

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22791504

研究課題名(和文)アロ活性化マクロファージによるアロ移植細胞拒絶機構の解析

研究課題名(英文)The mechanism of allo-grafted cell Rejection by Allo-Induced Macrophages

研究代表者

能見 勇人(Nomi, Hayahito)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：80418938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：アロ拒絶のeffector細胞は、キラーT細胞(CTL)やNK細胞であるとされてきたが、CTLでは説明がつかない事象も報告されている。我々は、マクロファージ(M ϕ)が活性化されeffectorとなることを示してきた。マウス腹腔内にアロ移植したMeth A腫瘍細胞が拒絶される際のEffector細胞の分画がNK1.1陽性よりM ϕ の表面マーカーとされるMac1陽性分画に細胞障害活性が高いことを確認した。また、Meth A細胞に対する抗体をin vitroで追加するとアロ移植後の腹腔浸潤細胞の細胞障害活性がやや高くなることからM ϕ がeffector細胞であること示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：The effector cells of allo-rejection has been to be killer T cells (CTL) or NK cells. However, several events which CTL cannot producing some allograft rejections have also been reported. We have shown that allo-activated macrophages are the major effector of some allograft rejections. We confirmed that the allo-cytotoxic activity is higher in Mac-1 positive fraction, which is a surface marker of macrophage, than in NK1.1-positive fraction of effector cells through the rejection of allo-grafted Meth A fibrosarcoma cells grafted into the abdominal cavity of mice. In addition, to obtain the results suggest that activated macrophage is the effector cell from the fact that the cytotoxic activity of peritoneal infiltration cell of allograft after slightly higher with antibodies against Meth A cells, in vitro.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 泌尿器科学

キーワード：アロマクロファージ 急性拒絶反応 免疫寛容 同異種系移植 マウス

1. 研究開始当初の背景

同種異型 (アロ) 移植における拒絶反応において実際に直接組織を攻撃細胞 (effector 細胞) は、キラー T 細胞 (CTL) であると広く認識されてきた。これは、リンパ系細胞の欠損マウスであるヌードマウスにおいては、アロ拒絶反応が起こらない事実があるため、CD8⁺ の細胞障害性 T 細胞が、アロ移植片を攻撃すると考えられてきた。

しかし、CTL のみでは説明がつかない事象が多々あることも判明し報告され、T 細胞や NK 細胞ではなく、CD4⁺ の T 細胞が必須であることも 1996 年に報告された。近年、一部では NK 細胞が effector であるとの報告もされるようになってきた。

我々は、細胞性拒絶反応において T 細胞はリンパ系の細胞は免疫記憶とサイトカインの供給といった免疫反応の加速因子を主とするものであり、CTL が effector としてアロ細胞を拒絶に働くのは、拒絶の標的となるアロ細胞が一部の白血球細胞などの CTL 感受性細胞に限られると考えられることを報告してきた。

実際には、アロが移植されたときまずマクロファージもしくは樹状細胞がこれを認識し抗原提示細胞として、T 細胞に抗原提示する。T 細胞からの IFN- γ などサイトカインを放出しマクロファージ (M) を活性化する。サイトカイン補助下にアロ刺激によりマクロファージが活性化されて、アロ活性化 M つまり AIM (allograft induced macrophage) となり、直接アロ拒絶における effector として、広く働いていると我々は考えている。しかしこれは、現状でもまだ広くは認められていない状況である。

また、最近一部で NK 細胞がアロ拒絶に関わるとされているが、我々は、M が主役であると考えている。

この AIM の働きを証明するため、我々はアロ拒絶に関与する AIM の機能や詳細を検証し報告を重ね調査報告してきた。たとえば、マウスの肥満細胞腫である P815 腫瘍細胞 (H2^a) は、CTL 感受性の細胞であるため、アロ移植された場合通常の C57BL/6 マウス (H-2^b) に移植された場合の effector は CTL であることは既知であるが、CTL や NK 細胞の攻撃因子であるパーフォリンと Fas リガンドを両欠損させたマウスでは CTL ではなく AIM が effector であることを我々は 2007 年に報告した。また、マウスアロ移植細胞として Meth A 線維肉腫細胞 (H-2^d) を使用した場合、AIM が M を噛み切るように障害する (bite off) することを確認しこれも 2007 年に報告した。

