

In vivo functional adaptive immune responses in mice subjected
to allogeneic umbilical cord blood cell transplantation

マウス同種異系臍帯血移植による
機能的獲得免疫反応の構築

弘前大学大学院保健学研究科保健学専攻

提出者氏名： 前 田 浩 志

所 属： 医療生命科学領域 生体機能科学分野

指導教員： 伊 藤 巧 一

目次

略語一覽	2
序論	3
方法	5
結果	9
考察	19
謝辭	22
引用文献	23
英文要旨	26

略語一覧

- HSC: 造血幹細胞 (hematopoietic stem cell)
- HSPC: 造血前駆細胞 (hematopoietic stem/progenitor cell)
- UCBC: 臍帯血 (umbilical cord blood cell)
- BMC: 骨髄細胞 (bone marrow cell)
- GVHD: 移植片対宿主病 (graft versus host disease)
- MHC: 組織適合性抗原 (major histocompatibility complex)
- HLA: ヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen)
- GFP: 緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein)
- FBS: 牛胎児血清 (fetal bovine serum)
- DMEM: ダルベッコ氏変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- BSA: 牛血清アルブミン (bovine serum albumin)
- PBS: リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline)
- RBC: 赤血球 (red blood cell)
- PE: フィコエリスリン (phycoerythrin)
- rh: 遺伝子組み換えヒト (recombinant human)
- rm: 遺伝子組み換えマウス (recombinant mouse)
- EPO: エリスロポエチン (erythropoietin)
- SCF: 幹細胞因子 (stem cell factor)
- CFU: コロニー形成単位 (colony forming unit)
- TNP-KLH: (2,4,6-trinitrophenyl-keyhole limpet hemocyanin)
- BSA: 牛血清アルブミン (bovine serum albumin)
- Ig: immunoglobulin
- IL: インターロイキン (interleukin)
- ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
- OD: 吸光度 (optical density)
- SD: 標準偏差 (Standard Deviation)

序 論

造血幹細胞 (HSC) 移植は白血病や再生不良性貧血の有効な治療法であり、主に骨髄細胞 (BMC) が用いられていた。現在では、臍帯血 (UCBC) 中にも骨髄と同じく HSC が含まれていることが知られている¹⁻³⁾。両移植とも組織適合性抗原 (MHC) を完全に一致させることは難しく、一致しない場合、成熟 T 細胞を多く含む BMC 移植は早期造血回復には有効であるが、重篤な拒絶反応である移植片対宿主病 (GVHD) を引き起こしやすい。一方、UCBC 移植は BMC 移植に比べて含有成熟 T 細胞が少なく、MHC 不適合 (異系) 下で移植を行っても GVHD のリスクが低いこと^{4,5)}、造血前駆細胞 (HSPC)⁶⁾ が豊富なこと、ドナー数が多いことおよびサイトメガロウイルス感染のリスクが低いこと⁷⁾ がメリットとして挙げられ、反面、UCBC 移植は造血機能回復までに時間を要する問題を抱えている。近年、UCBC 移植の実施件数が著しく増加しているが、移植後の生体内での造血機能回復をこれまでに詳細に解析した例はなく、臨床において移植患者の経過観察^{1,2,8)}、基礎研究ではヒト UCBC のインビトロ分化・成熟実験^{9,10)} や異種間移植 (ヒト UCBC のマウスへの移入)^{11,12)} の報告にとどまっている。この理由としてこれまで自由度の高い動物モデルがなかったことが挙げられる。そこで我々は、異系 UCBC 移植モデルマウスを用い、HSC の生着性と免疫細胞再構築を経時的に解析するとともに、その機能性について検証した。対象として、異系 BMC 移植も実施した。この研究は臨床での UCBC 移植の有効性を証明する上で重要である。

本研究では、GVHD にかかわる T 細胞を枯渇させた UCBC および BMC を移植ソースとして用いた。さらに、両異系移植前日に拒絶の原因となるレシピエントのナチュラルキラー (NK) 細胞も枯渇させた。MHC 適合 (同系) 移植では、UCBC および BMC は高い生着を示した。一方、異系移植において BMC は、高い生着が認められたが、UCBC 生着は認められなかった。しかし、異系 UCBC 移植細胞数の増加は、ある一定の生着を誘導するとともに T 細胞、B 細胞、単球および顆粒球の免疫細胞へと分化・再構築していた。

T 細胞および B 細胞欠損 Rag2^{-/-} BALB/c に異系 UCBC および BMC 移植を行い、再構築した T 細胞および B 細胞の免疫機能を検証した。再構築された T 細胞は第 3 者の皮膚片を拒絶し、再構築された B 細胞は T 細胞依存性抗原に対する特異的抗体

を産生したことから、両異系移植により再構築された獲得免疫系は正常な機能を有していることが証明された。

本研究の結果、異系 UCBC 移植は異系 BMC 移植と同様に造血機能回復をするとともに、再構築された免疫細胞は機能的成熟性を有していることが明らかとなった。

方法

1. 動物

8週齢の雌 C57BL/6 (B6; H-2^b)、BALB/c (H-2^d) および C3H/ HeN (C3H; H-2^k) を日本クレア株式会社から購入した。B6-TgN(act-EGFP) OsbY01¹³⁾ は岡部 勝博士(大阪大学)より、Rag2 欠損 BALB/c は篠原 信賢博士(北里大学)より供与して頂いた。以上のマウスは、弘前大学大学院医学研究科附属動物実験施設の Specific Pathogen Free エリアにて飼育した。本研究は弘前大学動物実験委員会によって承認(承認番号: G08006)され、さらに弘前大学動物実験規則に従って行った。

2. 培養液

UCBC および BMC の分離培養液として、非働化 5%牛胎児血清(FBS) (v/v)、200mM NEAA、10mM HEPES (pH7.2)、ペニシリン/ストレプトマイシン(100U/mL) および 2mM L-グルタミンを添加した DMEM (Sigma-Aldrich 社)を用いた。細胞培養液として、非働化 10%FBS (v/v)、10mM HEPES (pH7.2)、ペニシリン/ストレプトマイシン(100U/mL)、2mM L-グルタミンおよび 50 μ M 2-メルカプトエタノールを添加した RPMI1640 (Sigma-Aldrich 社)を用いた。

3. 臍帯血と骨髄細胞の採取

UCBC は GFP^{+/+} B6 (♂) と野生型 B6 (♀) の交配後 18.5 日目に妊娠マウスを頸椎脱臼にて安楽死させた。次に、その妊娠マウスから子宮を摘出し、付着した母体血を生理食塩水で洗浄した。氷冷したリン酸緩衝液 (PBS) 中で子宮から臍帯でつながった胎盤および胎児を取り出した後、37°C に加温したヘパリン添加 DMEM に移し、臍帯を切断することで胎児末梢血を放血させた。この血液含む DMEM を回収し UCBC とした。BMC は GFP^{+/+} B6 (♂) と野生型 B6 (♀) を交配させた F1 の大腿骨及び骨盤から採取した。UCBC および BMC の GFP 発光強度を半減させることでフローサイトメトリー解析での最適化を計った¹⁴⁾。さらに採取した UCBC および BMC に存在する赤血球 (RBC) は、塩化アンモニウム溶液にて溶血処理した。そ

