

2008/7003A

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小柴 貴明

平成21 (2009) 年 4月

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小柴 貴明

平成21 (2009) 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・坂口志文・芹川 忠夫・李 穎・小林 英司

参考資料1；肺移植術中写真

参考資料2；胸部レントゲングレード

参考資料3；ミニブタ肺移植急性拒絶の病理学的グレード

参考資料4；肝移植術中写真

参考資料5；CD4+CD25high+細胞の定義

参考資料6；Tregs のドナー抗原との培養

参考資料7；免疫寛容誘導プロトコル1

参考資料8；免疫寛容誘導プロトコル2

参考資料9；ミニブタ肝移植の成績

参考資料10；小腸移植後の内視鏡

参考資料11；FOXP3 の発現

参考資料12；CTLA4 の発現1

参考資料13；CTLA4 の発現2

参考資料14；Tregs の免疫抑制効果

参考資料15；制御性T細胞のドナー抗原特異的免疫抑制効果純度

参考資料16；エンドキサン投与による疎血再還流障害の悪化

参考資料17；実験群

参考資料18；エンドキサンの効果

参考資料19；グラフト生存

参考資料20；グラフト内各種遺伝子発現

### II. 分担研究報告

A, 臓器移植免疫寛容における制御性T細胞に関する研究 -----33

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

ドナー抗原に特異的な免疫制御

参考資料4；移植肝内のFoxp3 mRNA の発現

参考資料5；移植肝内の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

B, 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 -----43

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

C, 臨床臓器移植、免疫寛容 (tolerance) のメカニズムに関する研究	50
湊 長博	
参考資料1 ; 患者プロフィール	
参考資料2 ; 各遺伝子の mRNA の発現	
D, 肺移植後血再還流障害に関する研究	58
庄司 剛	
E, 肝局在免疫担当細胞の特殊性に基づいた免疫学的治療戦略に関する研究	61
大段 秀樹	
参考資料1 ; 図1	
参考資料2 ; 図2	
参考資料3 ; 図3	
参考資料4 ; 図4	
参考資料5 ; 図5	
参考資料6 ; 図6	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	75
IV. 研究成果の刊行物別刷	76

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・膵島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  
准教授

### 研究要旨

研究代表者らは、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 を産生し、再度レシピエントの体内に戻す細胞養子免疫療法を、臨床応用することを念頭に、前臨床モデルとして耐えるミニブタで同方法の安全性と有効性を確認するべくミニブタの各種臓器移植モデルを確立した。さらに、ミニブタにヒトやマウスの Tregs の counterpart が存在することを明確にし、ブタの末梢血から Tregs 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 Tregs の counterpart を作ることに成功した。各種臓器移植のなかでも最も激しい拒絶の起きるミニブタ肺移植モデルで Tregs の細胞養子免疫療法を施行したところ、レシピエントの体重 1kg あたり  $1 \times 10^6$  の Tregs の移入(術後 10 日)と、low dose のタクロリムスの併用で拒絶が著しく抑制された。また、免疫寛容の誘導された症例もあった(5 例中、1 例)。また、 $1 \times 10^6$  /kg の Tregs の移入により、重篤な副作用を認めなかった。

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

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

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. ミニブタで各種移植モデル(肺移植、肝移植、小腸移植)を確立する。2. ミニブタにヒトやマウスの制御性 T 細胞(Tregs)のカウンターパートが存在するかどうかを確認する。3. ミニブタ移植モデルで、Tregs 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 Tregs を試験管内で製造する。3. ドナー抗原特異的 Tregs を用いた細胞養子免疫療法の効果と安全性を最も激しい拒絶の起こるミニブタ肺移植モデルで確認する。

### B. 研究方法

1. 肺移植; MHC の異なる 2 系統のミニブタ (C2, C1) をドナー、レシピエントに用いて、同所生肺移植を行った。ドナーの左肺をグラフトに用いた。肺動脈にカニューレーションを行い、2L の冷 ETP Kyoto 液を用いて胸腔内でグラフトの還流を行った。一方、レシピエントの左肺を切除した。その間、グラフトは冷 ETP Kyoto 液に保存した。肺動脈、肺静脈、気管の吻合を行い、再還流した(参考資料 1; 肺移植術中写真)。術後、免疫抑制剤の不使用下に経過を観察した。経時的に胸部レントゲンを撮影し、陰影の程度により代表者らの考案したグレーディングに基づき評価をおこなった(参考資料 2; 胸部レントゲングレード)。レントゲンで完全に含気の無くなった段階(グレード 4)で開胸し、肉眼的にも完全に含気の無くなったことが確認できれば、生検を行い病理学的診断をおこなった。病理学的診

