

審査の結果の要旨

氏名 末 永 文 子

本研究は、血液系疾患の強力な治療法である同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT) 後の免疫不全、特に既報論文では説明できない、末梢血中の T および B 細胞数の回復後の液性免疫不全の原因を明らかにするために、allo-HSCT・移植片対宿主病 (GVHD) モデルマウスを用いて、解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. B6 マウスをドナー、BDF1 マウスをレシピエントにした allo-HSCT マウスモデル (B6 to BDF1) を用いて、T 細胞除去骨髄 (TCD BM) を移植したコントロール群と、TCD BM に加えて CD8⁺ T 細胞を移植した GVHD 群を作成した。末梢 T、B 細胞数がほぼ回復する移植後 40 日目に、フローサイトメトリー (FACS) を用いたリンパ球数解析、および、ヘマトキシリン-エオシン (H&E) 染色を用いた病理学的解析を行った。その結果、GVHD 群で、末梢 T、B 細胞数が BMT 群とほぼ同等に回復した一方、リンパ節が重度に萎縮することが明らかになった。
2. ドナーとレシピエントの間の組織適合抗原 (HA) 不一致の組み合わせが異なる 5 種類の allo-HSCT モデルマウスを用いて、CD4⁺ T あるいは CD8⁺ T 細胞依存的 GVHD 発症モデルマウスを作製し、それぞれ移植後 40 日目のリンパ球数および構造を FACS と H&E 染色により解析した。その結果、重度の萎縮を伴うリンパ節障害は、主に CD8⁺ T 細胞依存的に発症することが示された。
3. リンパ節の構造変化を蛍光免疫染色および電子顕微鏡により解析した。その結果、T 細胞への抗原提示の場である傍皮質領域、B 細胞への抗原提示ならびに増殖・分化の場である濾胞領域、T-B 細胞間相互作用の場である T-B 境界領域が失われていることが明らかになった。また、リンパ節への血行性細胞流入に必須である HEV が重度の障害を受け、抗原フィルタリングを担う髓質領域が失われること、ならびにリンパ管を介したリンパ球の正常な流入および流出が滞っている可能性が示された。
4. Allo-HSCT 後 40 日目のレシピエントに T 細胞依存的なモデル抗原 NP-OVA を皮下免疫し、1、2、3 週間後の NP 特異的 IgG1 抗体価を、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) を用いて解析した。その結果、BMT 群では 2 週目以降に抗体価を検出できたが、GVHD 群の抗体価はいずれも検出限界以下であった。
5. Allo-HSCT 後 40 日目のレシピエントに NP 特異的 B 細胞受容体ノックイン B 細胞 (B1-8) を免疫前日に移入後、NP-OVA を皮下免疫し、NP 特異的 IgG1 抗体価を ELISA にて解析した。その結果、B1-8 細胞を移入しなかったレシピエントと同様に、BMT 群

では 2 週目以降に抗体価を検出できたが、GVHD 群の抗体価はいずれも検出限界以下であった。皮下免疫に伴う B 細胞の活性化、T-B 間相互作用依存的なクラススイッチならびに affinity maturation がいずれも強く抑制されることが示された。

6. Allo-HSCT 後 40 日目のレシピエントにコレラ毒素 (CT) を経口投与し、IgG および IgA 抗体産生応答を、ELISA を用いて解析した。GVHD 群において CT 結合性 IgA、IgG 抗体ならびに中和抗体の産生が重度に減弱化されることが示された。
7. Allo-HSCT 後 40 日目のレシピエントに大量のサルモネラ菌 (1×10^9 cfu) を経口感染させ、その後の生存率を測定することで粘膜防御の評価を行った。その結果、GVHD 群が BMT 群と比較して優位に生存率が低いことが示された。GVHD 群において腸管膜リンパ節のフィルタリング機能に依存する感染防御が減弱化されることが示された。
8. Allo-HSCT 後の抗 CD8 抗体の投与による CD8⁺ T 細胞の除去で、リンパ節障害の予防・治療が可能であるかどうかを、FACS による細胞数解析により評価した。Allo-HSCT 後 2、4、7 あるいは 14 日目のいずれの時期から抗体投与を開始した場合も、コントロール IgG 投与群と同様に重度のリンパ節萎縮が認められた。Allo-HSCT 後 2 日目以降の抗体投与ではリンパ節萎縮を抑制できないことが明らかとなった。
9. 放射線非照射レシピエントに allo-HSCT (B6 to BDF1) を実施し、FACS および H&E を用いてリンパ節障害を解析した。その結果、放射線照射したレシピエントに allo-HSCT した場合と同様にリンパ節障害が認められた。リンパ節障害は放射線照射に依存することなく、免疫学的機序のみで発症し得ることが示された。
10. CD8⁺ T 細胞の持つ細胞傷害経路の内、Fas/Fas ligand (FasL) 経路の関与を検証した。FasL の機能欠損ミュータント (FasL^{gld/gld}) マウスから採取した CD8⁺ T 細胞を用いて、Fas/FasL 経路の阻害によるリンパ節障害抑制効果を、FACS および蛍光免疫染色法を用いて解析した。その結果、リンパ節の萎縮及び構造破壊の部分的な軽減が見られたことから、リンパ節障害機序に Fas/FasL 経路が部分的に関与することが示された。

以上、本論文はこれまで不明であった allo-HSCT 後の GVHD 患者に遷延する免疫不全、特に液性免疫不全の原因について、従来注目されていなかったリンパ節が allo-HSCT 後の CD8 依存的 GVHD によって不可逆的な障害を受けることが原因の一つであることを示した。本研究は allo-HSCT 後の免疫不全の早期治療および克服に向け重要な知見を与えるものであり、学位の授与に値するものと考えられる。