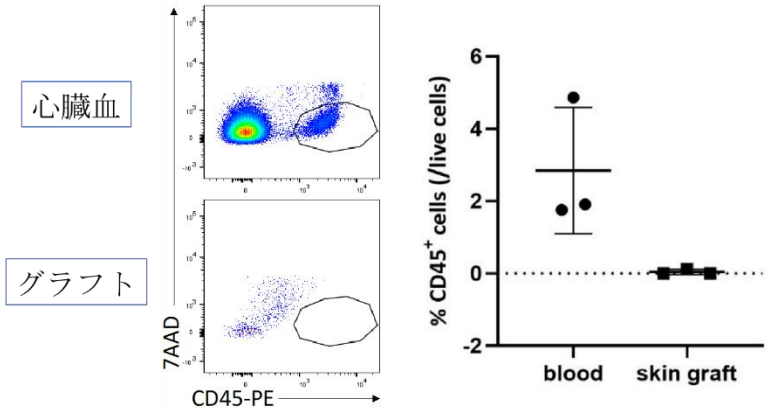


図 32. CD45⁺リンパ球の flow cytometry 解析結果. (左) 心臓血、もしくはグラフトでの dot image、(右) CD45⁺リンパ球の割合を示したグラフ

グラフト内の血管内リンパ球は循環しているリンパ球であり、GILs とはその役割、機能が区別される。GILs 採取の際に、この血管内リンパ球が混入しないように十分な洗浄を行っているが、実際の混入の可能性を intravenous labeling technique で確認した。結果を図 32 に示す。心臓血では静脈注射した CD45-PE が検出される一方、GILs には全く検出されなかった。これより、GILs に血管内リンパ球の混入が無いことが確認された。

8-5-4. BRG マウスへのグラフトからの移入リンパ球による免疫構築

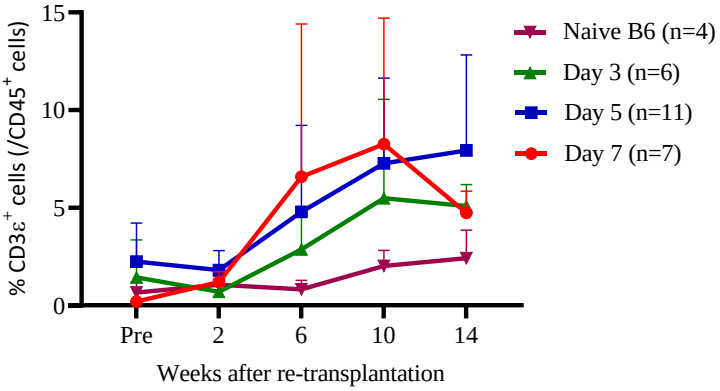


図 33. CD3⁺リンパ球の構築率. 赤線は Day 7 (n=7)、青線は Day 5 (n=11)、緑線は Day 3 (n=6)、紫線は Naïve B6 皮膚 (n=4) 移植による構築率の結果を表した

図 33 は B6 naïve または、B6 皮膚グラフトを Balb/c に移植して day 3、day 5、day 7 に採取した皮膚グラフトの BRG マウスへの再移植後にグラフトからの CD3 陽性リンパ球が BRG マウス末梢血中に出現した割合（構築率）を経時的に示したグラフである。移植後 6 週以降は day 3、day 5、day 7 いずれも 1%以上の構築率がえられた。

8-5-5. 構築リンパ球の MHC class I

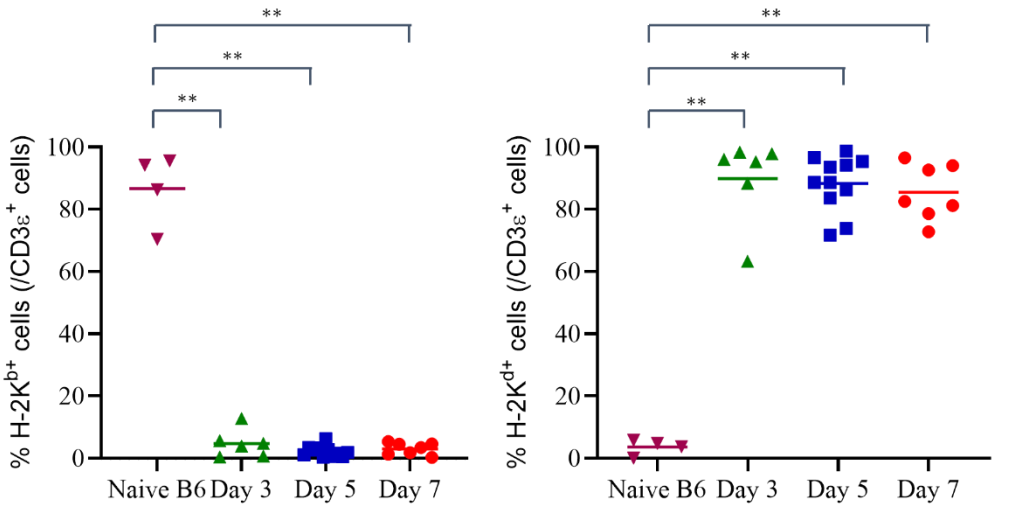


図 34. 構築リンパ球の flow cytometry 解析. (左) H-2K^{b+}リンパ球の割合、(右) H-2K^{d+}リンパ球の割合

図 34 は BRG マウスに構築されたリンパ球の MHC class Iの population を示している。Naïve は H-2K^{b}、すなわちドナー由来のリンパ球が構築されているのに対し、Balb/c に移植後 Day3、Day5 、Day7 に採取した B6 グラフトを再移植した場合は、いずれも H-2K^{d}、すなわちレシピエント由来のリンパ球が構築されている。

8-5-6. 構築リンパ球の population 解析

8-5-6-1. T リンパ球の population 解析

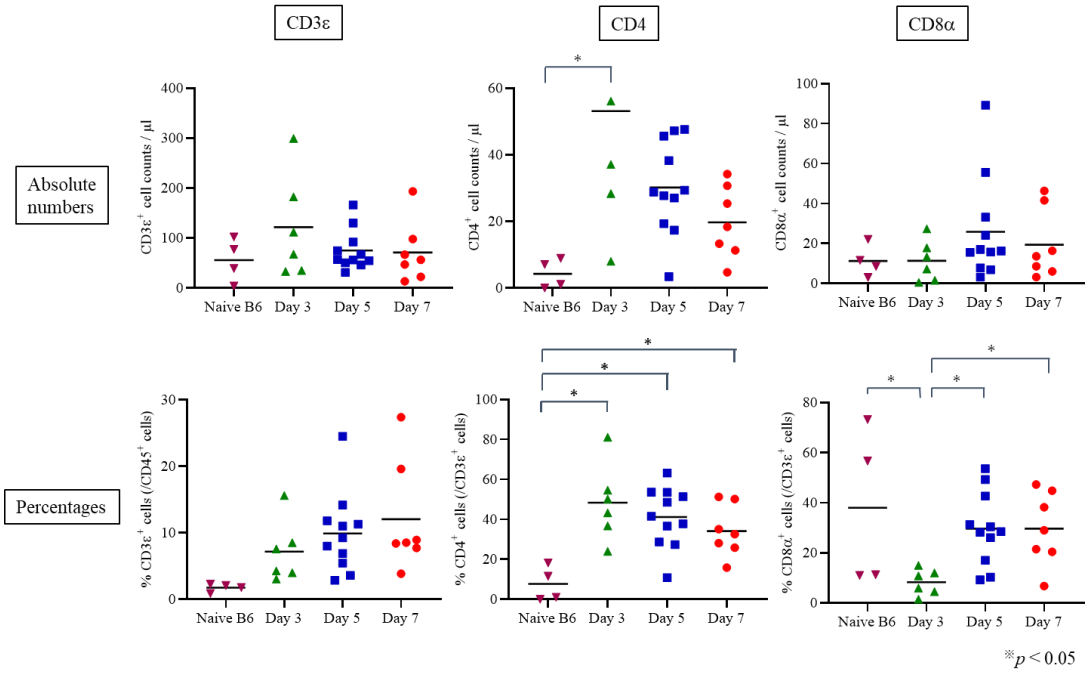


図 35.構築リンパ球の T リンパ球 population 解析. CD3 / CD4 / CD8 リンパ球の絶対数 (上段)、割合 (下段)を示す

BRG マウスに皮膚移植後、10 週後に BRG マウス末梢血で確認される構築リンパ球の population を図 35 に示す。上段は末梢血 1 μl 中の各々のリンパ球数を、下段は各々のリンパ球の割合を示している。CD4 陽性リンパ球の割合は Naïve B6 マウスの皮膚移植後が他の群と比較し、有意に少ないが、絶対数では Day 3 との間のみ有意差を認めた。Day 3 の CD8 陽性リンパ球の割合は他の群と比較し有意に少ないが、絶対数では有意差を認めなかった。

8-5-6-2. $CD4^+$ memory phenotype

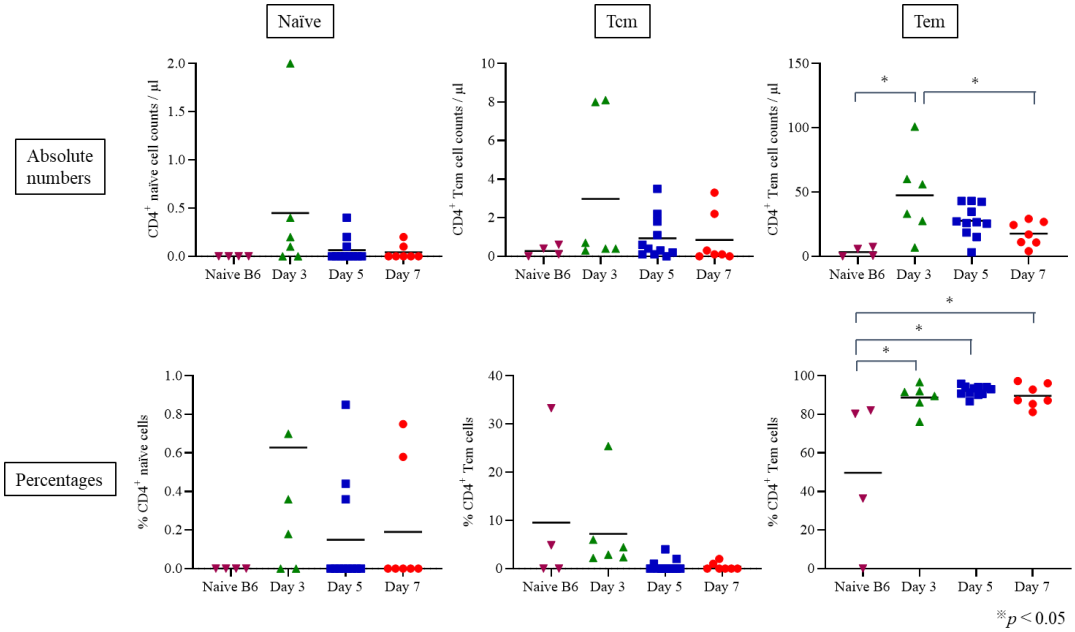


図 36. CD4$^+$ memory phenotype 解析. CD4$^+$ Naïve / Tcm / Tem リンパ球の絶対数 (上段)、割合 (下段)を示す