断は、アランのグレードに基づいて行われた(参考資料3; 拒絶の病理学的グレード)。

**肝移植;** 肺移植と同様の2系統のミニブタ(C2,C1)をドナー、レシピエントに用いて、同所性全肝移植を行った。ドナー手術では門脈からカニュレーションを行い、2Lの冷ETPKyoto液を用いて臍腔内でグラフトの還流を行った。冷凍血時では、グラフトは冷ETPKyoto液で保存した。レシピエントの手術では、無肝期には門脈と外頸静脈とのあいだにシャントを施した。ヒトの臓器移植の術式を模倣して、肝動脈-肝動脈吻合、門脈-門脈吻合、胆管-胆管吻合を行った(参考資料; 肝移植術中写真)。ETPKyoto液は再還流前にリンゲル液によるfinal rinseを行った。術後、免疫抑制剤の不使用下に血清のALT,ASTをSurrogateマーカーに拒絶のモニターリングを行った。血清のALT,ASTの上昇のある場合にはエコーガイド下に生検を行い、拒絶の診断をした。

**小腸移植;** 肺移植と同様の2系統のミニブタ(C2,C1)をドナー、レシピエントに用いて、同所性全小腸移植を行った。ドナー手術では腎門部下部の大動脈からカニュレーションを行い、上腸間膜動脈経由で全小腸の還流を行った。灌流液にはリンゲル液を使用した。グラフトの動脈は大動脈カフとし、静脈は肝門部の門脈をグラフトにつけて、harvestを行った。レシピエントの手術では、レシピエントの全小腸を切除したうえで、腎下部で大動脈カフと大動脈を吻合、門脈と下大静脈を吻合し、グラフト小腸を置換した。術後、拒絶の診断のために、小腸グラフトの近位端をストーマとした。

2 ミニブタの末梢血より CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> 細胞を細胞分離装置で分離し、その細胞分画の FOXP3mRNA (Tregs 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<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>細胞, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>細胞, CD8<sup>+</sup>細胞の FOXP3mRNA の発現と比較した。また、同様に Tregs 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<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> 細胞, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>細胞, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>細胞

CD8<sup>+</sup>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<sup>+</sup>レスポンド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。  
3. さらに、アフエレーシスの手技を用いて、レシピエントの末梢血から 1x10<sup>10</sup> 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 1x10<sup>8</sup> 個の Tregs の counterpart を分離して、ドナー抗原 (ドナー単核球) とともに 10 日間、高濃度の IL-2 (4ug/ml) とラパマイシン (100nM) の存在下に培養した。10 日の培養のうち、最初の 7 日間の済んだ段階で CD4 に対する抗体を用いて、磁気ビーズ法で、CD4<sup>+</sup> 細胞の純度を高めた (参考資料; Tregs のドナー抗原 との培養)。培養前の Tregs と培養後の Tregs とのドナー抗原に対する特異的免疫抑制効果は、Suppression assay を行い確認した。

4. その1. 移植の9日前にアフエレーシスを行いレシピエントの末梢血から 1x10<sup>10</sup>の単核球を単離、ドナー抗原と3の方法で培養した Tregs を 1x10<sup>6</sup>/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/day のエンドキサンを3日間ミニブタに投与して、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 (0.05mg/kg/day) のタクロリムス(TAC)をインフュージョンポンプにて持続投与した(参考資料; 免疫寛容誘導プロトコル 1)。血中タクロリムス濃度をモニターし、5ng-15ng/ml に保たれるように適宜、TAC の量を調節した。Window opportunity for immunological engagement (WOFIE) の論理に基づき、移植当日、術後1,2日の3日間、免疫抑制剤フリーの時期を設けた。

