

学位論文題名

ドナー由来 TNF- α による
Th1 依存的 GVHD エフェクター細胞誘導抑制機構の解明

学位論文内容の要旨

同種造血幹細胞移植は造血器悪性腫瘍や造血不全などの患者に対し有効な根治的治療法の一つである。近年、様々な支持療法の発達により、移植成績は徐々に改善しているが、Graft-versus-host disease (以下 GVHD と略す) は依然として移植後の死亡の主因の一つとなっている。強力な GVH 反応は Major あるいは Minor 抗原の相違を認識した活性化ドナー細胞により引き起こされる。しかしながらサイトカイン調節機構の破綻や、移植前処置による宿主の臓器障害もまた GVH 反応の誘導の増強に関与していることが示されている。なかでも tumor necrosis factor α (以下 TNF- α と略す) は GVHD の病態に深く関与していることが理解されてきている。すなわち TNF- α は宿主の臓器に対する直接傷害に加え Major histocompatible (以下 MHC と略す) 抗原や接着分子の発現を増強する。さらに TNF- α はオートクリン T 細胞増殖促進因子としても働きうるため、T 細胞クローンの増殖が促進される。またマウスモデルにおいては、抗 TNF- α 抗体は GVHD の重症度を低下させることが知られている。過去の報告では、ホストの p55 TNF- α 受容体は早期の GVHD を制御しているとされており、またドナーの p55 TNF- α 受容体はアロ抗原反応性 T 細胞活性化に重要な役割を果たしていることも報告されている。以上のことよりホスト由来の TNF- α はアロ抗原に対する T 細胞応答及び急性 GVHD の重症度を増悪させる働きを有すると考えられる。一方、ドナー由来の TNF- α がどのような役割を果たしているかは未だ明確にされていなかった。本研究において、私は GVHD マウスモデルを用いて *in vivo* でのアロ抗原に対する T 細胞応答において、ドナー由来の TNF- α がいかなる役割を果たしているかを検討した。

1. ドナー細胞の生着。B6xDBA/2 F1 (以下 BDF1 と略す) マウスに C57BL/6 (以下 B6 と略す) マウス脾細胞を移入することによって GVHD マウスを作成した。本 GVHD マウスにおけるキメリズムをホスト由来の H-2K^d ハプロタイプをマーカーとしてフローサイトメトリーで検討した。したがって、H-2K^d 陽性細胞はホスト由来であり、H-2K^d 陰性細胞はドナー由来を意味する。その結果、急性 GVHD 誘導 2 週間後には野生型 B6 マウスおよび TNF- α ノックアウト B6 マウスの脾細胞を移入されたホストいずれにおいても脾腫とドナー T 細胞比率の増加が見られたが、TNF- α ノックアウト B6 細胞を移入されたホストの脾細胞中の B220 陽性細胞は、野生型 B6 をドナーとしたホストと比較し早期に減少していた。また CD4 陽性細胞や CD8 陽性細胞は TNF- α ノックアウト B6 をドナーとした際に、より早期の増殖を認めた。

2. ホスト細胞に対する細胞傷害性 T 細胞の誘導。増殖した細胞のホストに対する特異的な細胞傷害活性を測定した。TNF- α ノックアウト B6 をドナーとしたホストは、野生型 B6 をドナーとした群に比べ H-2K^d 抗原に対する細胞傷害性をより強く有していた。また全てのホストにおいてドナー型である H-2K^b に対する細胞傷害性の増強は認めなかった。CD8 陽性 T 細胞分画を分離し測定ところ、ホストに対する細胞傷害活性は濃縮され、ホストに対する特異的な細胞傷害活性は主に CD8 陽性 T 細胞によるものと考えられた。

