

Title	The Potent Role of Graft-Derived NKR-P1+TCR $\alpha\beta$ +T(NKT)Cells in the Spontaneous Acceptance of Rat Liver Allografts
Author(s)	清本, 徹馬
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47529
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	清 本 徹 馬
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 20593 号
学位授与年月日	平成 18 年 5 月 18 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	The Potent Role of Graft-Derived NKR-P1 ⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ (NKT) Cells in the Spontaneous Acceptance of Rat Liver Allografts (ラット肝移植の自然免疫寛容系におけるグラフト由来 NKT 細胞の有用性)
論文審査委員	(主査) 教授 福澤 正洋 (副査) 教授 門田 守人 教授 宮坂 昌之

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

肝臓の免疫原性は他臓器に比べ低く、免疫学的寛容が得やすいことが知られている。ラット同所性肝移植においては、免疫抑制をせずとも寛容が誘導される自然寛容系と拒絶系が存在する。ラット肝移植における免疫寛容誘導の機序として、移植肝（グラフト）による soluble MHC class I 抗原の分泌、ドナーの MHC class II 抗原に対する抗体の産生、樹状細胞を含めたドナー細胞によるキメラリズム、alloreactive T 細胞の clonal deletion などの報告がなされているが、未だ明確な解明には至っていない。最近、免疫調節細胞として、CD4⁺CD25⁺T 細胞の他に、NKR-P1⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺T 細胞（NKT 細胞）が注目されており、特に NKT 細胞は肝臓に多く分布することより、免疫寛容系の機序に関与する可能性が示唆される。我々はこれまでに、糖尿病自然発症 BB ラット（BB-DP）に対する臍移植における術後糖尿病の再発抑制には、IL-4 を産生するドナー由来 NKT 細胞が免疫調節細胞として関与していることを報告して来た。

【目 的】

ラット同所性肝移植における自然免疫寛容の誘導にドナー由来 NKT 細胞が関与することを明らかにする。

[実験 I]

【対象・方法】

ラット同所性肝移植モデル（cuff technique による Kamada の変法）で移植肝が自然生着する、BN (RT1ⁿ) から LEW (RT1^l) への寛容系 (Group 1) と、DA (RT1^a) から LEW への拒絶系 (Group 2) を対象として、術後 7 日目にグラフトを摘出し、グラフト浸潤細胞 (graft infiltrating cells; GICs) を採取した。GICs は、摘出グラフトをステンレス網にてすり潰した後、Percoll 遠心分離法にて採取した。GICs を rabbit anti-rat IgG-coated Degalan beads column に通過させ、immunoglobulin-negative (Ig⁻) 分画 (T 細胞相当) を回収した。

1. Ig⁻GICs 中のドナー-NKT 細胞の比率を 3 color FACScan (PE-labeled NKR-P1 mAb、biotinylated TCR $\alpha\beta$ mAb、FITC-labeled anti-rat RT1ⁿ mAb; OX27、または FITC-labeled anti-rat RT1^a mAb) にて解析した。

- 寛容系における Ig⁻GICs 中のドナー NKT 細胞の CD4 および CD8 の比率を PE-Cy5-labeled mouse anti-rat CD4 mAb または、PerCP-labeled mouse anti-rat CD8 mAb を用いて 4 color FACScan にて解析した。
- Ig⁻GICs を抗 CD3 抗体にて刺激した培養上清中のサイトカイン産生 (IL-4、IL-10、IL-2、IFN- γ 、TGF- β) を ELISA 法により解析した。

【結果】

- 移植後 7 日目の GICs 中の全 NKT 細胞に対するドナー由来 NKT 細胞の比率は、拒絶系 (2.6 \pm 1.1%) に比し寛容系 (11.7 \pm 5.7%) で有意に高値であった。また、寛容系におけるドナー由来 NKT 細胞は CD4⁺ 優位であった。
- 培養上清中のサイトカイン濃度は、寛容系では IL-10 と TGF- β が、拒絶系では IFN- γ および IL-2 が有意に高値であった。

[実験 II]

【対象・方法】

ラット同所性肝移植の自然寛容系において、ドナー由来 NKT 細胞が免疫調節細胞として免疫寛容誘導に関与していることが示唆されたため、adoptive transfer (ad. tr.) による実験にてその検討を行った。

