

論文の内容の要旨

論文題目 同種輸血により生体内に誘導される免疫抑制物質
の同定とその免疫抑制機序

指導教官 橋都浩平教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

生殖発達加齢医学専攻

氏名 内田広夫

【背景】

近年臓器移植は末期臓器不全の唯一の根治療法として確立された。現在の課題は免疫反応のコントロールであるが、シクロスポリンやタクロリムスなどの強力な免疫抑制剤の使用は免疫機能を全般的に低下させ感染症や発癌などの問題をおこすため、移植臓器に特異的な免疫抑制法の開発が望まれている。実験的に免疫寛容を導入する試みは遺伝子背景の整った齧歯類などの小動物ではいろいろな方法で成功しているが、大動物やヒトではほとんど成功していない。逆に、腎移植における Donor specific transfusion(DST)や肝移植後の免疫抑制剤の計画的な離脱のように移植に有利な免疫抑制状態や免疫寛容が誘導されたとする臨床報告がある。従って、著者はこのような臨床的史実に基づき動物実験を展開することで臨床応用の可能性が高い研究を行うことができると考えた。

同種異系間の輸血によりレシピエントの免疫抑制状態がもたらされる。特に腎移植においては、強力な免疫抑制剤が出現する以前の1970年代にDSTによって治療成績が向上した。本研究は同種輸血により誘導される内因性生理活性物質を同定し、その免疫抑制機序を明らかにすることを目的とした。DST実験系を *in vivo* で確認した後、血清中に免疫抑

制物質が誘導されていることを確かめた。次に、誘導される免疫抑制因子の同定を試み、新規免疫抑制タンパク質、MAY-I を含めて 3 つのタンパク質の同定に成功した。

【材料および方法】

DA(MHC haplotype; RT1^a)ラットのヘパリン添加全血 1ml を Lewis (RT1^b) ラットに輸血する系を用いた。この組み合わせは high responder combination であるが、DST 後の腎移植モデルでは免疫寛容が誘導される。輸血経路として末梢静脈あるいは門脈を用い、輸血後経時的に血清を採取し血清中に誘導される免疫抑制活性物質の有無を混合リンパ球試験 (MLR) で確認した。さらに Protein profiles の比較を行い、輸血により新たに誘導されるタンパク質を検討した。In vivo の免疫抑制活性は、輸血後 1 週間目に異所性心移植 (HHT) を行い生着延長の有無で検討した。次に門脈から輸血を受けて 1 週間目のラット血清を大量に採取し、塩析や液体クロマトグラフィーを用いて免疫抑制因子の精製を行った。

【結果】

末梢静脈あるいは門脈からの輸血によって移植心の有意な生着延長が認められ、門脈からの DST がより効果的であった。特に門脈から DST を受けたラット血清は MLR を強力に抑制した。これらの血清を SDS-PAGE で比較すると門脈から輸血を受けたラットの血清にのみ新たに誘導される 165kDa のタンパク質を認めた。

免疫抑制因子-1 新規免疫抑制タンパク質 (MAY-I): 血清を塩析後、ProteinG、Hydroxyapatite column によって分離し、免疫抑制活性分画をゲルろ過した。26kDa 付近のタンパク質は MLR を抑制し、SDS-PAGE にて単離が確認された。N 末端アミノ酸配列はラット inter- α -inhibitory H4P heavy chain(H4P)の内部 sequence と 100%一致した。質量分析装置による精製タンパク質の分子量測定の結果、MAY-I は H4P の C 末端を含む fragment であることが確定した。MAY-I の cDNA をクローニング後、組換えタンパク質 (RP-MAY) を作製した。RP-MAY は容量依存的に MLR を抑制した。同時に H4P 全長と H4P の N 末側約 2/3 の cDNA(p-H4P)を作成し、組換えタンパク質を作製したところ H4P 全長には免疫抑制活性が認められたが、MAY-I を含まない p-H4P には免疫抑制活性が認められなかった。

免疫抑制因子-2 α 2-macroglobulin: Protein profiles の比較によって明らかになった、新たに誘導される 165kDa のタンパク質を精製した。このタンパク質は N 末端アミノ酸配列よりラット α 2-macroglobulin(α 2MG)と考えられた。ヒトの α 2MG をヒト MLR の系に添加したところ容量依存的に抑制を示し、MLR 上清中の IFN- γ 産生は強力に抑制され、

IL-10 の産生を亢進したが、IL-2 や IL-4 には変化が認められなかった。

免疫抑制因子-3 IgG 分画: 血清を硫酸沈殿ののち DEAE、Hydroxyapatite、Mono Q、Superose 12 カラムで精製した。還元条件の SDS-PAGE にて 56kDa と 27kDa の 2 本のバンドが認められた。これは Western blotting 法により抗イデオタイプ抗体を含む可能性が示唆された。この精製した抗体群は MLR を抑制し、MLR 上清中の IFN- γ 産生を強力に抑制したが、IL-2 や IL-4、IL-10 産生は変動しなかった。一方 IFN- γ mRNA の発現に変動は認められなかった。

