

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
井上善博	主査 教授 森 脇 真 一 副査 教授 東 治 人 副査 教授 上 田 晃 一 副査 教授 朝 日 通 雄
主論文題名  Transgene number-dependent, gene expression rate-independent rejection of D <sup>d</sup> -, K <sup>d</sup> -, or D <sup>d</sup> K <sup>d</sup> -transgened mouse skin or tumor cells from C57BL/6 (D <sup>b</sup> K <sup>b</sup> ) mice (C57BL/6 (D <sup>b</sup> K <sup>b</sup> )マウスは、D <sup>d</sup> 、K <sup>d</sup> や D <sup>d</sup> K <sup>d</sup> 遺伝子を移入したマウスの皮膚や腫瘍細胞を、移入した遺伝子の発現量ではなく、移入した遺伝子の数に依存して拒絶する)	
学位論文内容の要旨	
《背 景》 機能不全に陥った細胞、組織、臓器を持つ患者への究極の医療の一つに移植がある。しかし、移植部に浸潤するレシピエントの免疫担当細胞が、移植片の主要組織適合性抗原 (MHC : ヒト→HLA、マウス→H-2) を非自己 (同種異型) と識別し拒絶する。MHCにはクラスIとクラスIIが知られ、前者は有核細胞が、後者は抗原提示細胞が発現している。したがって、移植拒絶反応は、移植片上のクラスI分子をレシピエントの免疫担当細胞が非自己と認識し移植片を傷害することである。ヒトHLAは、A、B、Cの3領域、それぞれ約30種類、60種類および10種類からなり、マウスではDおよびK領域のそれぞれに10数種類が知られている。マウスでは、K <sup>b</sup> 分子が突然変異を起こしたbm1、bm10やbm11マウスの皮膚を野生型(D <sup>b</sup> K <sup>b</sup> )マウスに移植すると、全例、12~14日で急性拒絶されることが報告されている。しかし、MHCの遺伝子多型や複雑性のために移植拒絶反応のメカニズム (クラスI分子の発現量の拒絶反応への影響、2~3領域の拒絶反応への貢献度およびリガンドと受容体の相互作用の様式など) には不明な点が多い。	

## 《目 的》

BALB/c (D<sup>d</sup>K<sup>d</sup>)マウスとC57BL/6 (D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>)マウスは黄金ペアーとして知られ、MHCの多型性も両系統を中心に調べられている。また、移植部に浸潤するマクロファージ(D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>)が、移植片(D<sup>d</sup>K<sup>d</sup>)上のH-2D<sup>d</sup>とH-2K<sup>d</sup>分子をMacrophage MHC receptor 1 (MMR1)とMMR2によって、それぞれ非自己と識別し拒絶することが見いだされている。本研究では、移植拒絶反応におけるH-2D<sup>d</sup>およびH-2K<sup>d</sup>分子の役割を調べることを目的とした。

## 《方 法》

マウス：C57BL/6 (D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>)マウスにD<sup>d</sup>, K<sup>d</sup>やD<sup>d</sup>K<sup>d</sup>遺伝子を移入したトランスジェニックマウスは理研と共同で作製し、同種同系のC57BL/6マウスと同種異系のBALB/c (D<sup>d</sup>K<sup>d</sup>)マウス等は日本SLCより購入した。マウスはすべて雌を使用した。

腫瘍細胞：EL-4 (D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>)リンパ腫細胞にD<sup>d</sup>, K<sup>d</sup>やD<sup>d</sup>K<sup>d</sup>遺伝子を移入した腫瘍細胞を作製した。同種同系細胞としてEL-4 (D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>)リンパ腫細胞、同種異系細胞としてMeth A (D<sup>d</sup>K<sup>d</sup>)線維肉腫細胞を使用した。

移植：マウスの背部を麻酔下に剃毛後、種々のマウスの皮膚（約2 cm角）を同じ大きさの皮膚を切除した野生型C57BL/6マウスの背部に移植した。腫瘍細胞（5 x 10<sup>5</sup> 細胞/50 μl 磷酸緩衝液）は、マウスの背部を麻酔下に剃毛後、皮内注射した。

拒絶反応の判定：皮膚の大きさが保たれ白い毛が生える場合は“生着”、移植片が消失し黒い毛が生える場合は“拒絶”と判定した。腫瘍細胞の場合は、腫瘍の増大、増大の遅延、消失を、それぞれ“生着”、“部分拒絶（遅延）”、“拒絶”と判定した。