の後、GVHD 防止のため、T 細胞を抗 CD4 (GK1.5) および抗 CD8 (83-12-5) モノクローナル抗体を伴った補体依存性細胞傷害で枯渇させた¹⁵⁾。これら抗 CD4 および CD8 抗体は、それぞれのハイブリドーマ細胞 GK1.5 および 83-12-5 の細胞培養上清より自家精製したものをを用いた。

4. 移植

採取した GFP⁺ UCBC (1.0×10^6 個および 2.5×10^6 個) または GFP⁺ BMC (1.0×10^6 個) を致死量 X 線照射 (MBR-1505R2; 日立メディコ社) (フィルター Al; 2mm, Cu; 0.5mm) した野生型 BALB/c (異系移植) および野生型 B6 (同系移植) の尾静脈より移植した。また、T・B 細胞欠損 Rag2^{-/-} BALB/c へ異系 UCBC および BMC 移植を実施し、再構築された細胞の免疫機能を評価した。これら異系移植を受けるレシピエントマウスには、移植前日に抗アジアロ GM1 抗血清を腹腔投与し、移植細胞に対して傷害活性を有する NK 細胞を枯渇させた。この抗血清は、JW ウサギ (Oriental Yeast 社) にアジアロ GM1 (Sigma-Aldrich 社) を接種することで得た。

5. コロニーアッセイ

T 細胞枯渇前のそれぞれの UCBC および BMC を、ヒトリコンビナント (rh) インスリン ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)、rh トランスフェリン ($200 \mu\text{g}/\text{mL}$)、rh IL-6 ($10 \text{ng}/\text{mL}$)、rh エリスロポエチン (EPO) ($3 \text{U}/\text{mL}$)、マウスリコンビナント (rm) SCF ($50 \text{ng}/\text{mL}$)、rm IL-3 ($10 \text{ng}/\text{mL}$) を含有するメチルセルロース培地 (STEMCELL Technologies 社、#03434) へ $2 \times 10^4/\text{dish}$ (35 mm) 播種し、37°C に保温した 5%CO₂ インキュベーターで 12 日間培養した。培養後、顕微鏡下でカウントした造血コロニー数をコロニー形成単位 (CFU) とした。

6. フローサイトメトリー解析

解析細胞を抗 FcγR II/ III 抗体でブロックし、ビオチン標識抗 CD3e (T 細胞), CD45R/B220 (B 細胞), CD11b (単球), Ly-6G and Ly-6C (顆粒球) および TER119 (RBC) 特異的抗体 (BD Biosciences 社) を反応させ、PE 標識ストレプトアビジン

(BD Biosciences 社)で染色した。洗浄には 0.25%牛血清アルブミン (BSA) および 0.05%アジ化ナトリウムを含む氷冷 PBS を使用した。染色した細胞はフローサイトメーター (Cytomics FC500; Beckman Coulter 社) で測定、CXP ソフトウェアで解析した。

7. 皮膚移植

3 種混合麻酔した異系移植 16 週後の Rag2^{-/-} BALB/c の除毛した背部に野生型 B6、BALB/c および C3H の尻尾より採取した皮膚を移植した。脱落防止のため、移植皮膚片を絆創膏で保護した。7 日後、絆創膏を慎重に除去し、移植皮膚片の拒絶日数を計測した。

8. 細胞傷害試験

第 3 者 C3H 移植皮膚片を拒絶した正常 BALB/c およびキメラ Rag2^{-/-} BALB/c より脾臓を摘出し、10%FBS 添加 RPMI1640 を用いて細胞浮遊液を調製した。その浮遊細胞 (3×10^6 個) と mitomycin-C 処理した C3H 脾細胞 (2×10^6 個) を 37°C に保温した 5%CO₂ インキュベーターで 6 日間共培養することで浮遊細胞中の C3H に対する細胞傷害性 T 細胞を増殖させた。培養後、この奏効細胞である細胞傷害性 T 細胞を標的細胞である concanavalin A で幼若化した ⁵¹Cr 標識 C3H 脾細胞 (3×10^5 個) に 7.5, 15, 30, 60 倍の比率で添加し、5%CO₂ インキュベーターで 4 時間共培養した。培養後、細胞傷害 (溶解) により培養上清中に放出された ⁵¹Cr 量を液体 γ シンチレーションカウンター (Aloka, ARC-380) で測定することで細胞傷害度を評価した。特異的溶解 (%) は $100 \times [(\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release})]$ の計算式で算出した。Spontaneous release は ⁵¹Cr 標識 C3H 標的細胞に対して奏効細胞を含まない培養液のみを加えた陰性コントロールで、maximum release はこの標的細胞に対して 1%Nonidet-P40 溶解液を加えた陽性コントロールである。

9. 抗体産生試験

異系 UCBC および BMC 移植 16 週後の Rag2^{-/-} BALB/c に 2,4,6-trinitrophenyl-keyhole limpet hemocyanin (TNP-KLH) (Biosearch Technologies 社) を完全フロイントアジュバント (和光純薬工業株式会社) とともに腹腔投与し、さらに 2 週間後、TNP-KLH を不完全フロイントアジュバントとともに追加免疫した。追加免疫 2 週間後、尾静脈より採血し、血漿中の抗 TNP 抗体産生を ELISA 法により検出した。操作手順として、TNP-BSA (Biosearch Technologies 社) でコーティングした 96well プレートに 2 倍連続希釈した血漿を添加反応後、ペルオキシダーゼ標識抗 IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b および IgG3 抗体 (Invitrogen 社) を加え免疫複合体を形成させた。基質として O-phenylenediamine を用い、1N H₂SO₄ を加えて発色反応を停止させ、吸光度 (OD) 490nm にて測定した。コントロールとして野生型 BALB/c (陽性コントロール) および Rag2^{-/-} B6 (陰性コントロール) に同様の操作を行った。