BRG マウスに皮膚移植後、10 週後に BRG マウス末梢血で確認される CD4 陽性リンパ球の memory phenotype を図 36 に示す。Naïve の effector memory T cells (Tem)の割合が他群と比較し、有意に少なかった。絶対数では Day3 の Tem が Naïve、Day 7 と比較し有意に多かった。

8-5-6-3. CD8$^+$ memory phenotype

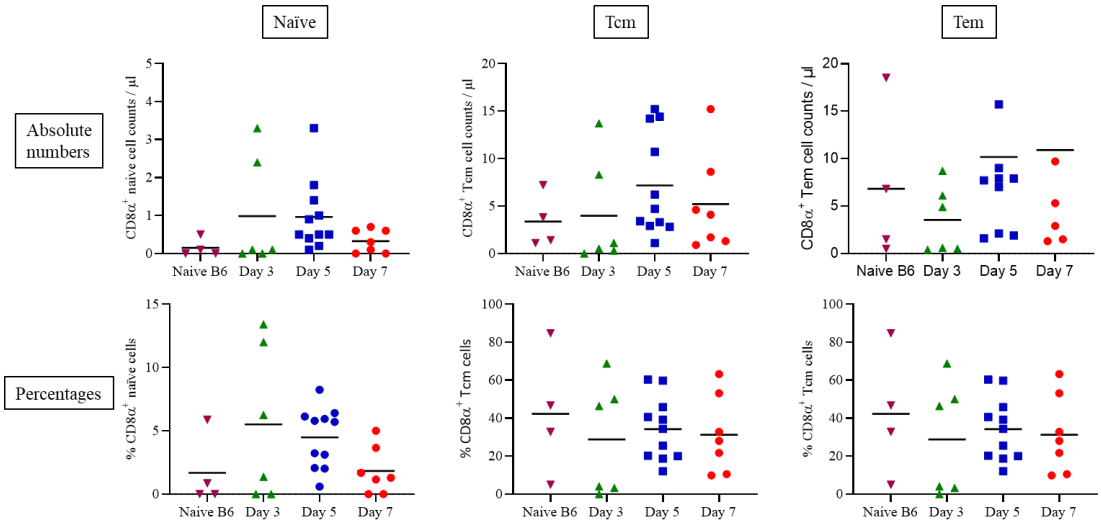


図 37. CD8$^+$ memory phenotype 解析. CD8$^+$ Naïve / Tcm / Tem リンパ球の絶対数 (上段)、割合 (下段)を示す

BRG マウスに皮膚移植後、10 週後に BRG マウス末梢血で確認される CD8 陽性リンパ球の memory phenotype を図 37 に示す。Naïve, Day 3, Day 5, Day 7 の間で明らかな有意差を持つ population は認めなかった。

8-5-7. 結果

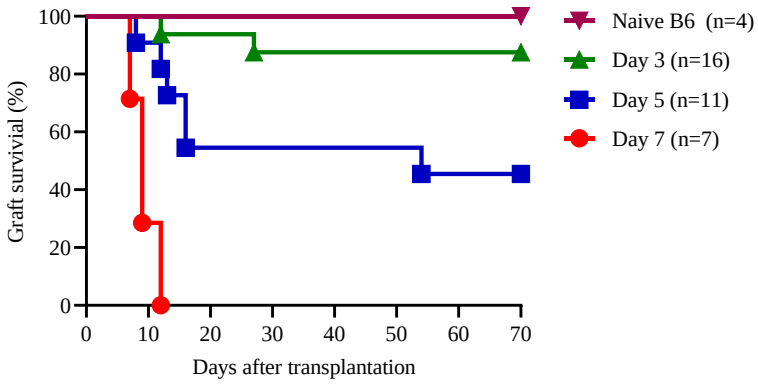


図 38. Graft survival. 赤線は Day 7 (n=7)、青線は Day 5 (n=11)、緑線は Day 3 (n=16)、紫線は Naïve B6 皮膚 (n=4) 移植による graft survival の結果を表した

BRG マウスに皮膚移植後の Graft survival を図 38 に示す。Day 7 の皮膚グラフトは全例で速やかに拒絶される一方、Day 5 の約半数は拒絶されず長期間生着した。Day 3 のほとんど (87.5%)は拒絶されず長期間生着した。

8-5-8. 拒絶されず長期生着を得た皮膚グラフトの Histology

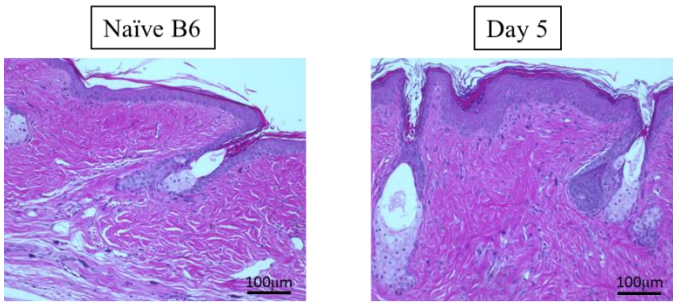


図 39. HE 染色. (左) Naïve B6 皮膚、(右) 長期生着を得た Day 5 皮膚グラフト

拒絶されず長期生着を得た Day 5 の皮膚グラフトの HE 染色を図 39 に示す。Naïve skin と同様、炎症細胞の浸潤をほとんど認めず、拒絶所見は認めなかった。

8-6. GILs を BRG マウスに adoptive transfer して構築させる

8-6-1. 実験デザイン

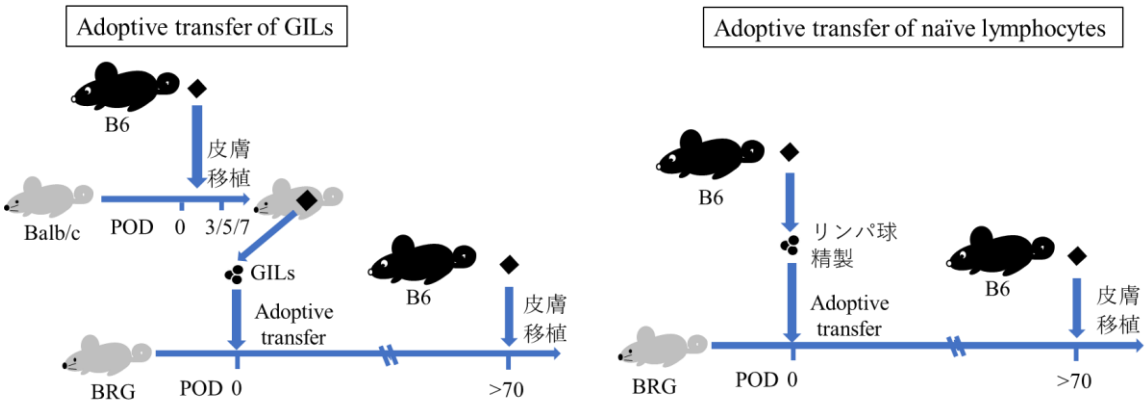


図 40. 実験シェーマ

移植後日数別の移植後早期 GILs の皮膚グラフトへの in vivo 免疫応答を検討する目的で、実験を計画した。実験シェーマを図 40 に示す。B6 皮膚グラフトを Balb/c マウスに移植後 3、5、7 日目にグラフトを採取し、このグラフトから GILs を単離し、BRG マウスに adoptive transfer することで、GILs のみで免疫が構築されるマウスを作成した。このマウスに adoptive transfer 後 70 日目に naïve B6 の皮膚を移植し、移植後早期 GILs の *in vivo* における機能、特に拒絶反応を引き起こす能力を観察した。Control として naïve B6 の皮膚からリンパ球を単離し BRG マウスに adoptive transfer した。

8-6-2. Adoptive transfer cell count

表 3. Adoptive transfer した CD3$^+$リンパ球数

Grafts	CD3ε$^+$細胞数/ skin graft
Day 7	2030/4495/1120/1320
Day 5	305/560/895/255
Day 3	5/30/30/40
Naïve B6 skin graft	105/135

BRG マウスに adoptive transfer した CD3$^+$ T cell 数を左に記載する。Day7 は Day5 の約 10 倍、Day5 は Day3 の約 10 倍であった。

8-6-3. Adoptive transfer したリンパ球の BRG マウスへの構築率

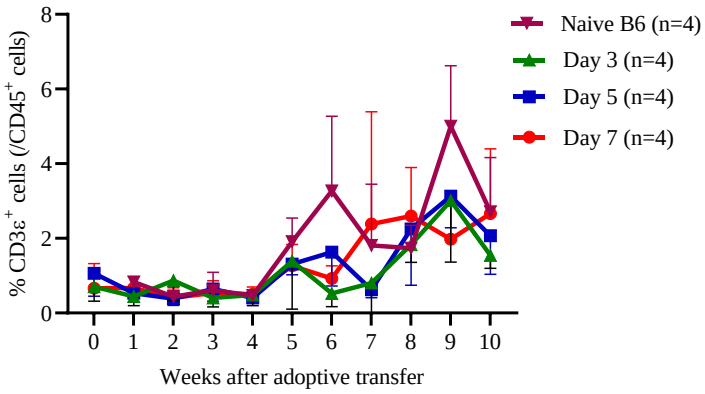


図 41. CD3$^+$リンパ球の構築率. 赤線は Day 7 (n=4)、青線は Day 5 (n=4)、緑線は Day 3 (n=4)、紫線は Naïve B6 皮膚 (n=4) 移植による CD3$^+$リンパ球の構築率を表している

移植後 3、5、7 日目に皮膚グラフトから採取した GILs（コントロールは B6 皮膚に存在したリンパ球: naïve と記載）の BRG マウスへの adoptive transfer 後の BRG マウス末梢血中の CD3 陽性 T 細胞の割合を図 41 に示す。Adoptive transfer 後 8 週以上でいずれの群においても末梢血中の CD3 陽性 T 細胞の割合は 1% 以上となった。各群間で有意差は無かった。

