

学 位 論 文 題 名

サブクリニカルレベルの GVHR の
宿主免疫機構再構築に与える影響

学位論文内容の要旨

（緒言）

近年、骨髄移植は白血病に代表される難治性造血器疾患等の根治的治療として確立しつつある。これまで骨髄移植に伴う難問の一つとされてきたGVHRは、移植細胞対白血病効果、ドナー骨髄細胞の生着率の向上等の効用が認識され、このGVHRをどのようにコントロール、応用していくかに焦点が移ってきている。これまでの実験で、抗Thy1抗体で単独処理したB10(H-2^b、Mls-1^b)ドナー骨髄細胞を移植された、白血病自然発症モデルAKRマウス(H-2^k、Mls-1^k)では、早期よりの造血組織、免疫組織のドナー側細胞への完全置換が認められ、このマウスはGVHRの臨床所見を示さぬまま長期生存し、白血病の発生も認められなかった。更に、このキメラより得たT細胞は、ドナー抗原、レシピエント抗原両者に寛容であった。骨髄細胞と共に脾臓T細胞を移植して、マイルドなGVHRを誘導したキメラにおいても同様の所見が認められた。しかし、その後、このようなキメラでは、マイナーなGVHRが誘導され、そのために、自己寛容メカニズムが障害され、胸腺内において自己(Mls-1^k)反応性T細胞クローン(Vβ6⁺T細胞)が消去されることなく、末梢に出現することが判明した。本論文では、これらの骨髄移植法を用いてサブクリニカルなレベルのGVHRが誘導されたと考えられる骨髄キメラマウスを作製し、マイナーなGVHRが宿主免疫機構の再構築にどのような影響を与えるかを、更に詳細に検討したので報告する。

（材料と方法）

1. 骨髄移植：11Gy全身照射したレシピエントマウス(AKR)に、抗Thy1.2抗体とウサギ補体 (C)で処理し、完全にT細胞を除去 (TCD)した 2×10^7 のドナー(B10)骨髄を静注し、コントロールキメラ (cont.[B10→AKR])とした。また、サブクリニカルなレベルのGVHRを誘導するために、11Gy照射AKRマウスに、抗Thy1抗体単独処理したB10骨髄細胞を静注して作製したキメラをGVHR[B10→AKR]とした。また、一部の実験では、ドナーをB10.BR(H-2^k、Mls-1^b)とするH-2適合キメラを作製した。二度骨髄移植を施行する場合（ダブルキメラ）は、上述の様にコントロールキメラ、GVHRキメラを作製し、3週後11Gy再照射しTCD-B10骨髄細胞を再度移植し、各々[B10→cont.[B10

→AKR]]、[B10→GVHR[B10→AKR]]と示した。

2.細胞精製：各脾臓精製T細胞分画は、ナイロンウールカラム通過後の脾臓T細胞を抗CD4抗体、または抗CD8抗体と抗ラットκ鎖Ig抗体とCで処理した後、抗ラット・マウスIg抗体をコートしたM-450ダイナビーズで更に精製して、得た。Vβ6⁺T細胞除去CD8⁺T細胞は、抗CD4抗体、抗Vβ6TCR抗体、抗ラットκ鎖Ig抗体とCで処理し、その後、更にダイナビーズで処理して、得た。

3.FACS解析：胸腺、脾臓細胞は、抗CD3ε鎖抗体、抗Vβ6TCR抗体、抗Vβ8TCR抗体で染色後、ビオチン化抗マウス・ラットIg抗体で染色、更にマウス・ラットIgを加え、PE標識抗CD4、FITC標識抗CD8、Duochromeで染色した。リンパ節細胞は、ビオチン化抗マウス・ラットIg抗体で反応させた後、抗Thy1.1抗体、抗Thy1.2抗体、抗CD3ε鎖抗体、抗Vβ6TCR抗体、抗Vβ8TCR抗体を加え、更にFITC標識抗マウス・ラットIg抗体、及びPE-Streptavidineで染色し、解析した。

(結果と考察)

