

氏 名	原 義 明
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第147号
学位授与の日付	平成19年 3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名	Anergic lymphocytes generated by blocking CD28 and ICOS pathways in vitro prolong rat cardiac graft survival (CD28 及び ICOS 経路の阻害により作成されたアナジーリンパ球はラット心移植においてグラフト生着期間を延長する)
論文審査委員	主査 教授 林 純 一 副査 教授 畠 山 勝 義 副査 教授 安 保 徹

#### 博士論文の要旨

目的: 抗原特異的 T 細胞の活性化には抗原提示細胞の MHC 複合体により提示されるペプチドから T 細胞受容体に伝達される第 1 シグナルのほかに抗原提示細胞と T 細胞上の細胞表面蛋白質の間の副刺激シグナルが必要であることが知られている. 抗原提示細胞の B7-1, B7-2 と結合し B7/CD28 間相互作用を阻害する CTLA4Ig と, CD28/CTLA4 ファミリーに属する第 3 の共刺激分子 ICOS に対する抗体である抗 ICOS 抗体を用いて, 副刺激シグナルを伝達する T 細胞表面の抗原分子である CD28 及び, ICOS のシグナルを同時に阻害すると, 安定かつ強固な免疫寛容が誘導できる. さらにこの移植臓器生着には制御性 T 細胞が関与していることも示唆されている. 制御性 T 細胞は免疫反応を抑制的に制御する細胞として知られており, CD4+CD25+T 細胞のほか, Tr1, Tr3 などが知られている. 共刺激シグナルを阻害することで T 細胞は抗原刺激に対して不応答(アナジー)の状態になることが知られているが, さらに制御性 T 細胞と同様, T 細胞の活性化を抑制する作用も有することが一部報告されており, 皮膚移植や膵島移植でもその効果が認められている. 今回我々は生体外で CTLA4Ig, 抗 ICOS 抗体存在下でアナジーリンパ球の調製を行い, 臓器移植モデルにおける免疫抑制効果について検討した.

方法: DA ラットの脾細胞(20Gy 放射線照射)と, Lewis ラットの脾細胞を CTLA4Ig 及び抗 ICOS 抗体存在下で 5 日間混合培養(MLR)を行い得られたリンパ球(アナジーリンパ球)を, DA 脾細胞を stimulator, Lewis 脾細胞を Responder としたリンパ球混合培養(2nd MLR)に加え, リンパ球増殖抑制効果を検討した. また得られたリンパ球自身のアロ抗原, 及び各種抗体刺激に対する増殖能も検討した. さらにアナジーリンパ球の各種 mRNA 発現, 及び培養上清中の IL-2, IL-10 サイトカイン濃度につきそれぞれ RT-PCR, ELISA にて解析した. また CD4, CD25, CTLA4 の発現についてフローサイトメトリーにて検討した. In vivo での検討のため GVH assay モデル及びラット臓器移植モデルを用いた. GVH assay については DA-LewisF1 をホストとした politeal lymphnode assay を行った. また臓器移植モデルとして 7.5Gy 放射線照射を行った Lewis ラットにナイーブな Lewis リンパ球とアナジーリンパ球を養子移植し, DA ラットをドナーとした心移植を行いグラフト生着延長効果を検討した.

結果:CTLA4Ig 及び抗 ICOS 抗体存在下で MLR を行うとそれぞれの濃度に依存した増殖抑制効果が認められた。また両者を同時に投与すると、さらに強い抑制効果が認められた。CTLA4Ig, 抗 ICOS 抗体存在下で得られたリンパ球はアロ抗原及び抗 CD3 抗体, CD28 抗体, IL2 による刺激に対して増殖反応の低下(アナジー)を認めた。2nd MLR では加えたアナジーリンパ球の細胞数に依存した強いリンパ球増殖抑制効果が確認された。フローサイトメトリーでは CD4+CD25+ 細胞群(0.8%)はアナジーリンパ球においてコントロール群(2.6%)より減少していた。また CTLA-4 の発現についてもアナジーリンパ球で減少していた。RT-PCR を用いた検討では FoxP3 の発現もアナジーリンパ球にて低値を示した。サイトカイン mRNA の発現については、アナジーリンパ球において IL-2 と IFN- $\gamma$  の発現が抑制されていた。IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  については差は認められなかった。ELISA では MLR 培養上清中で IL-2 産生が抑制されていた。IL-10 では、差を認めなかった。popliteal lymphonode assay では F1 ラット足底にナイーブな Lewis リンパ球のみを投与した群において popliteal lymphonode の顕著な増大(平均 101.5mg)を認めたのに対し、アナジーリンパ球のみを投与した群では全く増大を認めなかった(平均 6.9mg)。ラット心移植モデルでは放射線照射後 Lewis ラットのリンパ球を養子移植すると生着期間は平均  $10.8 \pm 1.3$  日であるが、同時にアナジーリンパ球を養子移植するとグラフト生着期間は  $17.5 \pm 5.8$  日と有意な延長を認めた。さらにアナジーリンパ球のみを養子移植した場合はグラフトは生着(100 日以上)した。

結論:CTLA4Ig, 抗 ICOS 抗体存在下で得られたアナジーリンパ球は MLR においてアロ抗原に対する不応答のみならず、強いリンパ球増殖抑制能を有していることが示された。また放射線照射ラットを用いた心移植モデルでは養子移植によりグラフト生着延長効果が認められた。

#### (論文審査の要旨)

抗原呈示細胞から T 細胞抗原受容体へのシグナル伝達を CTLA-4 Ig と抗 ICOS 抗体を用いて阻害すると安定的な免疫寛容が導入できることが知られている。申請者らは、*in vitro* でアナジーリンパ球を調製し、臓器移植モデルで免疫抑制効果について検討した。＜方法＞照射ラット脾細胞と Lewis ラット脾細胞を上記抗体下で混合培養してアナジーリンパ球を作成、その反応性やサイトカイン産生能を検討した。また移植片対宿主反応 assay モデルを用いてリンパ節増大の抑制効果を、アナジーリンパ球の養子移植により心移植グラフト生着延長効果を検討した。＜結果＞上記抗体下で作成されたアナジーリンパ球は、濃度依存的に増殖抑制効果を認めた。またアロ抗原などの種々の刺激に対し増殖反応の低下を認めた。アナジーリンパ球では IL-2 や INF- $\gamma$  等の mRNA 発現が抑制されていた。GVH assay モデルではアナジーリンパ球投与ではリンパ節は全く増大せず、心移植モデルではアナジーリンパ球の投与でグラフト生着は著明に延長した。＜結論＞CTLA-4 と抗 ICOS 抗体存在下で得られたアナジーリンパ球はアロ不応答とともにリンパ球増殖抑制を示した。本研究により、これまで *in vitro* で確認された免疫寛容の導入が、ラット心移植モデルで実現できることを示した点に学位論文としての価値を認める。