結 果

1. 移植ソースの解析

UCBC および BMC の T 細胞枯渇前後の成熟免疫細胞をフローサイトメトリーで解析した(表 1)。UCBC には成熟 T 細胞は認められなかった(T 細胞枯渇前: $0.6 \pm 0.1\%$ 、T 細胞枯渇後: $0.5 \pm 0.2\%$)。一方、BMC の成熟 T 細胞は枯渇後に UCBC と同水準まで減少した(T 細胞枯渇前: $3.4 \pm 0.2\%$ 、T 細胞枯渇後: $0.5 \pm 0.0\%$)。UCBC の未成熟細胞(Lineage⁻細胞)は BMC と比較して 5 倍以上多く存在していた(T 細胞枯渇後 UCBC: $32.8 \pm 4.6\%$ 、T 細胞枯渇後 BMC: $5.8 \pm 0.1\%$)。このように Lineage⁻細胞が多く含まれているにもかかわらず、コロニーアッセイは BMC と比較して有意な CFU の低下が認められた(図 1)。この結果は UCBC 中の Lineage⁻細胞には HSC および HSPC の数が少なく、造血系以外の細胞が含まれていることを示している。

表 1. 移植ソースのフローサイトメトリー解析

	UCBC		BMC	
	T-cell depletion			
	Before	After	Before	After
Lineage ⁻ cells	24.9 ± 3.2 %	32.8 ± 4.6 %	6.2 ± 0.4 %	5.8 ± 0.1 %
T cells	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.2	3.4 ± 0.2	0.5 ± 0.0
B cells	6.1 ± 1.6	8.1 ± 0.9	23.9 ± 0.4	22.0 ± 1.6
Macrophages	29.8 ± 4.9	27.5 ± 1.8	16.2 ± 3.5	14.5 ± 1.3
Granulocytes	38.9 ± 3.5	32.6 ± 4.7	50.7 ± 3.2	58.1 ± 0.7
Erythrocytes	7.0 ± 0.7	4.8 ± 0.9	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.0

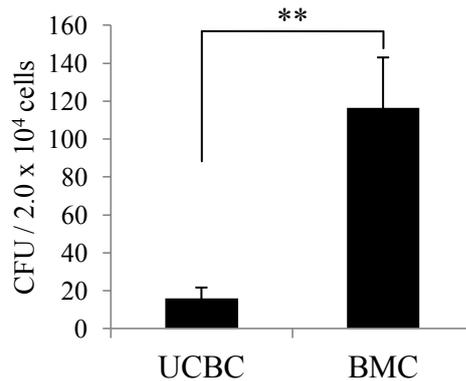


図 1 . UCBC および BMC のコロニーアッセイ.

T 細胞枯渇前の UCBC および BMC (2×10^4 /dish) を、成長因子 (rh インスリン、rh トランスフェリン、rm SCF、rm IL-3、rh IL-6、rh EPO) 含むメチルセルロース培地に播種し、12 日後、コロニー数をカウントし、これを CFU とした。棒グラフは CFUs \pm SD を示す。

**p < 0.01 by Student's t test; UCBCs versus BMCs.

2. 生存率

野生型 B6 および BALB/c へ致死量 X 線照射後、GFP⁺ B6 より採取した UCBC または BMC を移植した。X 線照射のみの野生型 BALB/c をコントロールとした。移植 16 週後の生存率は、同系移植群 (B6 \rightarrow B6) (1.0×10^6 個) の UCBC は 80.0% (n=10)、BMC で 100% (n=10) であった (図 2, A)。一方、異系移植群 (B6 \rightarrow BALB/c) (1.0×10^6 個) で UCBC は 13.3% (n=15)、BMC は 86.7% (n=15) と UCBC で有意な生存率の低下が認められたが、2.5 倍量 (2.5×10^6 個) の UCBC 投与でその生存率は 77.8% (n=9) まで回復した (図 2, B)。したがって、UCBC は BMC と比較して含有 HSC の数が少ないこと、異系環境下で HSC が排除されやすいことが考えられる。

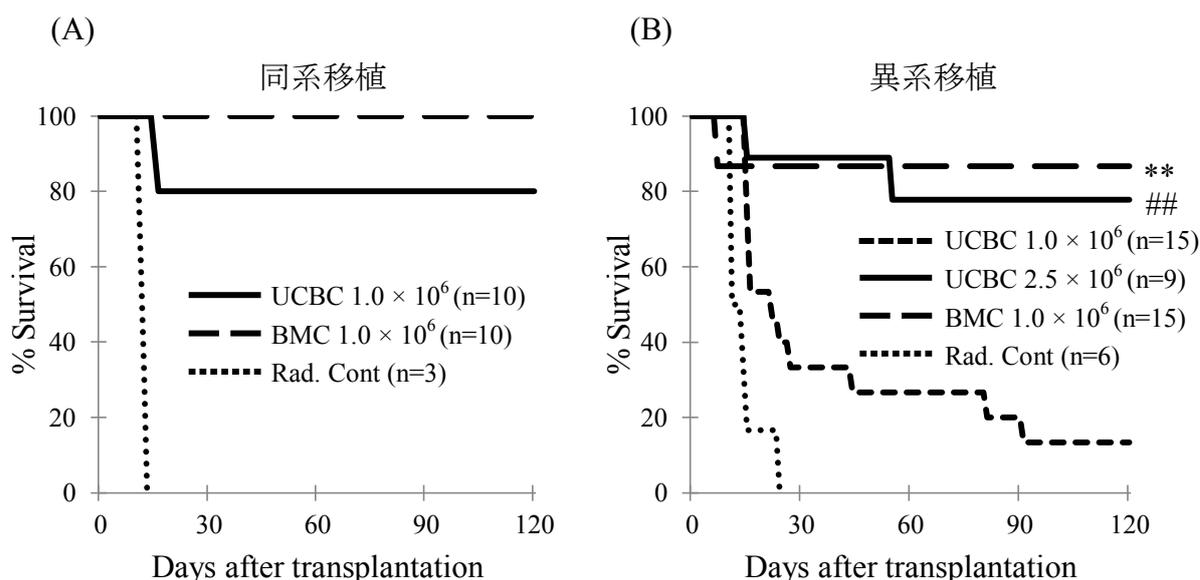


図 2. 移植後の生存率

致死量 X 線照射した野生型 B6 および BALB/c に、T 細胞枯渴 GFP^+ UCBC または BMC を移植し、120 日までの生存を観察した。(A) 同系移植における生存曲線 (UCBCs or BMCs from GFP^+ B6 \rightarrow B6)。(B) 異系移植における生存曲線 (UCBCs or BMCs from GFP^+ B6 \rightarrow BALB/c)。

**p < 0.01 by log-rank test; UCBC (1.0×10^6) versus BMC (1.0×10^6).

##p < 0.01 by log-rank test; UCBC (1.0×10^6) versus UCBC (2.5×10^6).