移入した遺伝子の発現量：移入した遺伝子の発現量は、腫瘍細胞と皮膚の蛋白分解酵素処理で得た遊離皮膚細胞を蛍光標識されたD<sup>d</sup>, K<sup>d</sup>分子に対する抗体を用いてセルソーターで解析し、mean fluorescence intensity (MFI)として定量化した。

## 《結 果》

D<sup>d</sup>, K<sup>d</sup> や D<sup>d</sup>K<sup>d</sup> 遺伝子を移入したトランスジェニックマウスと D<sup>d</sup>, K<sup>d</sup> や D<sup>d</sup>K<sup>d</sup> 遺伝子を移入した EL-4 (D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>)リンパ腫細胞を樹立し、皮膚細胞や腫瘍細胞における D<sup>d</sup>, K<sup>d</sup> や D<sup>d</sup>K<sup>d</sup> 遺伝子の発現量を定量した。野生型 C57BL/6 (D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>)マウスへの BALB/c (D<sup>d</sup>K<sup>d</sup>), B10.D2 (D<sup>d</sup>K<sup>d</sup>)や BDF1 (D<sup>b</sup>D<sup>d</sup>K<sup>b</sup>K<sup>d</sup>)マウスの非自己 (同種異型) 皮膚移植片は移植後 12~14 日で、全例、拒絶されたが、同種同系(D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>)マウスの皮膚移植片は、全例、生着した。生着群と拒絶群において、D<sup>d</sup>, K<sup>d</sup> や D<sup>d</sup>K<sup>d</sup> 遺伝子の発現量に有意差は無く、C57BL/6 (D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>)マウスに D<sup>d</sup>, K<sup>d</sup> や D<sup>d</sup>K<sup>d</sup> 遺伝子を移入したマウスの皮膚移植片は、クラス I 遺伝子の発現量非依存的に、それぞれ 9/19 (47%), 20/39 (51%), 12/17 (71%)が拒絶された。同様に、C57BL/6 マウスへ皮内注射した同種異型 Meth A (D<sup>d</sup>K<sup>d</sup>)線維肉腫細胞は、全例、拒絶され、同種同系 EL-4 リンパ腫細胞は、全例、移植部で増殖した。D<sup>d</sup>, K<sup>d</sup> や D<sup>d</sup>K<sup>d</sup> 遺伝子を移入した EL-4 細胞は、それぞれ 2 種類のクローンで移入した遺伝子の発現量が異なるが、1 種類の遺伝子の移入では同種同系の場合より 10~13 日遅れて皮内で増殖し始め、2 種類の遺伝子の移入では、さらに 1 週間増殖が遅れ、その内の 40%が拒絶された。

## 《結 語》

1)MHC クラス I 分子が 1 種類異なる同種異型の皮膚移植片は、約半数が拒絶され、従来の報告 (全例拒絶) とは異なり拒絶反応は軽度である。2)D<sup>d</sup> と K<sup>d</sup> 遺伝子は非自己 MHC クラス I 分子をコードする遺伝子として等価である。3)C57BL/6 (D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>)マウスに D<sup>d</sup>, K<sup>d</sup> や D<sup>d</sup>K<sup>d</sup> 遺伝子を移入したマウスの皮膚や腫瘍細胞は、移入した遺伝子の発現量ではなく、移入した遺伝子の数に依存して拒絶された。4)移植後 2 週間以降には、移植片の生着と腫瘍細胞の増殖が見られたことから、移植拒絶反応が、移植後、約 2 週間で終わることが推測された。これらの結果は、移植後 1 ~ 2 週間に、MHC クラス I 分子と受容体との結合の特異的な阻害剤を患者に投与することによる免疫抑制などの副作用のない、テーラーメイド移植医療の可能性を示唆するものである。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲第号	氏名	井上善博
論文審査担当者		主査教授 森脇 真一	
		副査教授 東 治人	
		副査教授 上田 晃一	
		副査教授 朝日 通雄	
主論文題名			
<p>Transgene number-dependent, gene expression rate-independent rejection of D<sup>d</sup>-, K<sup>d</sup>-, or D<sup>d</sup>K<sup>d</sup>-transgened mouse skin or tumor cells from C57BL/6 (D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>) mice</p> <p>(C57BL/6 (D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>)マウスは、D<sup>d</sup>、K<sup>d</sup>や D<sup>d</sup>K<sup>d</sup> 遺伝子を移入したマウスの皮膚や腫瘍細胞を、移入した遺伝子の発現量ではなく、移入した遺伝子の数に依存して拒絶する)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>移植拒絶反応は、非自己とみなされる非感染性の細胞に対して起きる反応である。臨床的に問題となる非自己は、同種異型の移植片であり、移植部位へ集まる宿主細胞は、移植片の主要組織適合性抗原(MHC：ヒト→HLA、マウス→H-2)を認識し、傷害する。MHCにはクラス I とクラス II が知られ、前者は有核細胞が、後者は抗原提示細胞が発現している。したがって、移植拒絶反応は、移植片上のクラス I 分子をレシピエントの免疫担当細胞が非自己と認識し移植片を傷害することである。ヒト HLA は、A、B、C の 3 領域、それぞれに数 10 種類からなり、マウスでは D および K 領域のそれぞれ 10 数種類が知られている。マウスでは、K<sup>b</sup>分子が突然変異を起こした bm1、bm10 や bm11 マウスの皮膚を野生型(D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>)マウスに移植すると、全例、急性拒絶されたと報告されている。しかし、同種異型の移植片に対する免疫反応は、MHC の遺伝子多型や複雑性のために移植拒絶反応のメカニズムには不明な点が多い。BALB/c (D<sup>d</sup>K<sup>d</sup>)マウスと C57BL/6 (D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>)マウスは黄金ペアーとして知られ、マクロファージ上の受容体が移植片上の H-2D<sup>d</sup>や H-2K<sup>d</sup>分子を非自己と識別し、傷害する(移植拒絶反応)ことが報告されている。本研究では、</p>			

