



Title	The significant role of intragraft lymphoid tissues in preventing IDDM (insulin-dependent diabetes mellitus) recurrence in whole pancreaticoduodenal transplantation
Author(s)	鳥, 正幸
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41662">https://hdl.handle.net/11094/41662</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	とり まさ ゆき 鳥 正 幸
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 5 3 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成11年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	The significant role of intragraft lymphoid tissues in preventing IDDM (insulin-dependent diabetes mellitus) recurrence in whole pancreaticoduodenal transplantation (全膵十二指腸移植における IDDM 再発抑制に対するグラフト内リン パ組織の意義)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 白 倉 良 太  (副査) 教 授 松 田 暉 教 授 宮 坂 昌 之

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

近年、全膵十二指腸移植 (PDTx) は良好な臨床成績が得られ、インスリン依存型糖尿病 (IDDM) に対する治療法として定着してきたが、膵島移植 (ITx) は未だ実験的段階であり、満足な治療成績が得られていない。その理由として、膵島分離の手技が確立していないため膵島細胞の十分な数や機能を得ることが困難であるためとされている。しかしわれわれは、これに加えて免疫学的特性、つまり PDTx ではグラフトとともに膵周囲リンパ節や十二指腸の粘膜固有層、粘膜内に存在する intraepithelial lymphocytes (IEL), lamina propria lymphocytes (LPL) といったリンパ組織が持ち込まれるが、ITx ではこれが欠如しているという違いが重要ではないかと考えている。最近 T 細胞の新たなカテゴリーとして登場した、T cell レセプターと NK レセプターの両者を有し、IL-4 産生能を持つ NKR-P1<sup>+</sup> TCR  $\alpha\beta$ <sup>+</sup> (NKT) cells が IDDM の発症に関与するとして注目されている。本研究では、拒絶は起こらないが、IDDM が再発する Wistar-Furth (WF) から糖尿病を自然発症する diabetes-prone BB (DP-BB) への膵移植モデルを用いて、移植後の IDDM 再発抑制メカニズムにおけるグラフト内リンパ組織中の NKT 細胞の意義を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法】

実験群は以下の 7 群に分けて検討した。

I 群：無処置 WF ラット (RT1<sup>u</sup>, RT6.2) (n = 5)

II 群：IDDM 発症後インスリン治療を行った DP-BB ラット (RT1<sup>u</sup>, RT6.1) (n = 4)

#### [膵島移植群]

膵島移植 (ITx) はコラゲナーゼ消化法と Ficoll gradation により分離した約 2000 個の膵島をレシピエントの腎皮膜下へ移植した。

III 群：IDDM 発症後に、WF ラットの膵島を移植した (n = 4)

IV 群：III 群に抗 ICAM-1 / LFA-1 抗体を移植当日より 6 日間、連続計 6 回 (1 mg/kg) 腹腔内に投与した (n = 3)

#### [膵単独移植]

膵単独移植 (PATx) は、顕微鏡下に膵十二指腸グラフトから十二指腸及び膵周囲リンパ節を除き S. Lee の方法に準じて腹部異所性に移植した。

V 群: IDDM 発症後に、WF ラットの PATx を行い、さらに同抗体を移植後 1 週間後より計 6 回 (1 mg/kg, 2 回/週) 腹腔内投与した。(n = 3)

#### [膵十二指腸移植]

膵十二指腸移植 (PDTx) は、S. Lee の方法に準じて腹部異所性に行った。

VI 群: IDDM 発症後に、WF ラットの PDTx を行った (n = 4)

VII 群: IDDM 発症後に、WF ラットの PDTx を行い、さらに同抗体を移植後 1 週間後より計 6 回 (1 mg/kg, 2 回/週) 腹腔内投与した (n = 7)

移植後経時的に血糖値を測定し、2 日間連続して 300mg/dl 以上の再上昇と組織学的所見 (insulinitis) をもって再発とし、それぞれの群について IDDM 再発までの期間を測定した。FACSscan (3 color) を用い、RT6 の allotype をマーカーにキメリズムの解析を行った (donor は RT6.2 で recipient は RT6.1 gene carrier である)。血清中サイトカインは ELISA 法にて測定した。IEL, LPL の分離は Lyscom らの方法に準じて行い、膵周囲リンパ節のリンパ球は、顕微鏡下で摘出したリンパ節から従来の方法で分離した。肝臓のリンパ球は Vujanovic らの方法で分離した。

#### 【成績】

(1) 移植成績: 組織学的に見て全ての群で拒絶反応は認めなかった。III~VI 群の再発までの期間は各々  $27.5 \pm 7.9$ ,  $26.0 \pm 5.0$ ,  $38.0 \pm 9.0$ ,  $59.3 \pm 12.7$  日で、全例再発した。VII 群のみ 60 日以上 (そのうち 4/7 は >100 日) の観察期間中再発を認めなかった。

(2) フローサイトメトリーによる脾、肝の解析:

1) 脾リンパ球中の T 細胞 (TCR  $\alpha\beta^+$ ) 数および NKT 細胞数は、

実験群	I	II	III	IV	V	VI	VII
T-cell ( $\times 10^7$ )	17.0	2.0	2.2	2.0	1.9	3.0	9.0
NKT ( $\times 10^6$ )	13.0	0.9	1.0	1.0	1.8	1.5	11.0

