



Pretreatment of recipients with
mitomycin-C-treated dendritic cells induces
significant prolongation of cardiac allograft
survival in mice

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 李, 宝興 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/324

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 4 2 3 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 3 月 9 日
氏 名	李 宝 興		
論文題目	Pretreatment of recipients with mitomycin-C-treated dendritic cells induces significant prolongation of cardiac allograft survival in mice (レシピエントに対する Mitomycin-C 処理樹状細胞を用いた前処置は、マウス同種心移植における移植心生着期間を著明に延長させる)		

博士(医学) 李 宝 興

論文題目

Pretreatment of recipients with mitomycin-C-treated dendritic cells induces significant prolongation of cardiac allograft survival in mice

(レシピエントに対するMitomycin-C処理樹状細胞を用いた前処置は、マウス同種心移植における移植心生着期間を著明に延長させる)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

Mitomycin-C(MMC)処理をした脾臓細胞の投与は、ラットの同種心移植グラフトに対してドナー特異的無反応を誘発することが知られている。しかし、そのメカニズムについては未だ十分に解明されていない。一方、樹状細胞(Dendritic Cells: DCs)は免疫応答の惹起および制御に重要な役割を果たしていることはよく知られている。そこで、今回、マウス同種心移植における移植片生着に対するMMC処理したドナー由来DCsの影響について検討した。

〔材料ならびに方法〕

動物：ドナーとして雄性BALB/c(H-2^d)マウスを用い、レシピエントとして雄性C57BL/6(H-2^b)マウスを用いた。比較対照としては、雄性C3H/HeJ(H-2^k)マウスをドナーとし、雄性C57BL/6(H-2^b)マウスをレシピエントとした。これらの動物を以下の7群に群別した。すなわち、第1群：DMEM投与のみの対照群、第2群：GM-CSFとIL-4で培養後、MMC無処理BALB/cマウスDCsの投与群、第3群：GM-CSFとIL-4で培養後、MMC処理DCsの投与群、第4群：GM-CSFとIL-3で培養後、MMC処理DCsの投与群、第5群：GM-CSFで培養後、MMC処理DCsの投与群、第6群：GM-CSFで培養DCsの投与群、第7群：GM-CSFとIL-4で培養後、MMC処理DCsの投与群で、C3H/HeJマウスをドナーとした群である。

DCsの調整：ドナーの骨髄細胞(2×10^6)を10%胎児牛血清添加DMEM培養液で培養し、これに0.1ng/mLのマウスGM-CSF単独、およびマウスGM-CSFに0.1ng/mLのマウスrecombinant IL-3またはIL-4併用したものを添加することでDCsを誘導した。MMC処理：得られたDCs(8×10^6)を50 μ g/mLのMMCで37℃、30分間培養した。DCsによるマウスの前処置：麻酔したC57BL/6マウスに $8 \times 10^6/0.5$ mLのMMC処理、または未処理DCsを陰茎静脈から投与した。

心臓移植：ドナーのBALB/cまたはC3H/HeJマウスから心臓を摘出し、DCs投与10日後のレシピエントC57BL/6マウスに異所移植し、心臓移植片の生着状態を経時的に観察した。

RT-PCR：移植後5日目に移植片のIFN- γ とIL-4mRNAの発現をRT-PCRで検出した。また、移植後5日目に移植心臓を摘出し、病理組織学的検討を行った。

〔結果〕

C57BL/6レシピエントにおけるBALB/cの移植心生着期間は、第1群(6.7 ± 0.4 日)に比較して、第3群で有意に延長した(25.7 ± 1.7 日)。また、第4群の移植心は(10.1 ± 2.1 日)、対照群と比較しても有意に長く生着した。C3H/HeJマウスをドナーとして施行した第7群は、対照群と同様の拒絶を示し、移植心は生着しなかった。

移植後5日目に摘出した移植心の組織学的所見は、対照群では移植片の静脈周囲に単核球の著明な浸

潤がみられたが、第3群ではこれらの細胞浸潤は軽度であった。

IFN- γ mRNAの発現は、対照群と第4群の移植片でみられたが、第3群ではみられなかった。また、第3群ではIL-4 mRNAの発現が僅かに認められた。

〔考察〕

IFN- γ を産生する1型ヘルパーT細胞(Th1)とIL-4を産生する2型ヘルパーT細胞(Th2)は互いに影響を及ぼし、どちらかが優位となることが*in vivo*で報告されている。今回の実験結果では、対照群の心臓移植片においてIFN- γ mRNAの発現と単核細胞浸潤の著明な増加が観察されたが、IL-4 mRNAの発現は軽度であった。一方、第3群ではIL-4 mRNAの発現は対照群と同様に軽度であったが、単核細胞浸潤はわずかであり、IFN- γ mRNAの発現は抑制されていた。したがって、対照群の移植片で見られた著明な単核細胞浸潤は主にTh1細胞であり、第3群の移植片で見られた軽度の浸潤細胞は主にTh2細胞であると推察される。これらの結果は、Th1細胞の抑制がマウス心移植のグラフト長期生着に関与していることを示している。さらに、MMCのTh1細胞抑制機序として、Th1細胞を活性化させる働きのあるDCsの接着分子や共刺激分子をMMCが抑制している可能性が示唆された。