3. レシピエント末梢血における GFP^+ 細胞の検出

移植後 4 週毎に 16 週まで、レシピエント末梢血中のドナー由来 GFP^+ 細胞をフローサイトメリーで検出した (表 2)。図 2 A のように同系移植において UCBC および BMC ともに高い生存率を示していたが (UCBC ; 80.0%、BMC ; 100%)、これに相関して GFP^+ 細胞も移植後 8 週の段階で高い生着を示した (UCBC ; $75.8 \pm 13.1\%$, BMC ; $87.3 \pm 3.9\%$)。一方、異系 BMC 移植の GFP^+ 細胞生着は、同様に高い水準に達しており (8 週 ; $87.9 \pm 4.2\%$)、以後 16 週目においても減少することはなかった (16 週 ; $87.8 \pm 7.9\%$)。しかし、異系 UCBC 移植 (1.0×10^6) の GFP^+ 細胞生着は低く (16 週 ; 0.0%)、生存している個体はレシピエント自身の細胞で構築されており、異系環境下での

UCBC-HSCの生着の難しさが示された。この結果が異系UCBC移植での生存率低下に反映されたと考えられる(図2B)。一方、移植細胞数増量(2.5×10^6)は生存率(図2B参照)とともに、ドナー由来GFP⁺細胞の生着率(移植16週後のGFP⁺細胞が生着した4個体; $78.0 \pm 15.3\%$)の向上にも寄与した。したがって、細胞数増量移植による生存率の向上は、GFP⁺細胞生着の向上によって支えられていると考えられる。

表 2 . UCBC および BMC 移植後の GFP⁺ 細胞生着率

		% GFP ⁺ cell			
		weeks after transplantation			
Recipient no.		4	8	12	16
同系 UCBC Tx (1.0 × 10 ⁶ cells)	#1	NT	57.0	67.4	72.8
	#2	NT	86.6	88.4	89.6
	#3	NT	87.6	82.7	84.0
	#4	NT	81.4	84.1	81.6
	#5	NT	66.1	65.5	62.4
	#6	NT	82.7	88.5	88.6
	#9	NT	86.9	86.8	89.9
	#10	NT	58.4	58.5	65.3
	mean ± SD	NT	75.8 ± 13.1	77.7 ± 12.1	79.3 ± 11.1
	同系 BMC Tx (1.0 × 10 ⁶ cells)	#1	79.5	87.0	87.9
#2		49.7	88.3	92.0	93.6
#3		87.0	91.7	93.8	94.2
#4		86.6	91.3	92.7	93.7
#5		87.2	89.2	93.8	94.8
#6		73.8	79.4	93.4	93.4
#7		80.4	90.1	90.9	93.0
#8		67.4	82.6	89.4	91.2
#9		79.3	85.0	90.6	90.8
#10		76.6	88.6	89.3	87.2
mean ± SD	76.7 ± 11.4	87.3 ± 3.9	91.4 ± 2.1	91.8 ± 3.1	
異系 UCBC Tx (1.0 × 10 ⁶ cells)	#12	NT	0.0	0.0	0.0
	#15	NT	0.0	0.0	0.1
	mean ± SD	NT	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
異系 UCBC Tx (2.5 × 10 ⁶ cells)	#1	58.5	71.6	76.1	55.3
	#2	1.6	18.3	76.4	82.2
	#3	67.2	80.3	85.0	87.4
	#5	NT	0.0	0.1	0.0
	#6	79.1	86.5	87.6	86.9
	#8	64.8	0.1	0.0	0.0
	#9	82.0	0.1	0.0	0.0
mean ± SD	58.9 ± 29.4	36.7 ± 40.8	46.5 ± 43.6	44.5 ± 43.0	
異系 BMC Tx (1.0 × 10 ⁶ cells)	#1	79.5	92.9	82.3	92.0
	#2	49.7	76.1	87.7	68.2
	#4	86.6	86.1	93.8	85.2
	#5	87.2	88.2	87.3	91.4
	#6	73.8	90.3	91.3	92.4
	#7	80.4	89.0	91.2	93.6
	#8	67.4	90.1	92.1	92.6
	#10	76.6	90.5	88.4	92.1
	#11	86.0	85.5	92.2	82.1
	#12	85.1	84.9	91.8	77.6
	#13	84.8	89.4	92.1	86.3
	#14	84.8	89.0	92.3	93.2
	#15	84.7	90.2	93.9	95.2
	mean ± SD	79.0 ± 10.6	87.9 ± 4.2	90.5 ± 3.3	87.8 ± 7.9

4. 免疫細胞再構築

移植 16 週後のレシピエント末梢血中の GFP⁺ 細胞を構成する T 細胞、B 細胞、単球、顆粒球の割合を Lineage 特異的抗体を用いたフローサイトメトリーで検出した(図 3)。図 2 で GFP⁺ 細胞の生着が見られなかった個体はこの解析から除外した(異系 UCBC 移植(1.0×10^6) #12, #15; 異系 UCBC 移植(2.5×10^6) #5, #8, #9)。再構築された細胞数は、同系および異系移植で UCBC は BMC に比較して低値であるが、T 細胞、B 細胞、単球および顆粒球の構成比率に違いがなかった。この結果より BMC-HSC と同様に UCBC-HSC は異系環境下においても主要免疫細胞の全てに分化する能力を有することが確認できた。

