

2007/6009A

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に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小柴 貴明

平成20 (2008) 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・膵島移植における免疫寛容の誘導に関する研究 ——— 1

小柴 貴明・李 穎・坂口 志文・芹川 忠夫・小林 英司

参考資料1;免疫寛容誘導プロトコル

参考資料2;CD4+CD25high+細胞の定義

参考資料3;FOXP3の発現

参考資料4;CTLA4の発現1

参考資料5;CTLA4の発現2

参考資料6;制御性T細胞の免疫抑制効果

参考資料7;制御性T細胞のドナー抗原特異的免疫抑制効果

参考資料8;末梢血Tリンパ球の変動

II. 分担研究報告

1. 臓器移植免疫寛容における制御性T細胞に関する研究 ——— 17

上本 伸二

参考資料1;5年生存率 臓器移植 対 悪性腫瘍

参考資料2;免疫寛容患者におけるCD4+CD25high+ cellsの増加

参考資料3;免疫寛容患者におけるCD4+CD25high+ cellsによるドナー抗原で特異的な免疫制御

参考資料4;移植前肝内のFOXP3mRNAの発現

参考資料5;移植前肝内のCD4+,CD8+,FOXP3+細胞の数

参考資料6;CD4,FOXP3及びCD8,FOXP3の二重蛍光染色

2. イマチニブ耐性CMLに対する新規Bcr-Abl/Lynチロシンキナーゼ阻害剤の開発に関する研究 ——— 27

前川 平

参考資料1;イマチニブ構造

参考資料2;親水性アミノ酸

参考資料3;臨床試験

参考資料4;医師主導型治験

3. 臨床臓器移植、免疫寛容(tolerance)のメカニズムに関する研究 ——— 35

湊 長博

参考資料1;患者プロフィール

参考資料2;移植片内各種遺伝子発現

4. 肺移植の疎血再還流障害に関する研究 ——— 42

庄司 剛

5. 肝局在免疫担当細胞の特殊生に基づいた免疫学的治療戦略に関する研究 ——— 45

大段 秀樹

参考資料1;肝類洞内皮細胞のアポトーシス誘導能

参考資料2;類洞内皮 transmigration assay

参考資料3;マウス肝類洞内皮細胞による寛容化

参考資料4;肝NK細胞のTRAIL分子の発現

参考資料5;TRAIL 表出肝NK細胞の移入による肝癌増勢の抑制

参考資料6;臨床応用

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ——— 55

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ——— 56

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）
統合研究報告書

制御性T細胞を用いた

肝・小腸・肺・膵臓移植における免疫寛容の誘導に関する研究
研究代表者 小柴 貴明 京都大学大学院 医学研究科
次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点

研究要旨

研究代表者らは、小動物(マウス)モデルを用いて、制御性T細胞 (Tregs) をレシピエントの末梢血から一旦分離し、試験管内で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 (免疫抑制剤を使用しなくても拒絶がおきない) 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—ミニプターモデルでの、同方法の安全性と有効性を各種臓器移植モデルで検証し、ヒトの臨床試験を開始することを目指す。19年度から、ミニプターモデルでの細胞養子免疫療法を実施するため、18年度は、肺移植・小腸移植・肝移植のミニプター急性拒絶の移植モデルを確立した。また、同時に、ブタにヒトやマウスの制御性T細胞の counterpart が存在することを明確にし、ブタの末梢血から制御性T細胞の counterpart を分離し、試験管内でドナーの抗原と培養して、ドナー抗原特異的な免疫抑制活性を有する制御性T細胞の counterpart を作ることに成功した。19年度から肺移植モデルにドナー抗原特異的な制御性T細胞の投与を開始した。現在の投与細胞数、併用する免疫抑制剤のレジメンでは、移植肺の生存日数の延長は認めないものの、制御性T細胞の投与により末梢血レベルでのTリンパ球の有意な減少を認めた。

李 穎:京都大学大学院 医学研究科
次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点 助教
坂口 志文:京都大学再生医学研究所
生体機能調節部門 教授
芹川 忠夫:京都大学大学院 医学研究科
動物実験施設 教授
小林 英司:自治医科大学 臓器置換研究部
教授

A. 研究目的

1. ミニプタにヒトやマウスの制御性T細胞のカウンターパートが存在するかどうかを確認する。
2. ミニプタ移植モデルで、制御性T細胞の細胞養子免疫を施行するにあたってドナー抗原特異的な制御性T細胞を試験管内で製造する。
3. ドナー抗原特異的な制御性T細胞をミニプタ肺移植のレシピエントに移植の当日に投与して、拒絶を抑制できるかどうか調べる。

B. 研究方法

1. ミニプタの末梢血より CD4+CD25^{high}+ 細胞を細胞分離装置で分離し、その細胞分画の FOXP3 mRNA (制御性 T 細胞特異的遺伝子) の発現を リアルタイム PCR の手法を用いて定量し、CD4+CD25^{low}+細胞, CD4+CD25⁻細胞, CD8⁺細胞の FOXP3 mRNA の発現と比較した。図に CD4+CD25^{high}+細胞, CD4+CD25^{low}+細胞, CD4+CD25⁻細胞, CD8⁺細胞の定義を示す(参考資料, CD4+CD25^{high}+細胞の定義)。また、同様に制御性T細胞のマーカーのひとつである細胞内 CTLA-4 の発現もフローサイトメータの手法を用いて CD4+CD25^{high}+細胞, CD4+CD25^{low}+細胞, CD4+CD25⁻細胞, CD8⁺細胞の4群間で比較した。また、アロ抗原に対して応答性及び、CD4⁺レスポンダー細胞のアロ抗原に対するリンパ球混合反応 (MLR) に対する抑制活性の有無を調べた。さらに、アフエーシスの手技を用いて、レシピエントの末梢血から 1x10¹⁰ 個の単核球を分離した。CD25 に対する抗体を用いて、磁気ビーズ法で 1x10⁸ 個の

制御性T細胞の counterpart を分離して、ドナー抗原（ドナー単核球とともに9日間、高濃度の IL-2 とラパマイシンの存在下に培養した。

2.MHC の異なるミニプタを用いて、肺移植を行い、ドナー抗原（ドナー単核球とともに9日間、高濃度の IL-2 とラパマイシンの存在下に培養した制御性T細胞を 1×10^6 /kg、肺移植の当日に移入した。細胞移入の3日前から7.5mg/kg のエンドキサンをミニプタに投与して、リンパ球減少を起こした後で、細胞移入を行った。移植後3-14日に low dose のタクロリムス(TAC)を投与する(参考資料; 免疫寛容誘導プロトコル)。

C. 研究結果

1.FOXP3mRNA の発現はCD4+CD25^{high}+ 細胞で、CD4+CD25^{low}+ 細胞, CD4+CD25⁻ 細胞, CD8+ 細胞と比較して有意に高い発現を示した(参考資料; FOXP3 の発現)。また、細胞内 CTLA4 の発現も高かった(参考資料; CTLA4 の発現 1,2)。この細胞分画は、それ自体、アロ抗原に対して不応性であり、CD4+ レスポンダー細胞のアロ抗原に対するリンパ球混合反応 (MLR) を用量依存性に抑制した(参考資料; 制御性T細胞の免疫抑制効果)。試験管内でのアロ抗原との暴露により、制御性T細胞はドナー抗原に対して特異的な抑制活性を獲得した(参考資料; 制御性T細胞のドナー抗原特異的免疫抑制効果)。

