

学 位 論 文 題 名

Effect of acute graft-versus-host disease (GVHD)
on generation of T cell repertoire and T cell function
after allogeneic bone marrow transplantation

(同種骨髄移植後のT細胞レパートリーの形成と
機能に及ぼす急性移植片対宿主病の影響)

学位論文内容の要旨

骨髄移植は、白血病など多くの致死性血液疾患に対する有効な治療法である。しかし、骨髄移植の最も重篤な合併症の一つである、移植片対宿主病 (GVHD) に対する治療法は確立されていない。筆者の教室ではこれまで GVHD の病態解明、ならびに免疫学的治療法の開発を目的に、B10 系 H-2 リコンビナントマウスと AKR マウスの系で同種骨髄移植を行い、マイナー抗原と主要組織適合遺伝子クラス I (H-2D) 抗原両者の不一致の場合に急性 GVHD が誘導され、胸腺内での negative selection 機構が破綻することを報告してきた。今回筆者は、(1)マイナー、または H-2D 抗原単独の不一致でも、GVHD が誘導されることを見出し、これら GVHD マウスの T 細胞レパートリーと反応性の検討を行い、(2)次に、マイナー抗原と H-2D 抗原両者の不一致でいったん誘導された急性 GVHD から回復した骨髄キメラマウスの T 細胞レパートリーと反応性の解析を行った。

マイナー抗原単独不一致の組み合わせとして、ドナー B10.BR マウス (H-2^k、minor lymphocyte stimulatory (Mls)-1^a 陰性)、レシピエント AKR マウス (H-2^k、Mls-1^a 陽性)、H-2D 単独不一致の組み合わせとしてドナー B10.A マウス (H-2^a、Mls-1^a 陰性)、レシピエント B10.BR マウス (いずれも 5~6 週齢、雌) を使用した。11Gy 全身放射線照射したレシピエントマウスに、抗 Thy1.2 抗体と補体処理により成熟 T 細胞を除去したドナー骨髄細胞 1×10^7 個を単独移植したものを T0 キメラとした。また、脾臓よりナイロンウールカラムで精製した T 細胞 1×10^5 個、または 3×10^5 個とともに骨髄移植を行ったものをそれぞれ T1、T3 キメラとし、[ドナー→レシピエント]と表示した。これら[B10.BR→AKR]、[B10.A→B10.BR]骨髄キメラマウスの生存率、体重、GVHD 症状を経時的に観察した。[B10.BR→AKR]、[B10.A→B10.BR]ともに、T0 キメラは GVHD 症状を示さなかったが、T1、T3 キメラは体重減少等、GVHD 症状を示した。続いて、骨髄移植 8 週後にフローサイトメトリーによる胸腺内 T 細胞レパートリーの解析と、混合リンパ球反応 (MLR) を用いた脾臓 T 細胞の機能解析を行った。MLR はドナー、キメラマウスより得た脾臓 T 細胞 3×10^5 個と、マイトマイシン C 処理をした B10.A、B10.BR、C57BL/6

(B6) (H-2^b)、AKR マウスの脾臓細胞 5×10^5 個を 4 日間培養し、³H チミジンの取り込み量にて定量した。[B10.BR→AKR] T0 キメラの胸腺においては、レシピエントの発現する内在性スーパー抗原、Mls-1^a に反応する V β 6 陽性 T 細胞のクローン消去が認められたが、T1、T3 キメラでは認められなかった。[B10.BR→AKR] T1、T3 キメラでは、GVHD によりレシピエントの Mls-1^a 産生細胞が早期に消滅し、胸腺で negative selection が誘導されなくなったと考えられた。また、[B10.BR→AKR]、[B10.A→B10.BR] T1、T3 キメラマウスでは、ドナー、レシピエント共に発現する内在性スーパー抗原の I-E tolerogenic coligand (Etc)-1 反応性 V β 5、または V β 11 陽性 T 細胞の割合が、ドナー、レシピエント、T0 キメラに比べ高かった。次に MLR で解析すると、[B10.BR→AKR]、[B10.A→B10.BR] T1、T3 キメラマウスの T 細胞は、ともにレシピエント抗原のみならず、ドナー抗原に対しても増殖反応を示した。これらより、GVHD により胸腺での negative selection 機構全体が障害を受けたと考えられた。