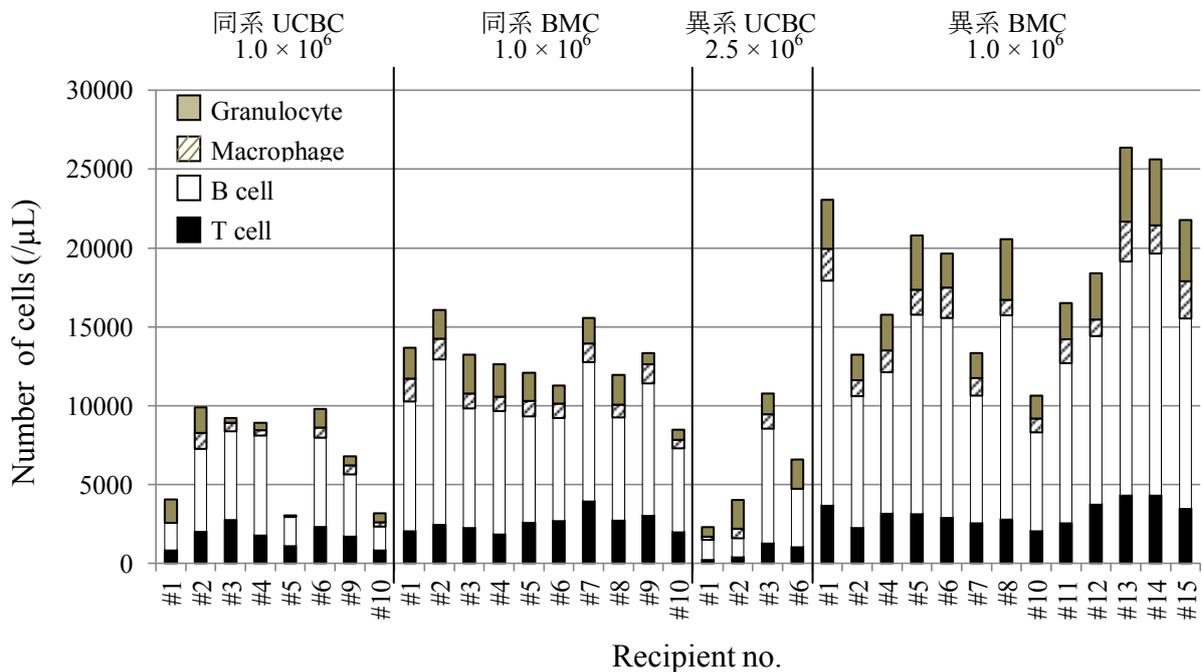


図 3 . 移植後の免疫細胞再構築

UCBC および BMC 移植 16 週後、採取したレシピエント末梢血をビオチン標識抗 CD3e (T 細胞), CD45R/B220 (B 細胞), CD11b (単球), Ly-6G and Ly-6C (顆粒球) 抗体と反応させ、PE 標識ストレプトアビジンで染色し、フローサイトメトリーで解析した。細胞数は末梢血有核細胞をチュルク液で染色し、顕微鏡下でカウントすることで算出した。

5. 異系キメラ Rag2^{-/-} BALB/c での T 細胞および B 細胞の構築

再構築されたドナー由来獲得免疫の機能性を検証するため、T・B 細胞欠損 Rag2^{-/-} BALB/c に異系 UCBC および BMC 移植を行った。移植 16 週後に GFP⁺ T 細胞および B 細胞の再構築をフローサイトメトリーで確認した。その結果、レシピエント末梢血中にはドナー由来 GFP⁺ T 細胞および B 細胞の再構築が確認された(図 4)。この異系キメラマウスに対して皮膚移植試験(含む細胞傷害試験)および TNP-KLH 投与試験を実施し、それぞれ T 細胞機能ならびに B 細胞機能を検証した。

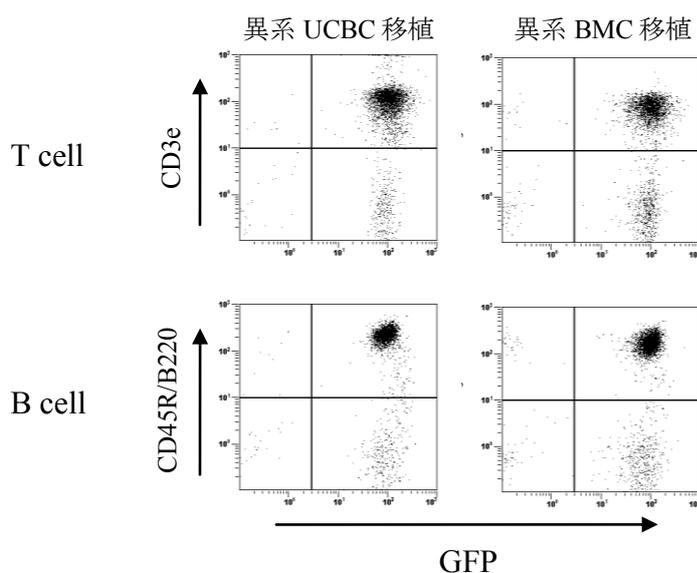


図 4 . Rag2^{-/-} BALB/c における異系ドナー由来 T 細胞および B 細胞の再構築

異系 UCBC および BMC 移植 16 週後、末梢血にビオチン標識抗 CD3e (T 細胞), CD45R/B220 (B 細胞)抗体を反応させ、PE 標識ストレプトアビジンで染色後、フローサイトメトリー解析により、ドナー由来 GFP⁺ T 細胞および B 細胞を検出した。

6. 移植皮膚片に対する特異的拒絶反応

T 細胞の機能性を証明するため、UCBC または BMC キメラ Rag2^{-/-} BALB/c に BALB/c、B6 および C3H の皮膚を移植した(図 5)。BALB/c および B6 の皮膚片は両キメラマウスに寛容であったのに対し(データ未掲載)、第 3 者 C3H の移植皮膚片だけを特異的に拒絶した(図 5, A)。UCBC キメラ BALB/c は BMC キメラ BALB/c と正常 BALB/c に比べ、2 日の拒絶反応遅延が認められた(図 5, A)ものの、この拒絶反応は

CD8⁺ キラーT 細胞の機能的再構築とともに CD8⁺ キラーT 細胞の成熟を IL-2 サイトカイン分泌で支える CD4⁺ ヘルパーT 細胞の再構築も成立していることを示している。

さらに第 3 者 C3H の移植皮膚片を拒絶した両キメラ BALB/c の脾細胞を用いて、細胞傷害試験を実施した(図 5, B)。UCBC および BMC 移植により構築された CD8⁺ T 細胞の C3H 標的細胞に対する傷害活性がインビトロ実験系でも検出された。正常 BALB/c に比較して両移植マウスではその傷害活性が有意に低下していたが、添加奏効細胞数の上昇に伴って細胞傷害性も上昇した。標的細胞に対して 60 倍量の奏効細胞添加時、BMC 移植群に比べて UCBC 移植群での差別化可能な細胞傷害活性の立ち上がりが認められた。

