

日本財団補助金による  
2000年度日中医学学术交流促進事業

⑤. 在留中国人研究者研究助成

(17) 抗炎症性単球を用いた臓器移植に於ける免疫制御の研究

# 抗炎症性単球を用いた臓器移植における免疫制御の研究

范小虎

中国西安医科大学第一臨床医学院臓器移植中心

日本広島大学医学部外科学第二講座

## 要旨

lipopolysaccharide (LPS) 刺激による単球・マクロファージからのサイトカイン産生の動態を利用し、*in vitro*でサイトカイン産生のパターンを抗炎症性にシフトさせてアロ免疫応答抑制能を検討した。DAおよびLewisラット末梢血から単球を濃縮する。これをLPSの存在下に培養し、*in vitro*および*in vivo*の実験に使用するために上清および細胞（マクロファージ）を採取した。単球・マクロファージからのTNF-alpha、IL-1betaとIL-10をLPS培養上清中の濃度を調べた。LPS培養細胞内のサイトカイン(TNF-alpha, IL-10)をフローサイトメトリーで検出し、個々の細胞レベルで細胞表面マーカーと各サイトカイン産生の関係を調べ、この細胞を採集し、*in vitro*でのTh1細胞活性化の抑制を研究した。最後にDAからLewisへの異所性心移植モデルを用いて、移植直後にLPSで誘導したレシピエントあるいはドナーのIL-10産生性単球・マクロファージを静脈内投与し、グラフト生着延長を確認した。LPS誘導抗炎症性マクロファージはアロ樹状細胞に対するT細胞からのIFN-gammaの産生を抑制する。

## KEY WORDS

lipopolysaccharide (LPS)、単球・マクロファージ、免疫応答

## 研究報告

### 目的

Ex vivoでのlipopolysaccharide (LPS)による刺激後、炎症惹起性サイトカインであるTNF-alphaの産生が低下し、逆に、強力な免疫制御作用を有するサイトカインであるIL-10を産生するようになった単球が臓器移植における拒絶反応を抑制しうるか検討する。

### 方法

#### 1. 単球採取とLPSによる活性化

DAおよびLewisラット末梢血から単球を濃縮する。これをLPSの存在下に培養し、*in vitro*および*in vivo*の実験に使用するために上清および細胞（マクロファージ）を採取する。

## 2. 単球・マクロファージの細胞表面マーカーとサイトカイン産生能の検討

1) 単球・マクロファージからのproinflammatory cytokines (TNF-alpha、IL-1beta)と anti-inflammatory cytokine (IL-10)をLPS培養上清中の濃度としてELISAで調べる。

2) LPS培養細胞内のサイトカイン(TNF-alpha、IL-10)をフローサイトメトリーで検出し、個々の細胞レベルで細胞表面マーカーと各サイトカイン産生の関係を調べる。

3) 抗原提示に必要なMHC Class II、CD80とCD86、およびFc receptorの細胞表面への発現の程度をフローサイトメトリーで調べる。

## 3. in vitroでのTh1細胞活性化の抑制

臓器移植における拒絶反応は、グラフト内の樹状細胞が脾臓やリンパ節といった二次性リンパ組織へと移動しそこで抗原提示細胞として成熟して、レシピエントのT細胞を活性化し特にTh1タイプの免疫応答が惹起されることに始まると考えられている(23)。これをin vitroでsimulateするためにDAドナーから調整した樹状細胞とLewisレシピエントから調整したT細胞をcocultureしTh1 cytokinesの代表であるIFN-gammaの分泌量をELISAで定量する。この培養系にLPSで誘導したレシピエントあるいはドナーのIL-10産生性単球・マクロファージを加えることでIFN-gamma産生が抑制されるか調べる。

## 4. in vivoでの移植グラフト拒絶反応の抑制

DAからLewisへの異所性心移植モデルを用いる。移植直後にLPSで誘導したレシピエントあるいはドナーのIL-10産生性単球・マクロファージを静脈内投与し、グラフト生着が延長するか調べる。

## 結果

我々がラット脾から調整したマクロファージを用いて、LPS刺激後の時間経過とTNF-alpha、IL-10分泌の関係を検討したところ、刺激後4時間ではproinflammatory cytokineであるTNF-alphaの高レベルの分泌が認められたが、anti-inflammatory cytokineであるIL-10分泌は測定感度以下であった。24時間後、48時間後と経過するにしたがい、培養上清中のTNF-alpha濃度は減少し、逆にIL-10分泌は著明に増加した。この結果から、LPS存在下に24時間刺激した脾マクロファージはIL-10産生状態にあると考えられるため、

このマクロファージをリンパ球とアロの樹状細胞の混合培養の系に培養開始24時間後に加えると、拒絶反応を惹起するTh1サイトカインであるIFN-gammaの産生が著明に抑制された。

## 考査

1. 本研究では臨床応用を考慮して、ドナーラットの末梢血単球から強力な免疫制御作用を有するIL-10を産生するマクロファージを誘導できた、その細胞表面マーカーとサイトカインの産生能、および、in vitroでのTh1細胞活性化制御能を確認した。

2. 臓器移植における拒絶反応抑制効果を検討し、グラフト生着延長に応用する試みは免疫寛容誘導および維持の達成につながる。

3. 単球・マクロファージはリンパ組織および炎症の場集積すると考えられ、遺伝子導入等を応用する場合も免疫組織へのdelivery systemとしてin vivoでの免疫療法の効率を高める可能性が十分に考えられる。

#### 参考文献

1. Aste Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G (1998) Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol* 160: 5936-44.
2. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C (1991) Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 is strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174: 915-24.
3. Willems F, Marchant A, Delville JP, Gerard C, Delvaux A, Velu T (1994) Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol* 24:1007-9.
4. Shaked A, Csete ME, Drazan KE, Bullington D, Wu L, Busuttil RW (1994) Adenovirus-mediated gene transfer in the transplant setting. II. Successful expression of transferred cDNA in syngeneic liver grafts. *Transplantation* 57: 1508-11.
5. de Roos WK, Fallaux FJ, Marinelli AW, Lazaris Karatzas A, von Geusau AB, van der Eb MM (1997) Isolated-organ perfusion for local gene delivery: efficient adenovirus-mediated gene transfer into the liver. *Gene Therapy* 4: 55-62.
6. Shinozaki K, Yahata H, Tanji H, Sakaguchi T, Ito H, Dohi K (1999) Allograft transduction of IL-10 prolongs survival following orthotopic liver transplantation. *Gene Therapy* 6: 816-22.