(1)本実験の方法で作製したGVHRキメラは、コントロールキメラと同様に、臨床的な、GVHRの所見を示すことなく長期生存し、移植早期よりほぼ完璧な、ドナーキメリズムを有していた。

(2)GVHRキメラでは、レシピエント抗原(Mls-1^{*})特異的なVβ6⁺T細胞のクローン消去が障害されていた。一方、胸腺からのドナー由来Vβ6⁺T細胞の除去の程度は、残存するレシピエントAKR T細胞の比率と正の相関を示した。トレロゲンのMls-1^{*}分子を産生するのはAKR T細胞であるという報告を考慮に入れると、GVHRキメラにおけるVβ6⁺T細胞のクローン消去の障害は、移植早期よりほぼ完全にレシピエントT細胞が除去されることに起因する事が示唆された。

(3)GVHRキメラでは、コントロールキメラと比較し、同程度の胸腺、脾臓の再構築が認められたが、リンパ節の再構築は、特異的に障害されていた。同様に、[B10→GVHR[B10→AKR]]と[B10→cont.[B10→AKR]]のダブルキメラ間で、胸腺、脾臓の細胞数には差が認められなかったが、リンパ節の細胞数は、[B10→GVHR[B10→AKR]]で、有意に少なかった。従って、GVHRキメラのリンパ節再構築障害は、リンパ球自体の異常ではなく、リンパ球のホーミングに関わるリンパ節組織の障害に由来することが示唆された。

(4)CD4⁺、CD8⁺T細胞または両者をTCD骨髓細胞と共に移植する実験より、ドナーキメリズムを促進し、リンパ節の再構築障害とVβ6⁺T細胞のクローン消去の異常をもたらすT細胞分画は、このシステムでは主としてCD8⁺T細胞であることが示された。

(5)以前の実験より、GVHRキメラでは、移植後早期にリンパ組織内でドナーVβ6⁺T細胞がレシピエント抗原に反応性に増殖し、ほぼ半数がVβ6⁺T細胞となることが判明している。従って、この増殖したVβ6⁺T細胞が、サブクリニカルなレベルのGVHRを誘導し、上述のような免疫再構築障害をもたらすことが予測された。しかし、Vβ6⁺T細胞を除去したCD8⁺T細胞も、ほぼ未処理の

CD8⁺T細胞と同様な免疫再構築障害をもたらしたことから、Vβ6⁺T細胞以外のドナーT細胞もサブクリニカルなレベルのGVHRを誘導する事が示された。(6)ドナーにB10.BRを用いて作製したGVHR[B10.BR→AKR]H-2適合キメラでは、GVHR[B10→AKR]で認められたようなレベルのGVHRは誘導されなかった。従って、[B10→AKR]キメラに認められるサブクリニカルなレベルのGVHRの誘導には、Mls-1以外にH-2分子の差が関与していると考えられた。さらに、(4)で示したように、CD8⁺T細胞が主としてドナーキメリズムを促進し、リンパ節の再構築障害とVβ6⁺T細胞のクローン消去の異常をもたらす事より、そのターゲット抗原はレシピエントのH-2クラスI分子であることが示唆された。

(結語)

骨髓キメラマウスを用い、サブクリニカルなレベルのGVHRが免疫機構の再構築に与える影響を解析し、ドナーCD8⁺T細胞が、レシピエントH-2クラスI抗原をターゲットとして反応を誘導すること、その結果、リンパ節再構築、レシピエント抗原(Mls-1^b)反応性Vβ6⁺T細胞のクローン消去の障害されることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保
副 査 教 授 小野江 和 則
副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

サブクリニカルレベルの GVHR の 宿主免疫機構再構築に与える影響

I、研究目的

これまで骨髄移植に伴う難問の一つとされてきたGVHRは、移植細胞対白血病効果 (GVL)、ドナー骨髄細胞の生着率の向上等の点で、その有効性が認識され、現在、このGVHRをどのようにコントロール、応用していくかに焦点がしぼられてきている。本論文では、サブクリニカルなレベルのGVHRが誘導されたと考えられる骨髄キメラマウスを作製し、マイナーなGVHRが宿主免疫機構の再構築にどのような影響を与えるかを検討した。