2.エンドキサンを移植の直前に使用したことにより、疎血再還流障害が極端に悪化して、細胞養子免疫による拒絶抑制効果を十分に評価することができなかった。しかし、細胞養子免疫群では、細胞養子免疫非施行群と比較して、Tリンパ球の数の減少が遷延した(参考資料; 末梢血 Tリンパ球の変動)。以上の経過から、 1×10^6 /kg 個の制御性T細胞の counterpart の移入では、細胞養子免疫の免疫抑制効果は in vivo では明瞭ではないものの、in vitro では、Tリンパ球に対する抑制効果が明確であった。

D. 考察

ミニプタの末梢血より CD4+CD25^{high}+ 細胞は FOXP3mRNA と細胞内 CTLA-4 を高発現するうえに、CD4+ 細胞のアロ抗原に対する増殖を抑制することから、ヒト、マウスの CD4+CD25^{high}+ 制御性 T 細胞のカウンターパートであると考えられた。また、エンドキサンの疎血再還流障害への増大効果のせいで、制御性T細胞の counterpart の移入の拒絶抑制効果は評価不能であったため、エンドキサンの使用するタイミング、制御性T細胞の counterpart の移入の時期を、移植から送らせるかたちでプロトコルを変更する必要がある。

E. 結論

19年度に、 1×10^8 のドナー抗原に特異的に抑制活性を有する制御性T細胞の counterpart を細胞養子免疫療法し、最も拒絶が強く起こる肺移植の拒絶抑制を試みたが、移植肺の生存日数の延長を評価するには至らなかった。ところが、細胞養子免疫療法によりレシピエントの末梢血のTリンパ球の減少を認めており、細胞養子免疫療法の免疫抑制効果が in vitro のレベルでは明白であることが半明した。また、 1×10^8 の制御性T細胞の移入ではレシピエントに有害な事象は認めなかった。今後、この細胞養子免疫療法を核として、制御性T細胞を投与する時期の変更、併用する免疫抑制剤の種類を変更するなどの工夫を加えて、本治療の有効性と安全性を確認する。

G. 研究発表

1.論文発表

Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, Yamaguchi T, Nomura T, Ito H, Nakamura T, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Preferential recruitment of arthritogenic Th17 cells to inflamed joints via CCR6/CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. J. Exp. Med. 204:2803-2812, 2007.

Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science*. 317:627-629, 2007.

Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells in brief history and perspective. *Eur. J. Immunol*. 37:s116-123, 2007

Ko, H. J., Kim, Y. J., Kim, Y. S., Chang, W. S., Ko, S. Y., Chang, S. Y., Sakaguchi, S., Kang, C. Y. A combination of chemoimmunotherapies can efficiently break self-tolerance and induce antitumor immunity in a tolerogenic murine tumor model. *Cancer Res*. 67:7477-7486, 2007.

Yamaguchi T, Hirota K, Nagahama K, Ohkawa K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity*. 27:145-159, 2007.

Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi S. Foxp3 controls regulatory T cell function via interacting with AML1/Runx1. *Nature*. 446:685-689, 2007.

Nomura T, Sakaguchi S. Foxp3 and Aire in thymus-generated T(reg) cells: a link in self-tolerance. *Nat Immunol*. 8:333-334, 2007.

Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*. 13:108-116, 2007.

Hirota K, Hashimoto M, Yoshitomi H, Tanaka S, Nomura T, Yamaguchi T, Iwakura Y, Sakaguchi N, Sakaguchi S. T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17+ Th cells that cause autoimmune arthritis. *J Exp Med*. 204:41-47, 2007.

Koshihara 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. *Transpl Immunol*. 17:94-97, 2007.

Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S. ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 37:884-895, 2007.

Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S. Regulatory T cell-mediated suppression: potential role of ICER. *J Leukoc Biol*. 81:161-167, 2007.

Ando, Y., Hakamata, Y., Nakamura, M., Ueda, M., Saito, S., Kimu, Z., Otagiri, M., Kobayashi, E.: A novel animal model for familial amyloidotic polyneuropathy: a transgenic rat with ATTR V30M. (Submitted)

Endo, T., Ajiki, T., Minagawa, M., Hoshino, Y., Kobayashi, E.: Treadmill training for hindlimb transplanted rats. *Microsurgery*. 27(4):220-223, 2007

Enomoto, A., Kikuchi, T., Seo, N., Matsuno, K., Kobayashi, E.: Impact of cold preservation on leukocyte adhesion to the transplanted rat lung. *Microsurgery*, 27(4):228-233, 2007

Haga, J., Wakabayashi, G., Shimazu, M., Tanabe, M., Takahara, T., Azuma, T., Sato, Y., Hakamata, Y., Kobayashi, E., Kitajima, M.: In vivo visualization and partially repeated transplantation of bone marrow cells in rats with liver damage. *Stem Cells Dev* 16(2):319-327, 2007

Inoue, S., Tahara, K., Fujishiro, J., Zhou, W., Ohdan, H., Asahara, T., Hashizume, K., Kaneko, M., Hakamata, Y., Takeuchi, K., Iwamoto, S., Kobayashi, E.: Severe rejection of rat intestinal grafts overexpressing human histo-blood group A/B transferase. *ICS* (in press)

Kimura, A., Ohmori, T., Ohkawa, R., Madoiwa, S., Mimuro, J., Murakami, T., Kobayashi, E., Hoshino, Y., Yatomii, Y., Sakata, Y.: Essential roles of sphingosine 1-phosphate/S1P1 receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury. *Stem Cells* 25:115:124, 2007

Kulbatski, I., Mothe, A.J., Tator, C.H., Keating, A., Hakamata, Y., Kobayashi, E.: Oligodendrocytes and radial glia derived from adult rat spinal cord progenitors: morphological and immunocytochemical characterization. *JHistochemCytochem.* 55(3):209-22, 2007

Kulbatski, I., Mothe, A.J., Tator, C.H., Keating, A., Hakamata, Y., Kobayashi, E.: Adult mammalian spinal cord ependymal region derived stem/progenitors preferentially differentiate into functioning oligodendrocytes and radial glia. (submitted)

Sato, Y., Seo, N., Kobayashi, E.: Does the N-Methyl-D-Aspartate receptor contribute to the effects of isoflurane, sevoflurane, and ethanol? *Anestha Analg* 104(1):219-20, 2007

Sato, Y., Takayanagi, Y., Onaka, T., Kobayashi, E.: Impact of cyclosporine upon emotional and social behavior in mice. *Transplantation.* 83(10):1365-1370, 2007

Sasaki, N., Takeno, Y., Masuda, T., Ando, Y., Muto, S., Shinohara, M., Kobayashi, E., Kusano, E.: Diabetic nephropathy in the novel Spontaneously diabetic non-obese Torii (SDT) rats. *BBRC* (submitted)

Sasaki, N., Takeno, Y., Masuda, T., Ando, Y., Muto, S., Shinohara, M., Kobayashi, E., Kusano, E.: Diabetic nephropathy in the novel Spontaneously diabetic non-obese Torii (SDT) rats. *BBRC* (submitted)

