

Title	MHC不適合でのマウス骨髄移植モデルにおけるアロ反応性T細胞の移入量と増殖・アポトーシスの関係について
Author(s)	藤岡, 龍哉
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43900
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	藤岡龍哉
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 17628 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	MHC 不適合でのマウス骨髄移植モデルにおけるアロ反応性 T 細胞の移入量と増殖・アポトーシスの関係について
論文審査委員	(主査) 教授 川瀬 一郎 (副査) 教授 金倉 讓 教授 青笹 克之

論文内容の要旨

【目的】

AICD (activation induced cell death) は同種造血細胞移植後の早期に大量に起こっていることが報告されている。AICD は反復して同じ抗原刺激を受けることにより誘導されるが、その抗原刺激の強度や反応する T 細胞の活性化段階などにより、さらに増殖をするかアポトーシスに陥るかが左右される。しかし反応する T 細胞の量 (抗原量に対する比率) と AICD の強度の関連性については明らかとなっていない。そこで我々はマウス同種造血細胞移植モデルを用いて、T 細胞の移入量とそれらの活性化・増殖・アポトーシスの変化を観察した。

【方法ならびに成績】

最初に MHC 不適合のレシピエントに移入した T 細胞がアロ抗原に反応してどのように増殖して行くかを観察するために、CFSE (carboxylfluorescein diacetate succinimidyl ester) でラベルしたドナーマウス (C57BL/6) の脾細胞を放射線照射 (8.5 Gy) したレシピエントマウス (BALB/c) に照射から 24 時間後に経静脈的に移入した。移入して 24~72 時間後にレシピエントマウスの脾臓を取りだしホーミングしているドナー由来 T 細胞をフローサイトメトリーにより解析した。24 時間後まではほとんど細胞分裂は認められず、48 時間後に 5 回、72 時間後には 8 回の分裂を認めた。mHa 不適合の組み合わせ (ドナーマウスに DBA/2 を使用) では 72 時間後でも増殖は非常に弱く、これらの強い増殖反応はアロ MHC 抗原に対するものだとことが確認された。

さらに活性化の指標として CD44 の発現レベルを調べると、細胞分裂の開始と同時に CD44^{high} となりだし、3 回の分裂を行うまでに大部分の T 細胞が CD44^{high} となった。Fas の発現も細胞分裂の開始とともに認められた。それに対して FasL は 5 回から 8 回の分裂の後に 10% から 15% ほどの陽性 T 細胞が観察された。

次にアポトーシスの頻度を Annexin-V を用いて観察した。5 回の細胞分裂後よりアポトーシス細胞が出現し、分裂回数を増すごとにアポトーシス細胞の割合が増加した。

また、移入した脾細胞の量とその後の増殖の強度の関係について調べた。移入細胞量の多い $1.0 \sim 2.0 \times 10^7$ では著しい増加を認め、 2.0×10^7 の場合には約 30 倍の増加を認めたが、移入細胞数が少なくなるにつれて増加の割合が強く抑制されていることが明らかとなった。

移入細胞量とアポトーシスの強度の関係を検討した。移入細胞量が少なくなるにつれてアポトーシスを起こす割合が多くなっており、アポトーシスが移入細胞量が少ない場合の細胞増加の抑制の原因となっていることが示唆された。

さらに FasL の発現とアポトーシスの関係を調べた。FasL を発現している T 細胞のほぼ全てがアポトーシスを起こしており、移入細胞数が少ないほど FasL を発現している細胞の割合が多いことがわかった。これらの結果よりこの実験系で認められるアポトーシスには Fas/FasL シグナルの関与があり、また移入細胞量が少ない場合のアポトーシスの増加は FasL の発現の増加が原因となっていることが推察された。

【総括】

今回のマウスモデルによる実験系で、GVH 反応 (graft-versus-host reaction) の早期においては移入細胞数が少なくなるにつれてドナー由来 T 細胞の増加が抑制されていることが示された。移入細胞数とアポトーシスの頻度との関係を調べたが、移入細胞数が減少するにつれてアポトーシスの頻度が著明に増大していることが明らかとなった。これらの結果より移入細胞数が少ない場合にみられる増加の抑制効果は、アポトーシスの頻度の増加が大きな原因となっているということが示唆された。

またドナー由来の T 細胞のうち FasL を発現しているもののほぼ全てがアポトーシスを起こしており、そして FasL の発現は分裂回数が進むほど、また移入細胞数が少ないほど増加しており、アポトーシスの頻度の変化と一致していた。また、T 細胞が十分に活性化され機能が成熟した後にアポトーシスが起こっていた。これらのことより、この実験系で認められるアポトーシスは Fas/FasL シグナルが関与している AICD であることが強く疑われた。

今回我々の実験系に置いて *in vivo* で MHC 不適合のアロ抗原に対して反応・活性化しているドナー由来 T 細胞のアポトーシスの強度は、T 細胞の移入量により強く影響を受けていること、そしてそのアポトーシスの強度の変化によりその後のドナー由来 T 細胞の増殖の度合いが大きく異なってくることが示された。

論文審査の結果の要旨

近年、造血細胞移植に際して移植片とともに移入されたドナー由来の成熟 T 細胞が、強い増殖の後に AICD (activation-induced cell death) を大量に起こしているという報告があり、また、移植片に混入している T 細胞を *in vitro* でレシピエント MHC 抗原により AICD を誘導してから移植することにより GVHD が抑制されるという実験モデルが報告されている。これらの報告より GVHD の強度と AICD とは密接な関係があると考えられるが、本研究は移入する T 細胞の数が増えることにより、アポトーシスの強度が影響を受けていることを証明した。すなわち、C57BL/6 マウス (H-2^b) の脾細胞を、致死量 (8.5 Gy) の放射線照射を受けた BALB/c マウス (H-2^d) に移入するという MHC 不適合の系において、移入したドナー T 細胞が著しく分裂、増殖をすること、そして分裂を多回数行った後の T 細胞ほどアポトーシスを強く起こしていることが示された。また、最も重要な点として移入 T 細胞数を変化させた移植モデルにおいて、移入 T 細胞の数が少なくなるほどアポトーシスの強度が強くなり、それと同時にドナー由来 T 細胞の増殖が著しく抑制されていることを示し、このアポトーシスの増加が結果的に増殖の抑制につながっていることを示している。また、FasL の発現についても調べ、移入細胞数が減少すると FasL の発現が優位に増加していることなど、この系におけるアポトーシスが AICD だと考えることを支持する結果を示している。さらに AICD であることを確定するためには Fas あるいは FasL に対する抗体によるブロッキングやノックアウトマウスによる解析により Fas/FasL が必須となっていることを示す必要があると思われるが、本研究で提示されたように、MHC 不適合の造血細胞移植モデルにおいて、移入する成熟 T 細胞数が減少するほど、移入した後に強くアポトーシスを起こし、増殖が著しく抑制されているという知見は、実際に臨床で行われている HLA 不適合移植における移植片に含まれるドナー T 細胞数と GVHD の重症度との関連性を示すものであり、学位の授与に値するものと認める。