

学 位 論 文 題 名

Effects of non-major histocompatibility antigens
on acute graft-versus-host reaction after allogeneic
bone marrow transplantation

(異系骨髓移植後の急性 GVHR に対する非 MHC 抗原の影響)

学位論文内容の要旨

はじめに

臓器移植後の拒絶反応は、主としてホスト T 細胞の移植片に対する反応と考える事が出来る (host versus graft reaction)。これに対して、骨髓移植 (bone marrow transplantation、以下 BMT) 後の graft-versus-host reaction (GVHR) は、主として移植片に含まれるドナー T 細胞がホスト抗原を非自己と認識して起こる現象である。このように、通常の臓器移植による拒絶反応と BMT 後の GVHR は、反応の方向性は異なるが、いずれも T 細胞のアロ抗原に対する反応によって誘導される。GVHR の場合には、エフェクター細胞として働くのがドナー由来であるというのが重要な点で、ホスト抗原に対してドナー T 細胞がどのようなタイプの免疫応答を生ずるかが、GVHR 病態形成の決定要因となる。

また、BMT は現在造血系疾患、免疫不全症等の根治療法としての座を得ている。しかし、出生率の低下とともに同胞数が減少し、他人 (アロ) からの BMT の症例数が増加する傾向にある。従って BMT の合併症の一つ GVHR を考慮する際、主要組織適合複合 (major histocompatibility complex、以下 MHC) 抗原以外に、非 MHC 抗原の影響が新たな問題として浮上しつつある。

今回申請者らは、非 MHC 抗原、特にレトロウイルス由来内在性スーパー抗原の一つである minor lymphocyte stimulatory-1^a (Mls-1^a) 抗原が、BMT 後の急性 GVHR にどのような影響を及ぼすかを検討した。

方法

MHC 及び非 MHC 抗原が BMT 後の急性 GVHR にどのような影響を及ぼすかを調べるために、マウスの系で骨髓移植をおこなった。マウスは 6-8 週齢の雌マウスを用いた。骨髓キメラマウスを移植方法によって 2 種類作成した。一種は致死量放射線照射したホストマウス (ホスト) {AKR/J (H-2^k, Mls-1^a) または B10.BR (H-2^k, Mls-1^b)} に、T 細胞を除去したドナーマウス (ドナー) {B10.AQR (H-2^d, Mls-1^b) または B10.BR (H-2^k, Mls-1^b)} の骨髓細胞 (1×10^7 /マウス) を移植したコントロールキメラマウス、他は、同様に前処置したホストに T 細胞

を除去したドナー骨髄細胞 (1×10^7 /マウス) と、同じドナー脾臓 T 細胞 (1×10^5 /マウス) を同時に移植した GVHR キメラマウスである。以下キメラマウスを[ドナー→ホスト]の様に表記する。また、ドナー、ホストの組み合わせとしては、MHC クラス I 単独ミスマッチ[B10.AQR→B10.BR]、内在性スーパー抗原である Mls-1^a 抗原など非 MHC 抗原ミスマッチ[B10.BR→AKR/J]、そして MHC クラス I と非 MHC 抗原両方のミスマッチ[B10.AQR→AKR/J]の 3 種類を作成した。この 3 種の骨髄キメラを用い、少数の T 細胞によって誘導される骨髄移植後の急性 GVHR を、特に Mls-1^a 抗原による影響に焦点をあてて以下の解析を行った。

1) BMT 後、経時的にキメラマウスの体重の回復程度等 GVHR の臨床像を観察した。2) フローサイトメトリーにより、ドナー T 細胞のサブポピュレーションを解析した。3) 骨髄キメラの脾細胞をそのまま培養し、上清中のサイトカインを測定した。4) ホスト抗原に対するドナー T 細胞応答を *in vitro* で解析するため、種々の組み合わせの混合リンパ球反応 (mixed lymphocyte reaction, 以下 MLR) を行った。

結果

1. 体重減少等の臨床症状に関しては、MHC クラス I ミスマッチ、または非 MHC 抗原単独ミスマッチの GVHR キメラマウスでは、明瞭な急性 GVHR 症状は認められなかった。しかし、MHC クラス I ミスマッチに非 MHC 抗原ミスマッチが重なると、BMT 後 2 週以降 GVHR キメラマウスに GVHR 症状(体重減少、脱毛、下痢、脾腫等)が認められた。

