

理的な検討を行っている。免疫寛容の患者のプロトコル生検では、移植前急性、慢性拒絶を認めなかった9)。同時に、著者らは、免疫寛容の患者のプロトコル生検により、移植前内の制御性T細胞の存在について検討を行う機会を与えられた。FOXP3は制御性T細胞の発生と分化に不可欠な転写因子であり、今日存在する最も信頼できる制御性T細胞のバイオマーカーである。著者らはまず、生検組織から、Total RNAを抽出し、mRNAレベルでFOXP3の発現を検討した。

結果3

その結果、図に示すようにFOXP3 mRNAの発現は免疫寛容の患者で、免疫抑制剤内服中(減量前)の患者に比べ増加していた。また、FOXP3はmRNAレベルでは、慢性拒絶で喪失した移植前でも、免疫寛容の移植前と同程度に増加していた(図4)。

方法4

さらに、免疫染色を行いCD4+, CD8+, FOXP3+(蛋白レベル)細胞の分布と、数について検討を行った。

結果4免疫寛容の患者の移植前、免疫抑制剤内服中(減量前)の患者の移植前の門脈域にCD4+とCD8+の集ぞくが散見された。門脈域におけるCD4+とCD8+の密度は、免疫寛容の患者と免疫抑制剤内服中の患者で差がなかったが、FOXP3+の密度は、免疫寛容の患者で、免疫抑制剤内服中の患者に比べて有意に増加していた(図5)。慢性拒絶の移植前には門脈域にCD8+細胞が豊富に見られた。しかし、FOXP3 mRNAの発現とは違い、FOXP3+は発現を認めなかった(図5)。

方法5

また、CD4, FOXP3, および CD8, FOXP3の二重蛍光染色をおこなった。

結果5

その結果、FOXP3+細胞は92%がCD4+でCD8+はわずか8%であった(図6)。

D. 考察

すでに、免疫寛容患者の末梢血の中でのリンパ球中のCD4+CD25^{high}+細胞の割合の増加と抗原特異的制御性T細胞の存在が同定されていることを合わせて考えると、免疫寛容の患者の移植前にはCD4+FOXP3+制御性T細胞が存在して、拒絶から移植前を守っているのではないかとの仮説が成り立つ。一方、免疫寛容のバイオマーカーという見地からFOXP3 mRNA, とFOXP3(蛋白)を捉えた場合、FOXP3 mRNAは拒絶の移植前にも高発現しているが、FOXP3(蛋白)が増加しているのは免疫寛容だけなので、著者らはFOXP3(蛋白)の方が、免疫寛容のバイオマーカーの候補となりうると考えている。しかし、図に示すように、免疫寛容の移植前にもFOXP3(蛋白)が認めない症例があり、このマーカーが免疫寛容のバイオマーカーとして、有用かどうかということについてはプロスペクティブは検討を要する。

ロッテルダムグループは心臓移植の拒絶時、生検組織内のFOXP3 mRNAが高発現することを報告している10)。著者らが認めた慢性拒絶の移植前内でのFOXP3 mRNAの高発現に一致する所見である。それにも関わらず、FOXP3+(蛋白)細胞は、慢性拒絶の肝臓では認めなかった。最近、ヒトのエフェクター細胞(CD4+CD25⁺細胞、CD8+CD25⁺細胞)は活性化するとlow levelのFOXP3 mRNAを発現することがin vitroの研究で明らかになった。すでに、慢性拒絶の移植前にはCD8+細胞が豊富に存在することが分かっている。これらの細胞は拒絶時に活性化されていると考えられ、low levelのFOXP3 mRNAを発現する可能性がある。仮に、個々の細胞の発現levelが低くても、細胞数が多ければ、慢性拒絶の移植前内のFOXP3 mRNAのトータルは増加しているであろう。しかし、免疫染色では、その感度の低さからlow levelのFOXP3(蛋白)は検出されない。このように考えると、慢性拒絶の移植前においてmRNAのレベルで検出されたFOXP3遺伝子のコードする蛋白が、免疫染色の

レベルでは検出されなかった理由を説明することが出来る 11)。

E. 結論

京都大学で生体肝移植を受け、免疫寛容の成立した患者の末梢血では、ドナー抗原特異的免疫制御能を有する制御性T細胞が増加しており、移植肝でも制御性T細胞が増加していた。これらのデータから、制御性T細胞は移植肝の局所で拒絶から移植肝を守ることで免疫寛容が維持されている可能性が示唆された。肝臓の immuno-privilege と制御性T細胞との関係を明らかにするため更なる研究を要する。

G. 研究発表

1. 論文発表

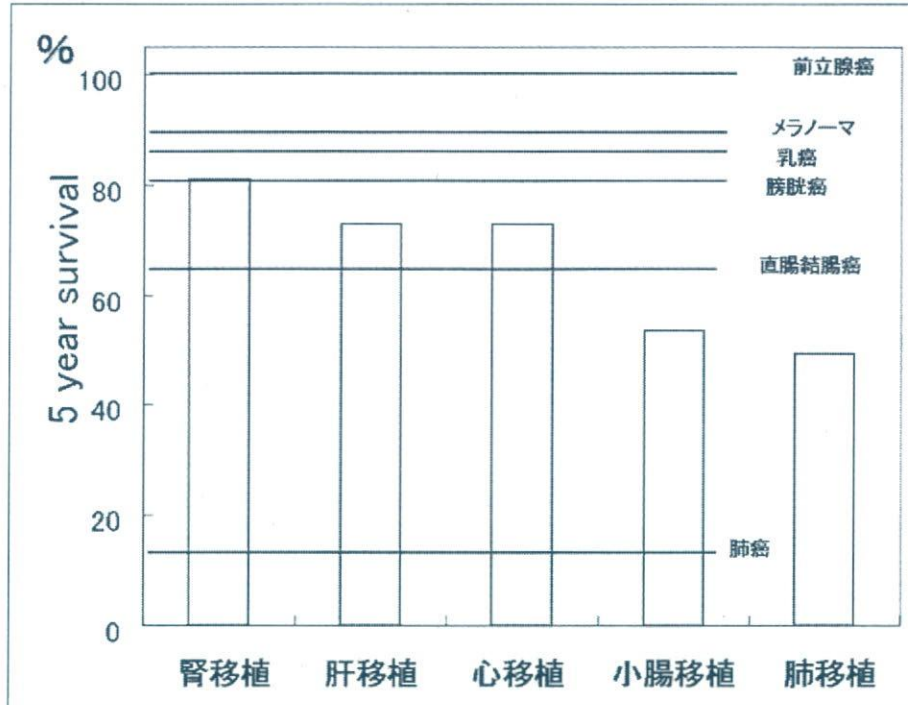
Tanaka K, Uemoto S, Egawa H, Takada Y, Ozawa K, Teramukai S, Kasahara M, Ogawa K, Ono M, Sato H, Takai K, Fukushima M, Inaba K. Cytotoxic T-cell-mediated defense against infections in human liver transplant recipients. *Liver Transplant* 13: 287-293, 2007. 489-494, 2008.