ドナーの持ち込み細胞を除去する目的で BN ラットに 10 Gy の全身 X 線照射 (IRR) を行った。照射後 4 日目に肝臓を摘出し、naive LEW ラットに移植した。移植 24 時間前に naive BN ラットの脾細胞 (SPCs)、T 細胞 (Ig⁻SPCs)、Ig⁻SPCs から NKR-P1⁺ 細胞を除去した細胞群 (Ig⁻NKR-P1⁻SPCs)、Ig⁻SPCs から TCR α β ⁺ 細胞を除去した細胞群 (Ig⁻TCR α β ⁻SPCs) を各々、IRR を施行した BN ドナーに静脈内投与 (ad. tr.) した。尚、NKR-P1⁺ 細胞または TCR α β ⁺ 細胞の除去には、Dynabeads による negative selection 法を用いた。

以下の各グループ (n=5) の BN 肝を naive LEW ラット (Group 2、3 以外) に移植し、生存期間を観察し検討した。

Group 1 ; naive BN 肝を naive LEW に移植

Group 2 ; naive DA 肝を naive LEW に移植

Group 3 ; IRR を施行した BN (IRR-BN) 肝を naive BN に移植

Group 4 ; IRR-BN 肝を naive LEW に移植

Group 5 ; SPCs (2 \times 10⁸) を ad. tr.した IRR-BN 肝を naive LEW に移植

Group 6 ; Ig⁻SPCs (1 \times 10⁸) を ad. tr.した IRR-BN 肝を naive LEW に移植

Group 7 ; Ig⁻NKR-P1⁻SPCs (8 \times 10⁷) を ad. tr.した IRR-BN 肝を naive LEW に移植

Group 8 ; Ig⁻TCR α β ⁻SPCs (2 \times 10⁷) を ad. tr.した IRR-BN 肝を naive LEW に移植

【結果】

- ドナーラットの IRR によって移植肝は 17 \pm 5.3 日で拒絶された (Group 4)。
- IRR を施行した BN ラットから無処置 BN ラットへの移植にて、全例 100 日以上生存期間を観察し得た (Group 3) ので、IRR による肝障害は否定された。
- ドナー由来の NKT 細胞を含む移植肝を移植した Group 5 ならびに 6 は、有意に生存期間の延長を認めた (Group 5 ; 39.2 \pm 5.7 日、Group 6 ; 38.8 \pm 8.0 日)。
- ドナー由来 NKT 細胞を含まない移植肝を移植した Group 7 ならびに 8 は生存期間の延長を認められなかった (Group 7 ; 17.8 \pm 4.0 日、Group 8 ; 18.8 \pm 7.7 日)。

【総括】

- ラット同所性肝移植における寛容系においては、術後 7 日目の Ig⁻GICs 中のドナー由来 NKT 細胞の比率は拒絶系に比し有意に高値であった。

2. 寛容系における Ig⁻GICs の培養上清中には、Th2 型 (IL-4、IL-10) 及び Th3 型 (TGF-β) サイトカイン産生が優位であった。一方、拒絶系では Th1 (IFN-γ、IL-2) 型サイトカイン産生が優位であった。
3. 寛容系ドナーを全身照射することにより、自然免疫寛容が破綻し、移植肝は拒絶された。
4. adoptive transfer による実験にて、ドナー由来 NKT 細胞を含まない移植肝を移植したグループ (Group 7、8) では生存期間の延長効果は認められなかったが、ドナー由来 NKT 細胞を含むグループ (Group 5、6) では有意に生存期間の延長効果を認めた。

【結 語】

ラット同所性肝移植において、ドナー由来の NKT 細胞は自然免疫寛容誘導に有用な役割を演じていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

ラット同所性肝移植においては、免疫抑制をせずとも寛容が誘導される自然寛容系と拒絶系が存在する。ラット肝移植における免疫寛容誘導の機序は、未だ明確な解明に至っていない。最近、免疫調節細胞として、NKR-P1⁺TCR α β⁺T 細胞 (NKT 細胞) が注目されており、免疫寛容成立の機序に関与する可能性が示唆されている。また、NKT 細胞は肝臓に多く存在することから、ラット肝移植の自然免疫寛容誘導において、ドナーNKT 細胞の関与につき検討することを目的とした。その結果、寛容系の移植肝内には、ドナーNKT 細胞の比率が拒絶系に比し多かった。Th2 型のサイトカイン分泌が寛容系において高値であった。adoptive transfer による実験にて、ドナーNKT 細胞を含む肝臓を移植したグループでは有意に生存期間の延長効果を認めた。以上より、ラット同所性肝移植において、ドナー由来の NKT 細胞は、自然免疫寛容誘導に有用な役割を演じていることを示唆した研究であり、学位に値するものと認める。