

原 著

二次性上皮小体機能亢進症患者より得られた上皮小体 細胞の同種免疫原性に関する検討

東京女子医科大学 医学部 第三外科学 (指導:阿岸鉄三教授)

ツジ カズヒコ サワダ トキヒコ フチノウエシヨウヘイ アギシ テツゾウ
辻 和彦・澤田登起彦・渕之上昌平・阿岸 鉄三

(受付 平成11年11月10日)

Investigation on Allogeneicity of Parathyroid Gland Cell taken from Patients with Secondary Hyperparathyroidism

Kazuhiko TSUJI, Tokihiko SAWADA, Shohei FUCHINOUE and Tetsuzo AGISHI

Department of Surgery (Director: Prof. Tetsuzo AGISHI), Kidney Center,
Tokyo Women's Medical University, School of Medicine

Parathyroid hypofunction is the complication which is occasionally encountered after the surgical treatments of secondary hyperparathyroidism. Allogeneic parathyroid cell transplantation is thought to be a promising way to treat the hypofunction syndrome of parathyroid gland. In the present study, the evaluation of the allogeneicity of parathyroid gland cells was investigated. To evaluate the allogeneicity of human parathyroid cells, flow cytometry and lymphocyte proliferation test (LPT) were done. Allogeneic human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were cultured with PBMC, or parathyroid cells (PTC) isolated from the patients with secondary hyperparathyroidism. After 5 days of in vitro culture, allogeneic human PBMC were analyzed by flow cytometry for the phenotypic changes in CD3/CD25 double positive cells, or ³H-thymidine uptake tests were done for LPT. T cells of allogeneic PBMC expressed higher level of CD25 when stimulated by PBMC rather than by PTC. ³H-thymidine uptake was greater when stimulated by PBMC rather than by PTC. In conclusion, the allogeneicity of human parathyroid cells was less both in CD25 expression and LPT than that of PBMC.

はじめに

二次性上皮小体機能亢進症は、慢性腎不全患者に高率に認められる合併症であり¹⁾、これが進行すると線維性骨炎をはじめとした腎性骨異常栄養症を惹起し、患者の quality of life を著しく損なう。これに対して上皮小体全摘術および部分自家移植術が行われるが、術後遠隔期において上皮小体機能低下症を来す患者が認められる。これらの患者

においては低カルシウム血症に起因する様々な病態が発生する²⁾³⁾。患者は、連日カルシウム製剤の内服、場合によっては点滴を余儀なくされる。

われわれは、この上皮小体機能低下症に対し、同種上皮小体細胞移植が有用であると考えている⁴⁾。同種移植を想定した場合、移植細胞の主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex, MHC) について検討しておくことは、臨床上重要

であると考えられる。上皮小体細胞 (PTC) は、元来 MHC の発現が低く、細胞培養により更に低下することが明らかになっている⁴⁾⁵⁾。培養による MHC 発現量の低下は、当然、摘出直後と培養後の PTC の同種免疫原性について影響を及ぼすことが予想される。

今回、PTC の培養前後における同種免疫原性に関する変化について、フローサイトメトリーと同種リンパ球増殖試験により検討したので報告する。

対象および方法

1. 対象

当科で上皮小体摘出術を施行した二次性上皮小体機能亢進症患者 15 例の摘出上皮小体組織を用いた。病理学的にび慢性過形成と診断されたもののみを用いた。これは、病理学的に結節型過形成と診断された場合、上皮小体の増殖が自律性を獲得するため細胞移植には適さないためである。

PTC の分離、培養法については既に報告した⁴⁾⁶⁾。概略を記すと、摘出直後の上皮小体組織を、径 800 μm の金属メッシュ上で細片化し、濾過する。回収された細胞のうち、赤血球を塩化アンモニウム溶液で溶血させる。その後、phosphate buffered saline (LIFE TECHNOLOGIES, MD) で 3 回洗浄し、 1×10^6 個の細胞を、10% ウシ胎児血清を含む 1ml の Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, LIFE TECHNOLOGIES, MD) に浮遊させ、24 穴細胞培養プレート (IWAKI, 千葉) で培養した。

2. フローサイトメトリーによる CD 25 陽性化率測定

健常人から採取した 5×10^6 個の同種末梢血リンパ球 (allogeneic peripheral blood mononuclear cells, alloPBMC) を、Mitomycin C (MMC, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 処理した同数の摘出上皮小体細胞、あるいは同一患者の末梢血リンパ球と混合し、10% ウシ胎児血清を含む 20 ml の DMEM に浮遊させ、T-25 細胞培養フラスコ (IWAKI, 千葉) を用いて 5 日間、5% CO_2 インキュベーターで培養を行った。上皮小体摘出当日および培養 5 日後の細胞を、フローサイトメトリー (FACScan, Becton Dickin-