Takahashi, R., Kuramochi, T., Aoyagi, K., Hashimoto, S., Miyoshi, I., Kasai, N., Hakamata, Y., Kobayashi, E., Ueda, M.: Establishment and characterization of CAG/EGFP transgenic rabbit line. *Transgenic Res.* 16(1):115-20, 2007

Ogawa, R., Takahashi, M., Hirose, Sho-ichi, Morimoto, H., Ise, H., Murakami, T., Yasue, T., Kuriyama, K., Hongo, M., Kobayashi, E., Ikeda, U.: A novel sphingosine-1-phosphate receptor agonist KRP-203 attenuates rat autoimmune myocarditis. *BBRC.* 361:621-628, 2007

Ohsawa, I., Uemoto, S., Kobayashi, E., Murakami, T.: Control of cyclosporine A-induced tumor progression using 15-deoxyspergualin for rat cardiac transplantation. *84(3):424-428, 2007*

Hara, M., Murakami, T., and Kobayashi, E.: In vivo bioimaging using photogenic rats: fate of injected bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J Autoimmun.* Jan 24, 2008 [Epub ahead of print]

Hung, KC., Yong, CC., Chen, YS., Heg, HL., Huo, FY., Lin, CC., Young, TH., Kobayashi, E., Chen, CL., Wang, CC.: A surgical model of fulminant hepatic in rabbits. *Liver Int,* 27(10):1333-1341, 2007

Kobayashi, M., Okada, T., Murakami, T., Ozawa, K., Kobayashi, E., Morita, T.: Tissue-targeted in vivo gene transfer coupled with histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) enhances adenoviral infection in rat renal cancer allograft model systems. *Urology*, 70(6):1230-1236, 2007

Ueda, M., Ando, Y., Hakamata, Y., Nakamura, M., Yamashita, T., Obayashi, K., Himeno, S., Inoue, S., Sato, Y., Kaneko, T., Takamune, N., Misumi, S., Shoji, S., Uchino, M., Kobayashi, E.: A transgenic rat with the human ATTR V30M: a novel tool for analyses of ATTR metabolisms. *BBRC* 352(2):299-304, 2007

Hung, K.C., Lin, C.C., Young, T.H., Chen, Y.S., Yong, C.C., Kobayashi, E., Wu, C.H., Yang, C.H., Chen, Yang, C.H., Chen, C.L., Wang, C.C.: Influence of hypothermic conditions on primary porcine hepatocyte-entrapped hollow fiber bioreactors. *Biochem Eng J* (in press)

2.学会発表

Takemura, M Koshiha, T Ueda, M Egawa, H Uemoto, S

Complete Cessation of immunosuppression after Pediatric Living-Donor Liver Transplantation - Its Safety and Feasibility
American Transplant Congress 2007 May5-May9
2007 San Francisco

Li, Y Tanaka, Y Pirenne, J Minato, N Koshiha, T
Propagation of a Unique V δ 1-Bearing γ δ T Cells Clone within Graft Infiltrates of Human Liver Transplantation Tolerance-Immprivileged Liver Specific?
American Transplant Congress 2007 May5-May9
2007 San Francisco

Satoda, N Wu, Y Shoji, T Aoyama, A Zhang, J Fujinaga, T Kobayashi, E Sakaguchi, S Wada, H Egawa, H Koshiha, T

Value of FOXP3 Expression in Peripheral Blood as Rejection Marker after Miniature Swine Pulmonary Transplantation.

American Transplant Congress 2007 May5-May9
2007 San Francisco

Wu, Y Li, Y Okazaki, T Honjo, T Minato, N Sakaguchi, S Pirenne, J Koshiha, T

Intra-graft Immneregulation-Differential Mechanisms of Tolerance between Human Liver Transplantation and Intestinal Transplantation.

American Transplant Congress 2007 May5-May9
2007 San Francisco

Shimon Sakaguchi : Targeting regulatory T cells. Academy Colloquium-Translating Immunological tolerance into novel therapies for (pediatric) autoimmune disease(2007 1. 18-19. Amsterdam, Netherlands).

Shimon Sakaguchi : Natural regulation of the immune response. The Netherlands Academy for Natural Sciences (2007 1. 20. Amsterdam, Netherlands).

Shimon Sakaguchi: Keynote Address: The Rebirth of Suppressor/Regulatory T Cells The Keystone Symposia (2007 2.1-6. Vancouver, Canada)

Shimon Sakaguchi: 2007 Bob Smith Lecture: Regulatory T cells in Immunological Self-Tolerance. University of Texas (2007 2.7-8. Houston, USA)

Shimon Sakaguchi: T Cells in Immunologic Tolerance to Self and Organ Transplants. BMT Tandem Meetings (2007.2.8-12. Denver, USA)

Masahiro Ono: Control of regulatory T cell function be the interaction of Foxp3 and AML1/Runx1. BSI Congress 2007 (2007.2.20-23.Glasgow, Scotland)

坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御
第48回京都府開成疾患懇話会
(2007.2.24. 京都)

坂口志文: 自己免疫病と制御性 T 細胞 千里
ライフサイエンスセミナー 免疫・感染症シリ
ーズ第一回「自己免疫疾患とその制御」
(2007.2.27.大阪)

坂口志文: 制御性 T 細胞の自己免疫、腫瘍免疫
における共通基盤について. 43th 免疫懇話会
(2007.3.6 山口)

坂口志文: 制御性 T 細胞の基礎と癌免疫. 第7
回バイオモジュレーション研究会 (2007.3.10.
東京)

野村尚史: CD25+CD4+制御性 T 細胞による免
疫応答制御. 第6回 日本再生医療学会総会
(2007. 3.13. 横浜)

Shimon Sakaguchi: Induction of tumor immunity by
depleting naturally CD25+CD4+ Regulatory T Cells
or attenuating their suppressive activity. The
Charles Rodolphe Brupbacher Foundation Eight
Scientific Symposium in conjunction with the Charles
Rodolphe Brupbacher Cancer Research Award
2007 (2007.3.14-16.Zurich,Switzerland)

坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御
第27回日本医学会総会(2007.4.6-8 大阪)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T Cells in
Immunologic self-tolerance, autoimmune disease
and tumor immunity. World Immune Regulation
Meeting (2007.4.11-15.Davos, Switzerland)

廣田圭司、坂口教子、坂口志文: SKGマウ
スの関節炎惹起性 IL-17 産生 T 細胞の分化に
おける IL-6 の役割 第51回日本リウマチ学会
総会 (2007.4.26-29.横浜)

坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御
第43回日本肝臓学会総会 (2007.5.31-6.1)

Keiji Hirota: Contribution of IL-6 to spontaneous
differentiation into IL-17-producing arthritogenic T
cells in SKG mice EULAR Congress 2007
(2007.6.13-16. Barcelona Spain)

坂口志文: 新しい免疫抑制剤、免疫制御法の
開発について. JST 基礎研究シーズン報告会
(2007,6,26.東京)

坂口志文: 制御性 T 細胞による自己/非自己の
識別と免疫応答制御. 神戸バイオメディカル
学術交流会第7回定期交流会 (2007,6,27.神戸)

坂口志文: Control of immune responses by natural
regulatory T cells. Kyoto University 21st Century
COE Symposium Integration of Transplantation
Therapy and Regenerative Medicine
(2007,6,29-30.京都)

