

ラット同種腎移植における術前ドナー樹状細胞および CTLA4Ig 投与による移植片生着延長効果

学位論文内容の要旨

I. 目的

同種臓器移植の抗原認識機構として、移植臓器片中に発現した主要組織適合抗原複合体(MHC)断片をレシピエント抗原提示細胞(APC)がprocessingし自己MHC上に発現させ、これをT cell が認識するindirect pathwayおよび、移植臓器中に存在するドナーAPCを直接レシピエントT cellが認識するdirect pathwayが重要な役割を占めている。passenger leukocyteの本体とされるprofessional APCである樹状細胞(DC)は同種臓器移植では、血流再開後にレシピエントリンパ系組織へ遊走し、direct pathwayを介して同種特異的T cell応答を惹起する。また近年T cellの抗原認識の際、CD80/86からT cell 上のCD28への副刺激を欠いた場合、抗原特異的免疫学的寛容状態が誘導されることが判明している。本研究では、移植前のドナーDCおよび、高率にCD28への副刺激をblockするrecombinant protein CTLA4Igの投与によって引き続き同種腎移植片の生着延長が図れるかをMHC完全不一致のラット腎移植モデルを用いて検討した。また得られた長期生着モデルに関して、そのメカニズムを検討した。

II. 材料と方法

1. 実験動物

近交系ラット3系統LEW/Hkm(RT1^b), WKAH/Hkm(RT1^b)およびACI/Hkm(RT1^b)。

2. ラット脾樹状細胞の調整

コラゲナーゼ融解したLEWラット脾細胞を1晩培養し、翌日脾付着細胞を回収。14.5% Nycodenz密度勾配上に重層後、遠心し中間層を回収した。さらに混在するマクロファージ、B cellを除去するため、panningにより非付着細胞を回収し脾DCとして実験に用いた。なおFACS解析にてDCはMHC class II, CD80/86, ICAM-1およびrat DC マーカーであるOX-62抗原陽性であった。またMLRにおいてDCは添加細胞数がLNCやSPCの1/10にもかかわらず、それらよりも強力な同種抗原提示能が確認された。

3. MLRにおけるCTLA4Igの抑制効果

LEW DCをstimulator, WKAH LNCをresponderとするone way MLRにて共培養開始時からCTLA4Igを添加した(0-500 μ g/ml)。またCTLA4Igをcoating(0-100 μ g/ml)したLEW DCをstimulatorとするMLRも行った。

4. アロ腎移植におけるCTLA4IgおよびDCの投与方法

MHC完全不一致の組み合わせであるLEWをドナーに、WKAHをレシピエントとする同種ラット腎移植において、ドナーDCが急性拒絶反応を促進するか、またCTLA4Igがこの現象を回避させ、さらにドナー特異的免疫学的無反応状態が誘導されるか否かを確認するために以下の9群の実験群を設けた。すなわちGroup I: 無処置コントロール移植群, Group II: 移

植0, 2, 4日後に 500 μ g/ratのCTLA4Igを腹腔内投与(i.p.), Group III: 移植0, 2, 4日後に500 μ g/ratのhIgGをi.p., Group IV:移植9, 7, 5日前に 500 μ g/ratのCTLA4Igをi.p., Group V: 移植9日前にドナーDC(2x10⁶/rat)を尾静脈から静脈内投与(i.v.), Group VI: 移植9日前に500 μ g/mlの濃度のCTLA4Igでcoatingされたドナー DC(2x10⁶/rat)をi.v., Group VII: 移植9日前に500 μ g/mlの濃度のhIgGでcoatingされたドナーDC(2x10⁶/rat)をi.v., Group VIII: 移植9日前にドナーDC(2x10⁶/rat)をi.v.し, かつ移植9, 7, 5日前に 500 μ g/ratのCTLA4Igをi.p., Group IX:移植9日前にドナー DC (2x10⁶/rat)をi.v.し, かつ移植9, 7, 5日前に 500 μ g/ratのhIgGをi.p. なお腎移植時に自己腎は両側とも摘出し, 死亡にて拒絶と判断した.

5. 皮膚移植手技

100日以上長期生着が得られたモデルにおいて, 移植片生着がドナー特異的か否かを確認するために3種類の純系ラット (LEW, WKAH, ACI) の尾部から直径10mmの全層皮膚組織グラフトを切除し長期生着ラットの背部に皮膚移植を行った.

