

氏名	川崎泰史
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 542 号
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 19 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	異種移植片対宿主病モデルマウスにおける免疫応答の解明
論文審査委員	(委員長) 教授 古川 雄 祐 (委員) 教授 大森 司 准教授 賀古 真 一

論文内容の要旨

1 研究目的

造血幹細胞移植後の急性移植片対宿主病（GVHD）は、予防や治療の技術的な進歩がなされた現在でも日常生活活動度の低下を招く原因となり、その後死につながることもある。GVHD の発症のメカニズムをより深く理解し新たな予防法や治療法を開発するためには、より臨床に即した実験動物モデルが必要である。現在の我々の GVHD の免疫応答に関する知識は、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）もしくは副組織適合抗原が不適合の骨髄移植のモデルマウスに基づいている。これらのモデルマウスでは、抗ヒトモノクローナル抗体や養子免疫療法などのヒト細胞を特異的に標的とする治療法の安全性と有効性を評価することは不可能である。この問題を解決するために高度免疫不全マウスにヒト細胞を移植した異種 GVHD モデルが開発された。しかし、このモデルにおける GVHD の発症に関与する T 細胞のメカニズムの解明は不十分であり、また、ドナーの造血系抗原提示細胞（APC）、ホストの造血系ならびに非造血系 APC の役割に関する調査も不十分である。本研究の目的は異種 GVHD におけるヒト T 細胞の活性化および増殖のメカニズムと APC による免疫反応を調べる事である。

2 研究方法

細胞

ヒト末梢血単核球（hPBMC）を採取するためにインフォームド・コンセントが得られた当研究室、本学の附属病院の医師ならびに本学の医学部学生健康な成人ボランティアから採血を行った。末梢血（PB）から hPBMC を密度勾配遠心分離により分離した。

磁気ビーズ法を用いて hPBMC よりヒト CD4 陽性およびヒト CD8 陽性 T 細胞、ナチュラルキラー細胞（NK）細胞および APC を単離した。また、 γ δ T 細胞は hPBMC をヒト IL-2 とゾレドロネートを用いて培養した後、磁気ビーズ法で単離した。樹状細胞（DC）はマウスの骨髄単核球をヒト組換え f1t3 リガンドを加えた培地で成熟樹状細胞に分化誘導させてリポポリサッカライドを用いて活性化させた後、磁気ビーズ法を用いて単離した。

細胞分裂分析のために、carboxyfluorescein succinimidyl ester（CFSE）を用いて細胞質を蛍光染色した。

免疫不全マウス

メスの NOD/Shi-*scid*-IL2rg^{null} (NOG) マウスおよび NOG-IA β , β 2m のダブルノックアウト (MHC^{-/-}) マウスは購入後本学の動物施設で飼育した。マウスは少なくとも 1 週間施設に順応させた後、7 から 9 週齢で実験に使用した。

異種 GVHD モデル

NOG マウスへヒトリンパ球を静脈内または腹腔内投与で移植して作成した。放射線の全身照射 (TBI) を前処置として実施した実験では、ヒトリンパ球の移植の 4 時間前にセシウム 137 を線源とする照射器を用いて 250 cGy をマウスに実施した。移植後はマウスを毎日観察し、移植後 84 日目までの間、週に 3 回体重を測定し GVHD スコアを採点した。GVHD スコアは GVHD の重症度を評価するもので、体重減少、活動、皮膚、毛並みおよび姿勢を点数化し、スコアの上昇と GVHD の重症度が正の相関を示す。

統計分析

全ての統計解析は EZR を用いて行った。Kaplan-Meier 法により生存率を比較した。GVHD スコアおよび移植時からの体重の推移を repeated measures ANOVA を用いて評価した。

3 研究成果

CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞のそれぞれが単独で致死的な GVHD を引き起こす能力を有しており、既存の報告と同等の生存期間や生存率が認められた。CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞を移植したマウスを比較すると CD4 陽性 T 細胞を移植したマウスでより早期により重症な GVHD が発症することが確認できた。また、NK および γ δ T 細胞は単独では GVHD の発症には関与しない事を証明した。静脈内投与で移植すると腹腔内投与によるものと比較して生存期間が短縮し、生存率が低下する傾向となった。しかし、病理組織学的検査では T 細胞の臓器分布に違いは認められず、投与経路の違いは細胞浸潤に影響を与えない事を示した。NK および γ δ T 細胞の単独接種における病理組織学的検査では生着していないことを確認した。

移植片から APC を除去して移植した場合と APC を除去せず移植した場合とを比較したが GVHD の発症に違いは認められず、ドナーの APC の有無は発症に影響を与えないことを示した。次にホストが MHC^{-/-}NOG と MHC^{+/+}NOG である場合の GVHD の発症の違いを調査し、発症には MHC の存在が重要であることを示した。更に、MHC^{-/-}NOG と MHC^{+/+}NOG を用いて骨髄キメラマウスを作成し、CD4 陽性 T 細胞による GVHD の発症においては非造血系ではなく造血系の APC が重要な役割を果たすことも示した。

