

学位論文題名

Monokine Induced by IFN- γ Is a Dominant Factor
Directing T cells into Murine Cardiac Allografts
During Acute Rejection

(monokine induced by IFN- γ は急性拒絶において
マウス心臓アロ移植片内にT細胞を誘導する主たる因子である)

学位論文内容の要旨

ケモカインとは白血球遊走作用を持つサイトカイン群の総称であり、様々な炎症の場に白血球を誘導する。従って、ケモカインの作用を拮抗することにより白血球が炎症の場に入場するのを制御することで治療的な応用が期待される。臓器疾患の終末病態においては現在置換療法として臓器移植が普及しつつある。しかし、免疫系が本来的に有する非自己を排斥する機構が存在するため、他個体からの臓器移植を成立させるためには強力な免疫抑制が必要となっている。この排斥機構、つまり拒絶反応においてはT細胞が主たる役割を果たしている。T細胞は二次リンパ組織において、抗原提示細胞により移植片のアロ抗原の提示を受け、活性化、クローン増殖し、末梢循環中に放出される。しかし、これだけではT細胞は炎症の場、つまり移植片に入場することはできず、移植片において接着分子、そしてケモカインが発現されていることが必要であると考えられる。ケモカインを拮抗することを治療応用するためには、まず炎症の場において、どのケモカインがどの白血球に対し、どのように時間的、空間的に作用するかを解明する必要がある。そこで、本研究においては、活性化T細胞に発現される受容体CXCR3を介して特異的に作用するケモカインであるmonokine induced by IFN- γ (Mig)とinterferon-inducible protein-10 (IP-10)の移植片急性拒絶における役割を、マウス異所性心移植モデルを用いて研究した。

マウスはA/J (ハプロタイプH-2a)をドナーとし、C57BL/6 (H-2b)をレシピエントとするMHC完全ミスマッチの組み合わせで心移植を行った。また、同系移植としてはC57BL/6をドナー、レシピエント双方に用いた。移植心停止を以て拒絶完了とした。このモデルではA/J心は中央値8日で拒絶され、同系のC57BL/6移植心は100日以上生着した。

まずこのモデルを用いて、移植心を移植後6時間、24時間、48時間、3日目、4日目、7日目に移植心を摘出し、RNA、タンパクを抽出した。RNase protection assayを用いて、Mig, IP-10, 他RANTES (regulated on activation normal T expressed and secreted), MIP-1 α (macrophage inflammatory protein), MIP-1 β , MCP-1 (monocyte chemotactic protein), Lymphotactin, そして受容体CXCR3, CCR1, CCR2, CCR5の遺伝子発現を調べた。発現レベルはGAPDH発現量で標準化した。蛋白発現はMig及びIP-10に関し、ELISA法を用いて調べた。その結果、活性化T細胞を誘導するケモカインであるMig, IP-10は同系移植片においてはほとんど発現が見られないものの、アロ

移植片においては移植後48時間から著明に発現が観察され、その後移植後7日目まで急増することが分かった。特にMigはIP-10を含めた他のケモカインに比し、強く発現していた。これに遅れる形でMigの受容体であるCXCR3の発現が移植後4日目より見られ、7日目には増強した。蛋白レベルでもMigのIP-10に対する優位は同様であった。ここまでの小括として、調べたケモカインの中では、Migがアロ特異的に、そして最も強く発現しており、拒絶の進行とともにその発現が増強した。それにつれてT細胞上に発現される受容体CXCR3のアロ移植心内での発現が増強し、Migにより誘導されたCXCR3陽性T細胞が移植心内に進入してきたことが示唆された。