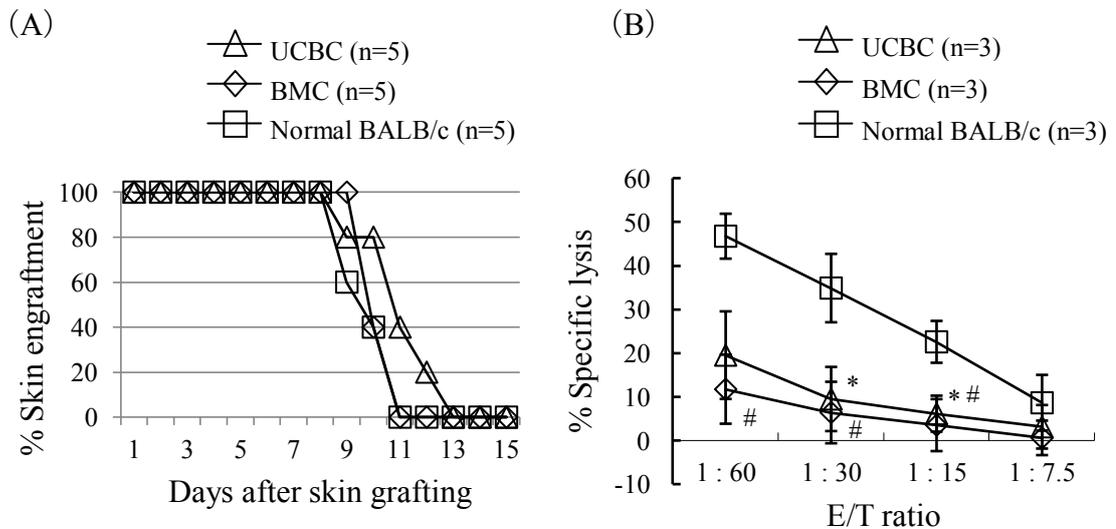


図 5 . 異系移植後ドナー由来 T 細胞の機能評価

(A) 異系 UCBC (△) および BMC (◇) 移植 16 週後、両キメラ Rag2^{-/-} BALB/c の除毛した背部に B6、BALB/c および C3H の尻尾より採取した皮膚を移植した。移植後、両移植キメラ Rag2^{-/-} BALB/c および正常 BALB/c (□) における第 3 者 C3H の皮膚片に対する拒絶日数を観察・計測した。(B) C3H 皮膚片を拒絶した UCBC および BMC 移植キメラ Rag2^{-/-} BALB/c の脾細胞 (E; 奏効細胞) を用いて、C3H 脾細胞 (T; 標的細胞) に対する細胞傷害 (溶解) 度を ⁵¹Cr 放出アッセイにより評価した。コントロールとして正常 BALB/c を用いた。各群の細胞傷害度は特異的溶解 (%) ± SD で示した。

*p < 0.05 by Tukey's test; UCBC versus normal BALB/c mice.

#p < 0.05 by Tukey's test; BMC versus normal BALB/c mice.

7. TNP 特異的抗体産生

B 細胞の機能性を証明するため、T 細胞依存性抗原である TNP-KLH を腹腔投与し、TNP 特異的抗体産生を検証した。コントロールとして正常 BALB/c(陽性コントロール)および Rag2^{-/-} B6(陰性コントロール)を用いた。その結果、TNP に対する特異的 IgM, IgG1, IgG2b 抗体産生が正常 BALB/c と同様に、両キメラマウスでも確認された。IgG 抗体の産生には IgM からのクラススイッチが必要であり、その機構は厳密なヘルパーT 細胞とB 細胞の分子間(CD40/CD40L)^{16,17)}ならびにサイトカイン相互作用の上に成り立つことから、異系 UCBC 移植はそのような複雑なネットワーク機構もきちんと構築していることが示された。当然ながら、陰性コントロールとして用いた非キメラ Rag2^{-/-} B6 には、TNP-KLH 投与にもかかわらず TNP 特異的抗体は検出されなかった。

これらの結果は、UCBC は本質的に BMC と同様、異系環境下での正常な機能を有した獲得免疫系を構築できることを示している。

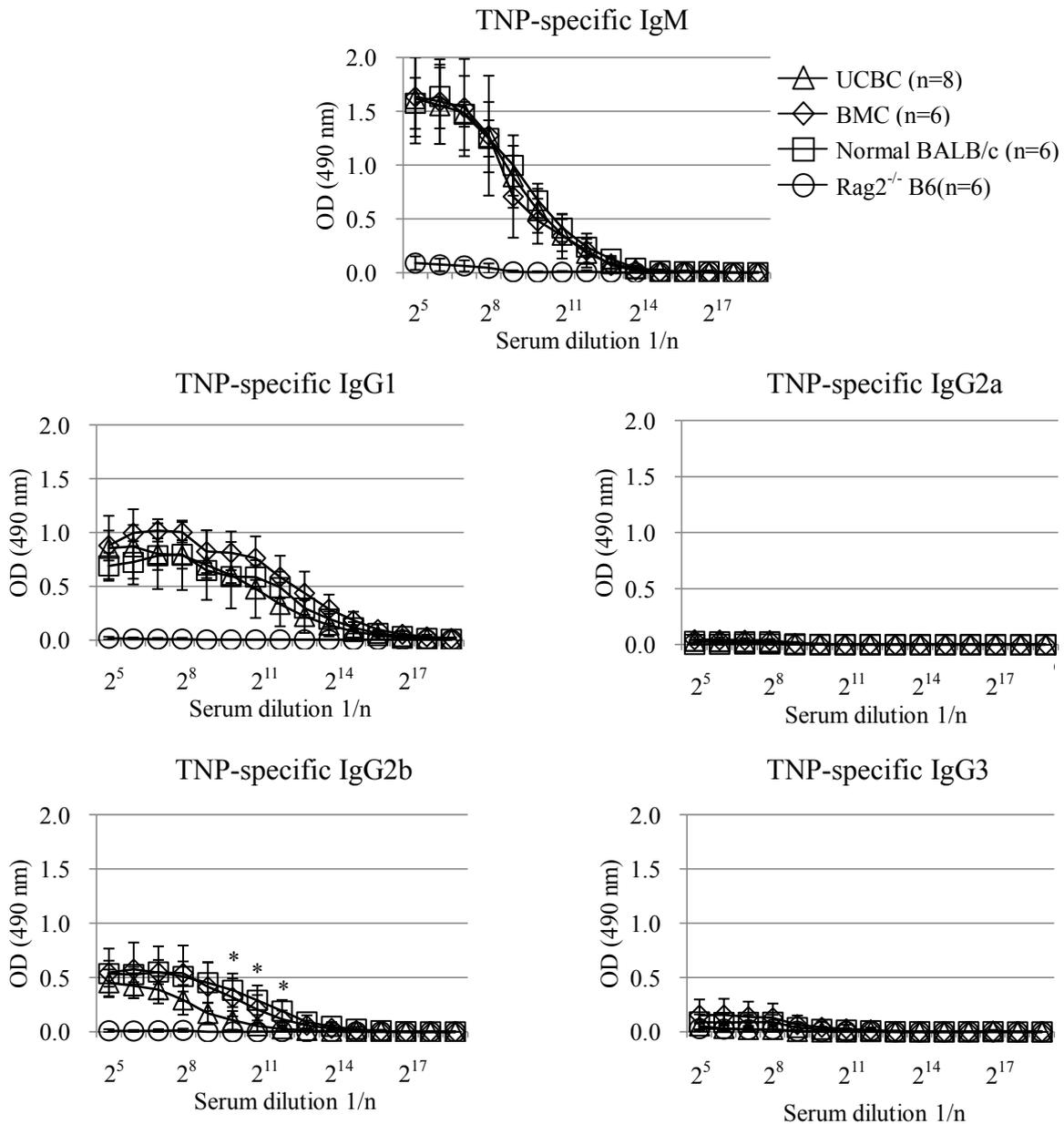


図 6. 異系移植後ドナー由来 B 細胞の機能評価

異系 UCBC および BMC 移植 16 週後、両キメラ Rag2^{-/-} BALB/c に TNP-KLH を腹腔投与し、その後、末梢血を採取した。得られた血漿を 2 倍連続希釈し、血漿中の TNP 特異的 IgM、IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b および IgG3) 抗体を ELISA 法(吸光度: 490 nm)で検出した。

各群の TNP 特異的抗体産生を平均吸光度 (OD) ± SD で示した。

*p < 0.05 by Tukey-Kramer test; UCBC versus normal BALB/c mice.