坂口志文: 自己免疫性関節炎を惹起する IL-17
産生 T 細胞の分化機構. 第72回インターフェ
ロン・サイトカイン学会学術集会(2007,7,5-6.
京都)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T Cells for the
control of immune responses. The 13th
International Congress of Mucosal Immunology
(2007,7,9-12, Tokyo)

Shimon Sakaguchi: Rheumatoid arthritis as a
systemic autoimmune disease: insights from an
animal model. Imperial College London Kennedy
Institute of Rheumatology Seminar (2007,7,16
London.UK)

Shimon Sakaguchi: 2007 Mathilda and Terence Kennedy Lecture: Regulatory T cells in autoimmune disease. Imperial College London (2007,7,18, London, UK)

Masahiro Ono: Foxp3 controls T cell function via interacting with AML1/Runx1. RUNX 2007 (2007.8.20-22. Biopolis, Singapore)

Shimon Sakaguchi: Plenary Lecture-Hot Topics in Immunology: Regulatory T cells for the control of Immune Response. 13th International Congress of Immunology (2007.8.21-25, Rio de Janeiro, Brazil)

Shimon Sakaguchi: Honorary Lecture: Regulatory T cells. The Baltic Summer School (2007.9.2-13, Lund, Sweden)

Shimon Sakaguchi: Creating animal models for rheumatoid arthritis (2007.9.2-13 Lund, Sweden)

Shimon Sakaguchi: Genetic basis of autoimmune disease due to regulatory T cell anomaly. From The Laboratory to the Clinic: From Immune Response Gene to Autoimmunity (2007.9.8-11. Oxford UK)

Masahiro Ono: Regulatory T cells in immunological self-tolerance and autoimmune disease. 21st World Congress of Dermatology (2007.9.30-10.5 Buenos Aires, Argentina)

坂口志文: 制御性T細胞による免疫応答制御
名古屋大学大学院特別講義 (2007.10.4 名古屋)

坂口志文: 制御性T細胞による免疫応答制御
第35回日本臨床免疫学会総会 (2007.10.19-20 大阪)

坂口志文: 制御性T細胞による免疫応答制御
第22回九州免疫血液研究会学術集会
(2007.10.20 博多)

Shimon Sakaguchi: The Molecular Basis of the Control of Regulatory T Cell Function: The New Century Health Care Promotion Foundation 11th International Congress (2007.10.26-27, Taipei, Taiwan)

Shimon Sakaguchi: Control of Immune Responses by Regulatory T Cells: The New Century Health Care Promotion Foundation 11th International Congress (2007.10.26-27, Taipei, Taiwan)

Shimon Sakaguchi: Thymus, Treg, Th17, and autoimmunity: insights from an animal model of autoimmune arthritis Immune regulation in clinical disease (2007. 11. 6-7, Pohang, Korea)

Shimon Sakaguchi: Thymus, Treg, Th17, and autoimmunity : insights from an animal model of autoimmune arthritis. The 55th Fall Conference of The Korean Association of Immunobiologists (2007. 11. 8-9, Seoul, Korea)

Kajsa Wing: Contribution of Treg-associated molecules, in particular CTLA-4, to Treg-mediated immune suppression in vivo and in vitro. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 (2007.11.20-22 品川)

坂口志文: 制御性T細胞・最近の話題 テクニカルセミナー 第37回日本免疫学会総会・学術集会 (2007.11.20-22 品川)

坂口志文: 制御性T細胞による免疫制御 東北大学大学院特別講義 (2007.11.29. 仙台)

坂口志文: 制御性T細胞による免疫恒常性の維持 第1回年輪細胞生体恒常性研究会シンポジウム (2007.11.30. 東京)

坂口志文: 制御性T細胞による免疫応答制御
免疫難病・感染症等の先進医療技術 第4回公開シンポジウム (2007.12.14. 品川)

Masahiro Ono: Control of regulatory T cell function by Foxp3 and AML1/Runx1. BMB 2007 (2007.12.11-15. 横浜)

Shimon Sakaguchi: Michael Sela Lecture: Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis. Weizmann Institute of Science (2007,12,16, Tel Aviv, Israel)

Shimon Sakaguchi: Thymus, Treg, Th17, and Autoimmunity: Insights from an Animal Model of Autoimmune Disease. Weizmann Institute of Science (2007,12,17, Acre, Israel)

Shimon Sakaguchi: The 23rd Annual Richard K. Gershon Memorial Lecture: Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis. Yale University (2007,12,20, New Haven, USA)

原 真由美、井上泰一、村上 孝、小林英司: ダブルレポータートランスジェニックラットのMSCの樹立とその応用、第6回日本再生医療学会総会、2007年3月13-14日、横浜、(再生医療6(Suppl)227, 2007)

小林英司: In vivo imaging using dual colored Tg eats for innovative medical research. 第2回 日本分子イメージング学会総会・学術集会 (シンポジウム2)、福井、2007年6月28-69日 (抄録p29)

Sato, A., Eij, Kobayashi., Murakami, T.: Differential NK cell-mediated antitumor activity between IFN-lambda (IL-28/IL-29) and IL-21. 第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月3-5日 (抄録p213)

小林英司: In vivo bioimagingを用いたトランスレーショナル・リサーチの展望、第28回日本臨床薬理学会 (教育講演2)、宇都宮、2007年11月28日-12月1日 (臨床薬理 38: S91)

Ohshita, H., Kobayashi, E., Enosawa, S., Horie, T., Yoshizato, K: Non-restraint biliary excretion model as a novel tool for predicting human biliary excretion in PxB-mice - chimeric mice with humanized liver. The 8th International ISSX Meeting (第8回国際薬物動態学会). 仙台. 2006年10月9-12日.

井上泰一、村上 孝、安食孝士、中間季雄、小林英司、星野雄一: 糖尿病ラットにおける骨髄由来細胞付加工真皮の創傷治療効果、第22回 日本整形外科学会基礎学術集会、浜松、2007年10月25-26日 (抄録pS858)

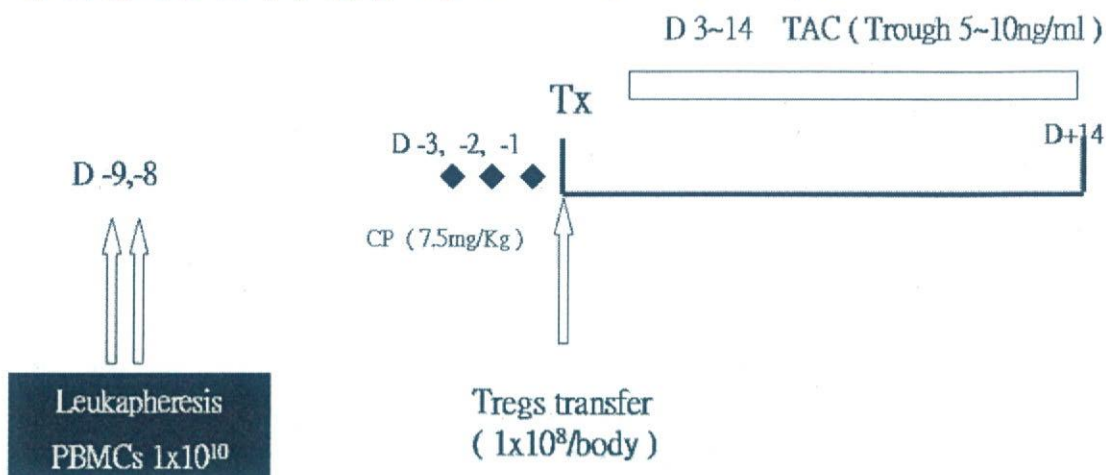
井上泰一、安食孝士、村上 孝、中間季雄、小林英司、星野雄一: トランスジェニックラットを用いた移植骨髄由来細胞のバイオイメージング、第22回 日本整形外科学会基礎学術集会、浜松、2007年10月25-26日 (抄録pS940)