8-6-4. BRG マウス末梢血中に出現した T リンパ球の population 解析

8-6-4-1. 構築リンパ球の T リンパ球の population 解析

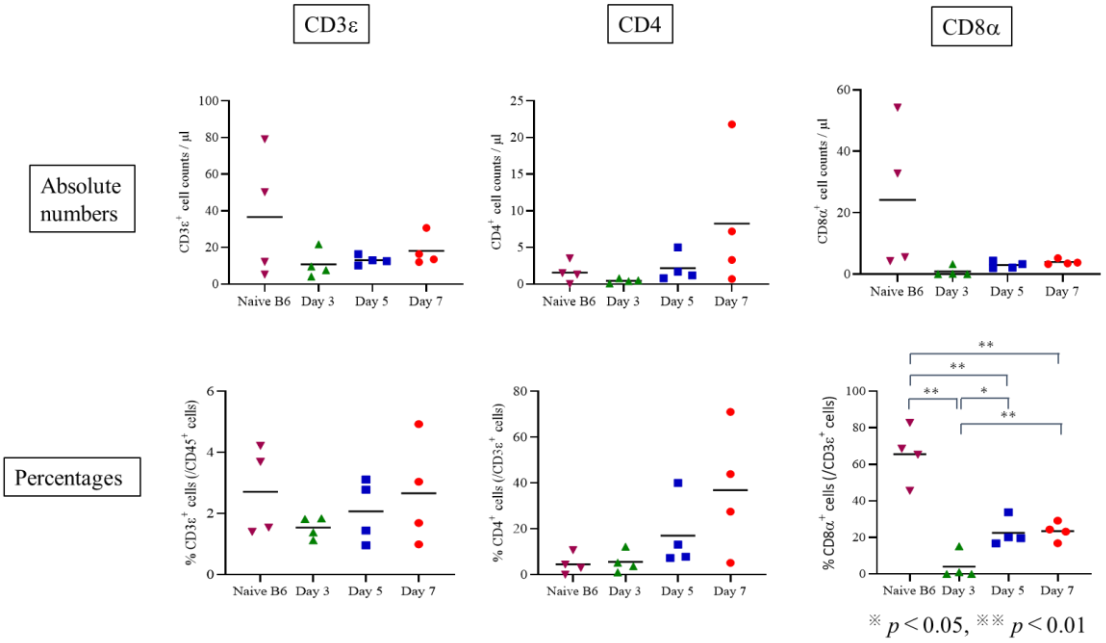


図 42. 構築リンパ球の T リンパ球 population 解析. CD3 / CD4 / CD8 リンパ球の絶対数 (上段)、割合 (下段)を示す

移植後 3、5、7 日目に皮膚グラフトから採取した GILs（コントロールは B6 皮膚に存在したリンパ球: naïve と記載）の BRG マウスへの adoptive transfer 後の BRG マウス末梢血中のリンパ球の population を図 42 に示す。CD8 リンパ球の割合は Naïve が他よりも有意に多く、Day 3 は他よりも有意に少なかった。

8-6-4-2. CD4$^+$ memory phenotype

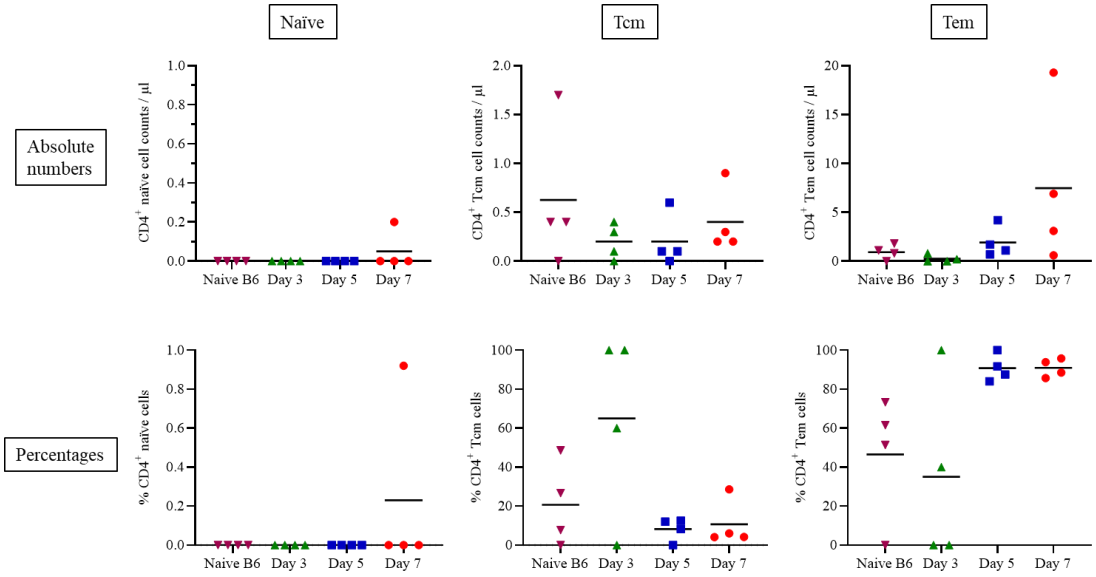


図 43. CD4$^+$ memory phenotype 解析. CD4$^+$ Naïve / Tcm / Tem リンパ球の絶対数 (上段)、割合 (下段)を示す

移植後 3、5、7 日目に皮膚グラフトから採取した GILs（コントロールは B6 皮膚に存在したリンパ球: naïve と記載）の BRG マウスへの adoptive transfer 後の BRG マウス末梢血中の CD4$^+$ memory phenotype を図 43 に示す。有意差のある population は認めなかった。

8-6-4-3. CD8$^+$ memory phenotype

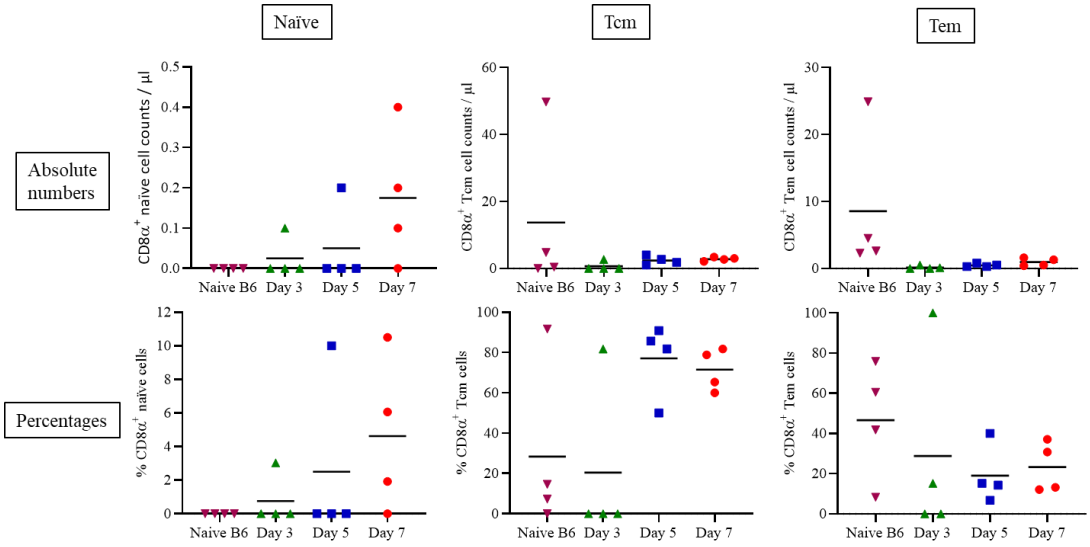


図 44. CD8$^+$ memory phenotype 解析. CD8$^+$ Naïve / Tcm / Tem リンパ球の絶対数 (上段)、割合 (下段) を示す

移植後 3、5、7 日目に皮膚グラフトから採取した GILs（コントロールは B6 皮膚に存在したリンパ球: naïve と記載）の BRG マウスへの adoptive transfer 後の BRG マウス末梢血中の CD8$^+$ memory phenotype を図 44 に示す。有意差のある population は認めなかった。

8-6-5. 結果

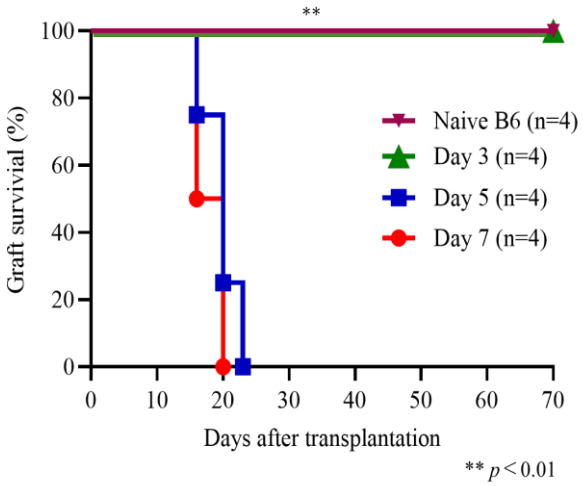


図 45. Graft survival. 赤線は Day 7 (n=4)、青線は Day 5 (n=4)、緑線は Day 3 (n=4)、紫線は Naïve B6 皮膚 (n=4) から単離したリンパ球を移入したマウスに対する graft survival を表している

B6 皮膚グラフトを Balb/c に移植後 3、5、7 日目に皮膚グラフトから採取した GILs（コントロールは B6 皮膚に存在したリンパ球: naïve と記載）を BRG マウスへ adoptive transfer し、10 週以降に B6 皮膚を BRG マウスに移植し、Graft survival を観察した（図 45）。Day 3 の GILs を再構築させた群は拒絶されず長期生着が得られたが、Day 5、Day 7 の GILs を再構築させた群はいずれも全例拒絶された ($p < 0.01$)。

8-7. 小括

・Day 3、Day 5、Day 7 いずれの GILs もレシピエント由来である。
・Day 7 の GILs はグラフトの有無に関わらずアロ攻撃性を持つ。
・Day 5 の GILs はアロ攻撃性を持つが、グラフトの存在下では半数がアロ攻撃性を持たなくなる。
・Day 3 の GILs はグラフトの有無に関わらずアロ攻撃性を持たない。

上記結果の機序として以下の仮説を立てた。

① Day 3 の GILs がアロ攻撃性を持たないのは制御性 T 細胞 (regulatory T cell; Treg) による拒絶抑制性作用 (実験 8-8)もしくはグラフト保護効果のあるリンパ球が作用しているためである (実験 8-9)。
② Day 5 の GILs がグラフトの有無によってアロ攻撃性が獲得されるのは、グラフトの存在によって anergy 状態になるためである (実験 8-10)。