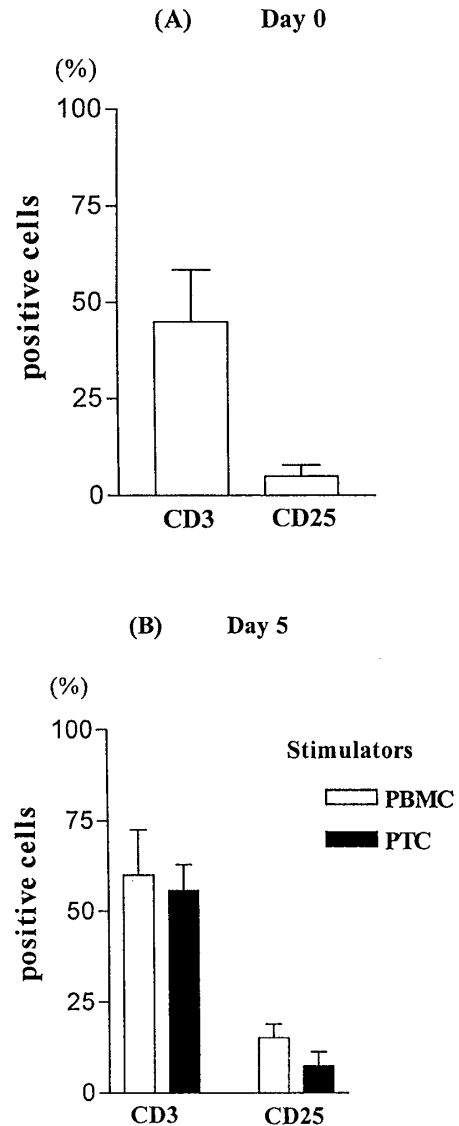


図1 フローサイトメトリーの結果

健常人の末梢血リンパ球と二次性上皮小体機能亢進症患者より摘出した上皮小体細胞、あるいは同一患者の末梢血リンパ球を混合培養した。上皮小体摘出直後 (A)、培養 5 日後 (B) の健常人末梢血リンパ球における CD3 陽性細胞および CD25 陽性細胞の変化について、フローサイトメトリーを用いて検討した (実験は独立して 5 回行われ、代表的な 1 例を示した)。

A: 上皮小体摘出直後におけるヒト同種末梢血リンパ球中の CD3 および CD25 陽性細胞の比率

B: 上皮小体細胞あるいは末梢血リンパ球と 5 日間混合培養した後のヒト同種末梢血リンパ球中における CD3 および CD25 陽性細胞の比率。

son, CA) を用いて解析した。リンパ球の活性化の指標として IL-2 レセプター α 鎖 (CD25) を用いた⁷⁾。

混合培養前後における alloPBMC 中の CD3 陽

性(T細胞)かつCD25陽性細胞陽性率の変化について検討した。

3. 同種リンパ球増殖試験

フローサイトメトリーの場合と同様に採取したalloPBMCをresponder, PTCおよび同一患者の末梢血リンパ球をstimulatorとして, 上皮小体摘出当日および混合培養5日後にリンパ球増殖試験を行った。Stimulatorの不活化はフローサイトメトリーの際と同様にMMCを用いた。

Responderとstimulatorを混合培養し, 5日後に1マイクロキューリーの³H-thymidineを加え, 4時間後にMATRIX™ 96 (PACKARD, CT)を用いて³H-thymidine取り込み量を測定した。また, 比較対照として, responderの末梢血リンパ球をMMCで処理し, stimulatorとして用いた。

結果

1. PTCの同種免疫原性がalloPBMCのphenotypic changeに及ぼす影響について

AlloPBMCは, $45.0 \pm 13.4\%$ がCD3陽性のT細胞であり, このうちT細胞活性化の指標となるCD25陽性細胞は $5.0 \pm 2.9\%$ であった(図1A)。このalloPBMCとPTC, あるいは同じ患者から分離したPBMCをstimulatorとして5日間混合培養すると, 前者においてはCD3陽性細胞の全体での比率は約 $60.0 \pm 12.5\%$ に上昇し, 後者では 55.7 ± 7.2 であった(図1B)。患者の末梢血リンパ球がstimulatorであった場合には, CD25陽性細胞が $15 \pm 3.9\%$ まで上昇するのに対し, PTCがstimulatorの場合は $7.3 \pm 4.0\%$ にとどまる。このCD3陽性かつCD25陽性細胞の全末梢血リンパ球に占める比率の差については統計的に有意であった($p < 0.05$, t test, two way)。

