

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第	471号	学位申請者	富田 祐介
審査委員	主査	堀内 正久	学位	博士 (医学)
	副査	宮田 篤郎	副査	田川 義晃
	副査	中川 昌之	副査	井本 浩

主査および副査の5名は、平成30年6月15日、学位申請者 富田 祐介 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

**質問1) footpad swelling の評価方法で二つのパラメータ (mm, %inhibition) を用いている理由は何か。**

(回答) 腫脹の有無は肉眼的に判断可能である。測定には専用の spring-loaded caliper を使用した。mm は実測値を、%inhibition は positive control と比較した減少率を示している。本研究では実際の浮腫の程度 mm で表すことに加え、抗原特異的な抑制率を明確に示すために% inhibition を用いた。

**質問2) H2<sup>k</sup>, H2<sup>b</sup>, H2<sup>d</sup> の抗原性の違いについて説明ください。**

(回答) マウスの主要組織適合性 (MHC) 抗原は H2 抗原と呼ばれ、11 種類のサブクラスが存在し、H2<sup>k</sup>, H2<sup>b</sup>, H2<sup>d</sup> は MHC class Ia を構成する haplotype の一型で、MHC class Ib phenotype (Qa1/T1a) はそれぞれ b/b, b/b, b/c である。MHC class I はほとんど全ての細胞に発現しており、MHC class I ミスマッチのマウス間で心臓移植を行うと7日以内に拒絶反応を起こすことが文献報告されている。

**質問3) day 14 と day 35 における footpad swelling の結果の違いについて説明ください。**

(回答) day 14 では、induced regulatory T cells (iTregs) によるドナー抗原 (H2<sup>k</sup>) に対する特異的抑制が表れ始めているものの、同時に生まれながら胸腺に存在している thymic Tregs (tTregs) による自己抗原 (H2<sup>b</sup>) の抑制がまだ残っている。しかし、day 35 では tTregs の効果は消失し、iTregs 優位になることで、ドナー特異的な免疫寛容が導入されたと考えられる。

**質問4) 心臓移植後の心機能低下の原因の一つである冠動脈硬化は免疫寛容によって減らせるか。**

(回答) 免疫学的な抗原抗体反応が関与した冠動脈硬化病変は免疫寛容の導入により予防できる可能性がある。IL35 により動脈硬化症が予防されるという論文報告を加味すると、糖尿病、高脂血症や薬剤など複合因子が誘因となり発症する冠動脈硬化症に関しても、その軽減に期待が持たれる結果と考える。

**質問5) 免疫寛容には IL35<sup>+</sup> 産生細胞と TGFβ<sup>+</sup> 産生細胞のどちらが重要なのか、また Tregs と non-Tregs のどちらが重要なのか。**

(回答) tv-DTH suppression assay において、抗 IL35 抗体と抗 TGFβ抗体は同程度にドナー特異的抑制を解除することが示されたため、どちらも重要であると考えられる。これまでの文献的な知見を加味すると、免疫寛容には non-Tregs よりも Tregs がより重要であると考えられる。本研究の結果から、IL35 の増加が Tregs の増加と相関しており、IL35 は免疫寛容導入の Biomarker となり得る。

**質問6) 末梢性 Tregs はどのような刺激で増殖し、どのように作用するのか。**

(回答) 現状では、in vivo で iTregs を増殖させることは難しい。臨床的にはドナー血液から iTregs をアフレーシスにより採取し、in vitro で抗原刺激や IL2 による刺激によって iTregs を増殖させたのちにレシピエントに戻すことでドナー特異的な免疫寛容を誘導するという方法が考えられる。

## 最終試験の結果の要旨

**質問 7) 臨床的に術前 1 回の制御性サイトカイン導入で移植後の永続的な免疫寛容が得られるのか。**

(回答) 現段階では難しいと考える。現在の標準的なプロトコルである周術期を中心とする induction therapy に対し、本研究では、移植手術の 1 ヶ月前に免疫抑制を行うことでドナー特異的な免疫寛容を導入できることを示しており、これは免疫寛容誘導に対する新規の重要な提言であると考えている。

**質問 8) footpad swelling の結果における IL10, IL35, TGF $\beta$  の相互作用の可能性について説明ください。**

(回答) 図 4 で各々の blocking antibody を単体投与しても、抗原特異的な抑制反応が完全に消失しないことが示されたため、これら 3 種類の制御性サイトカインの相互作用はあると考えられる。

**質問 9) TGF $\beta$  の増加が肝臓で特徴的である理由や臓器局在性について説明ください。**

(回答) 免疫寛容の導入後、二次リンパ組織だけでなく肝臓でも IL35, TGF $\beta$  が増加することを示したが、IL35 と比較して TGF $\beta$  の増加の方が早かった。肝臓では二次リンパ組織と比べ Tregs の割合が約 10 分の 1 であり non-Tregs の割合が高いため、TGF $\beta$  の発現が高値であることが考えられた。臓器局在性については、肺や心臓、腎臓などでの追加の検討が必要である。

**質問 1 0) Tolerance の実験系について、anti-CD154/40L 阻害薬は 3 回のブーストが必要なのか。**

(回答) 報告によって高用量 (500  $\mu$ g) の anti-CD154/40L 阻害薬を単回または 2 回投与して免疫寛容の誘導を試みているものもあるが、低容量 (125-250  $\mu$ g) の場合には 3 回投与が一般的である。

**質問 1 1) day 14 と day 35 では大きく結果が異なるが時期的にどのくらいから差が出るのか。**

(回答) day 7, 14, 28 ではドナー特異的な免疫寛容が得られず、day 70 になると Tregs は 2 割ほど減少するという preliminary data を得ており、治療から少なくとも 1 ヶ月以降にドナー特異的な免疫寛容がピークとなり、その後は徐々に消失することが示唆された。この結果は、Tregs の生成が抗原特異的であることや時間経過により胸腺で新しい T 細胞が生成されることを反映しているものと考えられる。

**質問 1 2) 臨床的に初めは普通の免疫抑制で行い、途中から tolerance を誘導するのは現実的か。**

(回答) 本プロトコルに基づき移植手術の 1 ヶ月前に治療を開始する場合、生体移植にしか適応できないのが課題である。通常の免疫抑制療法および移植手術を先行的し、骨髄移植や in vitro で増殖させた Tregs の注入を行い免疫寛容の導入を試みる、いわゆる delayed tolerance が研究されている。

**質問 1 3) 遺伝子導入した Foxp3/Ebi3 reporter B6 マウスが結果に及ぼす影響について説明ください。**

(回答) wild type B6 マウスを用いた tv-DTH assay, フローサイトメトリを行ったところ、Foxp3/Ebi3 reporter B6 マウスとの結果に違いはなく、本研究における遺伝子導入の影響はないと考えられる。

**質問 1 4) マウスとサル、ヒトとの免疫寛容導入の難易度の違いについて説明ください。**

(回答) 幼若マウスは、抗原被曝がないため免疫寛容の導入は比較的容易であることが報告されている。一方で、ヒトやサルでは常に外部からの抗原被曝により、様々な抗原に対する抗体や memory T 細胞を形成している。MHC 不均衡に加えて、これらの memory T 細胞がドナー抗原に対して交差反応を示し、その結果として拒絶反応を助長する可能性がある。これを予防するために、免疫寛容を導入する治療の前処置として放射線照射などの強力な治療が必要となるため、現状では非常に困難である。

**質問 1 5) 図 8 の統計処理について説明ください。**

(回答) N=3 以上のものについてのみ Student t-test を行い、有意差はリンパ節で認められた。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。