次に我々はマウスMigに特異的なウサギ抗血清を作成した。この抗血清の特異性はWestern Blot法で他のCXCケモカインに交叉反応を示さないこと、また、活性化T細胞のリコンビナントMigへの遊走をin vitroにおいて抑制し、リコンビナントIP-10への遊走は阻害しないことで確認した。同様にIP-10に対する抗血清も作成した。A/J心を移植したC57BL/6マウスにこの抗血清を術当日、2日目、4日目、以後3日ごとに250 μ L腹腔内投与することで生体内でのMigまたはIP-10の活性を中和した。対照群には正常ウサギ血清を同量投与した。その結果、対照群が8日で移植心を拒絶するのに対し、抗Mig血清投与群は最大19日までの生着延長が得られた。抗IP-10血清投与群は2-3日程度の生着延長しか得られなかった。Mig中和群と対照群において、移植後7日目に移植心を摘出し、組織像を比較した。HE染色では対照群で強い単核球浸潤が見られたのに対し、Mig中和群では浸潤細胞は明らかに少なかった。CD4及びCD8を免疫染色し比較すると、両群ともCD8陽性細胞がCD4陽性細胞に比し多かったが、Mig中和群では対照群に比し、有意にCD8及びCD4陽性細胞数が少なかった。以上により、抗血清によるMig中和によって、移植心へのCD4及びCD8陽性細胞の浸潤が減少し、それに伴い移植心の生着期間が延長することが示された。

ただ、移植心のT細胞浸潤が減少した理由として、リンパ球の移植心への誘導が阻害されたのではなく、T細胞の活性化が阻害された可能性は否定できない。そこで、両群レシピエントより移植後8日目に脾細胞を採取し、mitomycinC処理したドナー脾細胞に対するMLRを検証した。その結果、両群間にドナーに対するアロ反応性の差はなく、抗Mig血清の投与はレシピエントT細胞の活性化に影響を与えていないことが分かり、前記の生着延長は移植心内へのT細胞誘導が阻害されたためであると証明した。

Mig中和によりA/J移植心の生着期間が延長するものの、結局は拒絶されるので、この際に拒絶に関与する細胞を特定するため、移植後17-19日目の心停止寸前の移植心を摘出してRNAを抽出し、この移植心内のケモカイン及びその受容体発現を移植後7日目の対照群の移植心と比較検討した。その結果、Mig中和群では予想通りMig・IP-10の発現は対照群と同等に見られるのに対し、CXCR3の発現は低かった。しかし、Mig中和群でもCCR5の発現は対照群と同等に観察され、Mig中和後の拒絶にはCCR5そしてそのligandであるRANTESやMIP-1 α などが代償していると考えられた。

最後に、移植心内のMigの由来を調べるため、in situ hybridization法を用い、移植後3日目の移植心内のMig発現の空間的分布を観察した。その結果、血管内皮細胞、及びたくさんの単核球、顆粒球にその発現が見られた。移植後3日目ではリンパ球の浸潤は少ないため、単核球はマクロファージと考えられた。さらに強拡大で観察すると、血管内皮細胞に付着した単核球や顆粒球にはMigの発現が見られるが、血管内に浮遊しているものにはその発現が見られなかった。

以上より、マウス心移植モデルにおいて、移植心の急性拒絶においてMigは活性化T細胞を移植心内へ誘導する主要な因子であることが示された。しかしながら、Migの中和により拒絶を遅延させることができたものの、免疫系は別経路により移植心を拒絶できることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 柳 知 彦

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 吉 木 敬

学 位 論 文 題 名

Monokine Induced by IFN- γ Is a Dominant Factor Directing T cells into Murine Cardiac Allografts During Acute Rejection

(monokine induced by IFN- γ は急性拒絶において
マウス心臓アロ移植片内にT細胞を誘導する主たる因子である)