8-8. Treg による拒絶抑制効果を検討する

8-8-1. 実験デザイン

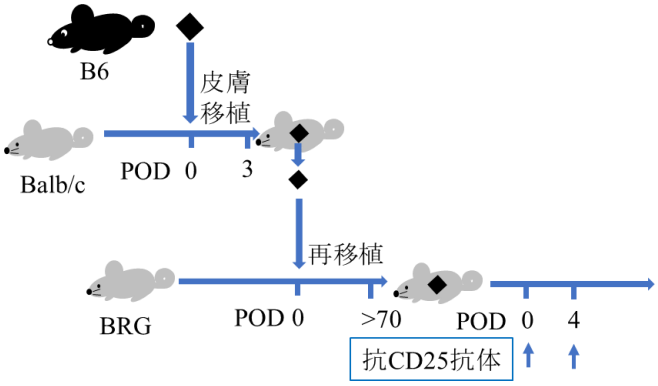


図 46. 実験シェーマ

Treg はグラフト保護効果を持ち、抗 CD25 抗体により Treg を除去することで拒絶が惹起されることが報告されている (Benghiat, Graca et al. 2005, Francis, Feng et al. 2011, Miller, Daniels et al. 2015)。Day 3 の皮膚グラフトが拒絶されなかった理由が Treg による拒絶抑制効果によるものである可能性を検討するため、Day 3 の皮膚を移植後長期生着を得た BRG マウスに抗 CD25 抗体を投与しグラフトの状態を観察した。実験シェーマを図 46 に示す。

8-8-2. 抗 CD25 抗体による Treg 除去

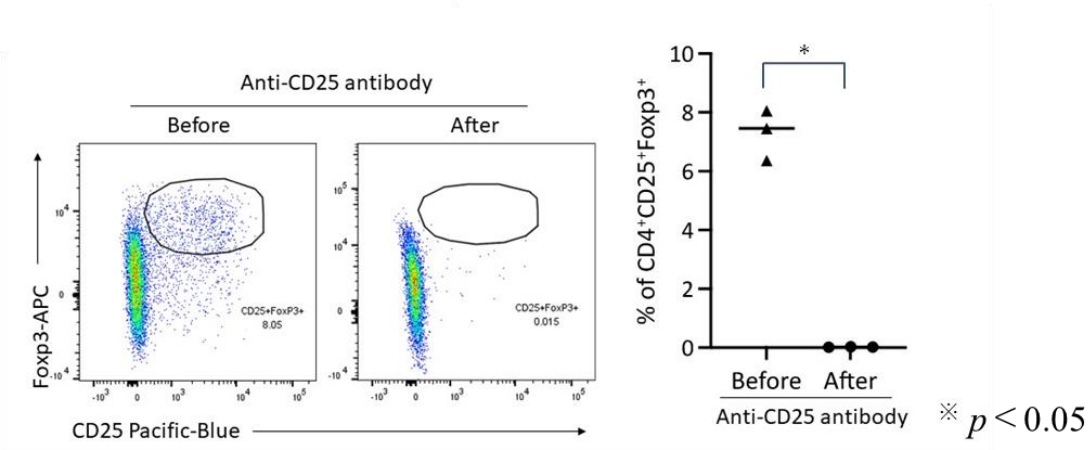


図 47. Naïve Balb/c に抗 CD25 抗体投与し、抗体投与前後で末梢血中の $CD4^+CD25^+FoxP3^+$リンパ球を flow cytometry で解析した. (左) dot image、(右) $CD4^+CD25^+FoxP3^+$リンパ球の割合 (n=3)

図 47 は Naïve Balb/c に抗 CD25 抗体を投与し、投与前と投与後での $CD4^+CD25^+FoxP3^+$リンパ球を解析したものである。抗 CD25 抗体投与によって $CD4^+CD25^+FoxP3^+$は消失し、Treg が除去されていることが確認された。

8-8-3. 抗 CD25 抗体による BRG への構築リンパ球内の Treg の除去

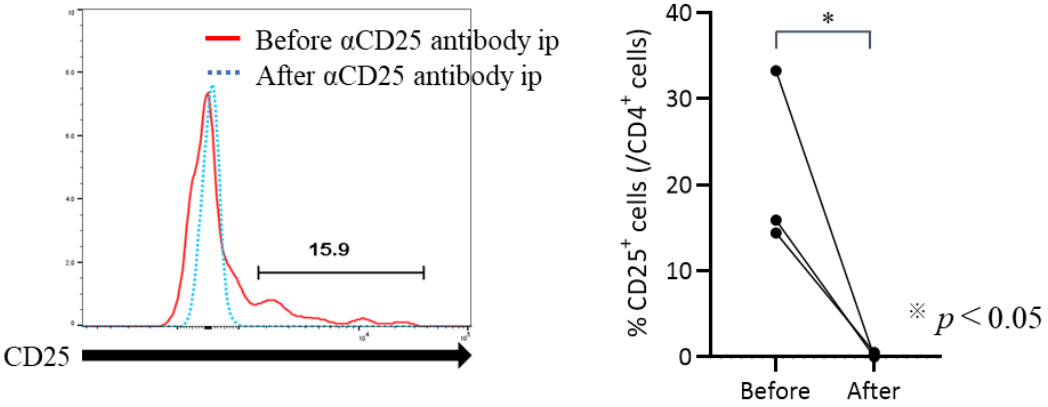


図 48. Flow cytometry. Day 3 皮膚グラフトを BRG マウスに移植後、長期生着を得たマウスに抗 CD25 抗体を投与した。抗体投与前後の末梢血中の $CD4^+CD25^+$リンパ球の代表的な Histogram（左図）と割合（右図、n=3）を示す

Day 3 の皮膚を移植された BRG マウスで、長期生着を得られたマウスに抗 CD25 抗体を投与した。投与前後での末梢血中の $CD25^+$リンパ球の割合を図 48 に示す。抗 CD25 抗体投与により BRG の末梢血中の $CD25^+$リンパ球は除去された。

8-8-4. 結果

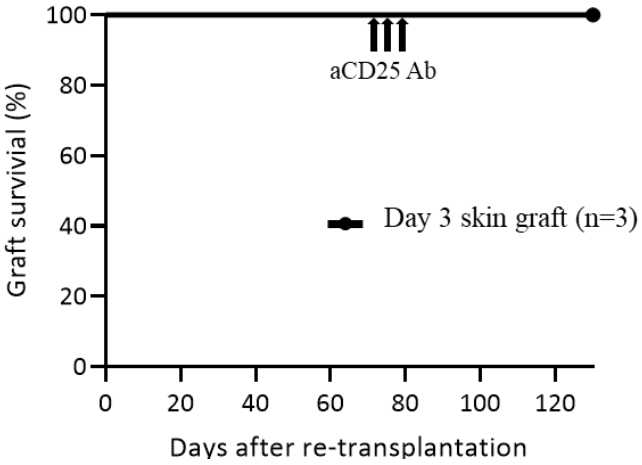


図 49. Graft survival. Day3 のグラフトを BRG マウスに移植し、移植後 70、74、78 日目に抗 CD25 抗体を投与した結果を示す (n=3)

Graft survival を図 49 に示す。抗 CD25 抗体投与後もグラフトは拒絶されず全例生着したままであった。

8-9. Day 3 のグラフトに保護効果のあるリンパ球が浸潤しているかを検討する

8-9-1. 実験シェーマ

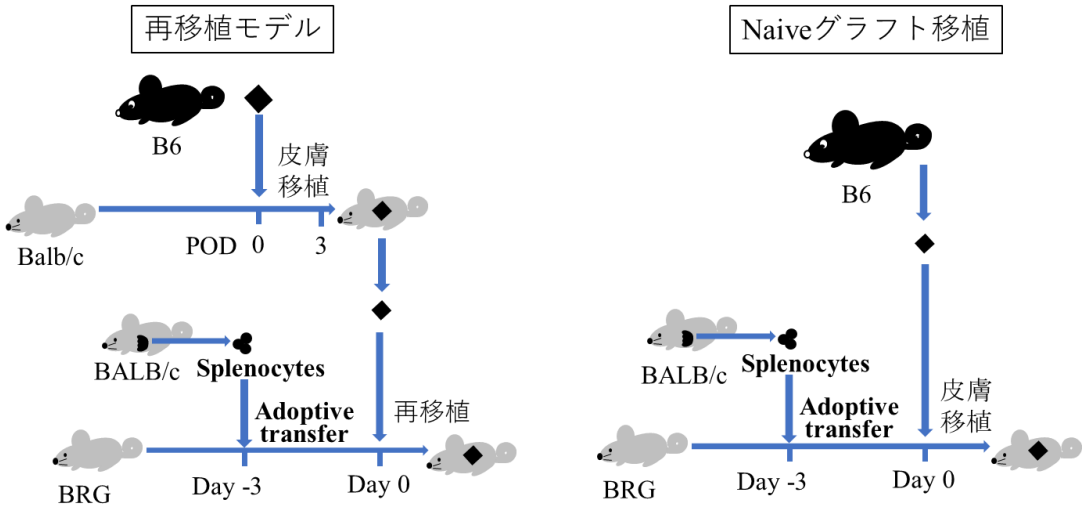


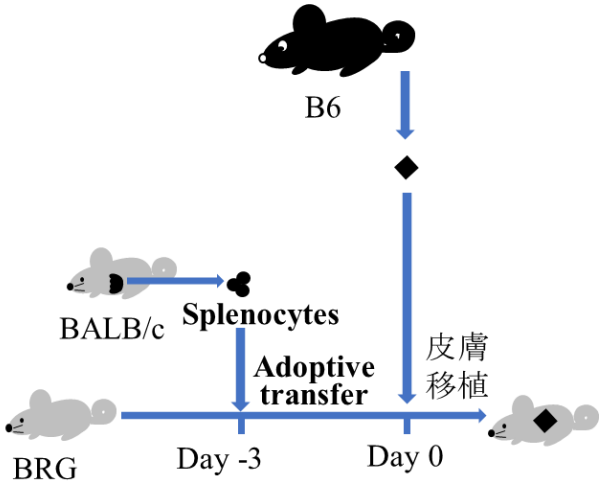
図 50. 実験シェーマ

実験シェーマを図 50 に示す。Balb/c の splenocytes を精製し BRG マウスに adoptive transfer 後、Day 3 のグラフトを移植する。Control として Naïve B6 の皮膚を移植する。もし Day 3 の GILs が拒絶を抑制する効果を持つならば、Day 3 の皮膚グラフトの graft survival は Naïve 皮膚グラフトよりも延長すると考えられ