考 察

現在、UCBC 移植は血液疾患の治療に広く用いられているが、臨床において異系移植後の免疫能を詳細に解析した例はなく、移植患者の経過観察^{1,2,8)}、基礎研究ではヒト UCBC のインビトロ分化・成熟実験^{9,10)}や異種間移植(ヒト UCBC のマウスへの移入)^{11,12)}の報告に限られている。異系環境下で分化・成熟したドナー由来細胞が正常な機能性を有しているかは検証すべき研究課題の一つである。これらの機能検証には移植モデルが必要である。我々はこれまでに、マウスモデルを用い、同系移植での機能的免疫再構築能を実証している^{14,18)}。本研究では異系移植マウスモデルを用い、移植後に再構築される細胞とともに再構築された獲得免疫系(T細胞およびB細胞)の機能性についても併せて検証した。

移植 120 日後において、同系 UCBC および BMC 移植個体は高い生存率を示したことから(図 2, A 参照)、図 1 で示された UCBC の低 CFU 値は同系移植後の生存率に影響しなかった。一方、異系移植において BMC は高い生存率を維持したものの、UCBC は有意な低下が認められた。そこで UCBC 細胞数を 2.5 倍に増量(2.5×10^6)したところ、その生存率は劇的に回復した。したがって、異系 UCBC 移植の成功の要因として、移植細胞数の増量が挙げられる。長期生着に関与する HSC は BMC と比較して UCBC で少ないことが先行研究でも知られており

(UCBC : 1 cell/ 4×10^4 , BMC : 1 cell/ 2.5×10^4)^{14,18)}、この報告は我々のデータを支持するものである。これに相反して、Chen et al らは UCBC 移植細胞数の増加と生存率亢進の間に正の相関はないことを報告している¹⁹⁾

同系移植 16 週後 UCBC および BMC は、高い生存率とともにドナー由来細胞の生着も高値を示した(図 2, 表 2 参照)。また、異系 BMC 移植は同系移植と同様に高い割合で末梢血にドナー由来 GFP⁺細胞が誘導されていたが、異系 UCBC 移植(1×10^6)では低生存率とともにドナー由来 GFP⁺細胞の生着も見られなかった。さらに生存している個体の末梢血はレシピエント由来の細胞で構築されていた。しかし、UCBC 移植細胞数を 2.5 倍に増加(2.5×10^6)すると移植個体の半数以上がドナー由来 GFP⁺細胞で構築されていた。これらの結果から、致死量 X 線照射後のレシピエントに残存した何らかの免疫細胞が BMC-HSC に比較し

て UCBC-HSC をより容易に排除しているのかもしれない。また、BMC には異系環境下で HSC の生着を亢進させる何らかの細胞が共存しているのかもしれない。実際にこの共存する細胞として先行研究では、BMC 由来間葉系幹細胞との移植²⁰⁾や BMC 由来抑制性細胞を用いた移植^{21,22)}により、異系環境下での生着を亢進させるといった報告がある。UCBC 増量移植により、生着したドナー由来 GFP⁺ 細胞はレシピエント末梢血で成熟した T 細胞、B 細胞、単球および顆粒球に分化していることから、異系環境下でも正常な分化能を有していることが示唆された。

臨床現場において、異系 UCBC 移植は造血器疾患の治療に用いられているが、免疫機能を確立しているかは定かではない。この免疫機能を検証するため T 細胞および B 細胞を欠損している Rag2^{-/-} BALB/c に異系移植を行い、ドナー由来 GFP⁺ 細胞のみで再構築された T 細胞および B 細胞の機能をインビボ実験系で評価した。T 細胞機能評価である皮膚片拒絶反応では、UCBC および BMC 移植キメラ Rag2^{-/-} BALB/c は第 3 者 C3H の皮膚片を拒絶したが (図 5 A 参照)、B6 および BALB/c の皮膚片は拒絶しなかった (データ未掲載)。この結果は、T 細胞レセプター (TCR) のレパートアー形成の過程で B6 または BALB/c の MHC に対して反応する T 細胞が胸腺でダブルネガティブセレクションにより排除されているためと考えられる。また、C3H に対するインビトロ細胞傷害活性は、正常個体と比較して UCBC および BMC 移植キメラ Rag2^{-/-} BALB/c で低値であった。これは上記で述べたダブルネガティブセレクションが C3H に対する TCR レパートアーを狭めたことが一つの要因として考えられる。しかし、この低値は皮膚片の拒絶に大きく影響しなかったことから、UCBC 移植キメラ Rag2^{-/-} BALB/c で再構築されたキラー T 細胞の細胞傷害活性およびこのキラー活性を IL-2 分泌で支えるヘルパー T 細胞の機能が正常であることを示唆する。

一方、B 細胞の機能試験では、TNP-KLH 免疫をした UCBC および BMC 移植キメラ Rag2^{-/-} BALB/c で TNP 特異的 IgM, IgG1, IgG2b 抗体の産生が認められた。この TNP-KLH に対する抗体の産生は T 細胞依存性であり、IgM から IgG へのクラススイッチはヘルパー T 細胞と B 細胞 (CD40/CD40L)^{16,17)} との相互作用およびヘルパー T 細胞から分泌されたサイトカインにより成立する。したがって、こ

の異系 UCBC 移植は B 細胞の抗体産生と併せて、T 細胞との正常な相互作用も構築していることを示している。

本研究の結果、BMC 移植と同様に異系環境下での UCBC 移植は機能性を有した免疫細胞の再構築に有効であることが証明された。すなわち UCBC-HSC は異系環境下で造血器官に生着後、免疫細胞へと分化・成熟し、その再構築された免疫細胞は成熟した機能を有しているということである。ただ、異系 UCBC 移植の生着機能は異系 BMC 移植と比較して著しく低下していることは事実であり、この理由として、UCBC-HSC の数が BMC-HSC と比較して少ないことと併せて UCBC-HSC の未熟さが影響しているのかもしれない。この未熟さとして、UCBC-HSC には造血器官へ遊走する機能が未成熟なものが多数おり、この多数の HSC は異系環境下で免疫学的排除を受けていると考えられる。しかし、一部の UCBC-HSC は BMC-HSC と同様に生着・分化し、長期の成熟した造血につながっていると考えられる。したがって、移植細胞数の増加は、一部含まれる成熟した UCBC-HSC の含有比率を補い、造血器官に達する HSC を数的に亢進させているのかもしれない。次の研究課題として、この未熟な HSC を成熟したものにすることが必至であり、臨床現場で行われる異系 UCBC 移植の早期生着へとつなげたい。