Ito T, Takada Y, Ueda M, Haga H, Maetani Y, Oike F, Ogawa K, Sakamoto S, Ogura Y, Egawa H, Tanaka K, Uemoto S. Expansion of selection criteria for patients with hepatocellular carcinoma in living donor liver transplantation. *Liver Transplant* 13: 1637-1644, 2007.

参考資料1

図1:

5年生存率 臓器移植 対 悪性腫瘍

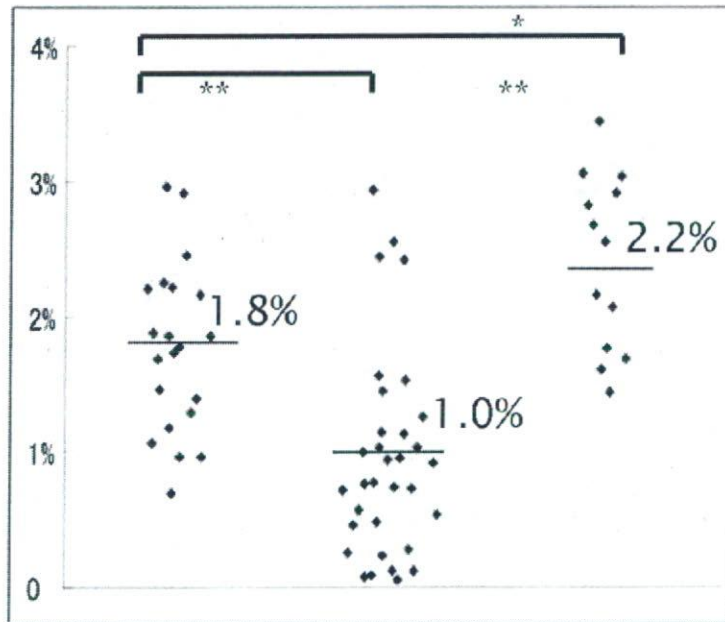


2005 OPTN/SRTR Annual Report (Organ Procurement and Transplant Network)

Cancer statistics 2006 (American Cancer Society)

図2:

免疫寛容患者における CD4+CD25high+ cells の増加



健常人 免疫抑制剤
 使用 免疫寛容

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

図3:

免疫寛容患者におけるCD4⁺CD25^{high+} cells によるドナー抗原に特異的な免疫制御

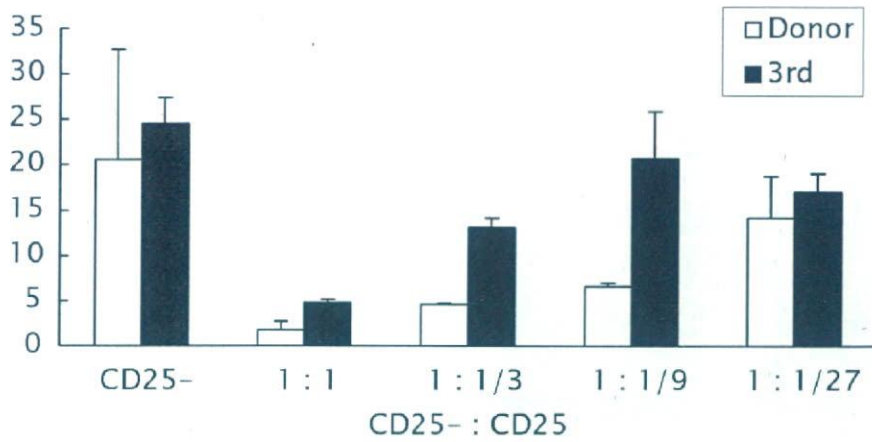
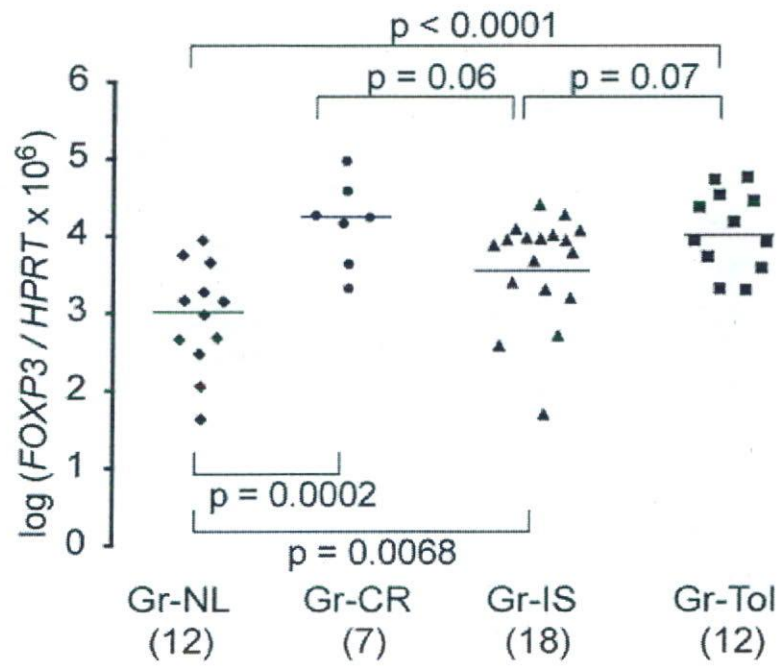


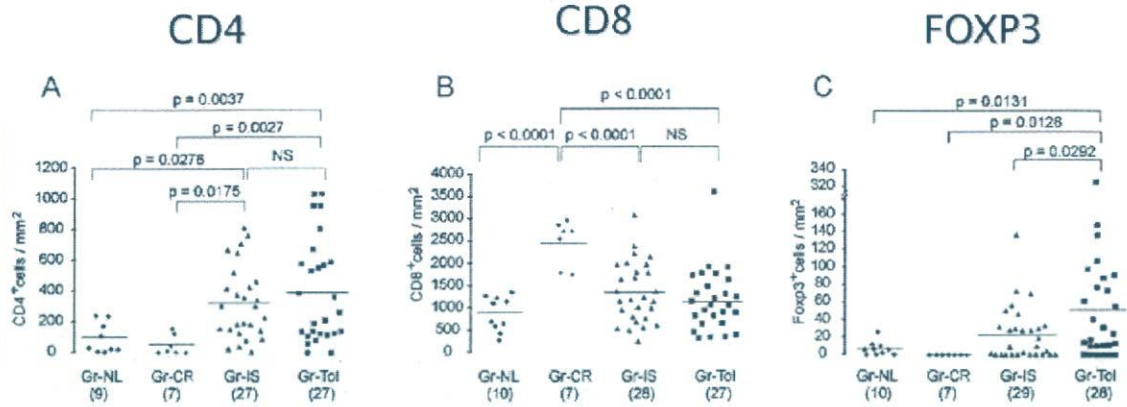
図4:

移植肝内の FOXP3mRNA の発現



Gr-NL; 正常肝
Gr-CR; 慢性拒絶
Gr-IS; 免疫抑制剤使用中(減量前)
Gr-Tol; 免疫寛容
—は各群の mean value を示す。

移植肝内の CD4+, CD8+, FOXP3+ 細胞の数



Gr-NL; 正常肝

Gr-CR; 慢性拒絶

Gr-IS; 免疫抑制剤使用中(減量前)

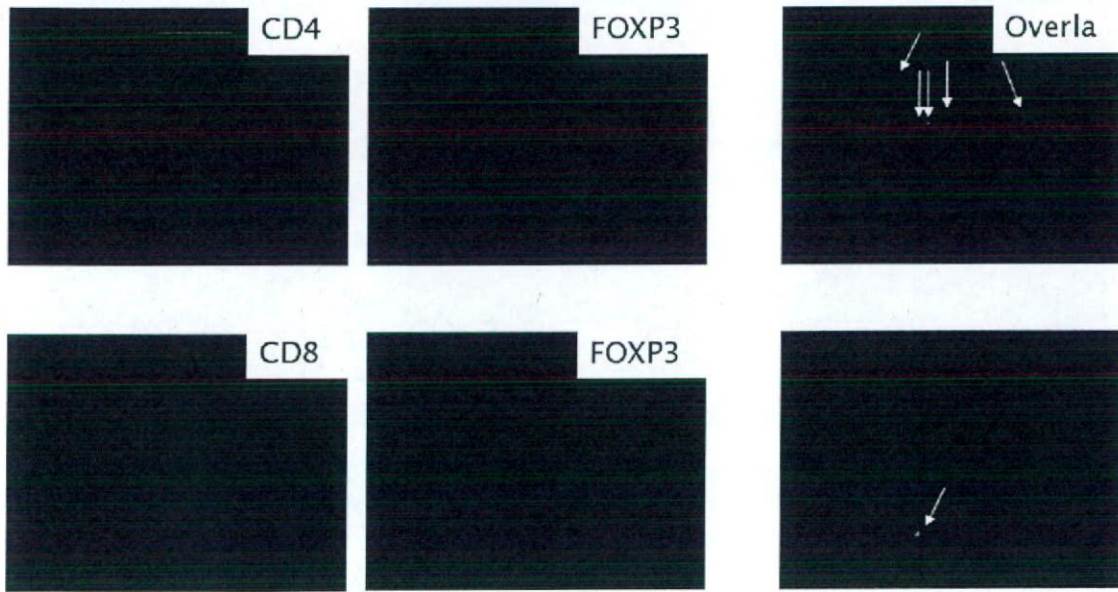
Gr-Tol; 免疫寛容

—は各群の mean value を示す。

参考資料6

図6:

CD4,FOXP3及び CD8,FOXP3の 二重蛍光染色



左上;赤CD4+ 細胞 中央上;緑 FOXP3+ 細胞 右上;矢印の黄緑 CD4+ FOXP3+ 細胞

左下;赤CD8+ 細胞 中央下;緑 FOXP3+ 細胞 右下;矢印の黄緑 CD8+ FOXP3+ 細胞

免疫寛容患者の移植肝内に存在する FOXP3+ 細胞のうち、92%はCD4+, 8%はCD8+ であった。

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

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
研究分担者 前川 平 京都大学医学部付属病院 輸血部 教授

研究要旨

Abl 特異的チロシンキナーゼ阻害剤メシル酸イマチニブ（グリベック®、IM）は、臨床導入後わずか数年で慢性骨髄生白血病治療の第1選択薬となった。しかし、このきわめて優れた分子標的薬においてすら、耐性の出現などいくつかの問題が明らかとなってきた。われわれはIMより有効な薬剤となりうる新規チロシンキナーゼ阻害剤の開発に取り組み、ユニークな作用を示してIM耐性を克服できる INNO-406（NS-187）という Bcr-Abl/Lyn 同時阻害剤を見出し、2006年7月より米国で臨床試験を開始した。臨床開発のゴールは、より有効で、より安全なあたらしい薬剤を患者さんの手元に一刻も早く届けることにあり、国内、国外を問わない。開発のスピードも重要な要素である。INNO-406（NS-187）の開発経緯について概説するとともに、わが国における抗悪性腫瘍薬開発の隘路についても言及したい。

A. 研究目的

フィラデルフィア (Ph) 染色体は9番染色体と22番染色体の相互転座(t(9;22)(q34;q21))により生じる。このPh染色体として観察される特異的再構成遺伝子Bcr-Ablから転写、翻訳されるキメラ蛋白のもつチロシンキナーゼの異常な活性化が慢性骨髄生白血病 (chronic myelogenous leukemia: CML) の発症原因とされている。歴史的に見ればCMLの治療薬はブスルファンとハイドロオキシウレアに始まるが、これらは白血病細胞の数を減らすものの生存期間の延長は見られず、数年の慢性期、その後数ヶ月の移行期、急性転化期を経て死の転帰をとるのが通例であった。1980年代インターフェロン・アルファ (IFN- α) が用いられ、血液学的のみならず細胞遺伝学的寛解も導入可能とされ、従前の治療と比較し生存期間を延長した。しかし、IFN- α 治療でPh染色体が消失する症例はたかだか5%程度で効果は十分ではなかった。一方、慢性期にHLA一致同胞ドナーから骨髄移植を受けた症例では治癒が期待されるものの、移植に伴う毒生とドナーの制約により適応症例が限られている。したがって、Ph陽性クローンを特異的に排除できるあらたな薬剤の開発が長年望まれてきた。

1990年代はじめ、スイスの製薬会社ノバルテイスは多くのチロシンキナーゼ阻害剤を合成していたが、米国オレゴン大学のドラッカーはその中からCML細胞の増殖を抑制する分子を見出した。彼はノバルテイス社と共同で、その分子をリード化合物としてAbl特異的阻害剤メシル酸イマチニブ (imatinib mesylate; IM, グリベック®) を合成し、臨床開発に乗り出した。IMは臨床導入後わずか2-3年でCMLの第一選択薬となったことは周知である。しかし、CMLの治療パラダイムシフトをもたらしたこの分子標的薬においてすら、少なからぬ症例で耐性が獲得されるなど多くの問題が明らかとなってきた¹⁾。われわれはIM耐性を克服し、より有効な薬剤となりうる新規チロシンキナーゼ阻害剤の開発に日本新薬と共同で取り組み、Bcr-Abl/Lyn同時阻害剤NS-187 (INNO-406) を見出した²⁾。本稿では、この研究開発経緯について国際共同試験の必要性を念頭に置きながら、わが国における抗悪性腫瘍薬開発の隘路についても言及したい。