II、材料及び方法

1) 骨髄移植: 11Gy全身照射したレシピエントマウスAKR(H-2^K、Mls-1^a)に、抗Thy1.2抗体と補体で処理し、完全にT細胞を除去 (TCD)した 2×10^7 のドナーB10(H-2^b、Mls-1^b)骨髄を静注したコントロール[B10→AKR]、抗Thy1抗体単独処理した骨髄細胞を静注したGVHR[B10→AKR]を作製し、3、5、8週後に検索した。二度骨髄移植を施行する場合は、両キメラを作製し、3週後11Gy再照射しTCD-B10骨髄細胞を静注し、5週後に検索した。さらに、一部の実験では、ドナーをB10.BR(H-2^K、Mls-1^b)とするH-2適合キメラを作製した。

2) 細胞精製: ナイロンウールカラム通過後の脾臓T細胞を各種抗体 (抗CD4、抗CD8、抗V β 6、抗ラット κ 鎖Ig)、補体、ダイナビーズで分画して得た 1×10^5 のT細胞亜群をTCD骨髄細胞と共に移植し、5週後に検索した。

3) FACS解析: T細胞レセプターは、ビオチン化抗マウス・ラットIg抗体で染色後、抗CD3 ϵ 鎖、抗V β 6TCR、抗V β 8TCR抗体、次いでFITC標識抗マウス・ラットIg抗体、及びPE-Streptavidineで染色して検索した。T細胞のキメリズムは抗Thy1.1、抗Thy1.2抗体、及びFITC標識抗マウス・ラットIg抗体を用いて検索した。

III、結果及び考察

1) GVHR[B10→AKR]は、臨床的なGVHRの所見を示すことなく長期生存し、リンパ節の萎縮、レシピエント抗原(Mls-1^a)特異的なVβ6⁺T細胞の出現、ドナーキメリズムの促進が認められた。Vβ6⁺T細胞の除去の程度は、残存するAKR T細胞の比率と正の相関を示した。Mls-1^a分子を産生するのはAKR T細胞であるという報告を考慮にいれると、このクローン消去の障害は移植早期よりほぼ完全にレシピエントT細胞が除去されることに起因する事が示唆された。

2) GVHR[B10→AKR]に再度TCD-B10骨髄を移植しても、リンパ節の再構築は、コントロールキメラに比較し不十分であり、この障害は、リンパ球自体の異常ではなく、リンパ球のホーミングに関わるリンパ節組織の障害に由来することが示唆された。

3) GVHR[B10→AKR]におけるGVHRは、主としてCD8⁺T細胞により誘導された。さらに、Vβ6⁺T細胞を除去したCD8⁺T細胞にもGVHR誘導能が認められ、リンパ組織には、Vβ6⁺T細胞が、ドナー前駆細胞より出現したことより、Vβ6⁺T細胞以外のレシピエント反応性細胞が、末梢リンパ組織の再構築に影響を与えると同時にVβ6⁺T細胞を消去するメカニズムが障害されたものと考えられた。

4) H-2適合GVHR[B10.BR→AKR]キメラでは、GVHRは誘導されなかった。従って、[B10→AKR]キメラに認められるサブクリニカルなレベルのGVHRの誘導には、Mls-1以外にH-2分子の差が関与していると考えられた。また、3)よりそのターゲット抗原はレシピエントのH-2クラスI分子であることが示唆された。

IV、結語

骨髄キメラマウスを用い、サブクリニカルなレベルのGVHRが免疫機構の再構築に与える影響を検索し、ドナーCD8⁺T細胞が、レシピエントH-2クラスI抗原をターゲットとして反応を誘導すること、その結果、リンパ節再構築、レシピエント抗原(Mls-1^b)反応性Vβ6⁺T細胞のクローン消去の障害されることが明らかとなった。

以上より、本研究は博士(医学)の学位論文として妥当なものと判断される。