

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2008 ~ 2009
課題番号：	20791129
研究課題名(和文)	自然免疫による移植片拒絶機構について
研究課題名(英文)	Allograft Rejection by Nature Immunity which Consist of Allograft Induced Macrophages
研究代表者	
能見 勇人	(Nomi Hayahito)
	大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：	80418938

研究成果の概要(和文)：

マウスアロ臓器移植モデルからマクロファージ(M ϕ)抑制実験の正確な結果を得るためには予想以上の時間的を要することが判明したため、有効な結果を得るため、まず細胞レベルの移植モデルで解析を先に行った。C57BL/6マウスにCTL抵抗性の細胞であるMeth A腫瘍細胞(MA)を 3×10^6 個、腹腔内移植するとアロ腫瘍細胞であるMAは約14日で完全に拒絶される。この急性拒絶に働く腹腔浸潤細胞の細胞傷害活性の中心はアロ活性化M ϕ (AIM)であることは以前にも報告した。今回ドナー側にGFP蛍光蛋白のトランスジェニックしたC57BL/6マウス(GFPマウス)を使用し、GFPマウス由来のAIMが標的細胞を噛み切るように傷害する様子を蛍光顕微鏡下に撮影し動画的に連続撮影することに成功した。(GFP-AIMは蛍光を発するため、ドナー側の細胞であることが容易に確認できる。)GFP-AIMにより噛み切られたMA細胞は細胞内容を細胞外に噴出するように破壊され、細胞膜が遺残物のように残ることが判明した。M ϕ がアロの細胞を噛み切るように傷害することは画期的な発見でこれを明確に裏付けできた。

しかし、このAIMの攻撃が、アロに対する攻撃効果であるのか、MAが腫瘍であるから攻撃しているのかを鑑別する必要であることが判明したため、まだ断定的なことが言えない状態である。このため、腫瘍に反応するAIMを除いた後、残ったAIMにおいて現在噛み切り機構につき再度観察を繰り返している。並行して、このGFP-AIMは癒着性の高い細胞であることから、①癒着性の高い細胞を取り出し、これがターゲットMAを攻撃することにより、変化する様子を蛍光下に各14時間以上連続撮影して、精査中である。またM ϕ の活動を抑制すると考えられるトラニラストを各濃度(3 μ M~300 μ M)存在下にAIMの変化を①と同様に観察しているが、これに関しても今のところは決定的な効果の検出には至っていない。推測ではトラニラストは活性化された後のAIMに作用するのではなくAIMが活性化段階に作用するものではないかと考え次に調査する予定である。

研究成果の概要(英文)：

At first, we analyzed in tumor cells of allogeneic transplantation models, because it turned out to require more time beyond our expectation to achieve the clear result of suppressing macrophages from allogeneic organ transplantation mouse models. We have already reported that 3×10^6 cells Meth A fibro-sarcoma (MA cells) which were allo-transplanted into peritoneal space of a C57BL/6 mouse completely rejected in about 14 days. We have also reported that allograft-induced macrophages (AIM) were effective mainly as cellular disorder of peritoneal infiltrating which were activated in this rejection. MA cells have been known to be CTL resistant cells. In this study, we used GFP transgenic C57BL/6 mice (GFP-mice) for the donors and we finally succeeded in videotaping that the GFP-AIM were biting off the co-cultured allogeneic MA cells. We were

sure that the bited off allo-MA cells from this achievement. But, we now have to solve the critical problems whether biting off abilities of the AIM are exert toward allogeneic or neoplastic changes of MA. Now we are examining the ability of AIM derived from PEC to solve this problem, after removing some AIM cells which can respond to neoplastic changes. In addition, we are investigating time course of fluorescence shift of the cells PEC drive adherent cells mainly consist from GFP-AIM with or without various concentration of some of agents influence to macrophage, like as Tranilast ($3\mu\text{M}\sim 300\mu\text{M}$). We, however, have not found out critical effect of it yet. Next, we will try it in activation phase of AIM.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：(1) マクロファージ (2) 同種異型移植 (3) 急性拒絶 (4) マウス (5) トラニラスト

1. 研究開始当初の背景

T細胞のないヌードマウスにおいて同種異系(アロ)移植片拒絶反応は起こらないことから、CD8⁺の細胞傷害性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、1996年にはCD8⁺のT細胞やNK細胞ではなく、CD4⁺のT細胞が拒絶に必須であると報告された。我々は、アロ移植により誘導されるマクロファージ(AIM; Allograft Induced Macrophage)のアロ細胞に対する傷害活性を調査してきた。AIMの働きを阻害することで、アロ移植時におこる拒絶反応のコントロールが可能か否かは未知である。

2. 研究の目的

アロ移植片の拒絶において、AIMの働きを確認し、AIMがそれぞれエフェクター細胞として、生体内でどのようにアロ細胞を直接もしくは間接的に攻撃をしているのかをさらに解明する。