3. GVHD マウスにおける血清 IFN- γ レベル. これまでの報告では IFN- γ などの Th1 サイトカインは、急性 GVHD の誘導に重要な役割を果たしていると考えられているためそれぞれの宿主における血清 IFN- γ を測定した. GVHD マウスにおいては day4 には IFN- γ の上昇を認め、day6 にピークを示した. 特に TNF- α ノックアウトをドナーにした群では、野生型 B6 をドナーとした群に比し有意に高い IFN- γ の上昇を認めた. また IFN- γ ノックアウトをドナーとした宿主や対照群では血清 IFN- γ の上昇は認めなかった. 血清中に上昇した IFN- γ がいかなる細胞から産生されているかを検討するため、宿主脾細胞の細胞内サイトカイン産生能を検討した. 野生型 B6 をドナーとした群に比べ、TNF- α ノックアウトをドナーとした群で IFN- γ 産生を伴う CD4 および CD8 の増加を認め、特に CD8 で顕著であった. これらの結果より血清 IFN- γ の上昇は主にドナー由来 CD8 に由来し、それに付随して活性化された宿主 T 細胞にも IFN- γ の産生が認められることが示された.

4. エンドトキシン投与に対する血清 TNF- α の上昇. GVHD マウスにおけるエンドトキシンに対する感受性を検討するため、GVHD を誘導した宿主に対し LPS を投与し、TNF- α の産生能を検討した. 正常コントロールマウスに 10 μ g の LPS を投与しても、血清中の TNF- α は測定感度以下であった. LPS を投与しない場合、野生型 B6 および TNF- α ノックアウト B6 いずれをドナーにした宿主においても、移植後 6 日後、8 日後の血清中の TNF- α は測定感度以下であったが、移植後 10 日後に LPS を投与することにより、著明な TNF- α の上昇が起こった. 特筆すべきことに、この現象はむしろ TNF- α ノックアウト B6 をドナーとした群に顕著に見られた. これらの結果から TNF- α ノックアウト B6 をドナーとした宿主においてはエンドトキシンに対する感受性の亢進がみられ、その際増強する TNF- α 産生はホストの残存細胞に由来していると考えられた.

5. TNF- α ノックアウトドナーによる GVH 反応増強の IFN- γ 依存性. IFN- γ は GVHD の誘導におけるアロ抗原反応性 T 細胞の活性化に重要な役割を有することが報告されているが、我々は TNF- α ノックアウトをドナーにすることにより惹起される GVH 反応の増強が、ドナーの IFN- γ に依存性であるかを検討した. 野生型 B6 及び TNF- α ノックアウト B6 に加え TNF- α 、IFN- γ の両者を欠損するダブルノックアウトマウスを作成し、これをドナーとして用いた. このダブルノックアウトマウスをドナーとして用いた場合には移植後 7 日目に見られたホストの血清中の IFN- γ の上昇や 10 日目に LPS を投与した際の TNF- α の上昇はほとんど見られなかった. 次に、CTL 誘導におけるドナー由来の IFN- γ の役割を検討するため H-2 がホストタイプである P815 に対する細胞障害性を検討した. 移植後 7 日目にホストの脾細胞を採取し、BDF1 脾細胞と共培養を行ったところ培養上清中の IFN- γ レベルは野生型 B6 をドナーとした群に比べ、TNF- α ノックアウト B6 をドナーとした群において著しい上昇を認め (結果は示さず)、共培養 4 日後の P815 細胞に対する細胞傷害活性も TNF- α ノックアウト B6 をドナーとした群で増強していた. しかし TNF- α 、IFN- γ 両者を欠損したダブルノックアウト B6 をドナーとして用いた群では、培養上清中の IFN- γ の上昇は検出されず、TNF- α ノックアウト B6 をドナーとした群に見られた P815 細胞に対する細胞傷害活性の著明な上昇もダブルノックアウトをドナーとした群では低下していた.

