

厚生労働科学研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

制御性T細胞を用いた肝・小腸・肺・膵島移植における免疫寛容の誘導

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 小柴 貴明

平成19（2007）年 4月

目 次

- I. 総括研究報告  
制御性T細胞を用いた肝・小腸・肺・脾臓移植における免疫寛容の誘導----- 1  
小柴 貴明

(資料) 資料名

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 5

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 別途添付

## 研究要旨

免疫抑制剤を使用しなくても拒絶が起こらない状態、すなわち免疫寛容の誘導が実現できれば、移植後の患者の成績は著しく向上すると考えられる。制御性 T 細胞 (Tregs) は、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> のフェノタイプを有し、自己免疫疾患の原因となる自己抗原反応性のリンパ球を抑制して免疫を制御している。主任研究者らは、京都大学で行われた生体肝移植の後に自然に免疫寛容が成立した患者の血液と移植肝を調べた結果、Tregs<sup>+</sup> が免疫寛容の成立に大きな役割を果たしているらしいことを見出した。小動物(マウス)モデルを用いて、Tregs をレシピエントの末梢血から一旦分離し、ドナーの血球と培養し、ドナー抗原特異的に免疫を制御する Tregs を増殖させ、再度レシピエントの体内に戻す細胞養子免疫療法を試みた。同方法により、あらゆる臓器のなかで最も拒絶が激しく起きる皮膚移植において、免疫寛容を誘導することに成功した。同方法を臨床へ応用するため、本研究では前臨床大動物—ミニブタ—モデルでの、同方法の安全性と有効性を検証し、臨床試験を開始することを目指す。

## A. 研究目的

免疫寛容を誘導する革新的方法である制御性 T 細胞(Tregs)による細胞養子免疫療法を前臨床モデルのミニブタ移植の系を用いて施行し、有効性と安全性を確認したうえで臨床試験を開始することで基礎医学の成果を適切に臨床の現場に役立てる。

## B. 研究方法

MHC の定まった異なる 2 系統のクラウン系ミニブタをそれぞれドナーとレシピエントに選び肝移植、肺移植、小腸移植、膵島移植を行う。移植に先立って、レシピエントの末梢血から Tregs を分離して、ドナー抗原特異的な免疫抑制能を有する Tregs を試験管内で培養増殖させる。増殖した Tregs は、ドナー抗原特異的な免疫抑制能が存在することをリンパ球混合試験にて確認した後に、移植時に移植臓器へ向かって経動脈的に投与して、拒絶が起こらないようにできるかどうか検討する。また、各々の細胞を移入したときに、レシピエントに副作用が生じないか観察する。またこれまで、臨床で使用されてきた免疫抑制剤を Tregs と併用にした場合、免疫寛容の誘導にどのような影響を与えるかを調べる。

(倫理面への配慮)

動物実験については、学内動物実験審査委員会の審査を経た実験計画に従い、実験動物の愛護的取り扱いを遵守する。ヒトについては、ヘルシンキ宣言、学内倫理委員会の答申に従って臨床試験を施行する。

## C. 研究結果

ミニブタの肝、肺、小腸、移植モデルを確立した。また、ミニブタにもヒト、マウスの制御性T細胞のcounterpart があることを明確にして、同細胞を分離して、ドナー抗原と一定期間試験管内で培養することでドナー抗原特異的な免疫抑制活性を獲得させる手技を確立

した。

#### D. 考察

これまでわが国では、前臨床大動物モデルとしてイヌ、霊長類が用いられてきた。しかし、今後イヌは動物愛護の面から使用しにくくなると考えられ、霊長類は管理にかかる費用が高額であることから使用が難しい。また、臓器移植の実験では主要組織適合性抗原の定まった系の使用が好ましいが、このような系が存在するのはミニブタだけである。初年度にミニブタの各種臓器移植モデルと、Tregs 培養の技術を確立することで、前臨床大動物モデルにおける制御性 T 細胞(Tregs)による細胞養子免疫療法施行のための準備が整った。

#### E. 結論

免疫寛容を誘導する革新的方法である制御性 T 細胞(Tregs)による細胞養子免疫療法を前臨床モデルのミニブタ移植の系を用いて施行するための準備が整った。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Transplant Immunology. 2007, 17, 94-7

Clinical, Immunological, and pathological aspects of operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation.