・メシル酸イマチニブ (IM) と NS-187 (INNO-406)

Bcr-Abl キメラ蛋白が活性化するためには、Abl にアデノシン3リン酸 (ATP) が結合することが必要である。IM (図1a) は、この ATP 結合部位に結合することにより競合的に Abl チロシンキナーゼを特異的に阻害する。IM は慢性期の CML に対し優れた効果を示すが、病勢の悪化した移行期や急性期の CML、それに Ph+ALL に対しては効果が劣る。IM 耐性の原因として IM 結合部位である Abl キナーゼドメインの ATP 結合領域の変異、Bcr-Abl 遺伝子の増幅や mRNA コピー数の増加、多剤耐性遺伝子の出現、Lyn の活性化などが報告されている。これらの中でも Abl キナーゼドメインの変異が最も重要な問題と考えられている。この部位の変異により ATP 結合領域の構造が変化してしまうため、IM が結合できなくなり耐性が生じる。ATP 自体はこの変異があってもこの結合領域に結合でき、Bcr-Abl キメラ蛋白を活性化する。また、IM は Abl 以上に platelet-derived growth factor 受容体 (PDGFR) や c-Kit の活性をつよく阻害し、骨髄抑制、浮腫などの副作用の出現に関与している可能性があり、Bcr-Abl への特異性が高い薬剤がより安全性が高いと考えられる。加えて、IM と同程度の Bcr-Abl 特異性をもちつつ、IM 耐性に関与すると考えられる Lyn などその他のキナーゼを同時に抑制する薬剤は、つよい効果を示す可能性があると考えられる。したがって、経口投与可能で Abl への特異性が高く、ATP 結合領域に変異のある Bcr-Abl にも効果を示し、かつ安全性の高い新規 Abl チロシンキナーゼ阻害剤の開発が俟たれていた。われわれは、既知の IM 結合 Abl キナーゼドメインの結晶構造を詳細に検討する過程で、IM のフェニル環周囲にアミノ酸残基 Ile-293、Leu-298、Leu-354、Val-379 によって作られた疎水性ポケットを見出した (図2)。検討の結果、このスペースを利用して Abl キナーゼドメインとの親和性が IM より強い化合物が合成できれば、突然変異を持つ CML 細胞の増殖を抑

えることができるのではないかと考えた。そこで、この疎水性ポケット内にさまざまな疎水性置換基を持つ化合物を合成し、試行錯誤を重ねた結果、この疎水性ポケットにフルオロメチル基を導入することで *in vitro* で IM より 25-55 倍、*in vivo* でも少なくとも 10 倍以上強力な Bcr-Abl /Lyn 同時阻害剤である NS-187 を同定し、その合成に成功した (図1c)。NS-187 は、キナーゼドメイン内に変異を持つ Bcr-Abl 蛋白 13 個中 12 個に抑制効果を認めたが、T315I には無効であった。また Src、Blk、Yes のリン酸化に影響を与えずに Lyn を抑制した。In vivo の検討では、野生型 Bcr-Abl あるいは T315I を除く M244V、G250E、Q252H、Y253F、E255K、M351T、H396P の変異 Bcr-Abl を発現する Ba/F3 を移植したマウスで、NS-187 は生存期間を延長した。さらに、マウス中枢神経白血球モデルにおいて用量依存性に生存期間を著明に延長した³⁾。NS-187 は Bcr-Abl と Lyn キナーゼを特異的にターゲットとするため、後述するような Src/Abl 阻害剤のような複数のキナーゼをターゲットにする薬剤よりも副作用は少ないと期待される。NS-187 (臨床開発コード INNO-406) は米国 FDA から IND (Investigational New Drug) としての承認を受け、臨床第 1 相試験が 2006 年 7 月より米国 MD アンダーソンがんセンターおよび 9 月からドイツのフランクフルト大学でも開始されている。

B. 研究方法 C. 研究結果 D. 考察

新規の Abl チロシンキナーゼ阻害剤は、ATP 競合型と非競合型阻害剤の大きく 2 つに分けられる。さらに ATP 競合型阻害剤は、もともと Src family kinases (Src) 阻害剤として開発された Abl への効果を強めるよう修飾された Src/Abl 阻害剤と、IM の基本構造である 2-phenylaminopyrimidine 骨格をもつ化合物の二つに大別される。BMS-354825 (Dasatinib, ダサチニブ)、AP23464、SKI-606、PD166326 は前者に、AMN107 (Nilotinib, ニロチニブ)、NS-187 (INNO-406) は後者に分類される。

一般的に Src/Abl 阻害剤は Bcr-Abl チロシンキナーゼの自己リン酸化を IM より 100-300 倍強力に阻害し、Bcr-Abl のほとんどの突然変異に有効である。しかし、IM が不活性型の Abl のみに結合するのに対し、Src/Abl 阻害剤は活性型にも結合し、また Src family protein を含むその他多くのプロテインキナーゼも阻害するため特異性が乏しい。一方、2-phenylaminopyrimidine 骨格の化合物に関しては、Bcr-Abl チロシンキナーゼの自己リン酸化抑制効果は IM の 10-100 倍にとどまるが、Bcr-Abl に高い特異性を持つ。しかし、これら ATP 競合型阻害剤で現在、T315I 変異をもつ Bcr-Abl に有効なものはない。Abl キナーゼドメインの 315 番目のアミノ酸 (スレオニン) は、IM が Abl と直接結合する部位のなかでも最も重要な部位にあるため、ゲートキーパーと呼ばれる。同部位がスレオニンより大きなイソロイシンに変異すると、IM や NS-187(INNO-406)を含めてその他の新規の ATP 競合型 ABL キナーゼ阻害剤が結合しようとしても、イソロイシンが障壁となって結合できなくなると考えられている。現在、すでに米国 FDA により承認されたダサチニブ (商品名 スプライセル) や試験中のニロチニブの臨床成績に関しては他の報告を参照されたい (4) (5)。この他にも、非 ATP 競合型阻害剤である ON012380、オーロラキナーゼ阻害剤である VX-680、p38 MAPK 阻害剤の BIRB-796、さらに T315I にも有効であるとされる SGX-70430 などが開発中である。

わが国における臨床開発とその隘路

臨床開発の原則は、より効果的で、より安全なあたらしい治療薬を、より早く患者さんの手元に届けることにある。われわれが開発した NS-187(INNO-406)も臨床試験は海外で先行することになった。IM 耐性を克服をめざす新規 CML 治療薬の開発競争は変身を削っている。開発のスピードはきわめて重要な要素である。新規薬剤が承認されれば、その後開発される薬剤が対象とするのは先行する新規薬剤に耐性あるいは不耐用の症例になる。このあたりは学

問的な興味だけでは如何ともし難い開発戦略が優先する。日本のみならず世界中の CML 患者が新規治療薬の開発を今や遅しと待っている。米国で開発が先行しても bridging phase 1 study を早く開始できれば、わが国での承認は遅れなくて済むであろう (図3)。