さらに、エフェクターとしてのMφ(AIM)を除くもしくは抑制することにより、アロ拒絶反応を制御可能か否か、また、ヘルパーT細胞系を中心に産生されるサイトカインネットワークの分泌量を含め他にどのような影響があるか検証し、より安全で有効な免疫抑制方法を確立する。将来は同種異型移植のみではなく異種移植の免疫コントロールに有用となる移植免疫学における基礎知識の全体的な向上に役立てたい。

3. 研究の方法

GFP トランスジェニック C57BL/6 (H-2^b) マウスのマウス腹腔内に同種異型 (アロ) の関係にあたる BALB/c (H-2^d) マウス由来の Meth A 繊維肉腫腫瘍細胞を移植。この腫瘍細胞は増殖後に約 14 日で拒絶される。この移植モデルにおいて、このアロ拒絶に働く C57BL/6 マウス由来の腹腔浸潤細胞 (PEC) を得るため、移植後 7 日にマウス腹腔内容物を PBS 洗い出し、MA を低速遠心分離により分離し MA を除く。さらに必要に応じてセルソーター (FACS Aria) で MA や顆粒急やリンパ球を除いて AIM を得た。GFP マウス由来の GFP-AIM によるアロ細胞の攻撃の様子を 14 時間以上経時的に観察した。この GFP-AIM は蛍光を発するので、蛍光を発しない同種異型となる標的細胞とは明確に区別可能であった。さらに、AIM の付着性を利用してプレートに付着する GFP-AIM (E) の蛍光強度について標的細胞となる MA (T) と共培養した場合の経時的変化について E:T 変化による差の有無やマクロファージ作用に拮抗するとされるトラニラストや抗体を使用し他場合、どのような変化が起こるのかを ImageXpress micro を用いて 14 時間以上の連続撮影を行い検証した。さらに MA に対する攻撃能の変化について検討した。これにより同種異型に対する拒絶機能が AIM の制御で可能かの検討をおこなった。

4. 研究成果

径が 10-15 μm の AIM が 25-30 μm の Meth A (MA) を攻撃するとき、AIM は MA 細胞に“噛み込む”もしくは、MA に“もぐりこむ”ように強く接触したあと“噛み切り” (bite off) 離れる。この新たな細胞障害機構が GFP-AIM を用いることでより鮮明にしかも動画的に連続撮影することに成功した。これにより、AIM の噛み切りによるアロ細胞攻撃能を新に確認するとともに、噛み切られた Meth A 細胞は、細胞内容物を噴出するように破壊され、細胞膜と一部の細胞内容物を残し遺残物様となる様子も確認できた。

この画期的な成果について、下記の第 19 回泌尿器科分子・細胞研究会にて動画を用いて発表した。

しかし、この AIM による攻撃が、アロに対する攻撃効果であるのか、MA が腫瘍であるから攻撃しているのかを鑑別する必要であることも必要であることが判明したため、まだ断定的なことは言えない状態である。

そこで、腫瘍に反応する AIM を除いた後、残った AIM において現在噛み切り機構につき再度観察を繰り返しており確認中である。

またトラニラストなどの薬剤やその他抗体 (抗 Toll-like receptor 4 抗体, 抗 CD11b 抗体) などのマクロファージに作用する薬剤もしくは抗体の、作用を *in vitro* で検証も行っているが、AIM の形態の変化は一部にみとめられるものの現在までのところ、拒絶反応を強く抑制させるような決定的な成果は得られていない。今後、方法を一部変更した追試を予定しているが、ここでは AIM が攻撃中、攻撃後どのように変化するのかも検証する予定である。

なお、活性化段階を抑制する実験も順次追加して行うが、純粋な AIM の活性化段階に加え、TGC マクロファージを MA で最終的に活性化し、これの細胞傷害活性をも確認し、AIM と同等の細胞傷害活性があるのか否かを確認する。細胞傷害活性化が認められるならば、TGC による初期の活性化段階と MA での後期活性化段階の二つに分けて調査することで AIM の活性化機構も精査する。これにより、AIM しいてはアロ拒絶反応の効率的で有効な制御方法を確認することが可能となりうる可能性があると考えている。

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 1 件)

1. 能見 勇人¹⁾、吉田 龍太郎²⁾、小山 耕平¹⁾、稲元 輝生¹⁾、右梅 貴信¹⁾、東 治人¹⁾、勝岡 洋治¹⁾

¹⁾大阪医科大学泌尿生殖・発達医学講座 泌尿器科学教室

²⁾大阪医科大学研究機構

アロ活性化マクロファージによるアロ細胞への直接傷害機能の検証。

第 19 回泌尿器科分子・細胞研究会

2008 年 2 月 20 日 神戸ポートピアホテル

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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・助教

研究者番号：80418938