以上のように、本研究において私は、親系マウス脾細胞を F1 マウスに移入する急性 GVHD マウスモデルを用いて、TNF- α ノックアウトドナー細胞は、移植後早期の Th1 依存性の CTL の誘導を促進すること、すなわちドナー由来の TNF- α は急性 GVH 反応に対し抑制的に働きうることをはじめて示した. これらの知見により同種造血細胞移植の際の GVHD の危険因子を持つ症例の同定において、ドナーのサイトカイン産生に着目した異なったアプローチが考慮されうるという点で重要な新知見であると考えられた.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 西 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

ドナー由来 TNF- α による

Th1 依存的 GVHD エフェクター細胞誘導抑制機構の解明

急性 GVHD の発症要因のひとつに炎症性サイトカインが深く関与していることが知られており、中でもレシピエント由来の TNF- α は移植前処置に関連して産生され、アロ抗原反応性 T 細胞の誘導の増強に重要な役割を果たしていることが、明らかにされてきている。しかし、ドナー由来の TNF- α の役割に関してはこれまで明確にされていない。本研究では、TNF- $\alpha^{-/-}$ マウスをドナーに用いた急性 GVHD マウスモデルにおいてドナー由来の TNF- α が GVHD エフェクター細胞誘導においていかなる役割を果たしているかを明らかにすることを目的とした。

対象と方法としては、野生型および TNF- $\alpha^{-/-}$ C57BL/6 マウスの脾細胞 5×10^7 個を BDF1 マウスに尾静注することにより誘導し、比較検討した。その結果 TNF- $\alpha^{-/-}$ B6 をドナーに用いたレシピエントでは移植後 14 日後には野生型 B6 をドナーとしたレシピエントと比較し早期の脾細胞の減少を認め、レシピエントタイプの P815 に対する細胞障害性も増強していた。移植後早期のレシピエントの血清 IFN- γ は TNF- $\alpha^{-/-}$ B6 をドナーとしたレシピエントで著明な上昇を認め、その産生細胞は主にドナー由来の CD8 陽性 T 細胞であることが明らかとなった。また LPS 刺激に対するレシピエントの TNF- α 産生能は TNF- $\alpha^{-/-}$ B6 をドナーとしたレシピエントにおいてむしろ著明に亢進していた。さらに TNF- α と IFN- γ のダブルノックアウト B6 をドナーに用いると TNF- $\alpha^{-/-}$ B6 を用いた際に認められた血清 IFN- γ の上昇、および LPS 刺激に対するレシピエントの TNF- α 産生能の増強はいずれも著明に低下した。また移植後 7 日後のレシピエント脾細胞を BDF1 脾細胞とリンパ球混合培養を行い再刺激した後、レシピエントタイプの P815 に対する細胞障害性を検討した結果、TNF- $\alpha^{-/-}$ をドナーにしたレシピエントの脾細胞では細胞障害性の増強が認められたが、ダブルノックアウトをドナーとしたレシピエントでは野生型 B6 をドナーとした場合に比べても細胞障害性は低下していた。以上より本論文において、ドナー由来の TNF- α の欠損がドナー由来の IFN- γ の産生を増強することにより GVH 反応を増強していることから、ドナー由来の TNF- α はドナーの IFN- γ の産生を制御することを介して GVHD エフェクター細胞誘導に対しむしろ抑制的に働いていることが示された。

質疑応答においては副査小野江教授から、LPS 刺激をしない際のレシピエントの TNF- α レベルについて、ドナー由来および宿主由来 TNF- α の働きが異なる理由、さらに宿主の TNF- α はどのような細胞群より産生されているか、および NK 細胞がどのような関与を有しているかにつき質問があった。次いで小池主査より今回の実験系が使用する種により違いがあるかにつき、ドナー由来の TNF- α の役割とレシピエント由来の TNF- α の役割が相反する理由、さらにドナーに LPS 刺激をした際の反応および本研究の成果による臨床応用への可能性につき質問があった。次いで西村副査より TNF- α を用いた GVHD の制御および予測における方向性と今後の展望についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は概ね適切に回答した。

本論文における検討から、今後はドナーの TNF- α の産生能に基づいた急性 GVHD の予測における臨床応用や、ドナーの TNF- α 産生能が GVHD の発症に与える新たな作用の解明が期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。