これらをふまえると AIM がアロ拒絶反応の effector としての能力をもつことは確実であると我々は主張しているが、現在のところ AIM がアロ拒絶における effector としての重要

性は広くは認知されていないのが実情であり、さらに検証を重ね報告を続けていくべきと我々は考えている。

2. 研究の目的

AIM が、アロ細胞性拒絶に effector の主役として、関与することを我々は示してきたと考えているが、現状では、T 細胞系もしくは B 細胞系の抗体などの研究が詳細に行われてきた免疫学の世界ではまだ広くは認知されていない。

まず我々は、AIM を抑制する新たな方法を発見し、これによりアロ拒絶反応を制御しアロ拒絶における AIM の主体性を示すことを目標とした。さらにそれが臨床応用可能な方法であれば、大きな社会貢献につながると考えた。しかし、新規の薬剤開発は我々の実験規模では容易ではないため、まず M に関与するとされる数種類の薬剤を使用し AIM の細胞障害活性を減じることが可能か否かを検討することとした。以前に使用したトラニラストも含め、AIM の制御可能か予備実験を行い検討してきたが、既知の免疫抑制剤単独投与のみでは AIM の細胞障害活性を制御することとの判断に至った。

また、アロ移植の領域で AIM がそれほど注目されないのかその理由を考えると、臨床での腎移植などの臓器移植において、現在で最も制御が困難で臓器の急な廃絶につながる強い拒絶反応は、抗体関連型拒絶反応であり、抗体は B 細胞が活性化し形質細胞となり多量の抗体を供給することが中心であることから、細胞性拒絶とは全く別物であると考えられていることが一因とも考えられる。

しかし、抗体と細胞性の拒絶反応が別と判断する明確な理由はなく、我々はこの抗体関連型拒絶反応における effector が細胞ではなく、抗体と補体によるものだけであるのか、それとも、抗 MHC 抗体の付着した標的細胞を AIM が攻撃するのか否かを検証すべきであると考えた。つまり、抗体関連型の拒絶反応は、補体と抗体のみで急性拒絶反応時の細胞障害が起こるのか、それとも、抗体のオプソニン効果等により M や好中球がより活性化され effector として働くのかを検証することとした。

仮に AIM が抗体関連型急性拒絶反応において effector として関与しない場合、抗体関連型拒絶における細胞の障害機序が補体のみでどの程度起こるのか否かを検証する方針とした。さらに AIM が現在原因まだ解明されず判然としない慢性拒絶反応において effector としての役割をなしている可能性も合わせて検討していくこととした。

3. 研究の方法

1 次移植 : C57BL/6 (H-2^b) マウスの腹腔内に Meth A 線維肉腫細胞 (MA 細胞 ; H-2^d)

を 3×10^6 個を移植する。MA 細胞は腫瘍なので移植後増殖を始める、しかしその後、アロであるため拒絶され、マウスの体内から約 14 日間で消失する。

2 次移植：一次移植したマウスにおいて 14 日目以降に再度 MA 細胞を 3×10^6 個移植する。この際、拒絶のために腹腔に免疫担当細胞が浸潤してくる。この二次移植により腹腔に浸潤してくる細胞を腹腔浸潤細胞 (PEC : peritoneal exudate cell) として回収する。

回収は 2 次移植後 1 日目、3 日目、5 日目、7 日目をそれぞれ検討する。

回収する方法は、頸椎脱臼させたマウスの腹壁を小切開し、腹腔内に PBS をディスプレイ注射器で約 1mL 注入し 1mL 回収するこれを約 24 回繰り返すことで、大半の PEC と残存する MA 細胞の混合液を回収することができる。