C57BL/6 (D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>)マウスにとって同種異型である BALB/c (D<sup>d</sup>K<sup>d</sup>)マウスの D<sup>d</sup>, K<sup>d</sup> および D<sup>d</sup>K<sup>d</sup> 遺伝子を C57BL/6 マウスや EL-4 細胞に移入し、それらを野生型マウスに皮膚移植して、移植拒絶反応における H-2D<sup>d</sup> および H-2K<sup>d</sup> 分子の役割を調べることを目的とした。

その結果、(1) C57BL/6 (D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>)マウスへのBALB/c (D<sup>d</sup>K<sup>d</sup>), B10.D2 (D<sup>d</sup>K<sup>d</sup>)や BDF1 (D<sup>b</sup>D<sup>d</sup>K<sup>b</sup>K<sup>d</sup>)マウスなどの非自己(同種異型)皮膚移植片は移植後12~14日で、全例、拒絶されたが、同種同系(D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>)マウスの皮膚移植片は、全例、生着し、実験系が正しいことが確認された。(2) D<sup>d</sup>, K<sup>d</sup>およびD<sup>d</sup>K<sup>d</sup>遺伝子を移入したC57BL/6 (D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>)マウスの皮膚移植片は、これらの遺伝子の発現量非依存的に、それぞれ9/19 (47%), 20/39 (51%), 12/17 (71%)が拒絶されることを見出した。同様に、(3) C57BL/6マウスへ皮内注射した同種異型Meth A (D<sup>d</sup>K<sup>d</sup>)線維肉腫細胞は、全例、拒絶され、同種同系EL-4リンパ腫細胞は、全例、移植部で増殖することを確認した。また、(4) D<sup>d</sup>やK<sup>d</sup>遺伝子を移入したEL-4細胞は同種同系の場合より10~13日遅れて皮内で増殖し始め、D<sup>d</sup>K<sup>d</sup>遺伝子を移入したEL-4細胞の4/10 (40%)が拒絶されることを見出した。

これらの結果より申請者らは、以下のように結論している。1) MHC クラス I 分子が 1 種類異なる同種異型移植片に対する拒絶反応は、従来報告とは異なり軽度である。2) D<sup>d</sup> と K<sup>d</sup> は非自己 MHC クラス I 分子をコードする遺伝子として等価であり、3) トランスジェニックマウスの皮膚や細胞は、移入された D<sup>d</sup> や K<sup>d</sup> 遺伝子の発現量ではなく遺伝子の数に依存して非自己と認識され、拒絶された。

今後、MHC クラス I 分子と受容体との結合阻害薬が開発されれば、副作用の強い非特異的免疫抑制剤とは異なる機序での、拒絶反応のテーラーメイド制御が可能である。従って、本研究の結果は、移植医療における今後の創薬の開発に役立つものと期待される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条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)

Microbiology and Immunology 55(6): 446-453, 2011