E. 結論

わが国において「試験の空洞化」が指摘されるようになって久しい。その原因は試験費用の高騰、審査期間の問題、症例登録のスピード、試験を支える人的インフラの不備、トランスレーショナルリサーチないし医師主導型の試験を推進させるための GMP 準拠の試験薬製造システムの不備など種々あるが (図4)、試験を担当する医師 (がんの場合は臨床腫瘍医) の絶対数の不足と GCP を遵守することに対する理解、それに試験に参加する意義を、被験者となる国民に十分理解できるように説明して啓蒙する努力も不足しているのではなからうか。医師、行政、製薬会社 (ベンチャー的な要素を持つ会社あるいは組織が必要)、それに被験者が一致協力してオールジャパンの体制を一刻も早く立ち上げることが喫緊の課題である。でなければ、日米欧の3極ではなく、アメリカ、ヨーロッパ、それに ROW (Rest of World) のなかの日本としての評価しからなくなることが大いに危惧される。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yokota, A., Kimura, S., Masuda, S., Ashihara, E., Kuroda, J., Sato, K., Kamitsuji, Y., Kawata, E., Deguchi, Y., Urasaki, Y., Terui, Y., Ruthardt, M., Ueda, T., Hatake, K., Inui, K., and Maekawa, T.: INNO-406, a novel BCR-ABL/Lyn dual tyrosine kinase inhibitor, suppresses the growth of Pht leukemia cells in the central nervous system and cyclosporine A augments its in vivo activity. Blood, 109(1):306-314, 2007.

Horie, N., Murata, H., Kimura, S., Takeshita, H., Sakabe, T., Matsui, T., Maekawa, T., Kubo, T., Fushiki, S. : Combined effects of a third-generation bisphosphonate, zoledronic acid with other anti-cancer agents against osteosarcoma. *Brit J Cancer*, 96(2):255-261, 2007.

Ashihara, E., Tsujī, H., Sakashita, H., Haga, H., Yurugi, K., Kimura, S., Egawa, H., Manabe, T., Uemoto, S., Maekawa, T.: Anti-donor antibody in patients receiving ABO-identical and HLA-mismatched living donor liver transplants: effect on survival. *Transplantation*, 83(4):506-509, 2007.

Uchida, R., Ashihara, E., Sato, K., Kimura, S., Kawata, E., Taniguchi, K., Okamoto, M., Shimura, K., Kiyono, Y., Shimazaki, C., Taniwaki, M., Maekawa, T.: $\gamma \delta$ T cells kill myeloma cells by sensing mevalonate metabolites and ICAM-1 molecules on cell surface. *Biochem Biophys Res Commun*, 354(2):613-618, 2007.

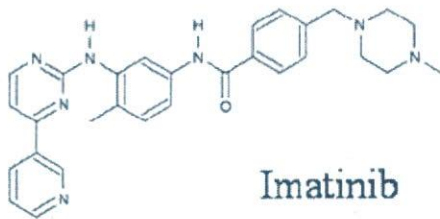
Egawa, H., Ohmori, K., Haga, H., Tsujī, H., Yurugi, K., Miyagawa-Hayashino, A., Oike, F., Fukuda, A., Yoshizawa, J., Takada, Y., Tanaka, K., Maekawa, T., Ozawa, K., Uemoto, S.: B-cell surface marker analysis for improvement of rituximab prophylaxis in ABO-incompatible adult living donor liver transplantation. *Liver Transpl*. 13(4):579-588, 2007.

Yurugi, K., Kimura, S., Ashihara, E., Tsujī, H., Kawata, E., Kamitsuji, Y., Hishida, R., Takegawa, R, Egawa, H., Maekawa, T.: Rapid and accurate measurement of anti-A/B IgG antibody in ABO-unmatched living donor liver transplantation by surface plasmon resonance. *Transfusion Med*, 17(2):97-106, 2007.

参考資料1; イマチニブ構造

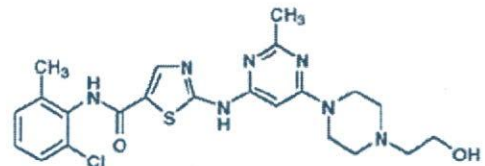
図1

a



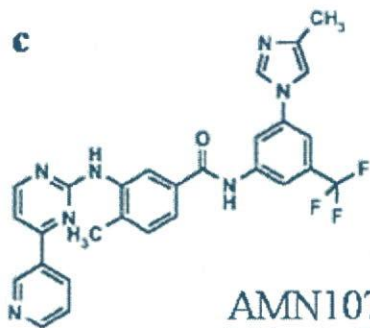
Imatinib

b



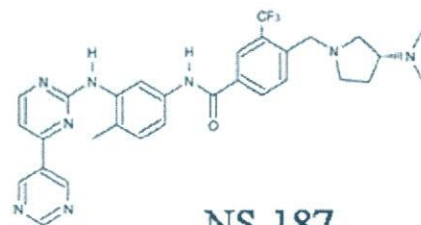
BMS-354825
(Dasatinib)

