

学位請求論文の内容の要旨

領 域	医療生命科学	分 野	生体機能科学
氏 名	前田 浩志		
(論文題目)	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		
主 査	高見 秀樹		
副 査	長内 智宏		
副 査	敦賀 英和		
副 査	伊藤 巧一		
<p><b>【背景と目的】</b></p> <p>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、その移植ソースとして主に骨髄細胞（BMC）と臍帯血（UCBC）が用いられている。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反応（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 不適合下で移植してもGVHD のリスクが低いが、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詳細に解析した例はない。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、MHC 不適合マウスUCBC 移植モデルを用い、HSCの生着性と免疫細胞再構築を経時的に解析すると共に、その機能性について検討した。対象としてBMC 移植も実施した。この研究は臨床でのMHC 不適合UCBC移植の有効性を証明する上で重要である。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>(1) 移植</p> <p>UCBCは雄GFPトランスジェニック(Tg) B6 (H-2<sup>b</sup>) マウスと雌野生型B6 (H-2<sup>b</sup>) マウスの交配18.5日後の胎児から採取した。BMC はGFP-Tg B6マウスの大腿骨及び骨盤から採取した。GVHD 防止のため、あらかじめUCBC 及びBMC に含まれるT 細胞は抗 CD 4 抗体及び抗 CD 8 抗体を伴った補体依存性細胞傷害で枯渇させた。これらGFP<sup>+</sup> UCBC (1.0×10<sup>6</sup> 個および</p>			

(注) 論文題目が外国語の場合は、和訳を付すこと。

【細則様式第 1 - 2 号続き】

2.5×10<sup>6</sup>個) またはGFP<sup>+</sup> BMC (1.0×10<sup>6</sup>個) を致死量X線照射した野生型BALB/c (H-2<sup>d</sup>) (異系移植) および野生型B6 (H-2<sup>b</sup>) (同系移植) マウスの尾静脈より移植した。また再構築されたT細胞およびB細胞の機能評価のため、異系移植したT・B細胞欠損Rag2<sup>-/-</sup> BALB/cを用意した。また異系移植を受けるBALB/c系マウスには、移植前日に抗アシアロ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細胞を枯渇させておいた。

(2) フローサイトメトリー

移植16週後、末梢血中に再構築されたGFP<sup>+</sup>免疫細胞をフローサイトメトリー解析で検出した。さらにGFP<sup>+</sup>免疫細胞中のT細胞 (CD3e), B細胞 (CD45R/B220), マクロファージ (CD11b), 顆粒球 (Ly-6G and Ly-6C), 赤血球 (TER119) の再構築を各lineage特異的蛍光標識抗体染色によって定量化した。

(3) 再構築されたT細胞及びB細胞の機能評価

異系UCBCおよびBMC移植後、Rag2<sup>-/-</sup> BALB/cマウスで構築されたGFP<sup>+</sup> T細胞およびB細胞に対して機能評価を実施した。T細胞機能は、第3者C3H (H-2<sup>k</sup>)マウスに対するインビボ移植皮膚片拒絶反応およびインビトロ細胞傷害活性により評価した。一方、B細胞機能は、T細胞依存性抗原として知られるTNP-KLH接種後のTNPに対する特異的抗体 (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3)産生で評価した。

【結果と考察】

(1) 生存率

移植16週後の生存率は、同系移植群 (1.0×10<sup>6</sup>個)でUCBCは80.0 %、BMCは100 %であった。一方、異系移植群 (1.0×10<sup>6</sup>個)でUCBCは13.3 %、BMCは86.7 %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<sup>6</sup>個) のUCBC投与でその生存率は77.8 %まで回復した。この結果は、UCBC-HSCはBMC-HSCに比較して異系環境下で生着できるHSCの含有率の低下に依存すると考えられる (図1参照)。