安食孝士、井上泰一、遠藤照頭、小林英司、星野雄一: 遺伝子改変ラットを用いた複合組織移植 - 再接合筋肉の修復過程の検討 -、第22回 日本整形外科学会基礎学術集会、浜松、2007年10月25-26日 (抄録pS975)

遠藤照頭、安食孝士、井上泰一、木村 敦、小林英司、星野雄一: 運動器損傷におけるリハビリテーションの効果 - ラット下肢再接着モデルを用いた検討 -、第22回 日本整形外科学会基礎学術集会、浜松、2007年10月25-26日 (抄録pS979)

小林英司: 生体肝移植で習得すべき Advanced Surgical Technique-生きた動物を使った科学的技術トレーニング法、第69回日本臨床外科学会総会 (ビデオシンポジウム6)、横浜、2007年11月29日-12月1日 (日本臨床外科学会雑誌 第68巻増刊号 p350)

免疫寛容誘導プロトコール



Leukoapheresis ; アフェレーシス

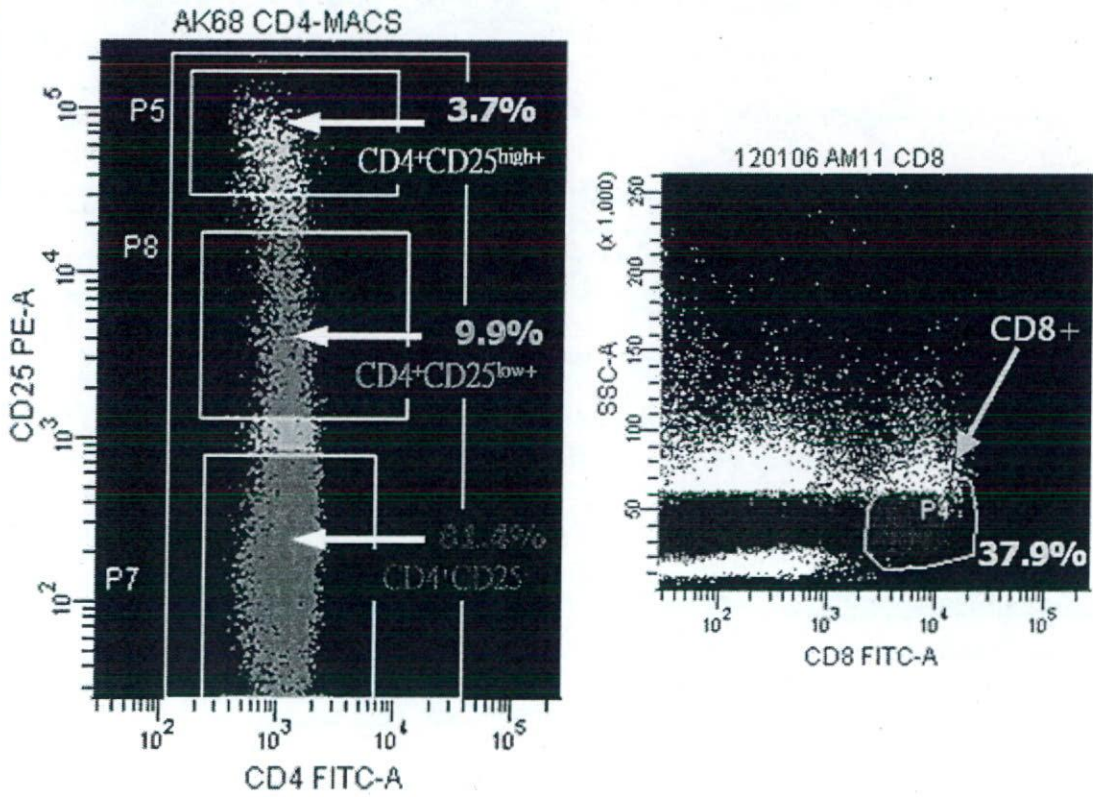
PBMCs ; 末梢血単核球

CP ; サイクロフォスファミド (エンドキサン)

