



| | |
|--------------|--|
| Title | Donor-Specific Tolerance by Perioperative Intrathymic Injection of Bone Marrow Cells in the Rat Cardiac Allograft Model |
| Author(s) | 伊藤, 章 |
| Citation | 大阪大学, 2000, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/42760 |
| 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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

| | |
|------------|---|
| 氏名 | 伊藤 章 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 第15602号 |
| 学位授与年月日 | 平成12年5月8日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当 |
| 学位論文名 | Donor-Specific Tolerance by Perioperative Intrathymic Injection of Bone Marrow Cells in the Rat Cardiac Allograft Model (ラット心移植モデルにおける周術期のドナー骨髄細胞の胸腺内移入による抗原特異的免疫寛容) |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 松田 噴 |
| | (副査) 教授 白倉 良太 教授 宮坂 昌之 |

論文内容の要旨

【目的】

最近ドナーのアロ抗原をレシピエントの胸腺内に直接移入することにより、ドナー抗原特異的な免疫寛容を得ようとする intrathymic injection (IT) が注目されているが、そのメカニズムに関しては未だ不明である。これまでの IT による寛容誘導の方法では移植前1-3週間にドナー抗原投与が行われており、死体臓器移植には応用できない。そこで本研究は、ラット同種心移植の系にドナー骨髄細胞を移植と同時に胸腺内に移入することにより免疫寛容を図り、そのメカニズムを移植後1ヶ月(短期)と6ヶ月(長期)において、免疫学的及び分子生物学的方法を用いて解析した。

【方法】

- 1) モデル: ドナーを BUF (RT1^b)、レシピエントを WF (RT1^a)とした。ラット腹部異所性心移植モデルを用いて、心移植の当日にドナーの骨髄細胞を 1×10^6 個 IT し、免疫抑制法として ALS を移植当日と翌日にそれぞれ 0.5ml 腹腔内へ、さらに FK506 を移植前日、当日、翌日に 1 mg/kg 筋肉内投与した。移植心を腹壁より触診し、その拍動の停止をもって拒絶時とし、病理組織学的にも拒絶を確認した。実験群を10群(1表)に分類し検討した。
- 2) 免疫学的検討: 脾細胞を用いた混合リンパ球反応 (MLR) を IL-2 非存在下及び存在下で検討した。限界希釈法 (LDA) を用いて、ドナー抗原に対する IL-2 産生ヘルパー T 細胞 (fThp) 及び細胞傷害性 T 細胞 (fTc) の前駆細胞頻度を測定した。
- 3) skin graft challenge: 長期生着したラットに対し、ドナー及び third-party (LEW) の皮膚を移植し、免疫寛容の抗原特異性を検討した。
- 4) RT-PCR 法: 拒絶ならびに寛容ラットのグラフトにおけるサイトカイン、特に IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-10 の mRNA の発現を RT-PCR 法にて測定した。

【結果】

- (1) 移植成績: FK+ALS (4群) 及び IT (WF) +FK+ALS (5群) のグラフト平均生着日数 (MST) はそれぞれ 30.8 ± 3.8 日、 28.8 ± 2.7 日と無処置 (1群) の 6.6 ± 0.6 日に比して、有意なグラフトの生着延長を認めた。IT (BUF) +FK+ALS (10群) は全例、平均218日以上の長期生着延長を認めた。
- (2) 免疫学的検討: a] MLR; 10群の長期生着モデルの移植後1ヶ月目の MLR では、ドナー及び third-party に対

| Group | I.T. | ALS | FK506 | Graft Survival (days) | MST±SD(days) |
|-------|------|-----|-------|--------------------------|---------------|
| 1 | (-) | (-) | (-) | 5,6,6,7,7,8 | 6.6 ± 0.6 |
| 2 | (-) | (-) | (+) | 9,15,20,22,28 | 18.8 ± 7.2 |
| 3 | (-) | (+) | (-) | 13,18,18,26,28 | 21.2 ± 7.2 |
| 4 | (-) | (+) | (+) | 25,28,30,32,35 | 30.8 ± 3.8 |
| 5 | WFu | (+) | (+) | 26,27,27,29,31,33 | 28.8 ± 2.7 |
| 6 | BUF | (-) | (-) | 6,8,8,8,10 | 8.0 ± 1.4 |
| 7 | BUF | (-) | (+) | 38,40,44,56,60 | 47.6 ± 9.8 |
| 8 | BUF | (+) | (-) | 52,58,62,75,80 | 65.4 ± 11.7 |
| 9 | (-)* | (+) | (+) | 40,45,60,62,65 | 54.4 ± 11.1 |
| 10 | BUF | (+) | (+) | >185,>190,>208,>250,>258 | >218.2 ± 30.3 |