c

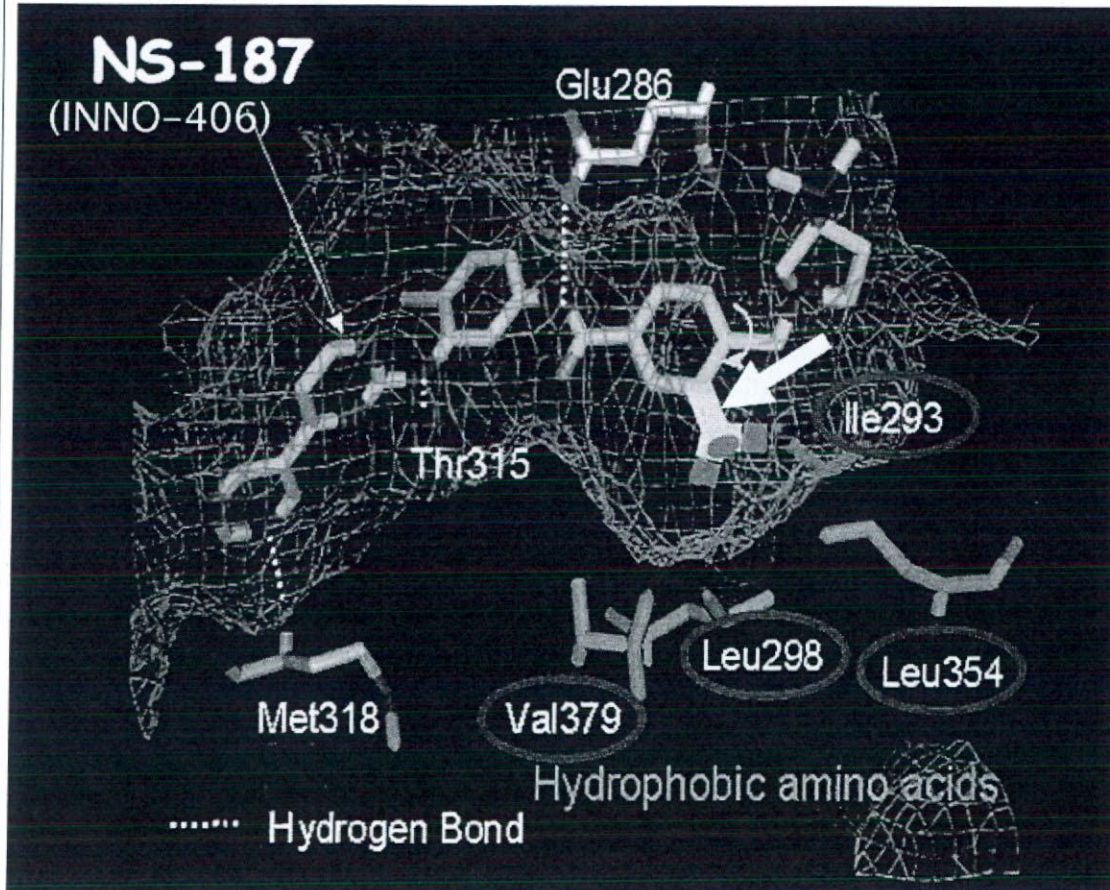


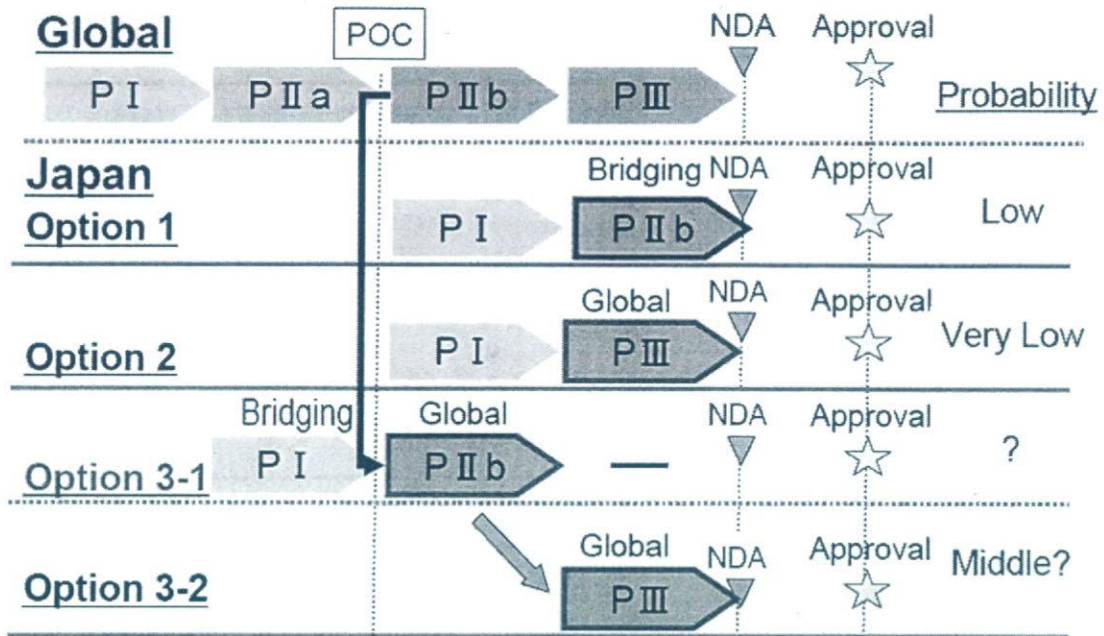
AMN107
(Nilotinib)

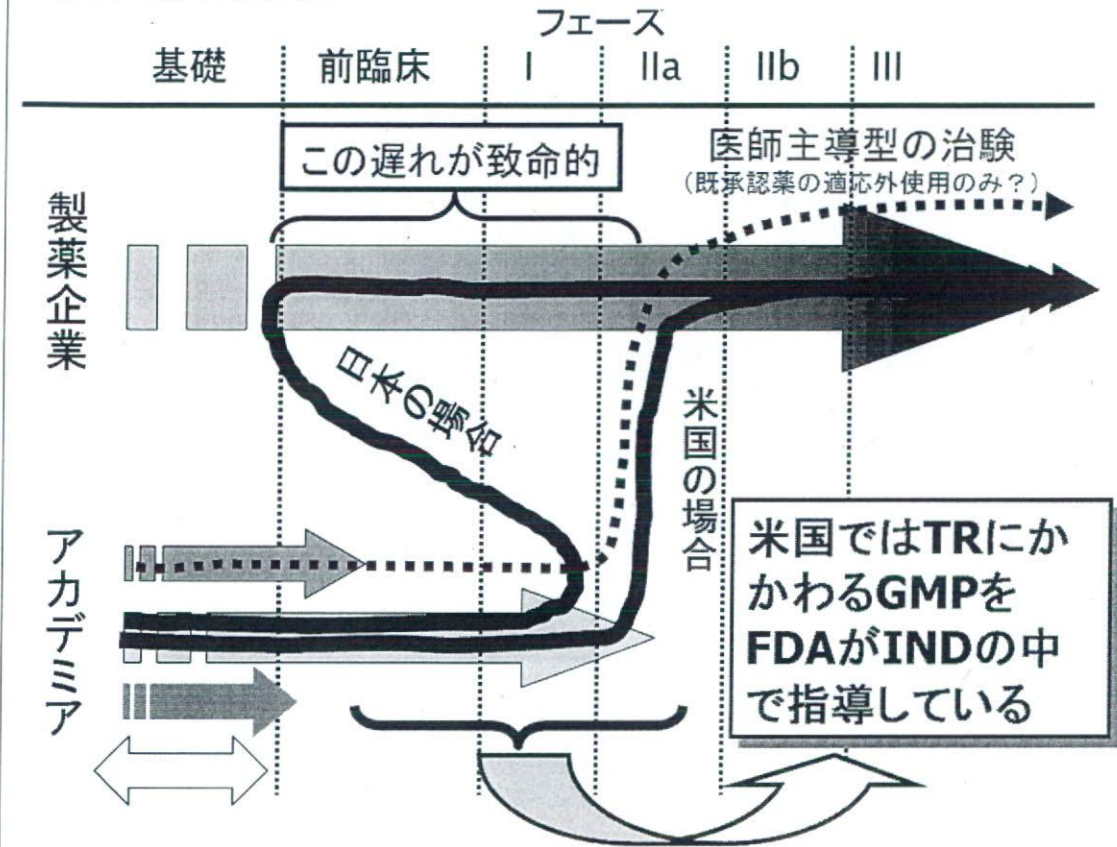
d



NS-187
(INNO-406)