6. 血清サイトカイン測定

Group II, III, VIIIおよびIXから経時的に採取した血清中のTh1サイトカイン(IL-2, IFN- γ), およびTh2サイトカイン(IL-4, IL-10)の濃度をELISAにて測定した.

III. 結果

1. MLRにおけるCTLA4Igの抑制効果: CTLA4Igは共培養開始時から添加した場合, 濃度依存性にMLRの抑制効果を示した. またCTLA4IgをcoatingしたDCをsimulatorとした場合coating時の濃度依存性にMLR抑制効果を示した.
2. 各実験群における移植腎生着日数: Group I(n=6); 8.2 \pm 1.6, Group II(n=9); >68.1 \pm 39.0, Group III(n=6); 7.0 \pm 0.9, Group IV(n=6); 7.5 \pm 1.2, Group V(n=8); 5.0 \pm 2.2, Group VI(n=10); 5.6 \pm 1.7, Group VII(n=6); 4.0 \pm 1.1, Group VIII(n=13); >38.8 \pm 38.3, Group IX(n=8); 5.3 \pm 4.1 (mean days \pm SD). すなわちCTの術後投与は有意に移植片生着を延長した. またDC単独移植前投与は移植片の拒絶を有意に促進した. しかしCTLA4IgをcoatingしたDCの効果はみられなかった. さらに移植前にDCおよびCTを投与した群では移植片生着は有意に延長した.
3. 長期生着モデルにおける皮膚移植: Group IIおよびGroup VIIIにおいて長期生着個体への皮膚移植を行った. すべてのレシピエントで移植腎と同系のLEWの皮膚移植片は50日以上生着が得られた. また対照同種のACIの皮膚移植片は15日以内に拒絶された.
4. 長期生着モデルにおける血清サイトカインの測定: IL-2は有意な変化を示さなかったが移植後早期のIFN- γ はGroup IIはGroup IIIに比べ有意に低値であった(4日目でp=0.025). また移植後早期にはIL-4はGroup IIが有意に高値で(4日目p=0.006)移植後30日まで高値で徐々に下降した. 一方IL-10では30日目までは2群間に差を認めなかったが, Group IIで徐々に上昇し100日を越えると有意に高値を示した. また同様の測定をGroup VIIIおよびGroup IXにおいて行ったが概して, 長期生着ラットのTh1/Th2 サイトカイン濃度はGroup II, IIIでみられたのと同様の傾向を示した.

IV. 考察

DCはprofessional APCである. DCの同種抗原提示能は移植前に1回投与された場合でも促進型急性拒絶反応を惹起させることができることから, 非常に強力であることがわかる. しかしCTLA4IgはこのDCをstimulatorとする同種MLRを培養開始時に添加することで抑制することが可能であった. また予めCTLA4IgをDCに結合させておいても, 余剰のCTLA4Igなしで濃度依存性にMLRを抑制できることが示されたが*in vivo*では無効であった. 本研究ではさらに移植前のDCの静脈内投与に加えCTLA4Igを腹腔内投与しているが, この場合はDCの強力な同種抗原提示能が抑制され移植片は長期に生着することが観察された. 皮膚移植の結果からドナー特異的免疫学的無反応状態が誘導されており, これはDCからT cellへの不完全な抗原提示の結果であると思われる. また血清Th1/Th2サイトカインの推移は特徴

的で移植後早期にはIL-4は上昇し、長期的にはIL-10の上昇がみられた。これらTh2タイプのサイトカインが優位であることから、Th2細胞が免疫応答を負に制御している可能性が考えられた。

V. 結 語

ラット同種腎移植においてドナー樹状細胞からの副刺激をCTLA4Igにより抑制することで術前操作による移植片生着延長の可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 柳 知 彦
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

