

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	佐伯 吉弘
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 Memory-like Liver Natural Killer Cells are Responsible for Islet Destruction in Secondary Islet Transplantation (メモリー肝臓内 NK 細胞の 2 次膵島移植における膵島傷害への関与)			
論文審査担当者			
主 査	教授	田 妻	進 印
審査委員	教授	浅 野	知一郎
審査委員	准教授	村 上	義 昭
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>経門脈的膵島移植は 1 型糖尿病の治療として行われているが、単回投与では十分な治療効果を得られないため複数回の移植を要する。これまでに、膵島移植後に肝臓内 Natural Killer (NK)細胞が細胞傷害分子である TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)を介し膵島グラフト傷害を生じることを証明してきた。近年、TRAIL を強発現する DX5⁻NK 細胞の memory 機能が報告されており、DX5⁻ NK 細胞の 2 次膵島移植時の膵島生着への関与を検討した。マウスに経門脈的膵島移植を行い、肝臓内における炎症性サイトカインの発現の推移を評価し、<i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> においてサイトカインが膵島移植後の肝臓内 NK 細胞に与える影響をフローサイトメーターで解析した。糖尿病化した免疫関連機能分子のノックアウトマウスに膵島移植を行うことで、特定の分子の膵島傷害への関与を検討した。糖尿病の改善には至らない 200 個の膵島を糖尿病マウスに膵島移植した後に、治療用量の 400 個の膵島を投与し 2 次膵島移植モデルとした。</p> <p>その結果、肝臓内 DX5⁻ NK 細胞は DX5⁺ NK 細胞に比し CD69 (活性化マーカー)、TRAIL, CXCR3 (ケモカインレセプター) の表出が有意に高く、より強力な膵島傷害能を示した ($p < 0.05$)。また、DX5⁻ NK 細胞の膵島傷害能は抗 TRAIL 抗体を用いることで減弱した。<i>Tbx21</i>^{-/-} マウス (DX5⁻ NK cell deficient マウス) では wild-type(WT)マウスに比較し、200 個の膵島を用いることでより良好な糖尿病の改善が得られた ($n = 5/6$ vs $0/6$, $p = 0.0152$)。CXCR3^{-/-} マウスへの膵島移植においても、WT マウスに比較しより良好な改善効果が得られ ($n = 6/6$ vs $0/6$, $p = 0.0022$)、DX5⁻ NK 細胞および CXCR3 分子の膵島傷害への関与が示唆された。膵島移植後 24 時間で肝臓内炎症性サイトカイン (TNF-α, IFN-γ, IL-1β) の mRNA は急激に上昇を示し、その後漸減した。<i>In vitro</i> の TNFα を中心としたサイトカイン環境下で、DX5⁻ NK 細胞の含有率は増加し ($p < 0.01$)、CD69 の表出も著明に増強した ($p < 0.001$)。更に <i>in vivo</i> の検討で、移植 24 時間後に DX5⁻ NK 細胞含有率、CD69, TRAIL, CXCR3 表出率は増大し ($p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, 各々)、その効果は抗 TNFα 抗体で抑制された。また急性期の活性化は膵島移植後 14 及び 35 日後においても維持・増強されていた。400 個の膵島投与を行ったモデルに比較し、200 個の膵島移植を行った後に 400 個の膵島移植を行った糖尿病マウスでは有意に糖尿病の改善が少なかった ($n = 5/6$ vs $0/6$, $p = 0.015$)。また、2 次膵島移植群では単回移植群に比較し DX5⁻ NK 細胞含有率、CD69, TRAIL, CXCR3 表出率がいずれも高値を示した ($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$, 各々)。一方で、2 次膵島移植前に NK 細胞を除去したモデルでは有意に糖尿病の改善が得られ ($n = 5/6$ vs $0/6$, $p = 0.015$)、2 次膵島移植時の膵島傷害への NK 細胞の関与が明らかとなった。そこで初回・2 次膵島移植時に抗 TNFα 抗体を投与したところ、コントロール抗体に比較し有意に糖尿病の改善が見られた ($n = 6/7$ vs $0/7$,</p>			

p = 0.0047)。また抗 TNF α 抗体群では、DX5⁻ NK 細胞含有率、CD69、TRAIL 表出率が有意に抑制されていた。これに対し 2 次膵島移植時にのみ抗 TNF α 抗体を投与した群では有意な糖尿病の改善は見られず(n = 1/5 vs 0/5, p = 1)、NK 細胞の活性化も抑制されなかった。初回膵島移植で一度膵島の曝露をうけて活性化した肝臓内 DX5⁻ NK 細胞は、抗 TNF α 抗体によって制御が困難であった。

経門脈的膵島移植においてはインスリン離脱のために複数回の移植を要するのが現状であるが、複数回移植による生体内の免疫への影響に関しては未だ解析が十分になされていない。今回の検討は、自然免疫担当細胞である肝臓内 DX5⁻ NK 細胞が膵島移植後の急性期を越えて、長期にわたり活性化を維持増強しており、2 次膵島移植において TNF α によってより強力なメモリー反応としての膵島傷害を生じることを明らかにした。

以上の結果から、本論文は肝臓内 DX5⁻ NK 細胞を抗 TNF α 抗体によって制御することで、繰り返し行われる膵島移植への肝臓内 DX5⁻ NK 細胞による強力な膵島傷害を制御できる可能性を証明した点で高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が佐伯吉弘に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	佐伯 吉弘
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Memory-like Liver Natural Killer Cells are Responsible for Islet Destruction in Secondary Islet Transplantation (メモリー肝臓内NK細胞の2次膵島移植における膵島傷害への関与)			
最終試験担当者			
主査	教授	田 妻	進 印
審査委員	教授	浅 野	知一郎
審査委員	准教授	村 上	義 昭
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成31年2月7日の第78回広島大学研究科発表会（医学）及び平成31年2月7日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 膵島移植の現状と将来展望 2 DX5NK細胞の肝臓内局在および生理学的意義 3 IBMIRにおけるサイトカイン産生細胞とその制御 4 自家膵島移植におけるNK細胞による傷害機構 5 iPS由来膵島による糖尿病治療の展望 <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			