(2) 免疫細胞再構築性

移植16週後、末梢血GFP<sup>+</sup>細胞率は同系BMC移植群 (1.0×10<sup>6</sup>個) で91.8 %、異系BMC移植群 (1.0×10<sup>6</sup>個)で87.8 %であった。これに対し同系UCBC移植群 (1.0×10<sup>6</sup>個)は79.3 %、異系UCBC移植 (1.0×10<sup>6</sup>個)は0 %と、異系環境下でのUCBC-HSCの生着の難しさが示された。この結果が上記の生存率低下に反映されたと考えられる。しかし、異系UCBC移植群 (2.5×10<sup>6</sup>個) で末梢血GFP<sup>+</sup>細胞率は78.0 %まで上昇し、その結果、生存率の上昇にも繋がったと推測される。また、すべての末梢血GFP<sup>+</sup>細胞集団が主要免疫細胞であるT細胞、B細胞、単球、顆粒球で構成されていることがフローサイトメトリー解析で確認出来た。

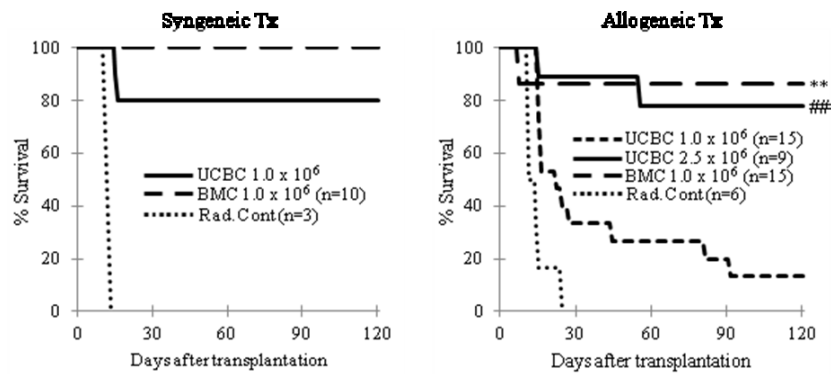


図1 生存率

したがって、異系UCBC移植の成功要因の1つに移植細胞数の増加が挙げられる。

### (3) 機能性

T・B細胞欠損Rag2<sup>-/-</sup> BALB/cマウスに異系UCBCおよびBMC移植を行い、末梢血中にGF<sup>+</sup>T細胞およびB細胞が構築されているかをフローサイトメトリーで確認した。これらUCBCおよびBMCキメラマウスを用いて下記の機能解析を行った。

T細胞の機能試験では、両キメラマウスは第3者のC3Hマウス(H-2<sup>k</sup>)の移植皮膚片だけを特異的に拒絶した。UCBCキメラマウスはBMCキメラマウスと正常BALB/cに比べ、2日の拒絶反応遅延が認められたものの、この拒絶反応にはキラーT細胞の構築と共に、このキラーT細胞の成熟をIL-2サイトカイン分泌で支えるヘルパーT細胞の構築も不可欠である。またこの構築されたキラーT細胞のC3Hに対する特異的細胞傷害活性はわずかながらインビトロ試験でも検出することが出来た。

次にB細胞の機能試験では、TNPに対する特異的IgM, IgG1, IgG2b抗体産生が正常BALB/cマウスと同様に、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。

### 【結語】

本研究の結果、UCBC移植はBMC移植と同様に異系環境下での造血機能回復に有効であることが証明された。すなわちUCBC-HSCは異系環境下で骨髄などの造血器官に生着した後、免疫細胞へと分化・成熟し、その構築された免疫細胞は機能的成熟性を有しているということである。UCBC-HSCはBMC-HSCと異なり異系環境下で移植されてから造血器官に到達するまでに時間を要し、この間に宿主から何らかの免疫学的排除を受けている可能性がある。移植細胞数の増加は、このような免疫学的排除の中で造血器官に到達するUCBC-HSCの数的確率を上げているのかもしれない。

【細則様式第 1－2 号続き】

学位論文のもととなる研究成果としての筆頭著者原著

論 文 題 目	In vivo functional adaptive immune responses in mice subjected to allogeneic umbilical cord blood cell transplantation
著 者 名	Hiroshi Maeda
掲載学術誌名	Hirosaki Medical Journal
巻, 号, 項	66 巻, 2-4 号, 162-175 項
掲載年月日	掲載日未定