

氏 名	前之園 良一
(ふりがな)	(まえのその りょういち)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	乙 第12号
学位審査年月日	令和 4年 7月 27日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Recipient sex and estradiol levels affect transplant outcomes in an age-specific fashion (レシピエントの性別と estradiol の年齢による変化が移植後グラフト生着率へ与える影響)
論文審査委員	(主) 教授 大道 正英 教授 高井 真司 教授 芦田 明

学位論文内容の要旨

《緒言》

慢性腎不全の患者数は世界中で増加しており、腎移植は腎代替療法の一つとして有効な治療である。様々な疾患で性差が報告されているのと同様に、腎臓をはじめ臓器移植においても性差に関わる因子がグラフト生着率へ影響を与えると考えられている。しかし、ドナーやレシピエントの性別特異的な差が実際に移植免疫応答にどのような影響を与えるかは明らかにされていない。

我々は、年齢で変化する女性ホルモンの一つの estradiol が女性のレシピエントのグラフト生着に影響を与えるという仮説を立て、動物モデルを用いてドナーおよびレシピエントの性別とその加齢における影響が移植成績と移植免疫に影響を与えるという事実を明らかにした。

《目 的》

女性において年齢の影響を受ける estradiol が、移植免疫に影響を与えることを証明する。

《方 法》

1. Scientific Registry of Transplant Recipient (SRTR)に登録された 427,228 例の移植患者の内 407,963 例を抽出した。3つの年齢カテゴリー (15-34 歳、35-54 歳、55-74 歳) に分類し、グラフト生着率の比較及び多変量 Cox 比例ハザード解析で解析した。
2. 月齢 2-3 か月 (young)と月齢 18 か月 (old)の C57/BL6 マウスを naïve、ovariectomy (ovx)に分け、血清 estradiol を測定した。Naïve、ovx、sham surgery 群に分けた young および old C57/BL6 マウスに対して、DBA/2 マウスから移植を施行しグラフト生着を観察した。またフローサイトメトリーを用いて T 細胞の割合を比較した。
3. Naïve、ovx、sham surgery 群に分けた C57/BL6 マウスの脾臓より T リンパ球を抽出し、DBA/2 マウスよりマイトマイシンで処理した脾細胞と混合リンパ球試験を行った。
4. C57/BL6 マウスの脾臓から negative selection 法で CD4+ T 細胞を分離し、濃度の異なる estradiol (0M、 10^{-12} M、 10^{-10} M、 10^{-8} M)で培養し Th1、Th17 および induced Treg (iTreg)へ分化させた。
5. Ovx 群にそれぞれ sesame oil 及び 50 μ g/mL、500 μ g/mL の estradiol をそれぞれ補充した群と sham surgery 群とに分けた C57/BL6 マウスに対して DBA/2 マウスの皮膚移植を施行しグラフト生着の観察、フローサイトメトリーを用いて細胞の割合を比較した。

《結 果》

1. 若年女性レシピエントが低いグラフト生着率を有した一方で、老年女性レシピエントではグラフト生着率は良好であり、Cox 比例ハザード解析では年齢と性別の交互作用の影響がみられた。
2. Young naïve 雌マウスは ovx と比べ血清 estradiol は有意に高い値を示し、それを反映して雌 young naïve/sham surgery マウスに対し young ovx マウスでグラフト生着率が

延長したが old 群では差がみられなかった。Sham surgery 群と比較して ovx 群では CD4+、CD8+T 細胞、及び CD4+IFN- γ +と CD4+IL-17+T 細胞の割合は低下した一方で、CD4+CD25+FOXP3+T 細胞は増加した。

3. Sham surgery 群と比較して ovx 群では、CD4+T 細胞の増加が減り死細胞の割合が増加し、CD4+T 細胞の IFN- γ 産生能が低下することを示した。
4. Th1 分化条件で培養した CD4+T 細胞は estradiol の濃度が高くなるにつれ(0M-10⁻¹⁰M) 分化が促進したが、妊娠期に相当する高い estradiol 濃度 (10⁻⁸M)では有意に分化が低下した。一方で iTreg 分化条件では高い estradiol 濃度 (10⁻⁸M)で大きく分化した。
5. Ovx+50 μ g/mL と sham surgery は同等のグラフト生着率を示していた一方で、ovx+500 μ g/mL は ovx よりも長いグラフト生着率を示した。フローサイトメトリーでは sham surgery、ovx+50 μ g/mL に対して ovx、ovx+500 μ g/mL では CD4+IFN- γ +T 細胞の低下と CD4+CD25+FOXP3+T 細胞の増加を示した。