その2. 移植の2, 1日前にアフエレーシスを行いレシピエントの末梢血から 1x10<sup>10</sup>の単核球を単離、ドナー抗原と3の方法で培養した Tregs を 1x10<sup>6</sup>/kg、肺移植後の10日目に移入した。細胞移入の3日前から 7.5mg/kg/day のエンドキサンを3日間ミニブタに投与して、リンパ球減少を起こした後で、細胞移

入を行った。移植当日、移植後 1 日目には、10mg/kg のメチルプレドニゾロンを静脈内投与した。移植当日—移植後 6 日(7 日間)には high dose (0.15mg/kg/day)の TAC を持続投与した。この間の血中濃度は 35-50ng/ml を目標に TAC の量を適宜調節した。移植後 7 日—21 日には low dose (0.05mg/kg/day) の TAC を投与し、移植後 22 日以降、免疫抑制剤は完全に中止した (参考資料;免疫寛容誘導プロトコル 2)。また、 $1 \times 10^6$  /kg の Tregs を移入したときに、レシピエントに重篤な副作用 (graft versus host disease, サイトカインストーム)が生じないか注意深く観察した。移植後 10 日、14 日で生検を行い、Tregs 移入時の病理像、それから 4 日後の病理像を確認した。また、生検材料から total RNA を抽出して cDNA を合成、リアルタイム PCR にて FOXP3、パーフォリン、IP-10、Fas-L の発現を定量した。

### C. 研究結果

1. 肝移植; 冷疎血時間、温疎血時間はそれぞれ 90 分、90 分であった。移植後 9 日でレントゲングレードは 4 に達した。また、肉眼的にも完全な含気の消失を認めた。また、病理診断で拒絶が確定された(アランのグレード A4)。技術が安定した後の手術成功率は 100%であった。

肝移植; 冷疎血時間、温疎血時間はそれぞれ 60 分、30 分であった。シャントの設置にて、無肝期のレシピエント血圧の低下が予防された。移植後 1 日頃から血清の ALT,AST の上昇し拒絶が疑われた。生検にて、拒絶が確認された。技術が安定した後の手術成功率は 100%であった (参考資料;ミニブタ肝移植の成績)。手術合併症の主なものは肝動脈の血栓であった。

小腸移植; 冷疎血時間、温疎血時間はそれぞれ 60 分、60 分であった。術後、内視鏡をストーマから挿入してグラフト粘膜の状態を観察し、生検をおこなった (参考資料;小腸移植後の内視鏡)。術後、2 週間で組織上の拒絶を認めたがレシピエントは 1 か月に亘り生存した。

2. FOXP3 mRNA の発現は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> 細胞で、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> 細胞、CD4<sup>+</sup>CD25 細胞、CD8<sup>+</sup> 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答性であり、CD4<sup>+</sup>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; Tregs の免疫抑制効果)。

3 試験管内でのドナーアロ抗原との暴露により、Tregs 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; Tregs のドナー抗原特異的免疫抑制効果、純度)。参考資料に示すように、Suppression assay により、培養後の Tregs は 3rd party に対してより、ドナー抗原に対する CD4 の増殖を強く抑制した。末梢血から分離時の Tregs の純度は約 80% であったが、ラパマイシンの効果、培養途中の CD4 positive selection により、10 日間の培養後の Tregs の純度も約 80% に保たれた (参考資料; Tregs のドナー抗原特異的免疫抑制効果、純度)。また、培養後の Tregs の FOXP3 の発現も高く保たれた。

4. その 1 ; 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 (参考資料; エンドキサン投与による疎血再還流障害の悪化)。

その 2 ; 培養した Tregs と low dose の TAC を併用するグループ (Group-Tregs+TAC n=5) と、培養した Tregs のみ投与するグループ (Group-Tregs alone n=3)、low dose の TAC だけ投与するグループ (Group-TAC alone n=4)、培養した Tregs も low dose の TAC も使用しないグループ (Group-non Tregs, non TAC n=2) の 4 群間で移植肺の survival を比較した (参考資料; 実験群)。