【考察】

同種輸血により受血者は一過性の免疫抑制状態となるが、そのメカニズムはいまだ十分には解明されていない。免疫抑制を起こす液性因子として、移植早期に産生される抗イデオタイプ抗体やプロスタグランジン E1、TGF- β 1 が移植片の生着延長に寄与していることが報告されている。

ラット high responder の組み合わせで、DST により移植心の生着が延長することを確認した。さらに、輸血を受けたラットの血清は MLR を抑制したため、輸血により誘導された内因性生理活性物質が全身性に免疫修飾を行うと考え、それらの物質の同定を試みた。

第 1 の免疫抑制因子として新規タンパク質を同定し MAY-I と命名した。MAY-I は血清より約 $1/1 \times 10^7$ の濃縮精製によって純化された。MAY-I はラット inter- α -inhibitory H4P heavy chain (H4P) の C 末端を含む fragment で、234 のアミノ酸からなる。Northern blotting 法より、MAY-I は肝臓で作られている H4P がプロテアーゼにより切断されて血清中に発現するものと考えられた。ラット H4P は肝臓より作られており、急性炎症時にその発現が上昇することがわかっているが、H4P 自体の機能についてはわかっていない。そのため H4P 全長および N 末端側約 2/3 の組換えタンパクを作製したところ、H4P は MLR を抑制したが、MAY-I を含まない N 末側の H4P は全く抑制しなかった。したがって、H4P のアミノ酸配列の中でも MAY-I に相当する部位が免疫抑制活性に重要な役割を果たしていると考えられた。(MAY-I:特許整理番号 22D00JP)

次に各種血清の protein profiles の比較から門脈からの輸血により誘導される 165kDa のタンパク質、 α 2MG を同定した。ヒトの系で確認を行うと、ヒト α 2MG はヒト MLR を容量依存的に抑制し、MLR 上清中の IL-10 産生を亢進させ IFN- γ 産生を抑制した。すなわち α 2MG は Th1 活性を抑制し、Th2 活性を誘導すると考えられた。 α 2MG はリンパ球系細胞の抗原依存性あるいは非依存性の刺激に対する増殖を抑えることが知られている。そ

の機序として T 細胞の活性化に重要な役割を果たすある種のプロテアーゼが α 2MG と結合することでその機能を失う可能性や、トリプシンなどのプロテアーゼと α 2MG が複合体を形成することで、IL-2 などの各種サイトカインの生理活性を抑制すると考えられている。これまで輸血により血清中の IL-10 産生が上昇することや、DST 後に心移植をするモデルでその移植心が IL-10 を強く発現し IFN- γ の発現が抑制されているという報告もある。我々の実験結果より DST により血清中の α 2MG が誘導され、IFN- γ の抑制と IL-10 の誘導を介して免疫反応を抑制することが示唆された。

最後に精製された免疫抑制活性を示すタンパク質は、IgG 分画に存在することが明らかになった。この精製分画は抗 RT1^a 抗体と反応することより、anti-idiotypic antibody (AI Ab) を含む可能性があると思われた。精製分画は MLR を強力に抑制し MLR 上清中の IFN- γ 産生を抑制したが IL-2 産生は抑制しなかった。一方、IFN- γ mRNA の発現を抑制していなかった。これまで anti-MHC イムノグロブリンが輸血後早期に誘導されることがラットおよびヒトで報告されており、この抗体が移植抗原に対する抗体の抗体価を抑制し、細胞障害的な反応を抑えることが示されてきた。また、T 細胞の抗原認識部位に直接作用して増殖反応を抑制するメカニズムも考えられている。今回我々が精製した抗体分画を MLR 開始後 24 時間目に加えても、同様に 50% 程度の増殖抑制率が認められた。さらに刺激細胞として third party (BN ラット) を用いて行った MLR でも、40% 程度の抑制率を示した。すなわち精製した抗体分画は非特異的免疫抑制成分も含む可能性が考えられた。

【結語】

ラット同種輸血モデルにおいて移植心の生着延長が認められ、輸血により誘導される生理活性物質が全身性に免疫修飾を行うことが明らかになった。輸血を受けたラットの血清の分離、解析により血清中に誘導される免疫抑制物質を 3 種類、新規タンパク質 MAY-I および α 2-macroglobulin、抗体分画を同定した。MAY-I は inter- α -inhibitor H4P heavy chain の C 末端側を含む 234 アミノ酸からなる。その免疫制御機序は明らかではないが、肝臓より分泌される H4P が切断され MAY-I となることでより強力な免疫抑制活性を示していた。 α 2MG は Th1/Th2 バランスを Th2 優位にすることで免疫を制御していると考えられた。精製した抗体分画は MLR 反応を抑制した。その免疫抑制機序として anergy が関与していると考えられた。また、この抗体分画はドナー非特異的な免疫抑制を行っている可能性が示された。