れる。

8-9-2. 予備実験：splenocytes 投与量の決定

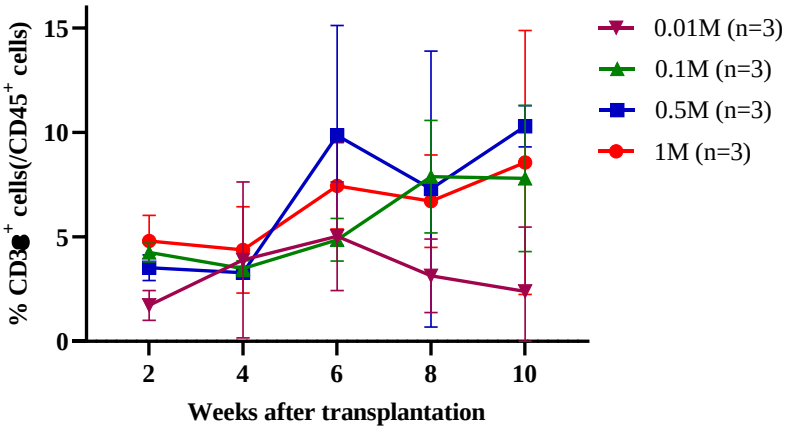
8-9-2-1. 実験シェーマ



実験シェーマを図 51 に示す。Balb/c の splenocytes を BRG マウスに adoptive transfer し、3 日後に B6 の皮膚を移植した。Adoptive transfer する splenocytes の細胞数は $0.01x10^6$ (M)、0.1M、0.5M、1M とした。

図 51. 実験シェーマ

8-9-2-2. Splenocytes 移入後 BRG マウス末梢血中の $CD3^+$リンパ球構築率



構築率を図 52 に示す。0.1M、0.5M、1M 投与群は 8 週以降 5%以上の構築率となったが、0.01M は 8 週以降も 5%未満と低い構築率となった。

図 52. $CD3^+$リンパ球の構築率. 赤線は splenocytes の移入数が 1M (n=3)、青線は 0.5M (n=3)、緑線は 0.1M (n=3)、紫線は 0.01M (n=3) である

8-9-2-3. 結果

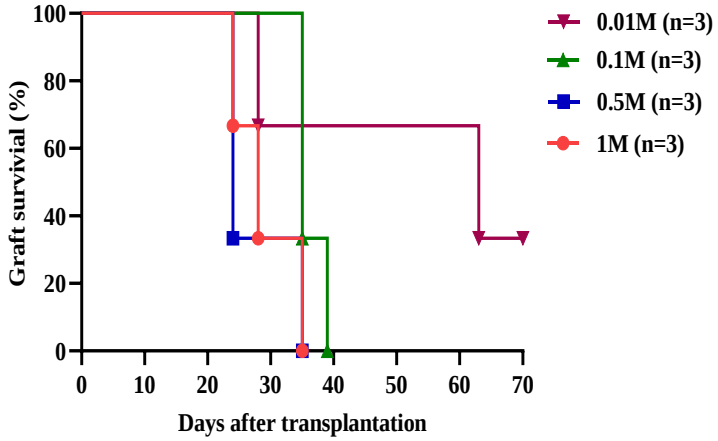


図 53. Graft survival. 赤線は splenocytes の移入数が 1M (n=3)、青線は 0.5M (n=3)、緑線は 0.1M (n=3)、紫線は 0.01M (n=3) での graft survival を示す

Graft survival を図 53 に示す。0.1M、0.5M、1M は同様の Graft survival を示す一方、0.01M は他よりも graft survival は延長する傾向を認めた。以上より、実験 8-9-1. で投与する splenocytes の量は 0.1M、0.5M とした。

8-9-3. 結果

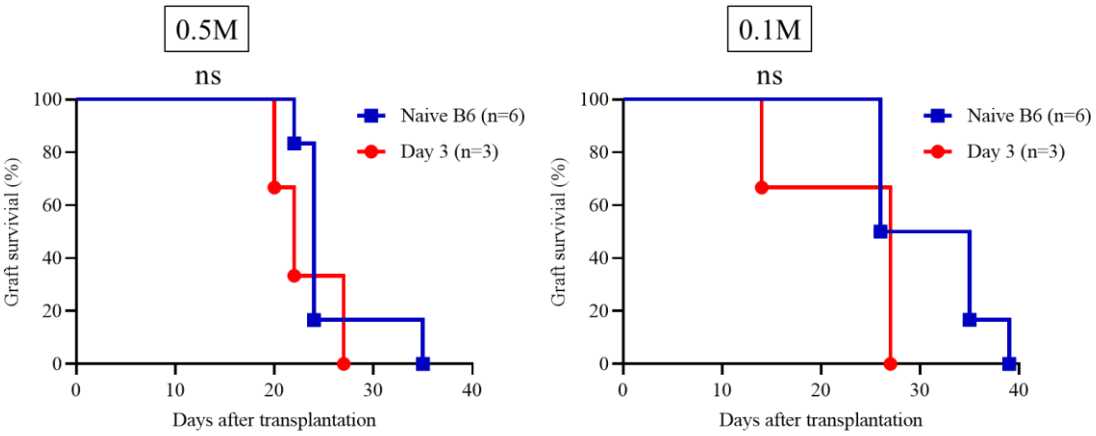


図 54. Graft survival. 左が splenocytes の移入数が 0.5M、右が 0.1M の graft survival を示したグラフで、赤線が Day 3 グラフトを再移植 (n=3)、青線が naïve B6 皮膚グラフトを移植 (n=6) した結果を示す

Graft survival を図 54 に示す。Splenocytes の移入数が 0.5M、0.1M に関わらず、Day 3、Naïve 間で survival に有意差を認めなかった。

8-10. Day 5 の GILs がグラフトの存在により anergy になっているかを検討する

8-10-1. 実験シェーマ

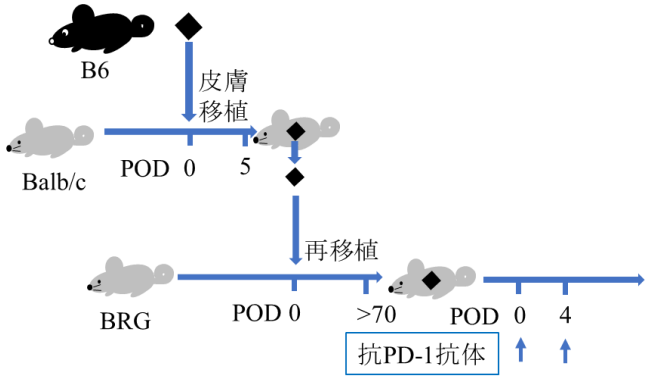


図 55. 実験シェーマ

T cell anergy は PD-1 陽性 T 細胞の発現をともなって観察され、臓器移植後の免疫寛容の機序に関与すると報告される膵島移植モデルで免疫寛容が誘導されたマウスに PDL-1 抗体を投与すると免疫寛容の維持がキャンセルされるとの報告がある(Baas, Besancon et al. 2016)。Day 5 の GILs がグラフトの有無によってアロ攻撃性を持たなくなる理由として、グラフトにより GILs が anergy になった可能性を検討した。

実験シェーマを図 55 示す。Day 5 の皮膚を BRG マウスに移植し、70 日以上の長期生着を得られたマウスに対し抗 PD-1 抗体を投与した。

8-10-2. 結果

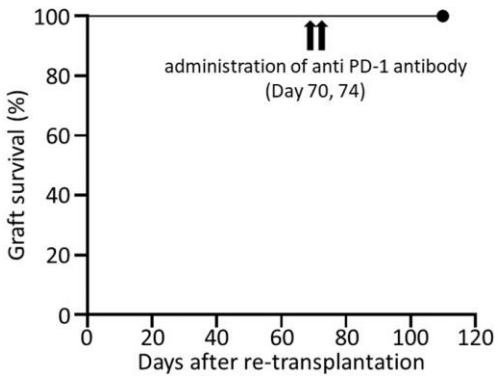


図 56. Graft survival. Day 5 のグラフト再移植後長期生着を得た BRG マウスに移植後 70、74 日目に抗 PD-1 抗体を投与した

Graft survival を図 56 に示す。抗 PD-1 抗体投与後も明らかな拒絶所見は認めず、グラフトは生着したままであった。

8-11. 考察

本研究では、移植後早期の皮膚グラフトにおける GILs の機能的役割の解析を行った。皮膚グラフト内の GILs 数は極めて少ないが、BRG マウスを用いることで in vivo において GILs のみで免疫構築させたマウスを作成し、解析を行うことが可能となった。皮膚移植後 7 日目の GILs にはアロ攻撃的なリンパ球が含

まれており、これが速やかにグラフトの拒絶反応につながる。一方、移植後 5 日目の GILs は単離された場合と皮膚グラフトと共に存在している場合ではグラフトに対する応答が異なっていた。5 日目の GILs 単独では 7 日目の GILs と同様に、直ちにグラフトに対する拒絶反応が誘発された。しかし、皮膚グラフトと共に移入した 5 日目の GILs は半数が拒絶反応を引き起こさず、皮膚グラフトは長期にわたって生着した。

膵島移植モデルにおいて、グラフト内に存在する anergy の性質を持った PD-1^{+}CD8^{+}リンパ球が免疫寛容の誘導に重要であるとの報告がされている(Baas, Besancon et al. 2016)。持続的に抗原に暴露されることで Anergy T 細胞上の抑制性レセプターの発現量が増加すると報告されている (Crawford, Angelosanto et al. 2014)。抗原量が多いと anergy 状態が誘導されるとの報告もあり、サイズが大きい皮膚グラフトは小さいグラフトよりも anergy T 細胞の誘導とグラフトの生存期間延長をもたらし (Zou, Dai et al. 2020)、抗原の持続的な曝露時間が長いほど anergy 状態を誘導されると報告されている (Miller, McIntosh et al. 2019)。臨床においても、anergy の性質を持ったリンパ球数増加はグラフト機能の改善に寄与することが報告されている(Thorp, Stehlik et al. 2015, Sanchez-Fueyo and Markmann 2016, Fribourg, Anderson et al. 2019)。以上の知見を元に、5 日目の GILs がグラフトの存在により半数がアロ攻撃性を持たなくなったことは、持続的なドナー抗原の曝露により GILs が anergy の状態に変化することが関与している可能性がある。しかし、5 日目の皮膚グラフトの BRG マウスへの移植後、皮膚グラフトの長期生着が得られたマウスに、抗 PD-1 抗体による anergy T 細胞の除去を行ったが、拒絶は惹起されなかった。再移植モデルにおける Day 5 の anergy リンパ球の免疫学的解析には更なる研究が必要である。