4 群すべてで、アフエレーシス、high dose TAC(移植当日から移植後 6 日まで)、エンドキサンを施した。移植後 7, 8, 9 日のエンドキサンにより移植後 10 日にはリンパ球減少の nadir を示した(<1000)。各群間の移植後 10 日のリンパ球数に差を認めなかった(参考資料; エンドキサンの効果)。Group-Tregs+TAC と Group-Tregs alone の 2 群間で、移入した Tregs の細胞の数に差を認めなかった。病理学的検討により、Tregs を移入した時点で拒絶は認めなかった。その 4 日後には、Group-Tregs, TAC では拒絶は認めなかったが、それ以外のすべての群で拒絶を認めた。Group-non Tregs, non TAC では移植後 15.5 ± 1.5 日で拒絶された。Tregs のみ投与するグループ、low dose の TAC だけ投与するグループではともに肺移植の生存日数は延長されなかった(Group-Tregs 15.0 ± 1.0 日、Group-TAC 16.3 ± 0.8 日)(参考資料; グラフト生存)。しかし、Tregs と low dose のタクロリムスを併用するグループでは、移植肺の生存日数は著しく延長された(Group-Tregs+TAC; 51.0 ± 13.9)。この群では、5 例中、1 例に免疫寛容が誘導された(グラフト生存 100 日)。免疫寛容の誘導されたレシピエントの移植肺には病理学的に慢性拒絶の像を認めなかった。また、 $1 \times 10^6$  /kg の Tregs を移入したときに、レシピエントに重篤な副作用(graft versus host disease, サイトカインストーム)はみとめなかった。PCR でグラフト内の各種遺伝子発現を移植後 10 日、14 日で定量し、14 日の発現を 10 日の発現で割って比を出した。14 日の FOXP3 の発現を 10 日の FOXP3 の発現で割った値 FOXP3 POD14/FOXP3 POD10 は、グラフト生存日数に相関したが、その他の遺伝子(パーフォリン、Fas-L, IP10)については、14 日の発現を 10 日の発現で割った値とグラフト生存日数との間に相関を認めなかった。

**D. 考察** 1. これまで、わが国では展開の難しかったミニブタを用いて、各種移植モデルを確立した。今後、これらのモデルを用いて、前臨床レベルでの移植実験の展開が期待される。2. ミニブタの末梢血より分離された CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> 細胞は FOXP3 mRNA と細胞内 CTLA-4 を高発現するうえに、CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Tregs のカウンターパートであると考えられた。3. 試験管内でミニブタ Tregs に IL-2 の存在下、ドナー抗原(アロ抗原)を暴露させたところ、10 日間で、ドナー抗原に特異的な抑制活性を Tregs に獲得させることに成功した。この培養では、ラパマイシンを培養上清に添加することと、培養の 7 日目に CD4<sup>+</sup> の positive selection を行い、Tregs の純度を高めることが重要であると考えられた。4. その 1; ミニブタ肺移植モデルで Tregs の細胞養子免疫の効果を評価しようと試みたが、エンドキサンの疎血再還流障害への増大効果のせいで、エンドキサンを Tregs の移入の直前に投与しての、Tregs の養子免疫の効果を評価する事は不能であった。その 2; その 1 の結果を踏まえ、Tregs の移入を、移植後 10 日目にずらす(エンドキサンも術後 7, 8, 9 日に投与した。)と、エンドキサンの疎血再還流障害への増大効果はなく、Tregs の拒絶抑制効果は評価できた。 $1 \times 10^6$  /kg のドナー抗原特異的 Tregs の投与と、low dose のタクロリムスの併用で、各種臓器移植のなかでもっとも激しい拒絶の起こる肺移植の拒絶を著しく抑制した。また、1 例で免疫寛容(免疫抑制剤を中止しても拒絶の起さない状態)が誘導できた。移植グラフト内の FOXP3 の動きをみたところ、グラフト生存の延長するレシピエントのグラフトでは、Tregs の移入の 4 日後に、FOXP3 の発現は増加しており、FOXP3 の発現は増加の程度と、グラフト生存日数とは相関した。これらの結果から、代表者らは、移入した Tregs は、移入後速やかに、グラフトへ集積し、グラフトで拒絶からグラフトを守っているのではない

かとの仮説を立てるに至った。また、 $1 \times 10^6/\text{kg}$  のドナー抗原特異的 Tregs の投与では重篤な副作用(サイトカインストームやGVHD)は起こらず、この量の細胞移入は、安全であると考ええる。

