

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                          |     |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 博士（ 医 学 ）                                                                                                                                                | 氏 名 | 里 田 直 樹 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Value of FOXP3 expression in peripheral blood as rejection marker after miniature swine lung transplantation<br>(ミニブタ肺移植後の拒絶マーカーとしての末梢血における FOXP3 発現の意義) |     |         |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                          |     |         |
| <p>【背景】 一般にげっ歯類では、制御性 T 細胞 (Tregs) に発現する Forkhead box P3 (Foxp3) が、移植免疫寛容の指標になり得るとされてきた。一方でヒトの心移植グラフト内、腎移植後尿中では拒絶時に <i>FOXP3 mRNA</i> が増加するとの報告が散見される。臨床肺移植では、信頼できる非侵襲的な急性拒絶の診断法方が無い。そこで大動物肺移植モデルにおいて拒絶マーカーとしての末梢血 <i>FOXP3</i> の発現の意義につき検討した。</p> <p>【実験 1】 (方法) ミニブタを用い同種左肺片肺移植を以下の 3 群で施行した。①免疫抑制剤なし拒絶群 (Gr-AR)：急性拒絶モデル、②クランプ再灌流群 (Gr-IRI)：自家肺の虚血再灌流傷害のモデル、③免疫抑制剤投与群 (Gr-IS)：高濃度タクロリムスを術後 12 日間投与。拒絶反応のモニタリングは、胸部 X 線所見のグレード (G0-4)、及び開胸肺生検検体 (術後 0、4、7、10 日目) の病理学的評価 (A0-4、国際心肺移植学会拒絶グレード) を用いた。拒絶のエンドポイントは胸部 X 線 G4 の時点とした。術後、末梢血、肺グラフト組織から mRNA を抽出しリアルタイム PCR を施行した。対象遺伝子は <i>FOXP3</i> に加え、従来知られた拒絶時に発現する遺伝子 <i>perforin</i>、<i>Fas-L</i>、<i>IP-10</i> を評価した。</p> <p>(結果) Gr-AR、Gr-IRI、Gr-IS のグラフト生存期間は、それぞれ 9.1 日、140 日以上、19.3 日であった。胸部 X 線では Gr-AR において、術後 6 日目以降 Gr-IRI、Gr-IS に比べグレードの有意な上昇を認めた。しかし病理組織所見では、Gr-IRI、Gr-IS に比べ Gr-AR において既に術後 4 日目以後にグレードの有意な上昇を認めた。末梢血の PCR の検討では、<i>FOXP3</i> は術後 4 日目に Gr-AR において術後 3 日目までに比べ有意な増加を認め 6 日目以降低下した。それに対し Gr-IRI、Gr-IS では <i>FOXP3</i> の増加は全過程において認められなかった。しかし Gr-AR で <i>Perforin</i>、<i>IP-10</i>、<i>Fas-L</i> の有意な増加は認めなかった。肺生検組織の検討では、Gr-AR の <i>FOXP3</i> 発現は術後 4 日目において有意増加を認めた。Gr-AR における末梢血 <i>FOXP3</i> 発現量とグラフト内 <i>FOXP3</i> 発現量の間には有意な相関を認めた。</p> <p>末梢血 <i>FOXP3</i> が術後 4 日目に増加するという実験 1 の結果に基づき、以下の実験を行った。</p> <p>【実験 2】 (方法) ④術後 4 日目 (末梢血 FOXP3 の増加する時期) からレスキュー免疫抑制療法を行う群 (Gr-D4R)：レスキュー免疫療法を術後 4 日目から 9 日目まで施行した群、⑤術後 6 日目 (胸部 X 線の変化を認める時期) からレスキュー免疫抑制療法を行う群 (Gr-D6R)：レスキュー免疫抑制療法を術後 6 日目から 11 日目まで行った群を設定した。レスキュー療法は高濃度タクロリムスとステロイドパルス療法の 2 剤を使用した。その他の評価方法は実験 1 と同様とした。Gr-D4R、Gr-D6R につき、Gr-AR に比べ生存期間を検討した。(結果) Gr-D4R では Gr-D6R、Gr-AR に比べ、グラフト生存期間の有意な延長を認めた。しかし Gr-D6R では Gr-AR に比べグラフト生存期間は延長しなかった (Gr-D4R 27.2 日、Gr-D6R 11.5 日、Gr-AR 9.1 日)。</p> <p>【結語】ミニブタ肺移植モデルにおいて、末梢血 <i>FOXP3</i> 発現レベルは急性拒絶時に増加していた。また、末梢血 <i>FOXP3</i> の増加時に免疫抑制剤を投与すると、グラフト生存期間が有意に延長した。</p> <p>【考察】 本知見は、末梢血 <i>FOXP3</i> が肺移植後の急性拒絶指となりうる可能性を示唆している。しかし本実験では、免疫抑制剤を投与していないため、今後臨床応用を念頭に、免疫抑制剤投与中に起こる急性拒絶時の末梢血 <i>FOXP3</i> の発現につき、検討を要する。</p> |                                                                                                                                                          |     |         |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |  |  |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--|
| (論文審査の結果の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |  |  |  |
| <p>臨床肺移植では、急性拒絶反応の診断における非（低）侵襲的な指標は確立されていない。</p> <p>本論文では、ミニブタ同種肺移植モデルにおいて、末梢血 <i>FOXP3</i> (Forkhead box P3; 制御性 T 細胞の特異的マーカー) mRNA の、急性拒絶の診断における意義を調べた。</p> <p>肺移植後急性拒絶群 (Gr-AR) において、急性拒絶は、胸部 X 線検査では術後 6 日目に初めて疑われるのに対し、病理検査では少なくとも術後 4 日目に検出された。末梢血 FOXP mRNA は術後 4 日目にピークとして増加することが分かった。即ち、末梢血 FOXP3 mRNA の増加は、病理学的に拒絶反応が認められる時期に既に増加していることが示された。</p> <p>この結果に基づき、以下の実験を行った。</p> <p>肺移植後、末梢血 FOXP3 mRNA 発現の増加日（術後 4 日目）に免疫抑制療法を開始する群 (Gr-D4R)、および胸部 X 線所見が変化した日（術後 6 日目）に免疫抑制療法を開始する実験群 (Gr-D6R) を追加し、生存期間は Gr-D4R において、Gr-D6R、Gr-AR に比べ有意に延長することを示された。</p> <p>本実験で得られた知見は、末梢血 FOXP3 mRNA が肺移植後の急性拒絶マーカーの指標となり得る可能性を示唆している。しかし本実験では免疫抑制剤を投与しないモデルを用いたため、臨床応用を念頭に免疫抑制剤投与中に起こる急性拒絶での末梢血 FOXP3 mRNA の発現については今後の検討を要する。</p> |  |  |  |
| <p>以上の研究は、肺移植での急性拒絶反応の解明に貢献し、肺移植後の急性拒絶指標の探索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みとめる。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 22 年 2 月 16 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。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  |  |
| 要旨公開可能日：                      年                      月                      日 以降                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |  |  |