2) 非再発ラット (VII 群) の脾においては  $45.6 \pm 10.2\%$  (RT6.2<sup>+</sup>T/panT) のマクロキメリズムが成立していた。脾臓の RT6<sup>+</sup>T 中の NKT の割合 (NKT/RT6<sup>+</sup>T) は I, II, V, VI, VII 群でそれぞれ  $12.7 \pm 1.9$ ,  $<1$ ,  $<1$ ,  $<1$ ,  $23.1 \pm 4.0\%$  であり、RT6<sup>+</sup>NKT 細胞数 ( $\times 10^6$ ) は各々 11.0,  $<1$ ,  $<1$ ,  $<1$ , 9.3 であった。一方 NKT/RT6<sup>-</sup>T は各々  $4.3 \pm 1.3$ ,  $4.0 \pm 1.1$ ,  $5.0 \pm 2.0$ ,  $5.1 \pm 3.3$ ,  $4.7 \pm 2.1\%$  であった。

3) 非再発ラット (VII 群) の RT6.2<sup>+</sup>NKT 細胞は 96% が CD4<sup>+</sup> であった。

4) 非再発ラットでは肝においても  $32.1 \pm 0.2\%$  のマクロキメリズムが成立していた。肝における NKT/T は I, II, VI, VII 群でそれぞれ  $15.0 \pm 1.7$ ,  $7.6 \pm 0.3$ ,  $8.9 \pm 1.3$ ,  $28.3 \pm 11.3\%$  と、VII 群において有意に増加していた。

(3) 血清中サイトカイン発現量は IFN- $\gamma$  が全ての群で感度以下 ( $<13\text{pg/ml}$ ) であったのに対し、IL-4 については I 群で  $118.7 \pm 87.9\text{pg/ml}$ , VII 群で  $158.8 \pm 28.0\text{pg/ml}$  で、他の群ではすべて感度以下 ( $<15\text{pg/ml}$ ) であった。

(4) WF 膵十二指腸グラフトのリンパ組織 (IEL, LPL, 膵周囲リンパ節) の解析 (n = 4) において、NKT/T は IEL, LPL, 膵周囲リンパ節でそれぞれ  $4.2 \pm 0.5$ ,  $0.7 \pm 0.2$ ,  $0.8 \pm 0.1\%$  と IEL で有意に高かった。一方、NKT 細胞の絶対数 ( $\times 10^4$ ) はそれぞれ  $20.4 \pm 7.5$ ,  $1.5 \pm 0.6$ ,  $17.1 \pm 2.9$  であり、IEL 及び膵周囲リンパ節ではほぼ同数であった。

#### 【総括】

WF を donor, DP-BB を recipient とした IDDM 再発モデルで以下の結果を得た。

(1) 抗 ICAM-1/LFA-1 抗体を移植後投与した PDTx モデルにおいてのみ非再発が得られたが、抗体非投与の場合や、リンパ組織を除いた PATx の場合、さらに ITx では抗体を投与しても IDDM の再発を認めた。

(2) 非再発のラットの脾臓においては T 細胞数がよく保たれていた。更に脾臓および肝臓で NKT 細胞数が他群に比して有意に高値で、WF に匹敵していた。脾 T 細胞の約 46% が RT6.2<sup>+</sup> でマクロキメリズムを呈し、NKT 細胞の 86

%が donor 由来の RT6<sup>+</sup>キメラ T 細胞で、この RT6<sup>+</sup>NKT 細胞数は、再発ラットに比し有意に増加していた。

- (3) 非再発ラットの RT6.2<sup>+</sup>NKT 細胞は96%が CD4<sup>+</sup>で、血清中サイトカインは IL-4 が WF と同程度検出されたが、DP-BB ラットでは感度以下であった。
- (4) DonorWF グラフトにおいて、T 細胞中の NKT 細胞の割合は IEL で高値であったが、NKT 細胞数では IEL と脾周囲リンパ節ではほぼ同数で、LPL で低値であった。
- (5) 以上より、抗接着分子抗体を投与した PDTx においては、donor 由来の RT6<sup>+</sup>NKT 細胞が高率に存続し、IL-4 産生による Th2 優位の免疫応答が誘導され、IDDM の再発が抑制されている可能性が示された。

#### 論文審査の結果の要旨

IDDM の治療法として全膵十二指腸移植と膵島移植が臨床応用され、前者は最近安定した成績が得られるようになっている。後者は膵島分離の手技が未だ確立するに至っていないが動物実験のレベルでは前者に匹敵する効果が得られている。

後者ではグラフト周囲リンパ節や十二指腸の粘膜固有層や粘膜内に存在する intraepithelial lymphocytes, lamina propria lymphocytes などリンパ組織の役割が移植後の IDDM の再発に重要であるとして注目されている。

本研究はラットの IDDM 再発モデルを用いて、再発のメカニズムを明らかにすることを目的に行われたもので、グラフトが持ち込むリンパ組織中の NKT 細胞の関与について解析している。

糖尿病を自然発症する DP-BB ラットをレシピエントに majorMHC が同じ WF ラットの膵臓または膵島を移植すると60日以内に IDDM が再発した。全膵に十二指腸をつけたまま移植した群に術後7日目より抗 LFA-1 / ICAM-1 抗体を週2回の割合で計6回腹腔内投与した場合に100日以降も IDDM の発症が抑えられた。膵島移植および十二指腸を極力取り除いた膵移植の場合は抗体投与の有無に関わらず IDDM が再発した。肝臓および脾臓内の T 細胞中 NKT 細胞の割合をみると非再発群で有意に高く、RT6 陽性 NKT 細胞が効率に認められた。グラフトの十二指腸のリンパ組織中に NKT 細胞が豊富に認められること、血中の IL-4 が高値であったこと、から RT6 陽性 NKT 細胞のキメラ状態の成立が重要で、Th2 有意の免疫応答が誘導され IDDM の再発が抑制されることを明らかにしたもので、本論文は博士の学位に十分値するものと考え