次に、マイナー抗原と H-2D 抗原両者の不一致の組み合わせで骨髄キメラを作製した。11Gy 全身放射線照射した AKR レシピエントマウスに、B10.A ドナーマウスより採取した T 細胞除去骨髄細胞 1×10^7 個を単独 (T0 キメラ)、または脾臓 T 細胞 1×10^5 個 (T1 キメラ) とともに尾静脈より注入し、経時的に生存率、体重、GVHD 症状を観察した。T0 キメラは GVHD 症状を示さなかった。T1 キメラは移植 3 週間後より体重減少等、GVHD 症状を示したが、8 週間には体重は移植前のレベルまで回復した。そこで、移植 8 週間後に急性 GVHD より回復したと判断し、T 細胞レパートリー、免疫機能を解析した。胸腺、脾臓ともに、レシピエントマウス、T0 キメラでは、Mls-1^a 反応性 V β 6 陽性 T 細胞のクローン消去は認められたが、T1 キメラでは、V β 6 陽性 T 細胞の消去が認められなかった。次にドナー、キメラマウスの脾臓 T 細胞を responder、マイトマイシン C 処理をした B10.A、B6、AKR 脾臓細胞を stimulator として MLR を行った。T0 キメラに比べ、T1 キメラ T 細胞はレシピエント抗原に対して有意な増殖反応を示した。そこで、マイトマイシン C 処理をした AKR 脾臓細胞と 5 日間培養したドナーマウス、またはキメラマウスの脾臓 T 細胞をエフェクター細胞、レシピエント脾臓細胞より作成した Con A blast をターゲット細胞として、⁵¹Cr release assay を行った。その結果、正常ドナーはレシピエント細胞に対し細胞傷害活性を示したが、T0、T1 キメラの T 細胞には、細胞傷害活性は誘導されなかった。次に、ドナー、キメラマウスの脾臓 T 細胞を抗 CD3 抗体または AKR stimulator で刺激後、サイトカイン産生量を測定した。同時にドナー、キメラマウスより得た血清 IgG1、IgG2a 抗体価を ELISA 法で測定した。T1 キメラの T 細胞はドナー、T0 キメラの T 細胞に比べ、有意な IL-4 産生の上昇と IFN- γ 産生の減少を示した。さらに T1 キメラの血清 IgG1 値は、ドナー、T0 キメラに比べ有意に上昇しており、T1 キメラは Th2 優位状態にあることが判明した。

以上より、急性 GVHD 回復後も胸腺内の negative selection の破綻は継続していること、急性 GVHD から回復したキメラマウスの T 細胞は、レシピエント抗原に対し増殖反応を示すが、細胞傷害活性を示さず split tolerance の状態にあることが判明した。キラー T 細胞の誘導には、Th1 細胞により活性化された抗原提示細胞が必要である。一方、Th2 細胞は IL-10 の産生により抗原提示細胞と Th1 細胞の活性を抑制する。急性 GVHD か

ら回復したキメラマウスの T 細胞は Th2 優位状態にあり、これが split tolerance の主要な原因の一つと考えられた。ヒト骨髄移植治療後の慢性 GVHD と Th1、Th2 の関連は、これまで明らかにされていない。しかし、マウスの慢性 GVHD モデルでは、脾臓 T 細胞の Th2 サイトカインの産生亢進と、血清 IgG1、IgE レベルの上昇が報告されており、今回の急性 GVHD から回復したキメラマウスと同様であった。骨髄移植後の慢性 GVHD に対する免疫学的治療法開発のため、今後、キラー T 前駆細胞の有無、Th2 状態へ誘導する因子の同定等、更なる GVHD の病態解明が必要と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則
副 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

Effect of acute graft-versus-host disease (GVHD) on generation of T cell repertoire and T cell function after allogeneic bone marrow transplantation

(同種骨髄移植後のT細胞レパートリーの形成と
機能に及ぼす急性移植片対宿主病の影響)

申請者の教室では、B10系 H-2 リコンビナントマウスと AKR マウスの系で同種骨髄移植を行い、マイナー抗原と H-2D 抗原両者の不適合の場合に急性 GVHD が誘導されることを報告してきた。今回申請者は、マイナー、または H-2D 抗原単独の不一致で誘導される GVHD マウスの T 細胞レパートリーと反応性の検討を行い、次にマイナー抗原と H-2D 抗原両者の不適合で誘導された急性 GVHD から回復した骨髄キメラマウスの T 細胞レパートリーと反応性の解析を行った。