2. ホスト抗原による T 細胞反応を *in vitro* で解析するため、キメラマウス作成と同じ組み合わせで MLR を行った。増殖反応と種々のサイトカイン (IL-1 α 、IL-2、IL-4、TNF- α) 産生は、非 MHC 抗原単独ミスマッチ、MHC クラス I と非 MHC 抗原両方のミスマッチの組み合わせで高かった。一次培養系で MLR を誘導することから、非 MHC 抗原として、主として働く抗原は Mls-1^a 抗原であること、またこの Mls-1^a 抗原は T 細胞に対して増殖反応のみならず、種々のサイトカイン産生を誘導することが判明した。

3. 実際に骨髄キメラマウス脾細胞のサイトカイン産生を測定した。クラス I 単独ミスマッチでは、コントロールキメラマウス、GVHR キメラマウスの両キメラマウスにおいて、有意のサイトカイン産生は認められなかった。しかし、非 MHC 抗原単独ミスマッチ、あるいは MHC クラス I と非 MHC 抗原両方のミスマッチの組み合わせでは、BMT 4 日後に GVHR キメラマウスの脾細胞においてサイトカイン産生が認められた。移植後 4、7、11 日と経過を観察すると、4 日以降ではサイトカイン産生は認められなかった。産生されたサイトカインの種類は MLR のサイトカイン産生と異なり、IL-4、IL-1 α 、IL-3、IFN- γ 、GM-CSF が主で、IL-2 や TNF- α 産生は認められなかった。またこの組み合わせのコントロールキメラにおいては、いかなる時期においても有意のサイトカイン産生は認められなかった。以上より GVHR においても、主として働く非 MHC 抗原は Mls-1^a 抗原であると考えられた。

4. フローサイトメーターを用いて、サイトカイン産生の認められた非 MHC 抗原単独ミスマッチと、MHC クラス I と非 MHC 抗原両方のミスマッチの組み合わせのキメラマウス脾細胞中の細胞ポピュレーションを調べた。GVHR キメラ脾細胞では、IL-4 産生が著明に高かったので、特に NK-T 細胞に注目し解析した。しかし、NK-T 細胞の増加は認められなかった。その代り、Mls-1^a 抗原反応性のドナー由来 V β 6⁺ T 細胞が、有意に増加していた。従って、これら GVHR キメラマウスの脾臓において、ドナー由来 V β 6⁺ T 細胞がホスト Mls-1^a 抗原に反応して、

増加することが判明した。即ち、Mls-1^a 抗原ミスマッチが、実際に骨髄移植後の急性 GVHR を誘導することを T 細胞クローンレベルで証明し得た。

考察

Mls-1^a 抗原ミスマッチは、実際に骨髄移植後の急性 GVHR 誘導で重要な役割を演じることが判明した。この GVHR によって種々のサイトカインが産生されるが、これらのサイトカインのあるものは、GVHR 症状を増強したり（体重減少等）、また骨髄生着（IL-3、GM-CSF の産生）に強く影響すると考えられた。ヒトの系でも、MHC 抗原以外のマイナー抗原、特にヒトゲノム内に取り込まれたウイルス産物の GVHR に対する影響を解析することが、今後必要と思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 小野江 和 則

学 位 論 文 題 名

Effects of non-major histocompatibility antigens on acute graft-versus-host reaction after allogeneic bone marrow transplantation

(異系骨髄移植後の急性 GVHR に対する非 MHC 抗原の影響)

骨髄移植 (bone marrow transplantation、以下 BMT) 後の graft-versus-host reaction (GVHR) は、主として移植片に含まれるドナーT細胞がホスト抗原を非自己と認識して起こる現象である。ドナーT細胞がホスト抗原に対してどのようなタイプの免疫応答を生ずるかが、GVHR 病態形成の決定要因となる。BMTは造血系疾患、免疫不全症等の根治療法としての座を得ているが、出生率の低下とともに同胞数が減少し、他人からの BMT の症例数が増加する傾向にある。従って BMT の合併症の一つ GVHR を考慮する際、主要組織適合複合 (major histocompatibility complex、以下 MHC) 抗原以外に、非 MHC 抗原の影響が新たな問題となりつつある。このような背景にあって、非 MHC 抗原、特にレトロウイルス由来内在性スーパー抗原の一つである minor lymphocyte stimulatory-1^a (Mls-1^a) 抗原が、BMT 後の急性 GVHR にどのような影響を及ぼすかを検討し、その成果をまとめたのが本研究である。