2. PTCのallogeneicityをヒト同種リンパ球に対する増殖試験を用いた検討

図2にstimulatorをPTCあるいはPBMCとした場合でのalloPBMCの増殖試験における³H-thymidine取り込み量の結果を示す。

図2(A)は上皮小体摘出当日, 図2(B)は培養5日後の結果である。上皮小体摘出当日のPTCをstimulatorとして用いた場合でも, PBMCをstimulatorとして用いるより, ³H-thymidine取り

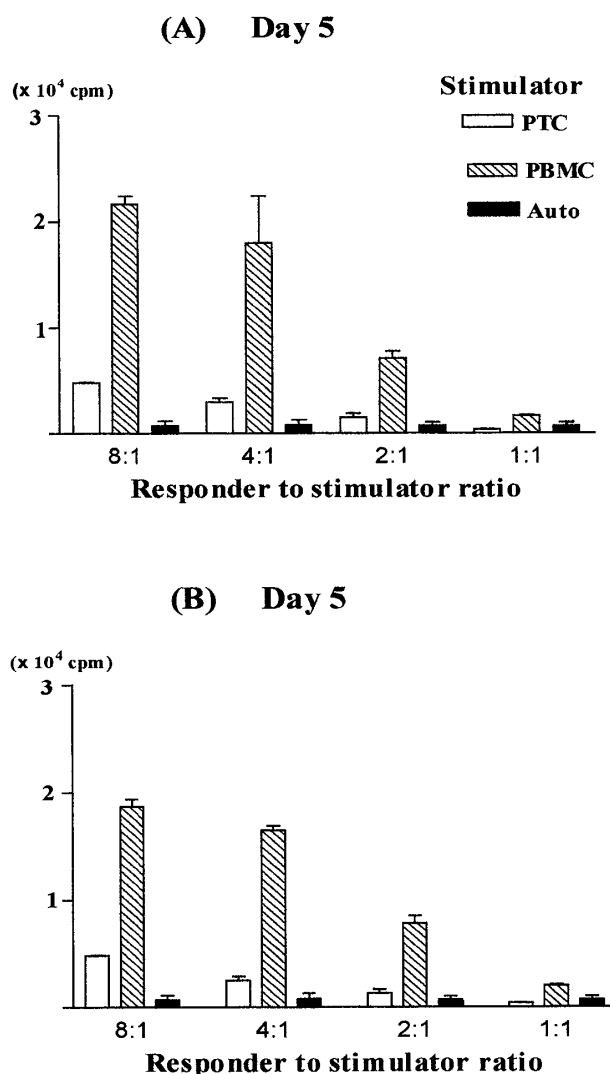


図2 ヒト同種リンパ球増殖試験

健康人末梢血リンパ球をresponderとし, 二次性上皮小体機能亢進症患者より摘出した上皮小体細胞(PTC), あるいは同一患者の末梢血リンパ球(PBMC)をstimulatorとして混合培養した。上皮小体摘出直後(A), および混合培養5日後(B)に³H-thymidine取り込み試験を行った。コントロールとしてresponderの末梢血リンパ球をstimulatorとして用いた(実験は独立して5回行われ, 代表的な1例を示した)。

A: 培養当日のヒト同種リンパ球増殖試験の結果
B: 培養5日後のヒト同種リンパ球増殖試験の結果

込み量は有意に低値であった。また, 培養5日後の実験でも³H-thymidine取り込み量の結果はPTCがstimulatorであった場合が有意に低値であった。しかし上皮小体摘出当日と混合培養5日後において, PTCをstimulatorとした場合の³H-thymidine取り込み量については, 明らかな差は

認めなかった。

考 察

既に報告したとおり、PTCのMHC抗原発現様式は末梢血リンパ球のそれと大きく異なっている⁴⁾。フローサイトメトリーによる検討では、上皮小体摘出当日においてもclass I, class IIの発現率はともに低値である。このMHCの低発現が、同種細胞移植を想定した場合の利点になる可能性があると考えられる。すなわち、T細胞が抗原認識する際には、標的細胞上のMHC抗原に結合したペプチドを同種抗原として認識するため、PTCのようにMHC抗原の発現率が低い場合は、T細胞の抗原認識が十分に働かないことが予想される。この点を明らかにするため、本実験ではPTCの同種免疫原性をフローサイトメトリーとリンパ球増殖試験を用いて検討した。