* : BUFの骨髓細胞をintravenousに投与した。

する増殖応答の著明な低下を認めた。また移植後6ヶ月目では、naiveのレベルまで増殖応答の回復を認めた。b] LDA ; BUF抗原に対するfThp及びfTcp頻度は、移植後1ヶ月目でnaiveに比して有意に低下しており、ドナー抗原特異的な免疫担当細胞のクローンサイズの縮小を認めた。しかしながら、移植後6ヶ月目では、同クローンサイズはMLRの結果と同様にnaiveのレベルまで回復する傾向を示した。

(3) skin graft challenge : 10群の長期生着したラット(n=3)に対して、心移植後130日目に皮膚移植を行うと、third-partyのLEW skinは9.3±1.2日で拒絶されたのに対し、ドナー skinのMSTは118.7±6.0日以上の長期生着を認めた。

(4) RT-PCR法：グラフトにおけるサイトカインの発現を検討すると、移植後1ヶ月目のグラフトではTh1(IFN-γ、IL-2)とTh1(IL-4、IL-10)とともにup regulationが認められた。しかし、移植後6ヶ月目の寛容ラットのグラフトではsyngeneic graftと同様にIFN-γ以外のサイトカインのdown regulationを認めた。

【総括】

1) 心移植と同時にドナーの骨髓細胞をITし、周術期のFK並びにALSの短期使用により、ドナー抗原特異的な免疫寛容が得られた。

2) 寛容ラットの移植後1ヶ月目(短期)の解析では、非特異的な免疫応答の低下を認め、グラフトのサイトカインはTh1、Th2とともにup regulationされていた。一方、移植後6ヶ月目(長期)では、それぞれの免疫応答はnaiveのレベルまで回復し、グラフトのサイトカインはIFN-γを除き、Th1、Th2とともにdown regulationされていた。

3) 以上より、術当日のITにおいても、周術期に短期間FK506を使用することにより胸腺でのドナー抗原に対するT細胞の再教育が行われ、抗原特異的な寛容が誘導されることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

ドナーのアロ抗原をレシピエントの胸腺内に直接注入することにより、ドナー抗原特異的な免疫寛容を得ようとするintrathymic injection(IT)が注目されているが、そのメカニズムに関しては未だ不明である。これまでのITによる寛容誘導の方法では移植前1-3週間にドナー抗原投与が行われており、死体臓器移植には応用できない。そこで本研究は、ラット同種心移植の系にドナー骨髓細胞を移植と同時に胸腺内に移入することにより免疫寛容を図り、そのメカニズムを移植後1ヶ月(早期)と6ヶ月(遠隔期)において、免疫学的及び分子生物学的方法を用いて解析することを目的とした。

ドナーをBUF(RT1^b)、レシピエントをWF(RT1^a)としたラット腹部異所性心移植モデルを用いて、心移植の当日にドナーの骨髓細胞を1X10⁶個ITし、免疫抑制法としてALSを移植当日と翌日にそれぞれ0.5ml腹腔内へ、さらにFK506を移植前日、当日、翌日に1mg/kg筋肉内投与した。このモデルの平均生着期間(MST)は全例、218日以上であり長期生着延長を認め、またドナーの皮膚もMSTは118日以上と長期生着し、ドナー特異的な免疫寛

容を誘導し得た。この寛容ラットにおける免疫学的及び分子生物学的解析では、移植後1ヵ月目の解析で非特異的な免疫応答の低下を認め、グラフトのサイトカインは Th1, Th2ともに検出されていた。一方、移植後6ヵ月目では、それぞれの免疫応答は naive のレベルまで回復し、グラフトのサイトカインは IFN- γ を除き、Th1・Th2ともに down regulation されていた。

以上より、心移植当日にドナーの骨髄細胞を IT し、さらに周術期に短期間の FK506 及び ALS を使用することによりドナー抗原特異的な免疫寛容が誘導され、死体臓器移植への応用特に、小児の移植において期待される新しい知見であり、学位に値すると考えられる。