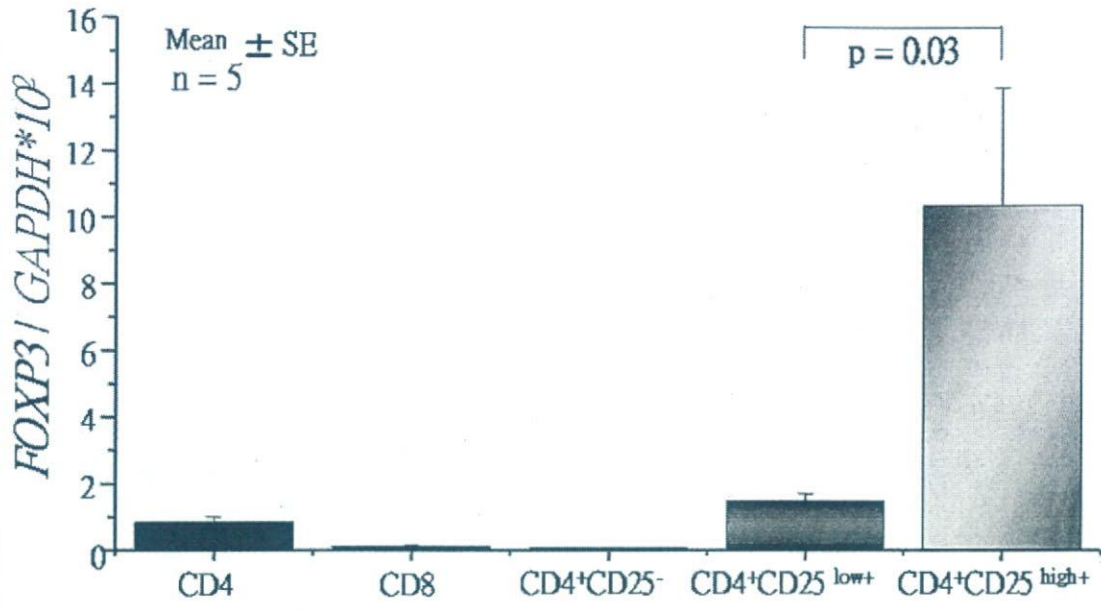
TAC ; タクロリムス

Tregs transfer ; 制御性T細胞

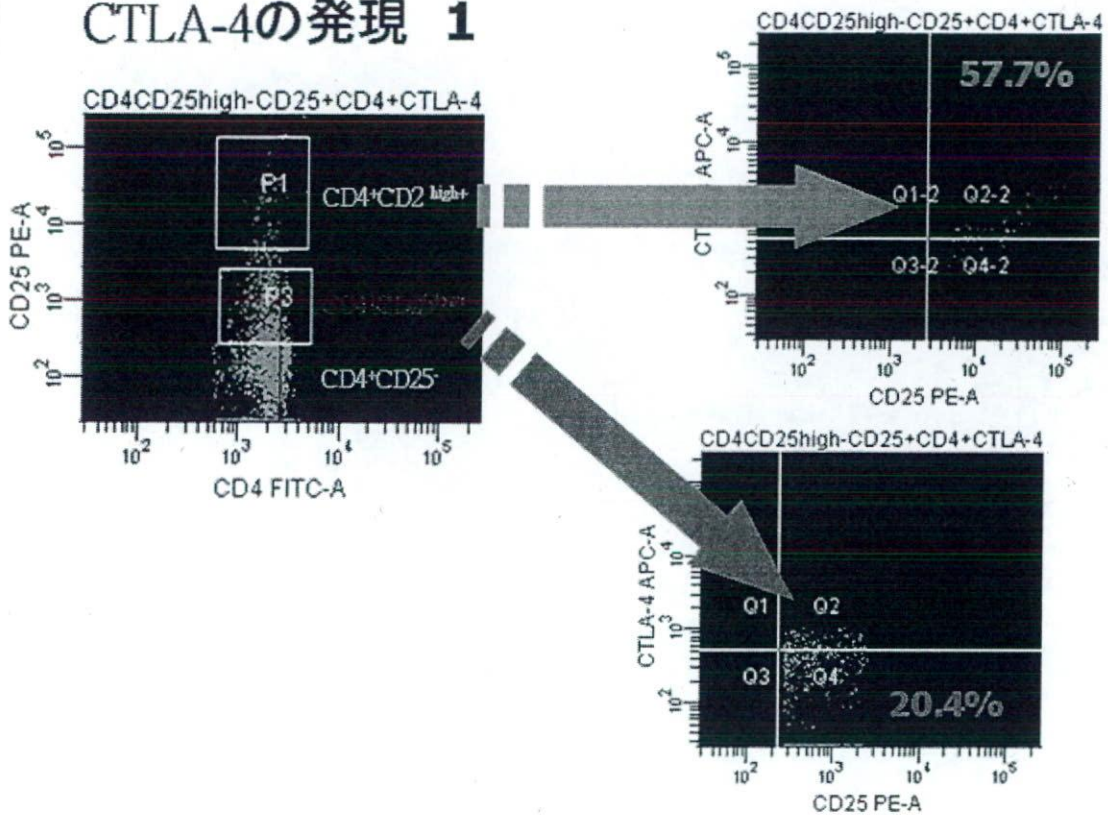
CD4+CD25^{high}+Tregs細胞の定義



FOXP3の発現



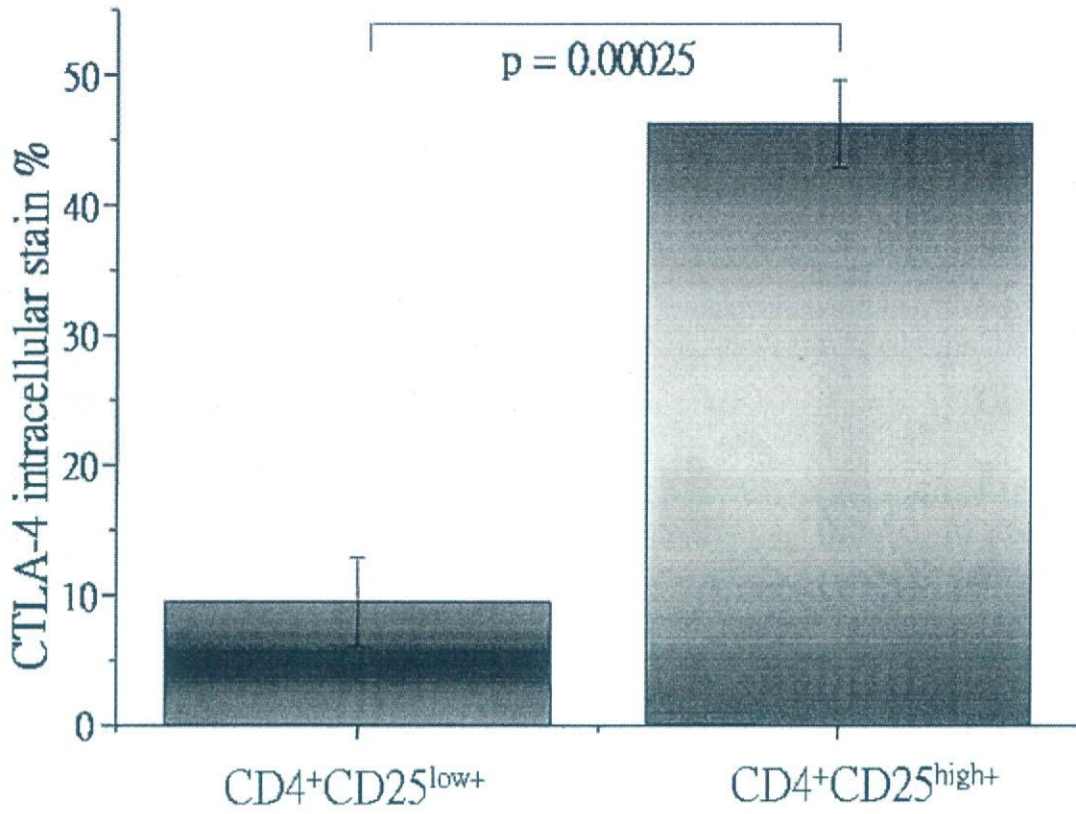
CTLA-4の発現 1



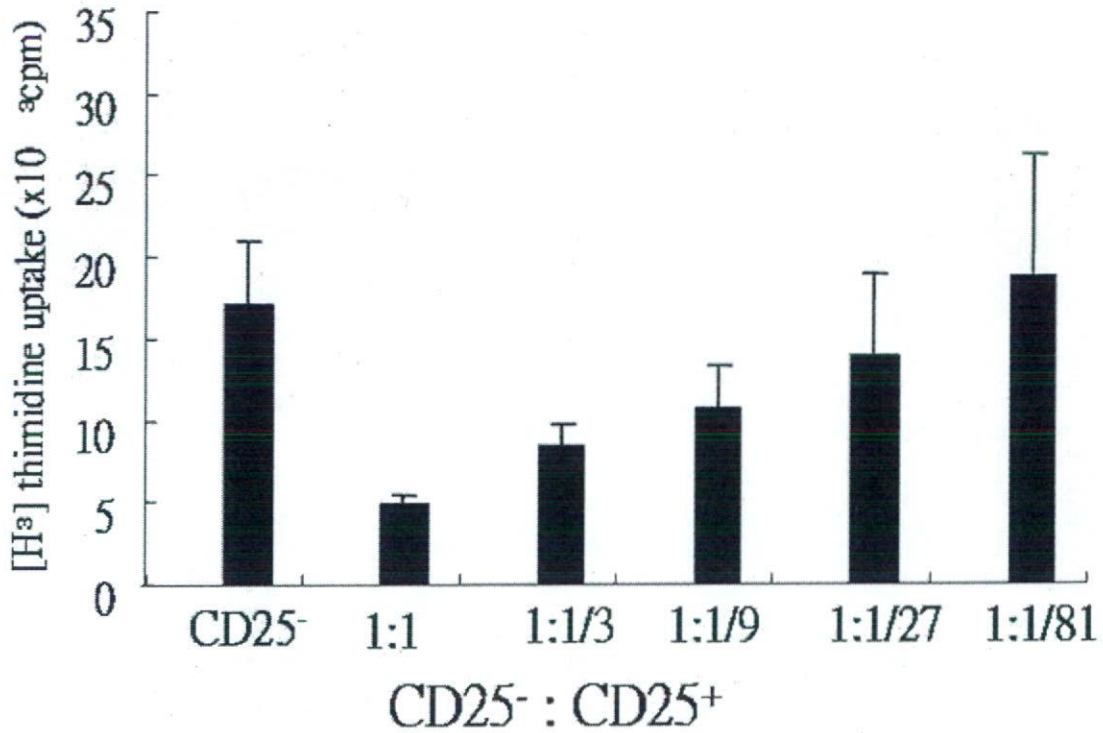
CD4⁺CD25^{high} 細胞, CD4⁺CD25^{low} 細胞の細胞内CTLA4の発現の一例を示す。CD4⁺CD25^{high} 細胞は、CD4⁺CD25^{low} 細胞と比較して明らかに、多くの細胞内CTLA4を発現している。

