

氏名(本籍)	せい の けんいちろう 清野研一郎(東京都)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第1,736号
学位授与年月日	平成9年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Contribution of Fas ligand to cardiac allograft rejection (同種心移植拒絶反応における Fas リガンドの関与)
主査	筑波大学教授 医学博士 中内啓光
副査	筑波大学教授 医学博士 柏木平八郎
副査	筑波大学教授 医学博士 三井利夫
副査	筑波大学教授 医学博士 渡邊照男
副査	筑波大学助教授 医学博士 八木沼洋行

論文の内容の要旨

(目的)

同種移植における拒絶反応には細胞障害性 T 細胞 (CTL) が重要な役割を担っていることが既に示されているが、その分子メカニズムについては不明な点が多い。現在、CTL による細胞障害の分子メカニズムには、パーフォリン・グランザイムを介した機構および Fas/Fas リガンド (FasL) を介するメカニズムの二つが知られている。CTL から放出されたパーフォリンは標的細胞の膜に孔をあけ、セリンエステラーゼであるグランザイムが細胞内に浸入し、浸透圧変化や CPP 32 プロテアーゼの活性化を介して標的細胞を破壊する。また、CTL 上に発現された FasL は、標的細胞上の Fas に結合し標的細胞にアポトーシスを誘導する。1995年、Schulz らはパーフォリンノックアウトマウスを用い、同種心移植拒絶反応においてパーフォリンは必須の分子ではないことを示した。心臓は Fas mRNA を発現していることが既に報告されているが、心移植拒絶反応における Fas/FasL の役割は明らかになっていない。そこで本研究では、心筋上の Fas の発現と機能を調べ、Fas 欠損マウスである Ipr マウス及び FasL 欠損マウスである gld マウスをドナーまたはレシピエントに用いて心移植実験を行い、同種心移植拒絶反応における Fas/FasL の役割について解析した。

(方法)

1. マウス

5週齢の BALB/c (H-2^d), C3H/He (C3H) -+/+, C3H-lpr/lpr (C3H/lpr), C3H-gld/gld (C3H/gld) (以上 H-2^k), C57BL/6 (B6) -+/+, B6-lpr/lpr (B6-lpr), 及び B6-gld/gld (B6/gld) (以上 H-2^b) を用いた。

2. フローサイトメトリーによる心筋細胞の解析および心筋細胞に対する傷害活性の測定

胎児マウスの心臓をトリプシン-EDTA で処理し、心筋細胞を調整した。心筋細胞上の Fas の発現を FACS で解析した。FasL トランスフェクタントによる心筋細胞の生存率の変化を Alamar Blue 法で測定した。

3. 心移植

Corry の方法でマウス異所性心移植を行った。移植心の停止を拒絶の完成とした。移植後、移植心の組織学的解析を行った。

4. T細胞機能試験

移植前後のマウス脾細胞を用い、リンパ球混合培養、CTL誘導を行いT細胞機能試験を行った。

(結果)

1. 心筋細胞上のFasの発現と機能

正常マウス的心筋細胞上はFasが発現していた。また、心筋細胞の生存率FasLトランスフェクタントとの接触によって低下した。

2. 同種心移植後の生着率

ドナー、レシピエントともに正常マウスを用いて心移植を行った場合に比べ、*lpr* (Fas欠損) マウスの心臓を正常マウスに移植しても生着期間の有意な延長は見られなかった。しかし、正常マウス由来の心臓を*gld* (FasL欠損) マウスや*lpr* (Fas欠損) マウスに移植した場合は、移植心の生着がやや延長し、細胞浸潤の程度も軽度であった。

3. T細胞機能試験

gld 及び *lpr* マウスのT細胞に機能異常は認められなかった。

(考察)

正常心筋細胞はFasを発現しており、その活性化によって心筋傷害が起こる可能性があると思われた。しかし、*lpr* マウスをドナーとした心移植実験では生着延長は見られなかった。したがって、同種心移植拒絶反応においては移植片上のFasは重要ではなく、CTLの発現するFasLが心筋細胞上のFasに結合し移植片の破壊をもたらすことはないと考えられた。しかし、*gld* または *lpr* マウスをレシピエントとした場合には有意に生着延長が認められ、レシピエント側の免疫反応の制御にFas/FasLの作用が関与していると考えられた。その詳細なメカニズムは現在明らかではないが、以下のような可能性が考えられる。(1) T細胞上のFasがコストимуラトリー (副刺激) 分子として働いている、(2) レシピエント由来の抗原刺激細胞 (マクロファージ等) 上のFasがFasLによって刺激されアポトーシスを起こすと同時にIL-1 β 等の炎症性サイトカインを放出する、(3) CTL上のFasLがレシピエント由来の浸潤細胞に作用しIL-8等のサイトカインの産生を促す、等である。

(結論)

これまでの知見と今回の研究結果から、同種心移植拒絶のメカニズムとして、パーフォリンまたはFasLによる直接的細胞傷害機構は重要はないと考えられる。FasLは、T細胞やマクロファージ等の産生するサイトカインによって起こる遅延型過敏性反応様の炎症に参加し、間接的に移植拒絶反応に関与していることが示唆された。

審査の結果の要旨

同種臓器移植に伴う拒絶反応は移植外科の分野で依然として大きな問題となっている。本研究ではFas遺伝子に異常を持つ変異マウスを使用して心移植を行うことにより、細胞障害性T細胞が組織を攻撃する際に用いる手段の一つであるFas・FasLの経路が拒絶反応に直接的な役割を持っていないことを明確に示すことができた。既に報告されているパーフォリン欠損マウスをレシピエントとした心移植の実験結果と合わせると、心移植の際の拒絶反応には、現在知られているCTLの細胞障害活性機構のいずれもが関与していないことが明らかになった。以上、本論文は拒絶反応の分子機構の解明に重要な手がかりを与える意義のある研究として評価できるものである。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。