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

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

研究分担者 湊 長博 京都大学大学院・医学研究科 感染・免疫 教授

研究要旨

免疫抑制剤の弊害により患者が死亡したり、患者のQuality of Life (QOL) が低下することが多い。臓器移植の現状で免疫寛容が成立することは患者にとって大変に好ましい。著者らは、肝移植や小腸移植の後に自然に免疫寛容となった症例に免疫学的アプローチを行い、制御性T細胞、 γ δ T細胞、PD-1が、免疫寛容の成立に重要な働きをしている可能性が高いことを見出した。免疫寛容のメカニズムを明確にすることは自然に免疫寛容の成立しない患者を、免疫寛容へと導くための次世代の治療法を開発する重要な手がかりになると期待される。

A. 研究目的

1980年代のシクロスポリン、1990年代のタクロリムスなどのすぐれた免疫抑制剤の登場により、臨床臓器移植の急性拒絶反応は著しく減少し、その成績は向上した1)。しかし、免疫抑制剤の弊害（感染症、移植後リンパ腫/PTLD、薬剤毒性）により患者のQuality of Life (QOL) が低下する場合が多い。また、現在使用されている免疫抑制剤は慢性拒絶には無効である場合が多い。事実、各種臓器移植の短期死亡例は感染症によるものが最も多い2-5)。一方、長期的には、慢性拒絶における移植臓器の喪失が最大の問題である。従って、免疫寛容=tolerance（用語説明あり）（免疫抑制剤を中止しても移植臓器が十分に機能する状態6)）が成立することは患者にとって大変に好ましい。これまで、臨床の臓器移植で免疫寛容が成立することは極めて例外的であるとの考えが一般的であった。臨床での免疫寛容は‘Holy grail’とまで言われることもあった。しかし、京都大学では既存の概念をくつがえし、小児生体肝移植を受けた患者のうち15%の症例で自然に免疫寛容の成立を認めた7)。また、小腸において‘forbidden organ to transplant’と呼ばれたほど拒絶の起きやすい臓器である8)。国際小腸移植レジストリーは、小腸移植後1年以内に80-90%の症例で拒絶が起こると報告している9)。ところが、共同研究を行ってきたベルギー国レーベンカトリック大学では4例の小腸移植が行われ、長期間、拒絶がまったく起きなかった10)。これら

の小腸移植の患者では現在QOLの障害されない程度の極めてわずかの免疫抑制剤の内服で移植臓器が機能しており、prope (almost) tolerance（用語説明あり）の状態である。著者らは、これらの、極めて貴重な症例に対し免疫学的なアプローチを行い、免疫寛容=toleranceおよびprope (almost) toleranceのメカニズムを追求してきた。免疫寛容=toleranceおよびprope (almost) toleranceのメカニズムを明確にすることは自然に免疫寛容の成立しない患者を、免疫寛容へと導くための次世代の治療法を開発する重要な手がかりになると期待される。

B. 研究方法

著者らは、制御性T細胞、 γ δ T細胞、PD-1の三つに着目して免疫寛容のメカニズムへのアプローチを行ってきた。制御性T細胞は動物実験のレベルでは移植後の免疫寛容に重要な役割をはたしているとの知見が集積されつつある。著者らは、京都大学で生体肝移植を受けた患者のうち免疫寛容の成立を認めた患者の末梢血で、制御性T細胞の本体とされるCD4陽性CD25強陽性細胞の割合が増加していることを見出した11)。また、同細胞は、ドナーに対するリンパ球の増殖を特異的に抑制していることも分かった12)。 γ δ T細胞はその受容体のタイプによりいくつかのサブクラスに分類される。サブクラスのひとつであ

るV δ 1 γ δ T細胞は母児間の免疫寛容の成立に重要な働きをしているとされてきた(13, 14)。V δ 1 γ δ T細胞は末梢血には少なく、小腸などの上皮組織に多い。一方、エフェクター機能をもつV δ 2 γ δ T細胞は末梢血に多い。従って、V δ 1 γ δ T細胞/V δ 2 γ δ T細胞比(V δ 1/V δ 2比)は、健康人の末梢血では低い(<1)。ところが、肝移植、免疫寛容の患者の末梢血ではV δ 1/V δ 2比が逆転していることが分かった(>1)(11)。PD-1は活性化リン球の表面に出現している副刺激因子である。そのリガンド(PD-L1, PD-L2)と結合した場合、抑制性のシグナルをリン球の細胞内に送り、免疫を制御している(15)。肝移植、小腸移植後の免疫寛容における移植臓器内の免疫細胞遺伝子発現

京都大学で生体肝移植を受けた後に免疫寛容となった患者にエコーガイド下に生検を行い移植肝を採取した。ルーベンカトリック大学で脳死小腸移植を受けた患者で prope (almost) tolerance の患者の移植小腸を内視鏡下に採取した。肝移植のコントロールは移植時のドナー肝(非移植正常肝)を使用した。小腸移植のコントロールは移植小腸の患者自身の残存小腸を使用した。表に各群のプロフィールを示す。小腸移植に関しては症例が少ないため、4例中、3例の患者について1年の期間をあけて2回の内視鏡を施行して移植小腸、残存小腸を採取した。生検材料から total RNA を抽出して cDNA を合成した。リアルタイム PCR にて、FOXP3 (用語説明あり)(制御性T細胞特異的遺伝子)、V δ 1 γ δ T細胞、V δ 2 γ δ T細胞、PD-1、PD-L1、PD-L2、CD4、CD8、CD25(活性化マーカー)、CD19(B細胞マーカー)、CD56(NK細胞マーカー)、V α 24 (NKT細胞マーカー)の発現レベルを定量した。内因性コントロールに HPRT を用いた。データは各パラメータと HPRT の比率に106をかけlogで表した。2群間の比較はスチューデントのt testを用いた。

C. 研究結果

FOXP3の発現は、肝移植ではコントロール群と比較して、免疫寛容群で有意に高かった(p<

0.01)。小腸移植では、FOXP3の発現は、コントロール群と比較して、免疫寛容群で高い傾向を認めた(p=0.067)。V δ 1 γ δ T細胞/V δ 2 γ δ T細胞比(V δ 1/V δ 2比)は、肝移植ではコントロール群と比較して、免疫寛容群で高い傾向にあった(p=0.1)。しかし、小腸移植では(V δ 1/V δ 2比)は2群間に差を認めなかった(NS)。PD-1、PD-L1、PD-L2、の発現は肝移植では2群間に差を認めなかった(NS)。小腸移植においては、PD-1、PD-L2、の発現はコントロール群と比較して、免疫寛容群で高い傾向にあった(p=0.09, p=0.077)。ところが、PD-L1はコントロール群と比較して、免疫寛容群で有意に低かった(p<0.05)。肝移植、小腸移植の両方でCD4、CD8、CD25、CD56、V α 24はいずれも2群間に差を認めなかった(NS)。CD19は肝移植、小腸移植の両方でコントロール群と比較して、免疫寛容群で高かった(p=0.055, p<0.01)。