フローサイトメトリーによる検討では、PTCとの混合培養により、同種T細胞中のCD25陽性率が約7%と、末梢血リンパ球との混合培養を行った場合よりも低値であった。CD25はIL-2レセプター α 鎖であり、活性化T細胞の指標となる。単純にCD25陽性率のみをもって、PTCの同種免疫原性について論ずることはできないが、一つの指標になると考えられる。

また、同種リンパ球増殖試験についてもPTCをstimulatorとして用いた場合は、末梢血リンパ球をstimulatorとして用いた場合よりも、³H-thymidine取り込み量は低値であった。フローサイトメトリーの結果と合わせて、PTCが惹起する同種免疫原性は末梢血リンパ球のそれと比べて低いことが示唆される。

また、PTCをstimulatorとして用いた場合に、上皮小体摘出当日と混合培養5日後の³H-thymidine取り込み量には顕著な差を認めなかった。同種リンパ球増殖試験は、responderであるalloPBMC上のCD4分子とstimulatorであるPTC上に存在するclass II抗原との反応が必須である。われわれの報告のとおり⁴⁾、PTCは細胞培養により、その細胞表面のclass II抗原が減少する。当然、上皮小体摘出当日に比して培養5日後のリンパ球増殖試験は低値になると予想された。

しかし結果は、³H-thymidine取り込み量については両者とも同様の結果であった。これは、摘出直後のPTCにおいてもclass IIの発現は極めて低値であるため、5日間の培養前後において³H-thymidine取り込み量に差を認めなかったものと考えられる。

同種移植においては移植された細胞のclass II抗原を認識したヘルパーT細胞(Th)が細胞障害性T細胞(Tc)の分化を誘導し、このTcが移植された細胞のclass Iを認識し、攻撃する。従って、上皮小体細胞はin vitroにおいてclass II抗原の発現が低いため、同種免疫原性においては利点を持つ。また、今後臨床応用を考える場合、PTCのclass I抗原の低発現が、同種Tcおよびナチュラルキラー細胞に及ぼす影響についての検討が必要であろう⁸⁾⁹⁾。

結 論

PTCのallogeneicityについて、フローサイトメトリーおよびヒト同種リンパ球増殖試験を用いて検討した。

フローサイトメトリーを用いたヒト同種T細胞におけるCD25抗原の発現率、およびヒト同種リンパ球増殖試験を用いた³H-thymidine取り込み試験の結果から、PTCはallogeneicityが低く、同種細胞移植に際して有利であることが示唆されたが、5日間の培養によって変化を認めなかった。

本稿を終えるにあたり、本研究に関してご指導を賜りました東京女子医科大学第二病理学教室笠島 武主任教授に深謝申し上げます。また本学第三外科学の諸先生に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 阿岸鉄三：透析入門。pp 222-225, 秀潤社, 東京 (1994)
- 2) Zeng Q: Allogeneic transplantation of parathyroid glands to treat intractable hypoparathyroidism. Surgery pp 99, 1986
- 3) Tolloczko T, Wozniwicz B, Sawicki A: Clinical results of human cultured parathyroid cell. Allogeneic transplantation in the treatment of surgical hypoparathyroidism. Transplant Proc 28: 1296-1297, 1996
- 4) 辻 和彦, 澤田登起彦, 増田昭博ほか：ヒト副甲

- 状腺細胞の培養. *Organ Biol* **16**: 73-80, 1999
- 5) **Wozniewicz B, Migaj M, Giera B et al**: Cell culture preparation of human parathyroid cells for allotransplantation without immunosuppression. *Transplant Proc* **28**: 3542-3544, 1996
 - 6) **Tsuji K, Fuchinoue S, Kai K et al**: Culture of human parathyroid cells for transplantation. *Transplant Proc* **31**: 2697, 1999
 - 7) **Sawada T, DellaPelle PA, Seebach JD et al**: Human cell-mediated rejection of porcine xenografts in an immunodeficient mouse model. *Transplantation* **63**: 1331-1338, 1997
 - 8) **Ljunggren HG, Kärre K**: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* **11**: 675-678, 1990
 - 9) **Liao NS, Bix M, Zijlstra M**: MHC class I deficiency: susceptibility to NK cells and impaired NK activity. *Science* **253**: 199-202, 1991
-