謝 辞

本研究の遂行、論文作成にあたり、終始ご指導を賜りました弘前大学大学院保健学研究科医療生命科学領域生体機能科学分野教授・伊藤巧一先生に深く感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご協力を賜りました弘前大学大学院保健学研究科医療生命科学領域生体機能科学客員研究員・伊藤京子先生に深く感謝申し上げます。統計解析においてご助言を頂きました弘前大学大学院保健学研究科健康支援科学領域老年保健学分野准教授・対馬栄輝先生に感謝申し上げます。そして、本研究にご協力くださいました弘前大学大学院保健学研究科医療生命科学領域生体機能科学・伊藤研究室の皆様感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med.* 1989;321:1174-8.
- 2) Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammand A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, Ortega J, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. *N Engl J Med.* 1997;337:373-81.
- 3) Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, Berkowitz RL, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med.* 1998;339:1565-77.
- 4) Bofill M, Akber AN, Salmon M, Robinson M, Burford G, Janossay G. Immature CD45RA^{low}RO^{low} T cells in the human cord blood. *J Immunol.* 1994;152:5613-23.
- 5) Madrigal JA, Cohen SBA, Gluckman E, Charron DJ. Does cord blood transplantation result in lower graft-versus host disease? *Hum Immunol.* 1997;56:1-5.
- 6) Wang JCY, Doedens M, Dick JE. Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. *Blood.* 1997;89:3919-24.
- 7) Rubinstein P, Rosenfield RE, Adamson JW, Stevens CE. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood.* 1993;81:1679-90.
- 8) Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Army M, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:3828-32.
- 9) Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 2000;109:235-42.

- 10) Rutella S, Bonanno D, Marone M, De Ritis D, Mariotti A, Voso MT, Scambia G, et al. Identification of a novel subpopulation of human cord blood CD34⁻CD133⁻CD7⁻CD45⁺lineage⁻ cells capable of lymphoid/NK cell differentiation after in vitro exposure to IL-15. *J Immunol.* 2003;171:2977-88.
- 11) Yahata T, Ando K, Nakamura Y, Ueyama Y, Shimamura K, Tamaoki N, Kato S, et al. Functional human T lymphocyte development from cord blood CD34⁺ cells in nonobese diabetic/Shi-scid, IL-2 receptor gamma null mice. *J Immunol.* 2002;169:204-9.
- 12) TRaggiari E, Chicha L, Mazzucchelli L, Bronz L, Piffaretti JC, Lanzavecchia A, Manz MG. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science.* 2004;304:104-7.
- 13) Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green Mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 1997;407:313-9.
- 14) Oikawa A, Ito K, Seguchi H, Okabe M, Migishima F, Eshima K, Azuma S, et al. Development of immunocompetent lymphocytes in vivo from murine umbilical cord blood cells. *Transplantation.* 2007;84:23-30.
- 15) Park SY, Kojima M, Suzuki H, Shinohara N. Effective blocking of natural cytotoxicity of young rabbit serum on murine thymocytes by high concentration of glucose in complement-dependent cytotoxicity method. *J Immunol Methods.* 1992;154:109-19.
- 16) Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama S, Bajorath J, et al. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell.* 1993;72:291-300.
- 17) Xu J, Foy TM, Laman JD, Elliott EA, Dunn JJ, Waldschmidt TJ, Elsemore J, et al. Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity.* 1994;1:423-31.
- 18) Oikawa A, Ito K, Seguchi H, Okabe M, Migishima F, Eshima K, Azuma S, et al. Development of immunocompetent lymphocytes in vivo from murine umbilical cord blood cells. *Transplantation.* 2007;84:23-30.

- 19) Chen BJ, Cui X, Sempowski GD, Gooding ME, Liu C, Haynes BF, Chao NJ. A comparison of murine T-cell-depleted adult bone marrow and full-term fetal blood cells in hematopoietic engraftment and immune reconstitution. *Blood*. 2002;99:364-71.
- 20) Li ZY, Wang CQ, Lu G, Pan XY, Xu KL. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on hematopoietic recovery and acute graft-versus-host disease in murine allogeneic umbilical cord blood transplantation model. *Cell Biochem Biophys*. 2014;70:115-22.
- 21) Le Blanc K, Jitschin R, Mougiakakos D. Myeloid-derived suppressor cells in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A double-edged sword? *Oncoimmunology*. 2013;2:e25009.
- 22) Jitschin R, Braun M, Büttner M, Dettmer-Wilde K, Bricks J, Berger J, Eckart MJ, et al. CLL-cells induce IDO^{hi} CD14⁺HLA-DR^{lo} myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote T_{regs}. *Blood*. 2014;124:750-60.
- 23) Bellgrau D. Induction of cytotoxic T cell precursors in vivo. Role of T helper cells. *J Exp Med*. 1983;157:1505-15.
- 24) Stendahl O, Tagesson C, Magnusson KE, Edebo L. Physiochemical consequences of opsonization of *Salmonella typhimurium* with hyperimmune IgG and complement. *Immunology*. 1977;32:11-8.

Abstract

IN VIVO FUNCTIONAL ADAPTIVE IMMUNE RESPONSES IN MICE SUBJECTED TO ALLOGENEIC UMBILICAL CORD BLOOD CELL TRANSPLANTATION

Hiroshi Maeda

Department of Biomedical Sciences, Division of Medical Life Sciences,
Hirosaki University Graduate School of Health Sciences

Using a murine model, we investigated whether allogeneic umbilical cord blood cell (UCBC) transplantation facilitates immune reconstitution with functional maturity in comparison with bone marrow cell (BMC) transplantation. UCBCs and BMCs prepared from green fluorescent protein (GFP)-transgenic C57BL/6 (H-2^b) mice were transferred into BALB/c (H-2^d) mice that had been subjected to lethal total body X-ray irradiation. Although UCBC-transplanted mice showed poorer survival than BMC-transplanted mice for the same number of transplanted cells, increasing the number of transplanted UCBCs improved survival with an increase of donor-derived GFP⁺ cell engraftment. Flow cytometric analysis revealed development of GFP⁺ immune cells of donor origin, including T cells, B cells, monocytes, and granulocytes, in the peripheral blood of both sets of recipient mice. Furthermore, the functional maturity of T and B cells involved in adaptive immunity following allogeneic UCBC- and BMC-transplantation was assessed in T- and B-deficient RAG2^{-/-} BALB/c mice. Both sets of recipients showed complete rejection of third-party C3H (H-2^k) skin grafts and antibody responses to the T cell-dependent antigen, 2,4,6-trinitrophenyl-keyhole limpet hemocyanin, with immunoglobulin class switching. These results suggest that UCBCs have essentially the same ability as BMCs to reconstitute a functional adaptive immune system, even in an allogeneic environment.