この混合液に含まれる PEC 細胞と MA 細胞と PEC の数をトリパンブルーで染色し血球計算盤を用いて顕微鏡で数える。回収日数による比較を行う。

この混合液を低速で遠心分離することで、MA 細胞を沈殿させる。上澄み液のみ分けとりこれを今度は高速回転で遠心器にかけ PEC を沈殿させる。今度は上澄み液を除き、沈殿に 1ml の medium を加える PEC 浮遊液とする。この PEC 浮遊液をセルソーター (FACS) にかけ、さらに含まれる MA 細胞、赤血球細胞を除き、M の多い分画を確保し AIM 浮遊液を得る。

AIM を effector (E) とし、 ^{51}Cr でラベルした MA 細胞 target (T) とする。E/T 比を 20 ~ 80 として混合し、CO₂ インキュベーターで数時間以上混合培養する。培養後遠心分離器で全細胞沈殿させ、上澄み液 (medium) を sampling する sampling した液の放射線 (線) 放出量をガンマカウンターで計測し、この測定値から AIM の細胞障害活性を計測する。(効率の良い E/T 比も確認する。)

混合培養時に H-2^d に対する抗体 (市販) を添加し、AIM の細胞障害活性化が変化するか否かを確認する。H-2^d 以外の抗体についても検証し AIM の障害活性を阻害する抗体が検出できるか否かも検討する。

1 次移植を行わない未感作群と 2 次移植群の比較検討も行う。

4 . 研究成果

アロ活性化 M (AIM) によって拒絶されると考えられるマウス腹腔内にアロ移植され

た MA 細胞を拒絶に関わる PEC のうち FACS で分離した分画の検証を行い、 ^{51}Cr releasing assay でアロ MA 細胞に対する障害活性の高い分画つまり、effector 細胞の含まれる分画にはおいて、NK1.1 陽性細胞より M の表面マーカーとされる Mac 1 陽性細胞の方が強い細胞障害活性を示した。また、Mac-1 陽性細胞のほうが Mac-1 陰性細胞よりも強い細胞障害活性を有した。

1 次移植で感作したマウスでの拒絶は、2 次移植時において、その腹腔 MA 細胞数の減少が未感作マウスよりも早いことから、MA の拒絶においても免疫記憶が行われ、抗体が 2 次移植時の拒絶に関与する可能性が高いと考えた。

また、Meth A 細胞に対する抗体として抗 H-2^d 抗体を ^{51}Cr releasing assay 時に追加すると PEC 浮遊液と AIM の細胞障害活性がそれぞれやや高くなることが判明した。この効果はまだ検証中ではあるが、1 次移植を行っていない未感作マウスを用いた実験でも確認された。

この現象は抗 H-2^d 抗体によるオプソニン効果によるものと考えられるが、今後この点をより明確にするため、H-2^d 抗体と Fc-Blocker を同時に投与すること等で検証する予定である。オプソニン効果であることが決定すれば、effector は NK 細胞ではなく M が主であることとなり、これらの結果は、AIM が MA に対するアロ拒絶反応における effector 細胞であることを示すさらなる証拠の一つといえると考えている。さらに今後、CTL の主な武器であるパーフォリンノックアウトマウスでも同様の検証を行う予定である。

また、抗体関連型拒絶反応の一部においても AIM が effector として作用している可能性も否定できないものと推察している。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 3 件)

1. 能見 勇人

腎移植の概要と最近の動向について
大腎協 移植部第 12 回臓器移植学習会
2013 年 9 月 1 日
大阪産業会館

2. 能見 勇人

免疫賦活療法から分子標的に切り替え腎細胞癌多発肺転移後5年以上病勢コントロールできている症例 FOCUS2013
2013年7月6日
東京コンファレンスセンター品川

3. 能見 勇人、稲元 輝生、高原 健、西田 剛、南 幸一郎、光野 絢子、上原 博史、小村 和正、右梅 貴信、東 治人。
免疫賦活療法から分子標的製剤療法に切り替え腎細胞癌多発肺転移後4年以上の生存中の2例の検討
第62回日本泌尿器科学会中部総会
2012年11月2日

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

能見 勇人 (Nomi Hayahito)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：80418938