マウス異所性心移植モデルを用いた、活性化T細胞に発現する受容体CXCR3を介して作用するMigとIP-10の移植片急性拒絶での役割に関する研究である。移植心にMig, IP-10の発現は移植後48時間から観察され、その後拒絶が完了する移植後7日目まで急増した。特にMigはIP-10を含めた他のケモカインに比し強く発現していた。Migは血管内皮細胞、浸潤マクロファージ、好中球により産生されることが示された。レシピエントにMigに対する抗血清を投与すると、移植心生着期間が6 - 12日間延長した。移植後8日目のドナーに対する反応性がMig中和に関わらず同等であり、移植後7日目ではMigの中和により移植心へのT細胞の浸潤が減少していた。以上より、Mig中和は移植心へのT細胞の進入を抑制し、移植心の生着期間を延長したことが示された。Migを中和しても移植心が遅れて拒絶される別のメカニズムには、RANTESなどのケモカインとその受容体であるCCR5が主に関わっていることが示された。

共同研究者の報告と本研究の結果から、移植手術や虚血障害に刺激され、好中球、マクロファージが初期に移植片内に炎症の場を形成し、ここにドナー抗原に対し特異性を持った記憶T細胞が到達し、Migを主とするケモカイン発現とT細胞誘導の増幅が始まるという仮説が提示された。本研究の後、記憶T細胞がMig発現の開始点となることを示した研究、また、慢性拒絶におけるMigの役割に関する研究を行ったことが紹介された。さらに現在、臨床応用を目指し、CXCR3及びCCR5拮抗剤をcyclosporinと併用し、初期免疫抑

制プロトコールの開発のための動物実験が進行中であること、ケモカイン発現がT細胞浸潤に先行することから、腎移植患者の尿中ケモカイン発現を測定し、拒絶反応の早期・非侵襲的診断方法を研究開発中であることが紹介された。

この学位論文の内容に対し、吉木敬教授からは将来へ継続する意気込みの感じられる研究とのコメントがあり、1) Migが早期から作用しているか、2) 他臓器で文献的に Mig を拒絶のマーカーとした報告があるか、3) 他の免疫抑制剤との併用や拮抗剤の実現の可能性は、4) deoxyspergualin を投与すると T 細胞は移植片に浸潤するが組織障害が起きない事実に意見があるか、との質問に対し、1) Mig は移植後 4 8 時間から発現し、T 細胞の浸潤と更なる Mig の発現の連鎖反応が増幅する、2) マウス皮膚移植で Mig 発現の報告があること、心移植患者の心内膜生検検体に急性拒絶のグレードと相関して Mig 等のケモカイン発現を認めること、3) 現在進行中の実験で有望な結果が出てきている、既存の非特異的免疫抑制療法を減量できる可能性がある、ケモカイン受容体拮抗薬が開発されている、4) ケモカインシステムに大きな影響はなく T 細胞の細胞障害機構への影響ではないかとの回答があった。次に上出利光教授からは、きれいな研究であり、ケモカインと細胞浸潤をカスケードとして考えている点が評価されるとのコメントがあった。1) 所属リンパ組織での受容体発現に関して、2) 樹状細胞に関して、3) MHC クラス I や II のみのミスマッチに関して質問があり、それぞれ、1) 末梢血、脾臓での受容体発現は移植心ケモカイン発現にはほぼ並行して上昇するが、拒絶完了近くでは細胞が動員されるので、移植片内ほど急峻なピークを作らない、2) 細胞数の少なさから染色による検出が困難、3) クラス I ミスマッチは皮膚移植では同様に Mig の発現を認め、クラス II のみのミスマッチは心臓は慢性に拒絶され、Mig も緩慢な変化を示すとの回答があった。小柳知彦教授からは、1) 腎移植でも同様なのか、2) ケモカイン抑制と副刺激路遮断のどちらが今後主流になるかとの質問があり、1) 進行中の研究で、急性拒絶中の腎移植患者の尿に Mig 発現を認めることからマウス心移植と同様であると推測される、2) 寛容導入が期待される副刺激路遮断が主流になるであろうが、一方でケモカインを標的とした治療が助けとなる症例も将来もいるであろうとの回答があった。

この論文は、移植片拒絶反応における細胞誘導・ケモカイン機構の解明に大きく貢献していることで高く評価され、今後ケモカインを標的とした治療やマーカーとして拒絶の診断といった臨床応用の実現が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院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。