##### 2. 学会発表

#### 国内

小柴貴明、生体肝移植と免疫寛容 第四回日本組織適合性学会・近畿地方会(平成 18 年 2 月 4 日, 大阪)

小柴貴明、生体肝移植と免疫寛容 平成 17 年度第二回 COE セミナー (平成 18 年 2 月 21 日、京都)

小柴貴明、Long-term “prope” tolerance after intestinal transplantation. 第 18 回日本小腸移植研究会(平成 18 年 3 月 11 日, 奈良) 研究奨励賞

小柴貴明、ヒトの臓器移植後の免疫寛容とグラフト内における免疫制御機構 日本移植学会 (平成 18 年 9 月 7 日-9 日、千葉)

小柴貴明、ヒトの臓器移植後の免疫寛容とグラフと内における免疫制機構 第33回日本臓器保存生物医学会総会 (平成18年11月23日~24日、東京)

小柴貴明、臓器移植と免疫寛容、東北移植研究会 (平成18年11月25日、仙台)

第19回日本小腸移植研究会(平成19年3月10日,札幌)

研究奨励賞 吳 艶玲

海外

**World Transplant Congress, 2006, July 27, Boston, USA, Oral Presentation**

Requirement of Protocol Biopsy before and after Complete Cessation of Immunosuppression Following Living-Donor Liver Transplantation.

(The First Joint International Transplant Meeting, Congress Abstracts, p.173, 2006)

**World Transplant Congress. July 22-27, 2006, Boston, USA**

Li Y, Koshiba T, Zhao X, Kawamoto H, Tanaka Y, Minato N, Sakaguchi S, Tanaka K. Differential roles of CD3<sup>+</sup>Vα24<sup>+</sup>Vβ11<sup>+</sup> NKT cells in rejection of liver transplantation between HCV and non-HCV patients.

**World Transplant Congress. July 22-27, 2006, Boston, USA**

Zhao X, Koshiba T, Nakamura T, Tsuruyama T, Li Y, Wada H, Tanaka K. ET-Kyoto solution plus dibutyryl cAMP is superior to University of Wisconsin solution in rat liver preservation.

**World Transplant Congress. July 22-27, 2006, Boston, USA**

Ito A, Narumoto M, Yoshizawa A, Li Y, Eguchi H, Yoshitomi M, Sakaguchi S, Tanaka K, Koshiba T. *FOXP3*<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45 T cells in human peripheral blood as precursor regulatory T cells.

**World Transplant Congress. July 22-27, 2006, Boston, USA**

Li Y, Wu Y, Sakaguchi S, Wood KJ, Pirenne J, Koshiba T. Presence of regulatory T cells within tolerant graft of human liver and intestinal transplantation.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

発明の名称：制御性 T 細胞の製造法

発明者：小柴貴明、伊藤淳、田中紘一、坂口志文

国内出願日：2005 年 4 月 1 日

出願番号：特願 2005-106887

発明の名称：免疫抑制性のマクロライド系抗生剤を用いる制御性 T 細胞の製造法

発明者：小柴貴明、伊藤 淳、田中紘一、坂口志文

出願日：2005 年 9 月 30 日

出願番号：特願 2005-289224

発明の名称：肝臓保存液

発明者：小柴貴明、趙 向東、和田洋巳、中村隆之、田中紘一

出願日：2005 年 11 月 13 日

出願番号：特願 2005-299314

### 2. 国際特許出願

発明の名称：制御性 T 細胞の製造を向上させる薬剤のスクリーニング方法の開発、及び免疫抑制性のマクロライド系抗生剤を用いる制御性 T 細胞の製造方法

発明者：小柴貴明、伊藤淳、坂口志文、田中紘一、呉艶玲、成木真有子

国際出願日：2006 年 9 月 29 日

国際出願番号：P C T / J P 2006/320029

研究成果の刊行に関する一覧表

2006 年度

小柴貴明、肝移植における免疫寛容—制御性T細胞による免疫寛容の誘導を目指して—、  
移植・2006年4月・Vol. 41No. 2・日本移植学会雑誌

小柴貴明、伊藤 淳、李 穎、吳 艶玲、竹村摩美、坂口志文、制御性T細胞による拒絶  
反応抑制—免疫抑制剤からの解放—、日本臨牀・2007年3月・第65巻・3号

Yoshizawa A, Takada Y, Fujimoto Y, Koshiba T, Haga H, Nabeshima S, Uemoto S.  
Liver transplantation from an identical twin without immunosuppression, with early  
recurrence. **Am J Transplant**, 2006, 6: 2812-16

Koshiba T, Li Y, Takemura M, Wu Y, Sakaguchi S, Minato N, Wood KJ, Haga H, Ueda  
M, Uemoto S. Clinical, immunological, and pathological aspects of operational  
tolerance after pediatric living-donor liver transplantation. **Transplant Immunol**, 2007,  
17:94-7