〔結論〕

以上より、MMC処理した成熟DCsは、Th1細胞活性を抑制することによりマウスのドナー特異的心臓同種移植片の生着を延長させると考えられた。

論文審査の結果の要旨

臓器移植における拒絶反応は移植グラフトに対する細胞性免疫と液性免疫により引き起こされる。タクロリムス、シクロスポリンはリンパ球など免疫担当細胞の機能を制御することにより、拒絶反応を抑制し移植グラフトの生着率を著しく向上させる。しかし、これら薬剤の長期投与はレシピエントに様々な臓器障害を引き起こすため、慎重に用いられなければならない。そこで、レシピエントにより負担の少ない拒絶反応抑制法が模索されている。このような方法の一つに、ドナー細胞にたいする免疫寛容(トレランス)の誘導があげられる。トレランスとはある特定の抗原にのみ免疫学的に無反応となる状態のことで、トレランスになったレシピエントでは移植グラフトに対して拒絶反応がおきないため、臓器生着期間を延長させ、同時に生着率を向上させる。

トレランスを誘導する方法の一つに、ドナー細胞の静脈内注入が知られているが、そのメカニズムはまだ十分には解明されていない。抗ガン剤であるマイトマイシンC(MMC)は、*in vitro*臓器拒絶反応ともいべき混合リンパ球反応において、ドナーに相当する細胞群の反応を抑制する目的で用いられている。近年、ラットにおいて、MMC処理した脾細胞を静脈内注入投与することにより、ドナーに特異的なトレランスを誘導できること、さらにこのようなトレランスラットでは同種心移植グラフトの拒絶反応を遅延することができることが明らかになった。脾細胞はリンパ球をはじめとしてさまざまな細胞から構成されており、どのタイプの細胞がトレランス誘導に関与するか興味を持たれる。

一方、樹状細胞はさまざまな臓器に分布し、侵入してくる異物を最初に認識するsentinel細胞として機能する。さらには、リンパ球との相互作用のなかで免疫反応をプラスあるいはマイナス方向にシフトする機能ももつ。したがって、樹状細胞は免疫反応の制御という面から極めて中心的な細胞群であるとい

える。樹状細胞は脾細胞中にも存在しており、ドナー細胞の静脈内注入によるトレランス誘導に果たす役割が注目されている。

申請者は樹状細胞を*in vitro*でさまざまな分化させたのち、MMCで処理し、これら細胞を静脈内注入することによりトレランスが誘導できるかどうかをマウスにおいて検討した。用いられた動物および実験方法は適切であった。すなわち、レシピエントはH-2^b、ドナーはH-2^dあるいはH-2^kのハプロタイプをもつマウスを用いた。樹状細胞は骨髓細胞をGM-CSF、IL-4、IL-3の存在下に培養することにより得た。これら樹状細胞をMMC処理後、レシピエントマウスに静脈内注入し、10日後にドナー心臓を異所移植し、その生着の状態を観察した。

得られた結果は以下の3点である。

- (1) GM-CSF、IL-4あるいはGM-CSF、IL-3刺激により成熟した樹状細胞を用いてトレランスを誘導する場合、MMC処理が必要であった。一方、GM-CSF単独刺激による未分化樹状細胞を用いる場合、トレランス誘導にMMC処理は必要なかった。
- (2) トレランス誘導マウスでは移植心は長期にわたり生着し、その組織学的検討では、炎症性細胞浸潤はわずかであった。
- (3) RT-PCRによる検討では、拒絶された移植片ではインターフェロン γ mRNAの発現が強く見られたが、長期生着した移植心ではIL-4mRNA発現がわずかに認められた。

これらの結果は、樹状細胞の静脈内注入によるトレランス誘導マウスでは、ドナー抗原に特異的に反応する2型ヘルパー細胞が活性化され、移植片を拒絶する1型ヘルパー細胞の機能を抑制することにより、移植片が長く生着する可能性が示唆された。また、MMCの役割は推測の域をでないが、樹状細胞上の接着分子や共刺激分子を構造的に修飾することが考えられた。MMCで処理した樹状細胞を用いるという極めて簡便な方法でトレランスが誘導できたことは、臓器移植における移植片拒絶を制御する新しい戦略の開発に大きく寄与するものと思われる。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 樹状細胞機能におよぼすNK細胞の影響について
- 2) GM-CSF、IL-3、IL-4の樹状細胞の分化におよぼす影響について
- 3) 樹状細胞注入後のマウスの異常所見について
- 4) 心臓を拒絶実験に用いた理由について
- 5) 腎臓における急性および慢性拒絶反応について
- 6) トレランス誘導・維持におけるTGF- β の役割について
- 7) CD4細胞およびCD8細胞の拒絶反応における役割について
- 8) 多核白血球の浸潤と拒絶反応との関連について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	瀧	川	雅	浩
	副査	宮	本	愛	副査 大橋 弘幸