ラット同種腎移植における術前ドナー樹状細胞および CTLA4Ig 投与による移植片生着延長効果

同種臓器移植の抗原認識機構として, indirect pathwayおよびdirect pathwayが重要な役割を占めている. professional APCである樹状細胞(DC)は同種臓器移植では, 血流再開後にレシピエントリンパ系組織へ遊走しdirect pathwayを介して同種特異的T cell応答を惹起する. またT cellの抗原認識の際, CD80/86からT cell上のCD28への副刺激を欠いた場合, 抗原特異的免疫学的寛容状態が誘導されることが判明している. 本研究は移植前のドナーDCおよびCTLA4Igの投与によって同種腎移植片の生着延長が図れるかをラット腎移植モデルを用いて検討した研究である. 脾細胞の抽出にはNycodenz密度勾配法を用いた. FACS解析にてDCはMHC class II, CD80/86, ICAM-1およびrat DC マーカーであるOX-62抗原陽性であった. またMLRにおいてDCは添加細胞数がリンパ節細胞(LNC)や脾細胞よりも強力な同種抗原提示能を有することが確認された. LEW DCをstimulator, WKAH LNCをresponderとするone way MLRにて共培養開始時からCTLA4Igを添加し, またCTLA4IgをcoatingしたLEW DCをstimulatorとするMLRも行ったところCTLA4Igは共培養開始時から添加した場合, 濃度依存性にMLRの抑制効果を呈し, CTLA4IgをcoatingしたDCをstimulatorとした場合coating時の濃度依存性にMLR抑制効果を示した. よってMHC完全不一致の組み合わせであるLEWをドナーに, WKAHをレシピエントとする同種ラット腎移植において, 以下の9群の実験群を設けた. Group I: 無処置コントロール移植群, Group II: 移植0, 2, 4日後に 500 μ g/ratのCTLA4Igを腹腔内投与(i.p.), Group III: 移植0, 2, 4日後に 500 μ g/ratのhIgGをi.p., Group IV: 移植9, 7, 5日前に 500 μ g/ratのCTLA4Igをi.p., Group V: 移植9日前にドナーDC(2×10^6 /rat)を尾静脈から静脈内投与(i.v.), Group VI: 移植9日前に500 μ g/mlの濃度のCTLA4IgでcoatingされたドナーDC(2×10^6 /rat)をi.v., Group VII: 移植9日前に500 μ g/mlの濃度のhIgGでcoatingされたドナーDC(2×10^6 /rat)をi.v., Group VIII: 移植9日前にドナーDC (2×10^6 /rat)をi.v.し, かつ移植9, 7, 5日前に 500 μ g/ratのCTLA4Igをi.p., Group IX: 移植9日前にドナー DC (2×10^6 /rat)をi.v.し, かつ移植9, 7, 5日前に 500 μ g/ratのhIgGをi.p. した. 結果はGroup I(n=6); 8.2 ± 1.6 , Group II(n=9); $>68.1 \pm 39.0$, Group III(n=6); 7.0 ± 0.9 , Group IV(n=6); 7.5 ± 1.2 , Group V(n=8); 5.0 ± 2.2 , Group VI(n=10); 5.6 ± 1.7 , Group VII(n=6); 4.0 ± 1.1 , Group VIII(n=13); $>38.8 \pm 38.3$, Group IX(n=8); 5.3 ± 4.1 (mean days \pm SD). また 移植片生着がドナー特異的か否かを確認するため長期生着ラットの背部に皮膚移植を行ったがすべてのレシピエントで移植腎と同系のLEWの皮膚移植片は50日以上が生着が得られた. さらにGroup II, III, VIIIおよびIXから経時的に採取し

た血清中のTh1サイトカイン(IL-2, IFN- γ), およびTh2サイトカイン(IL-4, IL-10)の濃度をELISAにて測定したところIL-2は有意な変化を示さなかったが移植後早期のIFN- γ はGroup IIはGroup III に比べ有意に低値であった。また移植後早期にはIL-4はGroup IIが有意に高値で移植後30日まで高値で徐々に下降した。一方IL-10では30日目までは2群間に差を認めなかったが, Group IIで徐々に上昇し100日を越えると有意に高値を示した。また同様の測定をGroup VIIIおよびGroup IXにおいて行ったが概して, 長期生着ラットのTh1/Th2 サイトカイン濃度はGroup II, IIIと同様の傾向を示した。本実験ではDCの単離も成功し, *in vitro*ではCTLA4Igのcoatingのみの有用性も示せた点で評価されるが, *in vivo*では無効であり種々の点に関してより改良を重ねていく必要性があろう。

この論文は, ラットからprofessional APCであるDCを純粹に単離できた点, また術後の免疫抑制療法なしに, 術前操作のみで同種腎移植片の長期生着延長が可能であった点で高く評価され, 今後ヒトへの移植においても移植片の生着をより確実にする可能性もあり非常に期待される。

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。