The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The Potent Role of Graft-Derived NKR-P1+TCRαβ+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、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

【38】

氏　　名	清　本　徹　馬（きよ もと てつ ま）
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 classⅡ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）に対する膵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（RT1^{n}）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、immunogloblin-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 RT1^{n} mAb；OX27、または FITC-labeled anti-rat RTl^{a} mAb）にて解析した。

2．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。
3．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）能をELISA法により解析した。

【結　果】
1．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±1.1%）に比し寛容系（11.7±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。
2．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TCRαβ^{+}細胞を除去した細胞群（Ig^{-}TCRαβ^{-}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TCRαβ^{+}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（2×10^{8}）をad. tr.したIRR-BN肝をnaive LEWに移植
Group 6；Ig^{-}SPCs（1×10^{8}）をad. tr.したIRR-BN肝をnaive LEWに移植
Group 7；Ig^{-}NKR-$P1^{-}$SPCs（8×10^{7}）をad. tr.したIRR-BN肝をnaive LEWに移植
Group 8；Ig^{-}TCRαβ^{-}SPCs（2×10^{7}）をad. tr.したIRR-BN肝をnaive LEWに移植

【結　果】
1．ドナーラットのIRRによって移植肝は17±5.3日で拒絶された（Group 4）。
2．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日以上の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。
3．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±5.7日、Group 6；38.8±8.0日）。
4．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±4.0日、Group 8；18.8±7.7日）。

【総　括】
1．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-$P1^{+}$TCRαβ^{+}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。