本研究では、移植後 3 日目までの GILs はアロ抗原に反応せず、その結果、皮膚グラフトが長期生着した。単離した GILs は 5 日目と対照的に、3 日目の GILs はアロ攻撃性を示さなかったことから、3 日目の GILs にはアロ攻撃性を持つ T 細胞が含まれていない可能性が示唆された。我々は以前、マウス心臓移植モデルにおいて、3 日目の GILs ではなく 5 日目の GILs にアロ攻撃性を持った T 細胞が含まれ、グラフトの即時拒絶につながることを報告した (Ganchiku, Goto et al. 2021)。移植後 3 日目の GILs はレシピエントのリンパ球由来であるが、二次リンパ組織においてドナー抗原にプライミングされたエフェクターT 細胞は含まれていない可能性がある。以前の研究では、メモリーT 細胞の表現型を持つ CD8^{+} GILs が移植後 24 時間ですでにグラフトに存在し、IFN-γ を産生することが示された (Schenk, Nozaki et al. 2008)。移植後 72 時間以内の早期アロ抗原特異的 IFN-γ および CXCL9 産生は、レシピエントマウス由来のグラフト内 CD8^{+} T

細胞に依存して増加した (Schenk, Nozaki et al. 2008)。しかし、マウスの心臓移植後 72 時間の脾臓には、抗原をプライミングしたエフェクター T 細胞は観察されなかった (Schenk, Nozaki et al. 2008)。さらに、脾臓を摘出した aly/aly マウス（すなわち、すべての二次リンパ器官を持たないマウス）は心臓グラフトの拒絶反応を促進できないことが示された (Kant, Akiyama et al. 2015)。BRG マウスはリンパ節やリンパ器官の発達が不十分で、抗原親和性の成熟や抗原のプライミングが損なわれている可能性があるため (Shultz, Brehm et al. 2012, Goto, Issa et al. 2013)、プライミングされていないリンパ球は BRG マウス内では心臓グラフトの拒絶反応を促進しない可能性がある。我々は以前、マウス心臓モデルにおいてナイーブリンパ球を BRG マウスに構築しても、アロ心グラフトは拒絶されないことを確認した。対照的に、感作後の脾細胞で免疫を構築した BRG マウスは心グラフトを速やかに拒絶した（data not shown）。このことは、アロ心移植においては、BRG マウスへの免疫を構築するリンパ球の中に、移入前のドナー抗原にプライミングされたリンパ球が含まれるか否かが、拒絶の是非に関わることを示唆している。対照的に、アロ皮膚移植においては二次リンパ臓器はグラフトの拒絶反応を促進するのに必要ではないと報告されている。二次リンパ器官を欠く脾臓摘出 aly/aly マウスにおいても、アロ皮膚グラフトは拒絶された (Kant, Akiyama et al. 2015)。同様に、BRG マウスにおいても、ナイーブリンパ球が皮膚グラフトの拒絶反応を誘発した (図 53)。二次リンパ器官がなくても、プライミングされていないリンパ球が皮膚グラフトの拒絶反応を誘発することが示された。

それにもかかわらず、移植後 3 日目の GILs は皮膚アログラフトの拒絶反応を引き起こすことができなかった。上術の報告からも、3 日目の GILs の機能的な免疫不応答は、プライミングされていないリンパ球の不在によって引き起こされるものではないと考えられる。また以前の研究で、移植後 72 時間以内の早期 GILs を許容することが免疫寛容の誘導、維持に重要であることが示されている (Goto, You et al. 2013)。この報告では、72 時間以内の早期 GILs からグラフト内に $CD4^+Foxp3^+$ Treg 優位な環境が作成され、長期グラフト生着が引き起こされたと考察している (Goto, You et al. 2013)。さらに、長期のグラフト生着は、グラフト内の $CD4^+Foxp3^+$ Tregs によって維持され、Tregs はアロ攻撃性 T 細胞の反応を抑制することを皮膚移植で示した報告もある (Kendal, Chen et al. 2011)。本研究においても 3 日目の GILs が長期皮膚グラフト生着を引き起こす機序として Treg の関与を検討したが、その関与は否定的であった (実験 8-8)。さらに、3 日目の GIL を含む皮膚グラフトの移植を受けた BRG マウスに、ナイーブリンパ球を追加投与しても、拒絶反応プロセスへの影響は観察されなかった (実験 8-9)。

本研究では3日目までの早期GILsの免疫学的役割の詳細を解明することはできなかったが、今後 Single cell RNA 解析などによる解明が期待される。

心臓移植モデルにおいて、3 日目の GILs は拒絶反応を促進する能力を持たないが、5 日目の GILs はドナー系統マウスのアロ心グラフトを速やかに拒絶した(Ganchiku, Goto et al. 2021)。心臓移植モデルでは、心臓グラフトは血管に直接吻合され、ドナー抗原は血流を通じて様々なリンパ系臓器に広がる。しかし、皮膚グラフトは血管に直接吻合されていないため、新生血管がネットワークを形成するのに数日かかり (Steinmuller 1984, Larsen, Steinman et al. 1990, Zeng, Chen et al. 2021)、グラフトに虚血傷害が生じ、他の移植モデルより強力な免疫反応が引き起こされる (He, Schenk et al. 2004)。血管を吻合しないグラフトと血管を吻合したグラフトとでは、グラフトの拒絶反応の程度に違いがあることが、数多くの研究で報告されている。MCP-1 や CXCR3 などのケモカインの発現は、血管吻合無しの皮膚移植モデルと血管吻合を行う心臓移植モデルで逆の効果を示した (Haskova, Izawa et al. 2007) 。また血管吻合を行う心臓移植モデルにおける免疫寛容治療戦略は、血管吻合を行わない皮膚移植モデルでは効果が低いことが報告されている。その理由として、拒絶反応を引き起こすアロ反応性 T 細胞が心臓より皮膚の方が少ないことや (Jones, Turvey et al. 2001)、免疫原性が異なること、皮膚にはランゲルハンス細胞が存在すること (Hull, Benichou et al. 2019) などが挙げられている。我々の検討でも、マウスアロ心移植モデルでは有効であった抗 CD3 抗体を用いた免疫寛容誘導プロトコールは、マウスアロ皮膚移植モデルでは無効であった（図 24)。一方で、本研究のアロ皮膚移植では 3 日目の GILs、また 5 日目の単離した GILs はアロ心移植の場合と似通った結果であった (Ganchiku, Goto et al. 2021)。皮膚移植後、ドナー抗原はリンパ系を介してdrainingリンパ節に運ばれ、そこでT細胞はプライミングされ、アロ攻撃性を獲得するとされている (Rosenberg and Singer 1992, Zeng, Chen et al. 2021)。最近の研究では、このドナー抗原の運搬が、これまでのドナー樹状細胞細胞の２次リンパ組織への移動によるよりも、細胞外小胞を介した運搬の可能性が示唆された (Zeng, Chen et al. 2021)。細胞外小胞を介したドナー抗原の移動であれば不完全な早期の脈管構築においても可能であり、血管吻合の有無による移植モデルでの時期による違いがみられなかったことを説明できる可能性があると考えている。

我々の adoptive transfer モデルでは、3 日目、5 日目、7 日目に単離された GILs は、移入後 10 週間までに同程度のレベルまで増殖した。しかし、GILs の細胞数がグラフトの拒絶を決定する因子である可能性がある。すなわち、3 日目または 5 日目の一部では GILs が少なすぎるため、グラフトの拒絶反応が促進され

なかった可能性がある。実験 8-6 で示した通り、5 日目の GILs の数は大きく変動していない。従って、5 日目の皮膚グラフト再移植モデルでみられたグラフトの転帰の違いは GILs 細胞数とは関連しないと考えられる。以前、我々は心臓移植モデルにおいて、5 日目 GILs の数を減らして 3 日目 GILs の数と同レベルにした場合においても、細胞数に依存することなくグラフトの拒絶反応が観察された（data not shown）。これらのデータは、GILs の数はグラフトの拒絶反応と関連しない可能性を示唆しているが、皮膚移植においても同様の結果となるかどうかについては検討が必要である。

9. 結論

本研究では以下の点を明らかにした

・NSG、BRG マウスを用いてヒト化マウスヒト皮膚移植モデルを作成した。

・皮膚移植モデルでメモリーT 細胞の作成を試みたが、作成出来なかった。

・皮膚移植モデルで抗 CD3F(ab')$_2$ 抗体を用いた免疫寛容プロトコルの作成を試みたが、他の移植モデルとは異なり免疫寛容を得ることが出来なかった。

・グラフトに対する GILs の免疫学的応答は時期やグラフトの存在によって異なる。早期のグラフトに対する免疫学的不応答は Treg やグラフト保護作用を持つリンパ球が原因でなく、グラフトの有無による免疫学的応答の差は anergy が原因ではない。

上記に示したように、非血管吻合移植モデルである皮膚移植を用いた検討にもかかわらず、GILs の拒絶反応を引き起こす時期は以前報告した血管吻合による移植モデルである心臓移植と同様であった。さらに、皮膚再移植モデルは、GILs 単独での再構築モデルと比較してグラフトに対する拒絶反応が一部異なる挙動を示した。この所見は、グラフト組織の存在によって 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。

10. 謝辞

本研究の一部は JSPS 基盤研究 C (Grant number: 19K18047 及び 19K09064)の助成を受けたものである。

本研究全般及び本文の執筆にあたり、ご指導、ご助言頂きました北海道大学大学院医学研究院 消化器外科学教室Iの武冨 紹信 教授並びに後藤 了一 助教に深く御礼申し上げます。

また、実験用マウスの繁殖及び維持管理をして頂いた土佐 紀子 先生及び動物実験施設の職員の方々に御礼申し上げます。ヒトの皮膚を使用するにあたり、多大なご協力を頂いた苫小牧日翔病院形成外科の吉田 哲也 先生に深く御礼申し上げます。実験において様々な補佐をして頂いた堀米 正敏さん及び消化器外科学教室Iの先生方に感謝の意を申します。

11. 利益相反

本研究において開示すべき利益相反はありません

12. 引用文献

Abramowicz, D., L. Schandene, M. Goldman, A. Crusiaux, P. Vereerstraeten, L. De Pauw, J. Wybran, P. Kinnaert, E. Dupont and C. Toussaint (1989). "Release of tumor necrosis factor, interleukin-2, and gamma-interferon in serum after injection of OKT3 monoclonal antibody in kidney transplant recipients." Transplantation 47(4): 606-608.

Anderson, C. C. and P. Matzinger (2001). "Immunity or tolerance: opposite outcomes of microchimerism from skin grafts." Nat Med 7(1): 80-87.

Anderson, K. G., K. Mayer-Barber, H. Sung, L. Beura, B. R. James, J. J. Taylor, L. Qunaj, T. S. Griffith, V. Vezys, D. L. Barber and D. Masopust (2014). "Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes." Nat Protoc 9(1): 209-222.