6-8 週齢の雌マウスを用い、ドナー、ホストの組み合わせとしては、MHC クラス I 単独ミスマッチ、内在性スーパー抗原である Mls-1^a 抗原など非 MHC 抗原ミスマッチ、および MHC クラス I と非 MHC 抗原両方のミスマッチの 3 種類を作成した。この 3 種の骨髄キメラを用い、少数の T 細胞によって誘導される骨髄移植後の急性 GVHR を、特に Mls-1^a 抗原による影響に焦点をあてて以下の解析を行った。1) GVHR の経時的観察。2) フローサイトメトリーによるドナーT細胞のサブポピュレーションの解析。3) 骨髄キメラ脾細胞の培養上清中のサイトカイン測定。4) 混合リンパ球反応 (mixed lymphocyte reaction、以下 MLR)。

MHC クラス I ミスマッチに非 MHC 抗原ミスマッチが重なると GVHR 症状が認められた。MLR による増殖反応と IL-1 α 、IL-2、IL-4、TNF- α 産生は、非 MHC 抗原単独ミスマッチ、MHC クラス I と非 MHC 抗原両方のミスマッチの組み合わせで高かった。一次培養系で MLR を誘導することから、主として働く抗原は Mls-1^a 抗原であること、またこの Mls-1^a 抗原は T 細胞に対して増殖反応のみならず、種々のサイトカイン産生を誘導することが判明した。非 MHC 抗原単独ミスマッチあるいは MHC クラス I と非 MHC 抗原両方のミスマッチの組み合

わせでは、BMT 4 日後に GVHR キメラマウス脾細胞においてサイトカイン産生が認められた。以上より *in vivo* の GVHR においても、主として働く非 MHC 抗原は Mls-1^{*} 抗原であると考えられた。フローサイトメーターを用いた解析から、サイトカイン産生の認められた非 MHC 抗原単独ミスマッチと MHC クラス I と非 MHC 抗原両方のミスマッチの組み合わせのキメラマウス脾細胞中で、Mls-1^{*} 抗原反応性のドナー由来 V β 6⁺ T 細胞が有意に増加していた。即ち、Mls-1^{*} 抗原ミスマッチが、実際に骨髄移植後の急性 GVHR を誘導することを T 細胞クローンレベルで証明し得た。この GVHR によって種々のサイトカインが産生されるが、これらのサイトカインのあるものは、GVHR 症状を増強したり（体重減少等）、また骨髄生着（IL-3、GM-CSF の産生）に強く影響すると考えられた。ヒトの系でも、MHC 抗原以外のマイナー抗原、特にヒトゲノム内に取り込まれたウイルス産物の GVHR に対する影響を解析することが、今後必要と思われる。

口頭発表にあたり、副査小児科小林教授より、マウスでは非 MHC の差による GVHD は強いとされているが、本研究の成績はそれと類似した現象である可能性、レトロウイルス由来内在性スーパー抗原の遺伝学的継代性およびヒトでそれに該当するものについての質問があり、申請者はこれまでの報告を引き合いにだして妥当な回答をした。その後、副査免疫研究所病理部門小野江教授より、今回と同様のマイナー抗原あるいは他のマイナー抗原に対する GVHR のヒトにおける可能性について質問があり、申請者は後者に対しては種々報告があるものの、前者に対しては同定の方法がないが十分考えられると回答した。次いで、主査加齢制御医学講座今村教授より、ヒトの GVHD では、MHC 一致、非 MHC 不一致の系で TNF- α との関連性が指摘されていることとの矛盾、MHC と非 MHC の両方が異なる系より非 MHC のみ異なる系でサイトカイン産生の高まっていた理由および GM-CSF および IL-3 の増加と造血回復の関連性についての質問があった。申請者は、いずれに対しても自らの豊富な検討結果より概ね妥当な回答をした。

この論文は、今後ますます重要性を増すと考えられるマイナー抗原と GVHR の関連性を明らかにしたことで高く評価され、造血幹細胞移植の臨床において今後の発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また大学院課程における研鑽や取得単位等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。