CD4 陽性 T 細胞は著明な炎症性サイトカイン産生に加えて、CD8 陽性 T 細胞の活性化および増殖を補助することを示した。それに対して CD8 陽性 T 細胞は炎症性サイトカインの産生はほぼ認められなかった。

移植後早期の CD4 陽性ナイーブ T 細胞の分化と増殖の大部分はホストの MHC の有無とは独立して起こる自律性の分化と増殖であることを示した。自律性に分化したメモリー T 細胞は細胞内インターフェロンガンマおよび Bcl-2 の発現が低いことが観察され、MHC を介した抗原反応により分化したメモリー T 細胞と比べて活性化が劣ることを示した。

4 考察

このモデルマウスは CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞が関与する獲得免疫で発症する。CD4 陽性 T 細胞による GVHD の発症には造血系 APC 表面上の MHC クラス II 分子が起点となり、その後には産生される炎症性サイトカインが関与している事が考えられた。CD8 陽性 T 細胞の場合にはサイトカインの関与はなく、造血系 APC 表面上の MHC クラス I 分子が起点となるが、その後の活性化や増殖には CD4 陽性 T 細胞の補助が重要である事が示唆された。ドナーの APC は GVHD の発症や増悪に関与せず、また、GVHD の発症にはホストの MHC も必要であることが実証されたため、GVHD の発症や増悪には MHC が発現したホストの APC が重要であると考えられた。更に、MHC^{-/-}NOG と MHC^{+/+}NOG を用いた骨髄キメラマウスの実験結果も含めると、GVHD の起点となる CD4 陽性 T 細胞の活性化はホストの造血系 APC 表面上の MHC の認識を介した抗原反応であると結論付けた。

移植後早期の肺と脾臓における CD4 陽性ナイーブ T 細胞の分化は MHC の有無に関わらず分化が認められた。しかし、分化した T 細胞の活性化に着目すると活性化は MHC^{+/+}NOG の脾臓でのみ認められ、機能が異なった細胞と考えられた。T 細胞の分化には MHC 非依存性の経路も存在する事が推測された。肺における活性化の低い CD4 陽性メモリー T 細胞では細胞内 IFN- γ の産生が減少し、細胞内 Bcl-2 の発現が低いことから自律性分化、増殖を起こしていると考えられた。GVHD 発症早期の肺における CD4 陽性ナイーブ T 細胞のメモリー T 細胞への分化は APC による抗原反応を起こした結果ではなく、自律性増殖を起こした結果であると考えられる。

5 結論

私たちの知見は異種移植 GVHD モデルマウスにおけるヒト T 細胞の免疫応答をより深く理解するのに有用であり、その免疫応答はヒトの造血幹細胞移植における GVHD の発症のメカニズムと類似している部分が多くあると考えられ、GVHD の予防および治療法の開発に貢献できると考える。

論文審査の結果の要旨

移植片対宿主病 (GVHD) は造血幹細胞移植後の重篤な合併症の1つであり、分子メカニズムに立脚した有効な治療法の開発が期待されている。本研究において申請者らは、高度免疫不全マウスにヒト免疫細胞を移植する系を用いて、GVHD に関与する免疫応答を解析した。

純化したヒト細胞を放射線照射した NOG マウスに移植し、生存期間と GVHD スコアで定量的に評価を行った。CD4⁺Tリンパ球と CD8⁺Tリンパ球を移植すると早期に致死的な GVHD が誘導されたが、NK および $\gamma\delta$ T 細胞では起こらなかった。MHC^{+/+}NOG マウスへの移植では GVHD は軽症であったことから、MHC 制御が重要と考えられた。さらに MHC^{+/+}NOG マウスの骨髄細胞を移植した NOG マウスでも GVHD が軽症であったことから、ホストの造血系 APC による抗原提示が関与すると考えられた。

本研究で開発されたモデルは、ヒトの造血幹細胞移植とくに HLA 半合致移植に伴う GVHD を再現していると考えられ、その予防や新規治療法の開発に役立つことが期待される。一方で標的臓器の違いなどの問題点もあり、さらなる研究が必要と考えられた。総合的には学位論文として十分な質を有していると考えられ、細部の修正をもって合格とした。

最終試験の結果の要旨

申請者はほぼ学位論文のとおりにより発表を行った。発表は明快で、時間も厳守された。内容の骨子は「論文審査の結果」にまとめたとおりである。

審査員からは、これまでの報告と比較しての新規性・ヒトの GVHD を正確に再現しているかどうかなど研究の限界・今後の方向性などに関する質問およびコメントが出された。

申請者はいずれの質問に対しても的確に返答し、有意義な discussion が行われた。発表および質疑応答から、申請者が研究者として十分な資質・能力を有することは明らかで、医学博士号を受けるに値すると審査員全員が判断、最終試験に合格とした。