Baas, M., A. Besancon, T. Goncalves, F. Valette, H. Yagita, B. Sawitzki, H. D. Volk, E. Waeckel-Enee, B. Rocha, L. Chatenoud and S. You (2016). "TGFbeta-dependent expression of PD-1 and PD-L1 controls CD8(+) T cell anergy in transplant tolerance." Elife 5: e08133.

Balkwill, F. R., M. Capasso and T. Hagemann (2012). "The tumor microenvironment at a glance." J Cell Sci 125(Pt 23): 5591-5596.

Benghiat, F. S., L. Graca, M. Y. Braun, S. Detienne, F. Moore, S. Buonocore, V. Flamand, H. Waldmann, M. Goldman and A. Le Moine (2005). "Critical influence of natural regulatory CD25+ T cells on the fate of allografts in the absence of immunosuppression." Transplantation 79(6): 648-654.

Beura, L. K., S. E. Hamilton, K. Bi, J. M. Schenkel, O. A. Odumade, K. A. Casey, E. A. Thompson, K. A. Fraser, P. C. Rosato, A. Filali-Mouhim, R. P. Sekaly, M. K. Jenkins, V. Vezys, W. N. Haining, S. C. Jameson and D. Masopust (2016). "Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice." Nature 532(7600): 512-516.

Billingham, R. E. and P. B. Medawar (1951). "The Technique of Free Skin Grafting in Mammals." Journal of Experimental Biology 28(3): 385-402.

Braat, A. E., J. J. Blok, H. Putter, R. Adam, A. K. Burroughs, A. O. Rahmel, R. J. Porte, X. Rogiers and J. Ringers (2012). "The Eurotransplant donor risk index in liver transplantation: ET-DRI." Am J Transplant 12(10): 2789-2796.

Brehm, M. A., A. Cuthbert, C. Yang, D. M. Miller, P. DiIorio, J. Laning, L. Burzenski, B. Gott, O. Foreman, A. Kavirayani, M. Herlihy, A. A. Rossini, L. D. Shultz and D. L. Greiner (2010). "Parameters for establishing humanized mouse models to study human immunity: analysis of human hematopoietic stem cell engraftment in three immunodeficient strains of mice bearing the IL2rgamma(null) mutation." Clin Immunol 135(1): 84-98.

Calderon, D., M. Prot, S. You, C. Marquet, V. Bellamy, P. Bruneval, F. Valette, P. de Almeida, J. C. Wu, M. Puceat, P. Menasche and L. Chatenoud (2016). "Control of Immune Response to Allogeneic Embryonic Stem Cells by CD3 Antibody-Mediated Operational Tolerance Induction." Am J Transplant 16(2): 454-467.

Cerny, A., H. Ramseier, H. Bazin and R. M. Zinkernagel (1988). "Unimpaired first-set and second-set skin graft rejection in agammaglobulinemic mice." Transplantation 45(6): 1111-1113.

Chatenoud, L., C. Ferran, A. Reuter, C. Legendre, Y. Gevaert, H. Kreis, P. Franchimont and J. F. Bach (1989). "Systemic reaction to the anti-T-cell monoclonal antibody OKT3 in relation to serum levels of tumor necrosis factor and interferon-gamma [corrected]." N Engl J Med 320(21): 1420-1421.

Chong, A. S., M. L. Alegre, M. L. Miller and R. L. Fairchild (2013). "Lessons and limits of mouse models." Cold Spring Harb Perspect Med 3(12): a015495.

Crawford, A., J. M. Angelosanto, C. Kao, T. A. Doering, P. M. Odorizzi, B. E. Barnett and E. J. Wherry (2014). "Molecular and transcriptional basis of CD4(+) T cell dysfunction during chronic infection." Immunity 40(2): 289-302.

Curiel, T. J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J. R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel,

A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M. L. Disis, K. L. Knutson, L. Chen and W. Zou (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." Nat Med 10(9): 942-949.

Datta, N., S. G. Devaney, R. W. Busuttil, K. Azari and J. W. Kupiec-Weglinski (2017). "Prolonged Cold Ischemia Time Results in Local and Remote Organ Dysfunction in a Murine Model of Vascularized Composite Transplantation." Am J Transplant 17(10): 2572-2579.

Feng, S., N. P. Goodrich, J. L. Bragg-Gresham, D. M. Dykstra, J. D. Punch, M. A. DebRoy, S. M. Greenstein and R. M. Merion (2006). "Characteristics associated with liver graft failure: the concept of a donor risk index." Am J Transplant 6(4): 783-790.

Francis, R. S., G. Feng, T. Tha-In, I. S. Lyons, K. J. Wood and A. Bushell (2011). "Induction of transplantation tolerance converts potential effector T cells into graft-protective regulatory T cells." Eur J Immunol 41(3): 726-738.

Fribourg, M., L. Anderson, C. Fischman, C. Cantarelli, L. Perin, G. La Manna, A. Rahman, B. E. Burrell, P. S. Heeger and P. Cravedi (2019). "T-cell exhaustion correlates with improved outcomes in kidney transplant recipients." Kidney Int 96(2): 436-449.

Fridman, W. H., F. Pagès, C. Sautès-Fridman and J. Galon (2012). "The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome." Nat Rev Cancer 12(4): 298-306.

Gajewski, T. F., H. Schreiber and Y. X. Fu (2013). "Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment." Nat Immunol 14(10): 1014-1022.

Ganchiku, Y., R. Goto, R. Kanazawa, T. Ota, K. Shibuya, Y. Fukasaku, N. Kobayashi, R. Igarashi, N. Kawamura, M. Zaitsu, M. Watanabe and A. Taketomi (2021). "Functional roles of graft-infiltrating lymphocytes during early-phase post-transplantation in mouse cardiac transplantation models." Transpl Int 34(12): 2547-2561.

Gong, W., T. Huang, F. Ge, G. Luo, S. Yuan, D. Gao and D. Kong (2013). "Presensitized

immune condition of host exaggerates prolonged cold ischemia-mediated injury of cardiac graft involving regulatory T cells." Transplantation 96(7): 609-615.

Goto, R., F. Issa, S. Heidt, D. Taggart and K. J. Wood (2013). "Ischemia-reperfusion injury accelerates human antibody-mediated transplant vasculopathy." Transplantation 96(2): 139-145.

Goto, R., S. You, M. Zaitsu, L. Chatenoud and K. J. Wood (2013). "Delayed anti-CD3 therapy results in depletion of alloreactive T cells and the dominance of Foxp3+ CD4+ graft infiltrating cells." Am J Transplant 13(7): 1655-1664.

Greiner, D. L., A. A. Rossini and J. P. Mordes (2001). "Translating data from animal models into methods for preventing human autoimmune diabetes mellitus: caveat emptor and primum non nocere." Clin Immunol 100(2): 134-143.

Haskova, Z., A. Izawa, A. G. Contreras, E. Flynn, G. Boulday and D. M. Briscoe (2007). "Organ-specific differences in the function of MCP-1 and CXCR3 during cardiac and skin allograft rejection." Transplantation 83(12): 1595-1601.

He, C., S. Schenk, Q. Zhang, A. Valujskikh, J. Bayer, R. L. Fairchild and P. S. Heeger (2004). "Effects of T cell frequency and graft size on transplant outcome in mice." J Immunol 172(1): 240-247.

Heeger, P. S., N. S. Greenspan, S. Kuhlenschmidt, C. Dejelo, D. E. Hricik, J. A. Schulak and M. Tary-Lehmann (1999). "Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes." J Immunol 163(4): 2267-2275.

Herold, K. C., B. N. Bundy, S. A. Long, J. A. Bluestone, L. A. DiMeglio, M. J. Dufort, S. E. Gitelman, P. A. Gottlieb, J. P. Krischer, P. S. Linsley, J. B. Marks, W. Moore, A. Moran, H. Rodriguez, W. E. Russell, D. Schatz, J. S. Skyler, E. Tsalikian, D. K. Wherrett, A. G. Ziegler, C. J. Greenbaum and G. Type 1 Diabetes TrialNet Study (2019). "An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in Relatives at Risk for Type 1 Diabetes." N Engl J Med 381(7): 603-613

Hiraoka, N., K. Onozato, T. Kosuge and S. Hirohashi (2006). "Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions." Clin Cancer Res 12(18): 5423-5434.

Hull, T. D., G. Benichou and J. C. Madsen (2019). "Why some organ allografts are tolerated better than others: new insights for an old question." Curr Opin Organ Transplant 24(1): 49-57.

Issa, F., J. Hester, R. Goto, S. N. Nadig, T. E. Goodacre and K. Wood (2010). "Ex vivo-expanded human regulatory T cells prevent the rejection of skin allografts in a humanized mouse model." Transplantation 90(12): 1321-1327.

Ji, H., X. D. Shen, F. Gao, R. W. Busuttil, Y. Zhai and J. W. Kupiec-Weglinski (2011). "Alloreactive CD8 T-cell primed/memory responses and accelerated graft rejection in B-cell-deficient sensitized mice." Transplantation 91(10): 1075-1081.

Jones, N. D., M. O. Brook, M. Carvalho-Gaspar, S. Luo and K. J. Wood (2010). "Regulatory T cells can prevent memory CD8+ T-cell-mediated rejection following polymorphonuclear cell depletion." Eur J Immunol 40(11): 3107-3116.

Jones, N. D., M. Carvalho-Gaspar, S. Luo, M. O. Brook, L. Martin and K. J. Wood (2006). "Effector and memory CD8+ T cells can be generated in response to alloantigen independently of CD4+ T cell help." J Immunol 176(4): 2316-2323.

Jones, N. D., S. E. Turvey, A. Van Maurik, M. Hara, C. I. Kingsley, C. H. Smith, A. L. Mellor, P. J. Morris and K. J. Wood (2001). "Differential susceptibility of heart, skin, and islet allografts to T cell-mediated rejection." J Immunol 166(4): 2824-2830.

Kant, C. D., Y. Akiyama, K. Tanaka, S. Shea, Y. Yamada, S. E. Connolly, J. Marino, G. Tocco and G. Benichou (2015). "Both rejection and tolerance of allografts can occur in the absence of secondary lymphoid tissues." J Immunol 194(3): 1364-1371.

Kendal, A. R., Y. Chen, F. S. Regateiro, J. Ma, E. Adams, S. P. Cobbold, S. Hori and H. Waldmann (2011). "Sustained suppression by Foxp3+ regulatory T cells is vital for infectious transplantation tolerance." J Exp Med 208(10): 2043-2053.

Kenney, L. L., L. D. Shultz, D. L. Greiner and M. A. Brehm (2016). "Humanized Mouse Models for Transplant Immunology." Am J Transplant 16(2): 389-397.

Kim, H. J. and H. Cantor (2014). "CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful." Cancer Immunol Res 2(2): 91-98.