### E. 結論

1. 前臨床モデルとして耐えるミニブタで各種臓器移植のモデルを確立した。
2. ミニブタにヒトやマウスの Tregs の counterpart が存在することがわかった。
3. ミニブタ Tregs をドナー抗原(アロ抗原)に試験管内で暴露させて、ドナー抗原に特異的な免疫制御活性を有する Tregs を獲得した。
4.  $1 \times 10^6$  ドナー抗原に特異的な免疫制御活性を有する Tregs の移入と low dose のタクロリムスの併用で、各種臓器移植のなかでもっとも激しい拒絶のおこる肺移植の拒絶を著しく抑制した。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1.Miyara M, Wing K, Sakaguchi S. Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3+ regulatory T cell activation and expansion. *J. Aller. Clin. Immunol.* 2009 Apr;123(4):749-55

2.Miyara, M., Shima, T., Kitoh, A., Yoshioka, Y., Niwa, A., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi T., Nomura, T., Wing, K., Ono, M., Amoura, Z., Guy Gorochoy, G., and Sakaguchi, S. Functional delineation and differentiation dynamics of FoxP3-expressing subpopulations of CD4+ T cells in humans. *Immunity.* 2009 Jun 19;30(6):763-5.

3.Nagahama, K., Fehervari, Z., Oida, T., Ogawa, O., and Sakaguchi, S. Differential control of alloantigen-specific regulatory

T cells and effector T cells by anti-CD4 and other agents in establishing transplantation tolerance. *Int. Immunol.* 2009 Apr;21(4):379-91.

5.李 穎、坂口志文、上本伸二、小柴貴明 臓器移植免疫寛容における制御性T細胞、アレルギー・免疫 2009 (in press)

6.Yoshitomi M, Koshiba T, Haga H, Li Y, Zhao X, Cheng D, Miyagawa A, Sakashita H, Tsuruyama T, Ueda M, Okamoto S, Wood K, Sakaguchi S, Manabe T, Tanaka K and Uemoto S. Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression following liver transplantation. *Transplantation* 87(4): 606-614 2009 .

7.Satoda N, Shoj T,Wu Y,Fujinaga T, Chen F , Aoyama A, Zhang JT, Takahashi A, Okamoto T,Matsumoto I, Sakai H ,Li Y, Zhao X, Manabe T, Kobayashi E,Sakaguchi S, Wada H, S Uemoto, J Tottori,Bando T, Date H and Koshiba T. Value of FOXP3 Expression in Peripheral Blood as Rejection Marker after Miniature Swine lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* ;27(12):1293-301.2008

8.Li Y, Zhao X, Cheng D , Haga H , Tsuruyama T ,Wood K,Sakaguchi S, Tanaka K ,Uemoto S and Koshiba T. The presence of FOXP3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients. *Transplantation* ;86(12):1837-43. 2008

9.小柴 貴明, 李穎, 吳 艷玲, 湊長博, 坂口志文, 上本伸二, ジャック・ピレンネ. 臨床臓器移植, 免疫寛容のメカニズムに迫る—制御性 T 細胞,  $\gamma$   $\delta$ T 細胞, PD-1—: 免疫寛容による拒絶反応の克服, 実験医学, ;26(5):199-203. 2008

10.Sakihama T, Sato T, Iwanari H, Kitamura T, Sakaguchi S, Kodama T, Hamakubo T. A simple detection method for low-affinity membrane protein interactions by baculoviral display. PLoS ONE. 2008;3(12):e4024.

11.Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. Science. 322:271-275, 2008.

12.Sharma, S., Dominguez, A. L., Manrique, S. Z., Cavallo, F., Sakaguchi, S., and Lustgarten, J. Systemic targeting of CpG-ODN to the tumor microenvironment with anti-neu-CpG hybrid molecule and T regulatory cell depletion induces memory responses in BALB-neuT tolerant mice. Cancer Res. 68:7530-7540, 2008.

13.Wakasa-Morimoto, C., Toyosaki-Maeda, T., Matsutani, T., Yoshida, R., Nakamura-Kikuoka, S., Maeda-Tanimura, M., Yoshitomi, H., Hirota, K., Hashimoto, H., Masaki, H., Fujii, F., Sakata, T., Tsuruta, Y., Suzuki, R., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. Arthritis and pneumonitis produced by the same T cell clones from mice with spontaneous autoimmune arthritis. Int. Immunol. 20:1331-1342.

14Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T., and Sakaguchi, S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 29:10113-10118, 2008.

15Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. Cell. 133: 775-787, 2008.

16Fehervari, Z. and Sakaguchi, S. T lymphocytes: Regulatory. Nature Encyclopedia of Life Sciences. Wiley Interscience, 2008. Available at [www.wels.net](http://www.wels.net).

17Sakaguchi, S. Regulatory T cells in the past and for the future. Eur. J. Immunol. 38:901-937, 2008.

Wakai, T., Tanaka, H., Yamanaka, K., Sugimura, S., Sasada, H., Kawahara, M., Kobayashi, E., Sato, E.: Induction of estrus in pubertal miniature gilts. *Animal reproduction sciences* 103: 193-198, 2008

Wakai, T., Sugimura, S., Yamanaka, K., Kawahara, M., Sasada, H., Tanaka, H., Ando, A., Kobayashi, E., Sato, E.: Production of Viable Cloned Miniature Pig Embryos Using Oocytes Derived from Domestic pig Ovaries. *Cloning Stem Cells* 10(2): 249-262, 2008

Yokoo, T., Fukui, A., Matsumoto, K., Ohashi, T., Sado, Y., Suzuki, H., Kawamura, T., Okabe, M., Hosoya, T., Kobayashi, E.: Generation of a Transplantable Erythropoietin-Producer Derived From Human Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation*. 85(11): 1654-1658, 2008

Sekine, H., Shimizu, T., Hobo, K., Sekiya, S., Yang, J., Yamato, M., Kurosawa, H., Kobayashi, E., Okano, T.: Endothelial Cell Coculture Within Tissue-Engineered Cardiomyocyte Sheets Enhances Neovascularization and Improves Cardiac Function of Ischemic Hearts. *Circulation*. 118(14) suppl 1: S145-152, 2008

Horie, M., Sekiya, I., Nakamura, T., Tanaka, H., Maekawa, K., Nakanishi, M., Muneta, T., Kobayashi, E.: In vivo pharmacokinetics of ketoprofen after patch application in the Mexican hairless pig. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* (submitted)

Inoue, H., Murakami, T., Ajiki, T., Hara, M., Hoshino, Y., Kobayashi, E.: Bioimaging assessment and effect of skin wound healing using bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells with the artificial dermis in diabetic rats. *Journal of Biomedical Optics* 13(6): 064036(1-10), 2008

Yokoo, T., Kawamura, T., Kobayashi, E.: Kidney organogenesis and regeneration: a new era in the treatment of chronic renal failure? *Clin Exp Nephrol*. 2008 Oct; 12(5): 326-331. Epub 2008 Jun 27.

Hara, M., Murakami, T., Kobayashi, E.: In vivo bioimaging using photogenic rats: Fate of injected bone marrow derived mesenchymal atromal cells. *Journal of Autoimmunity* 30(3): 163-171, 2008

Satoda, N., Shoji, T., Wu, Y., Fujinaga, T., Chen, F., Aoyama, A., Zhang, J, T., Takahashi, A., Okamoto, T., Matsumoto, I., Sakai, H, Z, Manabe, T., Kobayashi, E., Sakaguchi, S., Wada, H., Bando, T., Koshiba, T.: Value of FOXP3 mRNA in Peripheral Blood as Rejection Marker after Miniature Swine Lung Transplantation. *The journal of Heart and Lung Transplantation (JHLT)*, 2008 27(2) suppl 1, S178-179, 2008

Yokoo, T., Kawamura, T., Kobayashi, E.: Stem cells for Kidney repair: useful tool for acute renal failure? *Kidney Int*. 2008 Oct; 74(7): 847-849

Tanaka, H., Yasuda, Y., Lefor, A., Kobayashi, E.: The feasibility of an animal laboratory for teaching surgical techniques to medical students: Teaching in a non-clinical environment. *医学教育* 2008, 39(5): 299-303

Murakami, T., Sato, A., Chun, N, A, L, Hara, M., Naito, Y., Kobayashi, Y., Kano, Y., Ohtsuki, M., Furukawa, Y., Kobayashi, E.: Transcriptional Modulation Using HDACi Depsipeptide Promotes Immune Cell-Mediated Tumor Destruction of Murine B16 Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*. 128: 1506-1516, 2008