《 考 察 》

本研究は、臨床データ解析によって得られた「年齢を経るごとに男性に対して女性のグラフト生着率が良好となる」という結果が、“年齢とともに変化する女性ホルモンの一つの estradiol の影響である”という仮説を立て、これを動物実験モデルを用いて検証することを目的として行った研究である。我々が作成したマウス移植実験モデルでは、女性ホルモンの一つである estradiol が CD4+T 細胞の分化・分裂に作用し移植免疫に影響を及ぼすことでグラフト生着率に変化を及ぼす事が明らかとなった。また移植免疫においても、妊娠期に相当する濃度の estradiol の存在下では炎症性細胞である Th1 は減少し、制御性 T 細胞である CD4+CD25+FOXP3+T 細胞が増加し免疫寛容に傾くことが判明した。

女性ホルモンの一つである estradiol は最も強い生理活性を持ち、平均 50 歳頃に閉経が始まり著しく低下する。自己免疫疾患における研究では妊娠期に炎症性細胞である Th1 が低下した報告が知られているが、移植免疫での検討はこれまで報告されていなかった。

Estradiol は ER- α と IFN- γ 遺伝子のプロモーター領域の estrogen 応答エレメントとの直

接相互作用を介して IFN- γ 遺伝子発現を増強させることが自己免疫疾患の研究で示されていることから移植においても同様の反応が起きていると考えられる。

さらに本研究では estradiol をレシピエントマウスに投与し妊娠期に匹敵する血中濃度にすることでグラフト生着率を延長することを示した。通常妊娠期では胎児に対する免疫寛容が働いていると考えられており、本研究における炎症性細胞の低下と制御性 T 細胞の増加というフローサイトメトリーの結果からも、同様に移植グラフトに対する免疫寛容が働くと考えられる。今後は、これらの結果を裏付ける為に estrogen レセプターから下流の反応を検討する検証が必要であると考えられる。

《結 果》

臨床データ解析で得られた結果は女性レシピエントでの年齢特異的なグラフト生着率を示し、さらに estradiol に代表される女性ホルモンが CD4+T 細胞及びドナー特異的な免疫反応に影響を与えることが判明した。本研究の結果は、二次性徴の開始・月経・閉経と一生涯を通して estradiol 変化が大きい女性では、年齢における estradiol の量的変化が同種移植免疫に影響を及ぼすことが判明し、臓器移植時の免疫抑制管理に大きな情報を寄与する可能性があると思われる。

(様式 乙7)

論文審査結果の要旨

本研究では男女の差を分ける指標である性ホルモン、特に女性において年齢で劇的に変化する **estrogen** のひとつである **estradiol** に着目して臓器移植の予後を検討した。

申請者はまず臨床のデータベースである米国の **Scientific Registry of Transplant Recipient (SRTR)** を解析し、実臨床における臓器移植で男女差が存在するかどうかを確認した。また得られた結果が女性と年齢の変化で移植成績に影響を及ぼす事を解明した上で、それを証明する為に月齢 2-3 か月 (**young**)・月齢 18 か月 (**old**)のマウスを卵巣摘除 (**ovx**)・非卵巣摘除 (**sham surgery**)及びコントロールである **naïve** の実験モデルを構築し比較検討した。グラフト生着率は、臨床データ解析と一致して雌の **young naïve/sham surgery** マウスと比較して雄 **young ovx** マウスでは延長したが、血清 **estradiol** の差が無い **old** 群ではこの差は見られなかった。またフローサイトメトリーを用いた実験では、**ovx** は **sham surgery** と比較して炎症性細胞である **CD4+IFN- γ +T** 細胞の低下と制御性 T 細胞である **CD4+CD25+FOXP3+T** 細胞の増加を確認したのみならず、混合リンパ球試験を用いて実際にレシピエントとドナーの **CD4+**細胞の反応性が **ovx** 群で低下することも確認した。

In vitro で T 細胞が **estradiol** の濃度依存性に、Th1 分化条件で低い濃度から中等度濃度 (10^{-12} から 10^{-10} M)で Th1 は増加するものの高濃度 (10^{-8} M)で低下、一方で iTreg 分化条件で高濃度で増加する事実を明らかにした。この結果を *in vivo* で確認する為に、**estradiol** を補充した **ovx+50 μ g/mL** と **ovx+500 μ g/mL** モデルを作成した。それぞれが **sham surgery** (**naïve** と同等の **estradiol**)と妊娠期に匹敵する血清 **estradiol** になる事を確認した上で、**ovx+500 μ g/mL** は **ovx** に比較してグラフト生着期間が延長することを示した。フローサイトメトリーを用いた解析では **sham surgery**、**ovx+50 μ g/mL** に対して **ovx**、**ovx+500 μ g/mL** では **CD4+IFN- γ +T** 細胞の低下と **CD4+CD25+FOXP3+T** 細胞の増加を示し一連の解析結果と矛盾しない結果が得られた。

これらの事実は性差によって免疫抑制剤の調整が必要であることを示し、特に女性の移植レシピエントに対して **estradiol** が新しい免疫抑制の戦略になる可能性があり、重要な知見と考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 14 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

（主論文公表誌）

American Journal of Transplantation 21(10): 3239-3255, 2021 Oct

doi: 10.1111/ajt.16611