Kirkiles-Smith, N. C., M. J. Harding, B. R. Shepherd, S. A. Fader, T. Yi, Y. Wang, J. M. McNiff, E. L. Snyder, M. I. Lorber, G. Tellides and J. S. Pober (2009). "Development of a humanized mouse model to study the role of macrophages in allograft injury." Transplantation 87(2): 189-197.

Kitagawa-Sakakida, S., M. Tori, Z. Li, K. Horiguchi, H. Izutani, H. Matsuda and R. Shirakura (2000). "Active cell migration in retransplanted rat cardiac allografts during the course of chronic rejection." J Heart Lung Transplant 19(6): 584-590.

Larsen, C. P., R. M. Steinman, M. Witmer-Pack, D. F. Hankins, P. J. Morris and J. M. Austyn (1990). "Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants." J Exp Med 172(5): 1483-1493.

Legrand, N., A. Ploss, R. Balling, P. D. Becker, C. Borsotti, N. Brezillon, J. Debarry, Y. de Jong, H. Deng, J. P. Di Santo, S. Eisenbarth, E. Eynon, R. A. Flavell, C. A. Guzman, N. D. Huntington, D. Kremsdorf, M. P. Manns, M. G. Manz, J. J. Mention, M. Ott, C. Rathinam, C. M. Rice, A. Rongvaux, S. Stevens, H. Spits, H. Strick-Marchand, H. Takizawa, A. U. van Lent, C. Wang, K. Weijer, T. Willinger and P. Ziegler (2009). "Humanized mice for modeling human infectious disease: challenges, progress, and outlook." Cell Host Microbe 6(1): 5-9.

McFarland, H. I. and A. S. Rosenberg (2009). "Skin allograft rejection." Curr Protoc Immunol Chapter 4: Unit 4 4.

Miller, M. L., M. D. Daniels, T. Wang, J. Chen, J. Young, J. Xu, Y. Wang, D. Yin, V. Vu, A. N. Husain, M. L. Alegre and A. S. Chong (2015). "Spontaneous restoration of transplantation tolerance after acute rejection." Nat Commun 6: 7566.

Miller, M. L., C. M. McIntosh, Y. Wang, L. Chen, P. Wang, Y. M. Lei, M. D. Daniels, E. Watkins, C. Mora Solano, A. S. Chong and M. L. Alegre (2019). "Resilience of T cell-intrinsic dysfunction in transplantation tolerance." Proc Natl Acad Sci U S A 116(47): 23682-23690.

Minamimura, K., K. Sato, H. Yagita, T. Tanaka, S. Arii and T. Maki (2008). "Strategies to induce marked prolongation of secondary skin allograft survival in alloantigen-primed mice." Am J Transplant 8(4): 761-772.

Monk, N. J., R. E. Hargreaves, E. Simpson, J. P. Dyson and S. Jurcevic (2006). "Transplant tolerance: models, concepts and facts." J Mol Med (Berl) 84(4): 295-304.

Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol 7: 145-173.

Murray, A. G., P. Petzelbauer, C. C. Hughes, J. Costa, P. Askenase and J. S. Pober (1994). "Human T-cell-mediated destruction of allogeneic dermal microvessels in a severe combined immunodeficient mouse." Proc Natl Acad Sci U S A 91(19): 9146-9150.

Murray, A. G., J. S. Schechner, D. E. Epperson, P. Sultan, J. M. McNiff, C. C. Hughes, M. I. Lorber, P. W. Askenase and J. S. Pober (1998). "Dermal microvascular injury in the human peripheral blood lymphocyte reconstituted-severe combined immunodeficient (HuPBL-SCID) mouse/skin allograft model is T cell mediated and inhibited by a combination of cyclosporine and rapamycin." Am J Pathol 153(2): 627-638.

Pearson, T., D. L. Greiner and L. D. Shultz (2008). "Creation of "humanized" mice to study human immunity." Curr Protoc Immunol Chapter 15: 15.21.11-15.21.21.

Perdigoto, A. L., P. Preston-Hurlburt, P. Clark, S. A. Long, P. S. Linsley, K. M. Harris, S. E. Gitelman, C. J. Greenbaum, P. A. Gottlieb, W. Hagopian, A. Woodwyk, J. Dziura, K. C. Herold and N. Immune Tolerance (2019). "Treatment of type 1 diabetes with teplizumab: clinical and immunological follow-up after 7 years from diagnosis."

Diabetologia 62(4): 655-664.

Racki, W. J., L. Covassin, M. Brehm, S. Pino, R. Ignotz, R. Dunn, J. Laning, S. K. Graves, A. A. Rossini, L. D. Shultz and D. L. Greiner (2010). "NOD-scid IL2rgamma(null) mouse model of human skin transplantation and allograft rejection." Transplantation 89(5): 527-536.

Rosenberg, A. S. and A. Singer (1992). "Cellular basis of skin allograft rejection: an in vivo model of immune-mediated tissue destruction." Annu Rev Immunol 10: 333-358.

Ruscher, R. and K. A. Hogquist (2018). "Intravenous Labeling and Analysis of the Content of Thymic Perivascular Spaces." Bio Protoc 8(5).

Sagoo, P., N. Ali, G. Garg, F. O. Nestle, R. I. Lechler and G. Lombardi (2011). "Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells." Sci Transl Med 3(83): 83ra42.

Sanchez-Fueyo, A. and J. F. Markmann (2016). "Immune Exhaustion and Transplantation." Am J Transplant 16(7): 1953-1957.

Savas, P., B. Virassamy, C. Ye, A. Salim, C. P. Mintoff, F. Caramia, R. Salgado, D. J. Byrne, Z. L. Teo, S. Dushyanthen, A. Byrne, L. Wein, S. J. Luen, C. Poliness, S. S. Nightingale, A. S. Skandarajah, D. E. Gyorki, C. M. Thornton, P. A. Beavis, S. B. Fox, C. Kathleen Cuningham Foundation Consortium for Research into Familial Breast, P. K. Darcy, T. P. Speed, L. K. Mackay, P. J. Neeson and S. Loi (2018). "Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis." Nat Med 24(7): 986-993.

Schenk, A. D., T. Nozaki, M. Rabant, A. Valujskikh and R. L. Fairchild (2008). "Donor-reactive CD8 memory T cells infiltrate cardiac allografts within 24-h posttransplant in naive recipients." Am J Transplant 8(8): 1652-1661.

Segev, D. L., L. M. Kucirka, G. C. Nguyen, A. M. Cameron, J. E. Locke, C. E. Simpkins, P. J. Thuluvath, R. A. Montgomery and W. R. Maley (2008). "Effect modification in liver allografts with prolonged cold ischemic time." Am J Transplant

8(3): 658-666.

Shiao, S. L., A. P. Ganesan, H. S. Rugo and L. M. Coussens (2011). "Immune microenvironments in solid tumors: new targets for therapy." Genes Dev 25(24): 2559-2572.

Shultz, L. D., M. A. Brehm, J. V. Garcia-Martinez and D. L. Greiner (2012). "Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges." Nat Rev Immunol 12(11): 786-798.

Shultz, L. D., F. Ishikawa and D. L. Greiner (2007). "Humanized mice in translational biomedical research." Nat Rev Immunol 7(2): 118-130.

Steinmuller, D. (1984). "Adoptive transfer." Methods Enzymol 108: 35-40.

Thorp, E. B., C. Stehlik and M. J. Ansari (2015). "T-cell exhaustion in allograft rejection and tolerance." Curr Opin Organ Transplant 20(1): 37-42.

Turgeon, N. A., S. J. Banuelos, L. D. Shultz, B. L. Lyons, N. Iwakoshi, D. L. Greiner, J. P. Mordes, A. A. Rossini and M. C. Appel (2003). "Alloimmune injury and rejection of human skin grafts on human peripheral blood lymphocyte-reconstituted non-obese diabetic severe combined immunodeficient beta2-microglobulin-null mice." Exp Biol Med (Maywood) 228(9): 1096-1104.

Valujskikh, A., B. Pantenburg and P. S. Heeger (2002). "Primed allospecific T cells prevent the effects of costimulatory blockade on prolonged cardiac allograft survival in mice." Am J Transplant 2(6): 501-509.

van der Leun, A. M., D. S. Thommen and T. N. Schumacher (2020). "CD8(+) T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis." Nat Rev Cancer 20(4): 218-232.

Wang, G., B. Hu and Z. Li (2013). "Cold ischemia/reperfusion injury in a mouse model of partial liver transplantation." J Surg Res 181(2): 337-341.

Wu, Z., S. J. Bensinger, J. Zhang, C. Chen, X. Yuan, X. Huang, J. F. Markmann, A. Kassaee, B. R. Rosengard, W. W. Hancock, M. H. Sayegh and L. A. Turka (2004). "Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance." Nat Med 10(1): 87-92.

Xia, J., J. Chen, W. Shao, T. Lan, Y. Wang, B. Xie, H. Thorlacius, F. Tian, R. Huang and Z. Qi (2010). "Suppressing memory T cell activation induces islet allograft tolerance in alloantigen-primed mice." Transpl Int 23(11): 1154-1163.

You, S., J. Zuber, C. Kuhn, M. Baas, F. Valette, V. Sauvaget, S. Sarnacki, B. Sawitzki, J. F. Bach, H. D. Volk and L. Chatenoud (2012). "Induction of allograft tolerance by monoclonal CD3 antibodies: a matter of timing." Am J Transplant 12(11): 2909-2919.

Zeng, F., Z. Chen, R. Chen, W. J. Shufesky, M. Bandyopadhyay, G. Camirand, M. H. Oberbarnscheidt, M. L. G. Sullivan, C. J. Baty, M. Q. Yang, M. Calderon, D. B. Stolz, G. Erdos, R. Pelanda, T. V. Brennan, S. D. Catz, S. C. Watkins, A. T. Larregina and A. E. Morelli (2021). "Graft-derived extracellular vesicles transported across subcapsular sinus macrophages elicit B cell alloimmunity after transplantation." Sci Transl Med 13(585).

Zhai, Y., L. Meng, F. Gao, R. W. Busuttil and J. W. Kupiec-Weglinski (2002). "Allograft rejection by primed/memory CD8+ T cells is CD154 blockade resistant: therapeutic implications for sensitized transplant recipients." J Immunol 169(8): 4667-4673.

Zou, D., Y. Dai, X. Zhang, G. Wang, X. Xiao, P. Jia, X. C. Li, Z. Guo and W. Chen (2020). "T cell exhaustion is associated with antigen abundance and promotes transplant acceptance." Am J Transplant 20(9): 2540-2550.

Zwang, N. A. and J. R. Leventhal (2017). "Cell Therapy in Kidney Transplantation: Focus on Regulatory T Cells." J Am Soc Nephrol 28(7): 1960-1972.