

氏 名	お 小 倉 やす ひろ 弘
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2526 号
学位授与の日付	平 成 14 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Apoptosis and Allograft Rejection in the Absence of CD8 ⁺ T cells. (和訳: CD8 ⁺ T 細胞の非存在下におけるアポトーシスと拒絶反応に関する 研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 湊 長 博 教 授 坂 口 志 文 教 授 田 中 紘 一

論 文 内 容 の 要 旨

<研究背景>

臓器移植後の拒絶反応におけるメカニズム, とりわけ cytotoxic T リンパ球の必要性に関しては, 依然議論の余地のあるところである。1998年に, ラット小腸移植モデルを用いて, 拒絶・アポトーシスに, CD8⁺ T 細胞が必要でないと報告されているものの, 肝移植モデルにおいては明らかにされていない。本実験の目的は, ラット肝移植モデルを用いて, CD8⁺ T 細胞の非存在下のもとで, グraft肝に拒絶反応とアポトーシスが起こるのかどうか, そのメカニズムを解明するものである。

<方法>

Lewis あるいは DA ラットをドナーとして, Lewis ラットへ肝臓移植を施行し, それぞれ syngeneic と allogeneic の移植モデルを作成した。Syngeneic モデルでは拒絶反応が起こらず, allogeneic モデルは, 移植後 9-12日目に急性拒絶反応が起こる組み合わせである。CD8⁺ T 細胞非存在下の系を作成するため, allogeneic モデルには, OX-8モノクローナル抗体(抗ラット CD8抗体)を肝移植日の前日と翌日に腹腔内投与し, CD8⁺ T 細胞をレシピエント・ラットから除去するモデルを追加した。これら計3グループを用いて, 組織染色, 分子生物学の手法を駆使して, メカニズムの解明を試みた。

<結果>

移植後の肝臓グラフトの拒絶反応とアポトーシスは, H & E 染色, TUNEL 染色, 同位元素ラベルした annexin V *in vivo* イメージにて調べたところ, allogeneic モデルの CD8⁺ T 細胞の存在下, 非存在下の両方でほぼ同レベルで観察された。このことは, CD8⁺ T 細胞が拒絶反応・アポトーシスに必須ではないことを示している。それでは, どのような経路にて拒絶反応・アポトーシスが誘導されるのかを調べるために, molecular level にて検索した。Granule-exocytosis pathway の granzyme B と FasL は拒絶反応の起こった allogeneic の両方のグループにて観察され, CD8⁺ T 細胞以外の浸潤リンパ球がこれらの分子の供給源と考えられた。アポトーシスを導く caspase cascade の活性化も拒絶反応のおこった allogeneic のグループで観測され, それらの拒絶肝のなかでは, caspase-3, -8, -9は, ほぼ同等レベルで有意に活性化されていた。Caspase-8, -9は initiator caspases であり, それぞれ death receptor pathway と mitochondrial pathway を介して, アポトーシスを誘導する。従って, 拒絶反応の絡む caspase cascade は, 単一の pathway でなく複数の signaling pathway を介した反応であり, CD8⁺ T 細胞の存在, 非存在に関係なく活性化されているため, CD8⁺ T 細胞はこれらの反応に必須ではなく, その他の effector 細胞の存在が示唆される。

<結論>

これらの結果は, ラット肝移植モデルで CD8⁺ T 細胞の非存在下においては, granzyme B, FasL や caspase cascade に活性化による経路を用いてアポトーシスや拒絶反応を起こさせることが出来ることを示している。

<考察>

CD8⁺ T細胞以外の effector 細胞としては、CD4⁺ T細胞やNK細胞などがあげられるが、これまでのデータからNK細胞が数多くグラフト肝に浸潤しており、NK細胞の急性拒絶反応への関与を類推させる。

論文審査の結果の要旨

臓器移植後の拒絶反応のメカニズム、とりわけ cytotoxic T細胞の必要性に関しては、依然議論の余地のあるところである。本実験の目的は、ラット肝移植モデルを用いて、CD8⁺ T細胞の非存在下のもと、グラフト肝に拒絶反応とアポトーシスが起こるのかどうか、そのメカニズムを解明するものである。

H & E 染色, TUNEL 染色, annexin-V in vivo image にて調べたところ、CD8⁺ T細胞の存在・非存在下の両方で、肝臓グラフトの拒絶反応とアポトーシスはほぼ同レベルで観察された。RNA level では、CD8⁺ T細胞の有無にかかわらず、Granule-exocytosis pathway の granzyme B と FasL が、拒絶グループにて観察された。caspase cascade (caspase-3, -8, -9) の活性化も、CD8⁺ T細胞の存在に関係なく拒絶グループではほぼ同等レベル観測された。Caspase-8, -9 は、それぞれ death receptor pathway と mitochondrial pathway を介して、アポトーシスを誘導する。従って、拒絶反応中のアポトーシスは、単一の pathway でなく複数のシグナルを介した反応であり、CD8⁺ T細胞の有無に関係なく活性化されているため、CD8⁺ T細胞はこれらの反応に必須ではなく、その他の effector 細胞の存在が示唆される。

以上の研究は、肝移植後の急性拒絶反応における免疫担当細胞またそのシグナル伝達の解明に貢献し、臓器移植後の新たな免疫抑制療法に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成14年5月28日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。