マイナー抗原単独不一致の組み合わせとして、ドナー B10.BR マウス (H-2^k, Mls-1^a 陰性)、レシピエント AKR マウス (H-2^k, Mls-1^a 陽性)、H-2D 単独不一致の組み合わせとしてドナー B10.A マウス (H-2^a, Mls-1^a 陰性)、レシピエント B10.BR マウスを使用した。放射線照射レシピエントマウスに、T 細胞除去ドナー骨髄細胞 1×10^7 個を単独 (T0) または、脾臓 T 細胞 1×10^5 個、 3×10^5 個 (T1、T3) とともに静注し、[ドナー→レシピエント]骨髄キメラマウスを作成した。いずれの組み合わせのキメラにおいても、T0 キメラは GVHD 症状を示さなかったが、T1、T3 キメラは GVHD 症状を示した。続いて、骨髄移植 8 週後に胸腺内 T 細胞レパートリーの解析と、混合リンパ球反応 (MLR) 解析を行った。[B10.BR→AKR] T0 キメラの胸腺では、Mls-1^a 反応性 V β 6 陽性 T 細胞はクローン消去されたが、T1、T3 キメラでは消去が認められなかった。理由として、GVHD によりレシピエントの Mls-1^a 産生細胞が早期に消滅し、胸腺で負の選択が誘導されないと考えられた。また、[B10.BR→AKR]、[B10.A→B10.BR]キメラとも、ドナー、レシピエント両者に発現する Etc-1 反応性 V β 5、V β 11 陽性 T 細胞の割合が、ドナー、レシピエント、T0 キメラに比べ、T1、T3 キメラでは高かった。MLR でも、T1、T3 キメラの T 細胞は、レシピエント、

ドナー抗原に対して反応性を示し、GVHDにより胸腺での負の選択機構全体が障害を受けたと考えられた。

次に、[B10.A→AKR] T1 骨髄キメラマウスを作製し、急性GVHDより回復した移植8週後に、T細胞レパートリー、免疫機能を解析した。T0キメラでは、Mls-1^a反応性Vβ6陽性T細胞のクローン消去は認められたが、T1キメラでは認められなかった。MLRでは、T0キメラに比べ、T1キメラT細胞はレシピエント抗原に対して有意な増殖反応を示した。またAKR刺激細胞とのMLR後、正常B10.A T細胞はレシピエント細胞に対し細胞傷害活性を示したが、T0、T1キメラT細胞は示さず、T1キメラはsplit toleranceの状態と考えられた。正常ドナー、T0キメラT細胞と比べ、T1キメラのT細胞はレシピエント抗原、抗CD3抗体刺激に対し、IL-4産生の有意な上昇とIFN-γ産生の低下を示した。さらにT1キメラの血清IgG1値は、ドナー、T0キメラに比べ有意に上昇しており、T1キメラはTh2優位状態にあることが判明し、これがsplit toleranceの主要な原因の一つと考えられた。

公開発表に際し、副査の上出教授より骨髄移植の際に脾臓T細胞を添加する理由、CTL前駆細胞、LAK活性に関して質問があった。申請者は骨髄中には急性GVHDを軽減するNKT細胞が含まれること、IL-2存在下でMLRを行うとCTL活性、LAK活性が見られる旨回答した。

続いて副査の今村教授よりGVHDによるMls-1^aの消失、マイナー抗原単独不一致とH-2D抗原単独不一致でのGVHDによる体重減少の相違、ヒトのシステムとの相違に関して質問があった。申請者はMls-1^aは主にT細胞が産生するが、GVHDによりレシピエントのT細胞が消滅すると考えられること、体重減少はマイナー抗原単独不一致では新たに産生された自己反応性のT細胞が原因で、H-2D抗原単独不一致では移植時に注入したT細胞が原因と考えられること、マウスはヒトに比べGVHDに抵抗性で、今回のGVHDモデルはヒトに当てはめるとごく軽いGVHDと思われる旨回答した。

さらに主査の小野江教授よりGVHDを起こしたマウス系統の組み合わせとTh分化に関して質問があり、申請者はレシピエント、ドナーともにTh1優位な組み合わせでも、骨髄移植後慢性GVHDでTh2優位となり、反応性が単純に系統差に依存しない旨回答した。

本研究は、GVHDによる胸腺機能の破綻、並びに骨髄移植後急性GVHD回復後のT細胞機能の異常を明らかにし、今後の臨床応用の可能性を示唆した点で、重要と考えられる。

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)の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。