CTLA-4の発現2

Mean \pm SE
n = 4

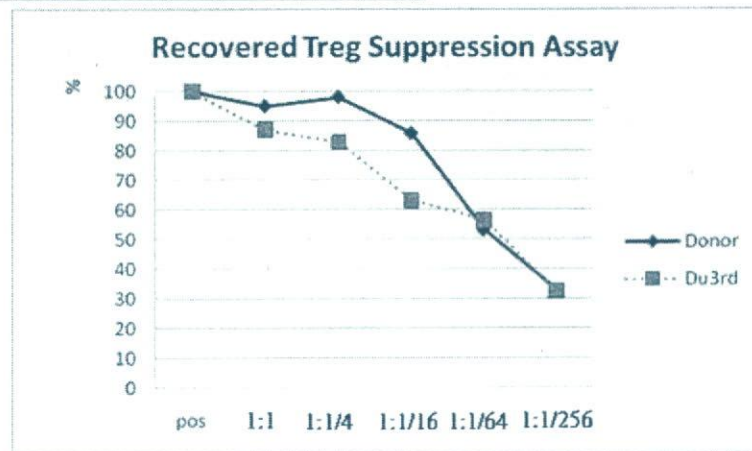
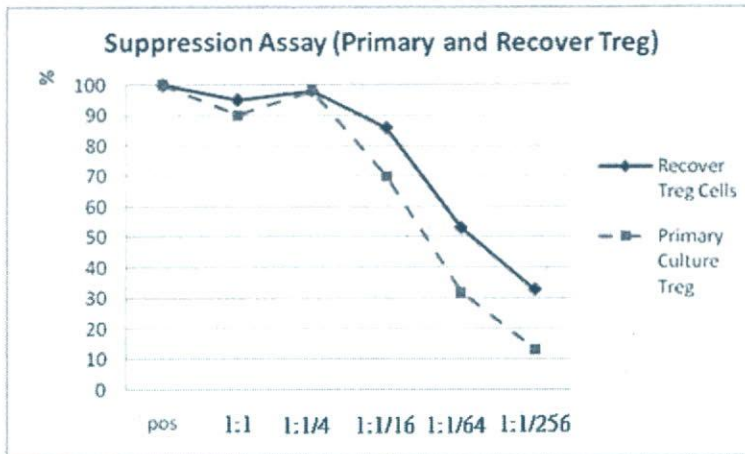


制御性T細胞の免疫抑制効果



バーの下の数字は、CD25⁻とCD25⁺混合の比率を示す。CD25⁺細胞は、容量依存的に、CD25⁻のアロ抗原に対する増殖を抑制する。

制御性T細胞のドナー抗原特異的免疫抑制効果



Primary Treg; 分離時の制御性T細胞

Recover Treg; 培養後回収した制御性T細胞

上のグラフ; Primary Treg と Recover Treg のアロ抗原に対する CD4 の増殖抑制効果を示す。

X 軸は CD4 と制御性T細胞 (Treg) の混合比率を示す。

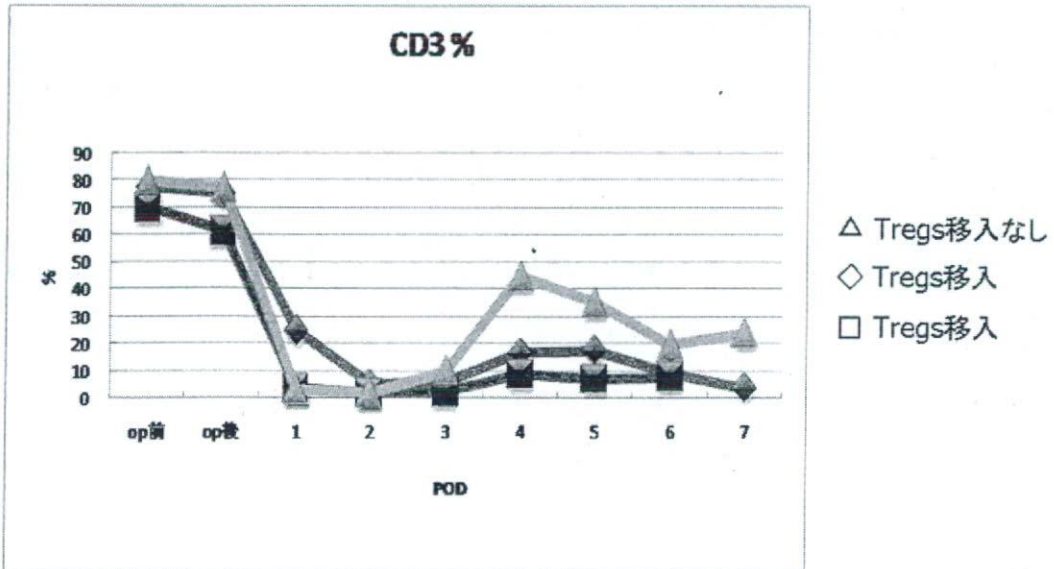
Recover Treg は Primary Treg に比べ、強い抑制効果を示す。

下のグラフ; Recover Treg のドナー抗原と 3rd party アロ抗原に対する CD4 の増殖抑制効果を示す。

X 軸は CD4 と制御性T細胞 (Treg) の混合比率を示す。

Recover Treg は、3rd party アロ抗原に対する CD4 の増殖抑制よりも、ドナー抗原に対する CD4 の増殖を強く抑制する。

末梢血Tリンパ球の変動



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）
分担研究報告書

臓器移植免疫寛容における制御性T細胞に関する研究

研究分担者 上本 伸二 京都大学大学院医学研究科 肝腸膵・移植外科 教授

研究要旨

肝移植では他臓器と違い、臓器移植の最終目標である免疫寛容が自然に起こりうる (immuno-privilege)。特に京都大学の小児生体肝移植では免疫寛容の成立は高い頻度で起きたため、そのメカニズムを調べる機会に恵まれた。免疫寛容患者の末梢血でドナーの抗原に特異的な免疫制御を果たす制御性T細胞 (Tregs) が増加しており、移植肝にも Tregs が存在し、局所で移植肝を拒絶から守っている可能性がある。Tregs が肝の immuno-privilege という現象を説明できるのか今後の検討を要す。