D. 考察

本研究では免疫寛容のメカニズムを探るため移植臓器を用いた。末梢の血液よりも、抗原に直接接触する移植臓器の免疫細胞の遺伝子発現を調べるほうが多くの情報が得られると期待したからである。これまでに明らかとなった、肝移植免疫寛容患者の末梢血でのCD4陽性CD25強陽性細胞の増加と一致して(11)、FOXP3の発現は、肝臓、小腸ともに移植臓器で高いことより、制御性T細胞は両方の移植臓器内に存在することが示唆され、両臓器の免疫寛容の成立に寄与している可能性が高い。ところが、V δ 1/V δ 2比については、肝移植と、小腸移植で異なる結果となり、肝移植においてのみ増加が認められた。先に述べたように、V δ 1は妊娠の維持やすなわち母こことってallo-graftというべき児に対する免疫寛容である。通常、拒絶されるはずのallo-graftが自然に受け入れられる現象は、免疫学的特権(immuno-privilege)と言われる。肝移植もまたimmuno-privilegeの臓器の移植である。腎臓、心臓、肺、小腸の移植を行って自然に免疫寛

容が成立することは動物実験、臨床どちらにおいてもほとんどない。しかし、肝移植については主要組織適合性抗原(MHC)の違いを乗り越えて、自然に免疫寛容が成立することがある(16)。V δ 1は母児間免疫寛容と肝移植免疫寛容の共通点、すなわち immuno-privilege を可能とする重要な免疫細胞なのではないか?一方、PD-1,PD-L2は小腸の免疫寛容においては発現が上昇していたが、肝臓では上昇が認められなかった。肝臓、小腸両者において、自然免疫、獲得免疫のエフェクターのマーカーである、CD4,CD8,CD25,CD56,V α 24の上昇がないことから、これら拒絶に関わるエフェクターは、制御性T細胞、 γ δ T細胞、PD-1のシステムで抑制されている可能性が強く示唆された。ところが、immunoprivilegeの肝移植と highly immunogenic (拒絶の極めて起きやすい)小腸移植とで免疫寛容に寄与するメカニズムが異なる可能性があり、前者では、制御性T細胞、 γ δ T細胞が後者では、制御性T細胞、PD-1のシステムが寄与していると想定される。自然免疫、獲得免疫のエフェクターのマーカーのなかで、B cellのマーカーであるCD19が肝移植、小腸移植両方の移植臓器内で増加していた。これまでの肝移植の免疫寛容における移植肝内のサイトカインの検定から、免疫寛容の移植肝ではIL-2, γ -IFNなどのTh1サイトカインは発現しておらず、IL-4,IL-10などのTh2サイトカインが発現していることが分かっている(Th2 immuno-deviation)(17)。Th2サイトカインは細胞性免疫を抑制するが、液性免疫を活性化する(18)。従って、肝臓、小腸両者で認めたCD19の増加はTh2 immuno-deviationにより招かれた結果であるのかもしれない。

E. 結論

肝移植、小腸移植の移植肝内の免疫寛容の遺伝子を詳細に調べることで、免疫寛容のメカニズムについて重要な手がかりを得た。

G. 研究発表

1.論文発表

Tanaka, Y., H. Kobayashi, T. Terasaki, H. Toma, A. Aruga, T. Uchiyama, B. Mikami, C. T. Morita, and N. Minato, (2007) Synthesis of Pyrophosphate-Containing Compounds that Stimulate V \cdot 2V \cdot 2 T Cells: Application to Cancer Immunotherapy. *Medicinal Chemistry*.1;85-99.

Hamazaki, Y, Fujita, H, Kobayashi, T, Choi, Y, H. Scott, Matsumoto, M, and Minato, N. (2007) Medullary thymic epithelial cells expressing Aire represent a unique lineage derived from claudin-expressing cells. *Nature Immunol*. 8:304-311.

(News and Views: Claudins provide a breath of fresh Aire. G.Hollander. *Nature Immunol*. 8:234-236

Minato, N, K.Kometani, and M.Hattori. (2007) Regulation of immune responses and hematopoiesis by the Rap1 signal. (Review) *Adv. Immunol*. 93: 229-264.

Kitamura, T., Kometani, K., Hashiba, H., Matsunaga, A., Miyoshi, H., Hosogi, H., Aoki, M., Oshima, M., Hattori, M., Takabayashi, A., Minato, N., and Taketo, M. (2007) Intestinal tumors inactivated in TGF- β signaling secrete CCL9 and recruit CCR1+ myeloid cells that help invasion. *Nature Gen*. 39:467-475.

Koshiha, T., Li, Y., Takemura, M., Wu, Y., Sakaguchi, S., Minato, N., Wood, K.J., Haga, H., Ueda, M., and Uemoto, S. (2007) Clinical, immunological, and pathological aspects of operational tolerance after pediatric living-liver transplantation. *Transplant Immunol*. 17:94-97.

Hamanishi J., Mandai, M., Iwasaki, M., Okazaki T., Tanaka, Y., Yamaguchi, K., Higuchi, T., Yagi, H., Takakura, K., Minato, N., Honjo, T., and Fujii, S. (2007) PD-L1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are independent prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*104; 104:3360-3365..

Terawaki, S, Tanaka, Y, Nagakura, T, Hayashi, T, Shibayama, S, Muroi, K, Okazaki, T, Mikami, B, Garboczi, D, Honjo, T, and Minato, N. (2007) Specific and high-affinity binding of tetramerized PD-L1 extracellular domain to PD-1 expressing cells: possible application to enhance T cell function. *Int. Immunol.* 19: 881-890.

Sakata D, Taniguchi H, Yasuda S, Adachi-Morishima A, Hamazaki Y, Nakayama R, Miki T, Minato N, and Narumiya S. (2007) Impaired T lymphocyte trafficking in mice deficient in an actin-nucleating protein mDia1. *J. Exp. Med.* 204:2031-2038.

Masuda, K, Kakugawa, K, Nakayama, T, Minato, N, Katsura, Y, and Kawamoto, H. (2007) T cell lineage determination precedes the initiation of TCR γ gene rearrangement. *J. Immunol.* 179:3699-3706..

Hiratsuka T, Tsuruyama T, Kaszynski R, Kometani K, Minato N, Nakamura T, Tamaki K, Hiai H. (2007) Bone marrow pre-B expansion by SL/Kh-Bomb1 locus: Not sufficient for lymphomagenesis. *Leuk Res.* 32:2031-2038

Korematsu, S., Yoshimasa, T., Nagakura, T., Minato, M., and Izumi, T. (2007) Human $\gamma\delta$ T cells inhibit IL-4 production by mite allergen-specific Th2-type $\alpha\beta$ T cells. *Clin Exp Allergy.* 37:1681-1687