

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)	氏名	山下 正博
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項・2 項該当		
論 文 題 目			
Different sensitivities to calcineurin inhibitors between B cells responding to blood group A and B antigens (血液型 A 抗原/B 抗原応答 B 細胞はカルシニューリンインヒビターの感受性が異なる)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	菅 野	雅 元 印
審査委員	教 授	一 戸	辰 夫
審査委員	講 師	大 島	久 美
〔論文審査の要旨〕			
<p>ABO 血液型不適合移植の成績は、抗体除去療法の進歩により改善したが、感染症や制御困難な抗体関連拒絶反応は依然として問題である。血液型抗原に特異的な免疫抑制療法の確立が求められているが、最適な動物モデルは確立されていない。マウスは B 型抗原決定基と類似構造を持つ主要異種抗原 Gal 抗原を発現しているため、A 抗原に対する抗体産生は惹起されるが、B 抗原に対する免疫応答は寛容化されていると考えられる。本研究では、αGal 抗原決定基を持たない α-galactosyltransferase-deficient ($GalT^{-/-}$)マウスを用いて血液型 A/B 抗原に対する応答性を解析した。Wild type (WT) または $GalT^{-/-}$マウスにヒト A 型および B 型赤血球で腹腔内投与により免疫し、血清中抗 A 抗体および抗 B 抗体価を ELISA 法で測定した。また、脾臓における抗体産生細胞の存在を ELISPOT 法で解析した。腹腔内および脾臓における血液型抗体産生細胞のフェノタイプ解析は、FITC 標識合成血液型糖鎖 (A-BSA/B-BSA) 抗原を用いフローサイトメトリーで評価した。B 細胞サブセットにおける calcineurin inhibitors (CNIs) の感受性を検討するため <i>in vitro</i> 分化誘導モデルを作成した。マウス脾臓 B 細胞を CFSE 蛍光色素でラベルすることで分化増殖を可視化した。B-1a 細胞への分化は、B 細胞受容体 (BCR) が cross link することで分化増殖することを模倣し、anti-IgM F(ab')₂ で培養した。B-1b 細胞への分化は BCR の cross-linking と共に TLR 刺激で分化増殖することを模倣し、anti-IgM F(ab')₂ および LPS 添加で培養した。これら</p>			

の培養系に CNIs を添加することで各 B 細胞サブセット分化誘導への影響を検討した。 *In vivo* での CNIs に対する感受性は、 *GalT*^{-/-}マウスに Cyclosporine (CsA) を投与し、ヒト AB 型赤血球で A 型および B 型抗原に対する免疫応答を構築後 (1 回/週, 4 週), 血清中抗 A 抗体および抗 B 抗体価を ELISA 法で測定した。ヒト A 型および B 型赤血球で免疫された *GalT*^{-/-}マウスにおいて、腹腔内の A 型抗原認識 B 細胞は CD5⁺CD11b⁺B-1a 細胞フェノタイプを、B 型抗原認識 B 細胞は CD5^{dim}^{-/-} CD11b⁺B-1b 細胞フェノタイプを示した。血清中には、免疫 2 週以降で抗 A、抗 B 抗体ともに有意な上昇とクラススイッチを認めた。一方、WT マウスでは抗 B 抗体の上昇を認めなかった。脾臓内の抗 B 抗体産生細胞は、 *GalT*^{-/-}マウスが WT マウスに比べ有意に高い割合で存在した。過去の報告で E-Coli 086 が強い血液型活性を持ち、それが B 型 trisaccharide の部分的構造を含む LPS 由来であることが報告されている。そこで、B 型抗原認識 B 細胞が Toll-like receptor (TLR) を介して活性化するか否かを検討する目的で Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) の発現を解析した結果、A 型抗原認識 B 細胞と比較し有意な上昇を確認した。次に、B 細胞サブクラスへの *in vitro* 分化誘導モデルを用いて CNI に対する感受性を解析したが、CsA は B-1b 細胞への分化に比べ B-1a 細胞への分化をより強力に抑制した。すなわち、BCR と共に TLR4-MyD88 シグナルを介して B 細胞が活性化される場合、CNI に対する感受性が低下することが解明された。さらに *GalT*^{-/-}マウスを用いた *In vivo* での抗 A/抗 B 抗体産生における CsA 感受性評価では、抗 A 抗体産生は CsA により抑制されたが、抗 B 抗体産生は抑制されなかった。本研究結果と臨床との関連性を評価するため、日本移植学会で集積した ABO 不適合生体腎移植のデータを用い解析した。リツキサンや脾臓摘出などの汎 B 細胞抑制が行われておらず CsA ベースの免疫抑制療法で管理された症例を対象とし、移植腎生着率を解析すると、15 年以上の長期生着率が B 型不適合は A 型不適合に比べ不良であった。この結果は、本研究の A 抗原認識 B 細胞と B 抗原認識 B 細胞の CsA に対する感受性が異なる結果を反映していると考えられた。

以上の結果から、本論文は血液 A 型抗原認識 B 細胞は CD5⁺B-1a 細胞であるのに対し、B 型抗原認識 B 細胞は CD5⁻B-1b 細胞で、活性化の際に MyD88 を表出し TLR signal が関与していること、さらに CsA は抗 A 抗体産生を抑制できるが、抗 B 抗体産生は抑制できず、B 型不適合腎移植の長期生着率に影響する可能性を示した点で高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が山下正博に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。