A. 研究目的

臓器移植における免疫寛容の必要性・課題

各種臓器移植において拒絶反応を防ぐために免疫抑制剤が投与される。しかし、免疫抑制剤による非特異的な免疫の抑制下に患者は感染症に罹患する危険にさらされるだけでなく免疫抑制剤そのものの副作用も大きな弊害である。従って、免疫抑制剤を投与されなくても免疫が制御され拒絶が起こらない状態、すなわち免疫寛容が成立することは臓器を問わず患者にとって大変に好ましい1)。

とりわけ小腸移植と肺移植の移植後の5年生存率は50%前後と他の臓器の移植より低く、図1に示すように肺癌を除く主要な悪性腫瘍の予後よりも悪い。従って、これらの臓器の移植の予後を改善することは、緊急の課題である。小腸移植と肺移植では拒絶反応が強く起こるため、これまで免疫抑制剤が強力に使用されてきた。しかし、その結果、免疫抑制剤の弊害が強く現れ、患者が死亡することが多い。従って、今後、特にこのような臓器で免疫寛容が誘導されれば患者の生存率は著しく向上すると期待される。

また、図1が示すように肝移植の場合、全体的な予後は良好であるが、原疾患により予後が異なる。欧米、日本どちらにおいても現在、成人の肝移植の適応の一番はC型肝炎である。ガンマグロブリンなど特效薬のないC型肝炎ウイルスは移植を行っても、血液中に残存したウイルスが移植肝に再感染を起こすことは必発で

ある。さらに移植後の免疫抑制剤の使用により、ウイルスの増殖は促進され、移植肝のウイルスによる変化が急速に進行すると考えられている2)。事実、移植後、短期間で移植肝が肝硬変となることはまれではない。従って、C型肝炎硬変で移植を受けた患者で逆に免疫寛容が成立すれば移植肝のウイルスによる変化を遅らせることができるのではないかと予想される。

肝移植における免疫寛容

マウス、ラット、ブタを用いた動物実験では、ドナーとレシピエントの主要組織適合性抗原の違いを超えて移植肝が免疫抑制剤を使用しなくても拒絶されない場合がある3, 4, 5)。ところが、同じ系のドナーとレシピエントの組み合わせで腎臓や心臓の移植をすれば拒絶が起こる。この現象を肝臓の immuno-privilege と呼ばれる。同様に、ヒトの腎臓移植や心臓移植で免疫寛容が成立することは例外的である。しかし、京都大学で生体肝移植を受けた小児の患者においては、免疫抑制剤によるEBウイルスの再燃や、免疫抑制剤の副作用が原因で、免疫抑制剤を中止したところ拒絶が起きず免疫寛容の成立した患者が見られた。これらの経験から、京都大学では小児の患者に限って肝機能の安定している場合には、計画的に免疫抑制剤を中止してきた6)。これまで80例以上の患者に免疫寛容が成立した（小児の肝移植患者は総計およ

そ600例7)。しかし、この immuno-privilege という現象を十分に説明する機序は明らかにされていない。

免疫寛容のメカニズム解明

免疫寛容のメカニズム解明をすることには、2つの理由が存在する。1つは、移植での免疫抑制剤を減量する過程で拒絶が起きる可能性があり、拒絶の危険を回避し免疫抑制剤を中止する指標を得るために、メカニズムが解析されなければならない。2つ目は、メカニズムが詳細に解明されれば、移植患者に積極的に免疫寛容を誘導する方法を開発するための手がかりになる。

B. 研究方法・C. 研究結果

方法1

著者らは、制御性T細胞が生体肝移植後の免疫寛容に重要な役割を果たしているのか、もし、そうであればどのようにして、拒絶を抑制しているのかを調べてきた。

免疫寛容患者における制御性T細胞の役割

免疫抑制剤を完全に中止して、一年以上肝機能が安定している患者について末梢血、移植肝内における制御性T細胞の存在と機能について詳細な検討を行った。

(末梢血におけるCD4+CD25^{high}+細胞)

免疫寛容患者の末梢血におけるリンパ球中のCD4+CD25^{high}+細胞の割合をフローサイトメータの手法を用いて解析した。長年、Suppressor cells という概念が存在はしたが、その存在をフェノタイプで同定することが出来なかった。しかし、共著者の坂口により、マウスの免疫抑制性の細胞集団をCD4+CD25^{high}+細胞というフェノタイプで同定し、今日、CD4+CD25^{high}+細胞は制御性T細胞(regulatory T cells)と呼ばれるようになった。SPFにいるマウスではCD4+CD25^{intermediate}+細胞(エフェクター細胞)は事実上存在しないので、CD4+CD25^{intermediate}+細胞とCD4+CD25^{high}+細胞の区別は難しくはない。しかし、pathogensに暴露を受けエフェクター細胞の多いヒトでは、CD4+CD25^{intermediate}+

細胞が存在して、CD4+CD25^{high}+細胞の同定は難しい。著者らはpathogensに暴露を受けず、CD4+CD25^{intermediate}+細胞の存在しない新生児の血液を臍帯から採取して、CD4+CD25^{high}+細胞のCD25のintensityを定義した。

結果1

そうして、定義されたリンパ球中のCD4+CD25^{high}+細胞の割合は、免疫寛容の患者において、免疫抑制剤使用中の患者や同年代の健常人に比較して有意に増加していた(図2)8)。

方法2

(末梢血CD4+CD25^{high}+細胞の免疫制御機能)

さらに、細胞分離装置にて分離した免疫寛容患者のCD4+CD25^{intermediate}+細胞とCD4+CD25^{high}+細胞を図に示すように混合する割合を変えて、ドナーの抗原と3rd partyの抗原に対する、MLRを測定した。

結果2

3rd partyの抗原に対するCD4+CD25^{intermediate}+細胞のMLRはCD4+CD25^{intermediate}+細胞:CD4+CD25^{high}+細胞を1:1、から1:1/3まで、CD4+CD25^{high}+細胞により抑制されている。ところが、ドナーの抗原に対するCD4+CD25^{intermediate}+細胞のMLRはCD4+CD25^{intermediate}+細胞:CD4+CD25^{high}+細胞を1:1、から1:1/9まで、CD4+CD25^{high}+細胞により抑制されており、1:1/27になって初めて解除される(図3)。このことは、免疫寛容患者のCD4+CD25^{high}+細胞がCD4+CD25^{intermediate}+細胞のMLRを、ドナー抗原に対して、3rd partyの抗原に対するよりも強く抑制していることを意味する。換言すれば、免疫寛容患者のCD4+CD25^{high}+細胞の免疫制御はドナー抗原特異的である。本検討では、5名の免疫寛容患者のうち4名に、ドナー抗原特異的制御性T細胞の存在が証明された7)。

方法3

(移植肝内のFOXP3+細胞)

京都大学では、2003年から肝機能が正常でも長期生存症例にプロトコル生検で移植肝の病