## 2.学会発表

Kai, K., Teraoka, S., Adachi, Y., Ikehara, S., Murakami, T., Kobayashi, E.: In vivo cell kinetics of bone marrow transplantation using dual colored transgenic rat system. SPIE poster session 21-22 January 2008 san jose, California, USA (Proc. of SPIE 6868: 68680R-1-68680R-9, 2008)

Horie, M., Sekiya, I., Muneta, T., Murakami, T., Kobayashi, E.: Establishment of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and synovium of transgenic rats expressing dual reporter genes. SPIE poster session 21-22 January 2008 san jose, California, USA (Proc. of SPIE 6868: 68680V-1-68680V-8, 2008)

Satoda, N., Shoji, T., Yanling, W., Fujinaga, T., Chen, F., Aoyama, A., Zhang, T.J., Takahashi, A., Okamoto, T., Matsumoto, I., Sakai, H., Ying, L., Xiangdong, Z., Manabe, T., Kobayashi, E., Sakaguchi, S., Wada, H., Uemoto, S., Tottori, J., Bando, T., Date, H., Koshiba, T.: Paradoxical Up-Regulation of FOXP3 mRNA in the Peripheral Blood after Miniature Swine Lung Transplantation. American Transplant Congress 2008 Poster Board#-Session: P11- II. (抄録集 p 412) May.30-Jun.3, 2008 Canada

Kikuchi, T., Hotta, J., Murakami, T., Kobayashi, E.: A Novel Visualization System of Organ/Tissue ATP Levels Using Luciferase Transgenic Rats. American Transplant Congress 2008 Poster Board#-Session: P56- III. (抄録集 p 501) May.30-Jun.3 Canada

Hata, T., Hishikawa, S., Konno, K., Uemoto, S., Kobayashi, E.: A Novel Technique of Portocaval Shunt Using Partial Intestinal Graft and Possible Application for the Scaffold of Regenerative Liver. American Transplant Congress 2008 Poster Board#-Session: P276- III. (抄録集 p 559) May.30-Jun.3 Canada

Hata, T., Uemoto, S., Kobayashi, E.: Transplantation of Chimeric Liver with Autologous Hepatocyte and Xenobiotic Scaffold in Mouse and Rat Combination. American Transplant Congress 2008 Poster Board#-Session: P283- III. (抄録集 p 561) May.30-Jun.3 Canada

Yokoo, T., Fukui, A., Matsumoto, K., Hosoya, T., Kobayashi, E.: Application of Non-Viral GDNF Diffusion for Development of Chimeric Rat Kidney with Human Components. American Transplant Congress 2008 Poster Board#-Session: P285- III. (抄録集 p 561) May.30-Jun.3 Canada

齋藤敏之、藤原青悦、今野兼次郎、小林英司、明間立雄、笹森士一郎、山口峻司：無線を用いたブタの神経活動記録—有線との比較。Telemetry system for recording of pig neuronal activities-comparison with the cable system. P1-P01 Poster Sessions 第31回日本神経科学大会 2008年7月9日 東京国際フォーラム

小林英司：簡便な無期臓器ブタモデルの作成法とその応用。日本外科代謝栄養学会第45回学術集会 口演 2008年7月11日 仙台国際センター (外科と代謝・栄養 p34)

Hata, T., Uemoto, S., Kobayashi, E.: Tissue engineering using partial intestinal graft as a possible scaffold for liver regeneration in pigs. The Transplantation Society. 10-14 August 2008 Sydney AUSTRALLA (Supplement to Transplantation July 27,2008(86) 2S p12)

Satoda, N., shoji, T., Wu, Y., Fujinaga, T., Chen, F., Bando, T., Date, H., Kobayashi, E., Uemoto, S., Koshiha, T.: Value of FOX3 mrna in peripheral blood as rejection marker after miniature swine lung transplantation. The Transplantation Society. 10-14 August 2008 Sydney AUSTRALLA (Supplement to Transplantation July 27,2008(86) 2S p113)

Kai, K., Teraoka, S., Yokoo, T., Murakami, T., Kobayashi, E.: Development of renal components from rat mesenchymal stem cells using a mouse xenobiotic scaffold. The Transplantation Society. 10-14 August 2008 Sydney AUSTRALLA (Supplement to Transplantation July 27,2008(86) 2S p628)

Kobayashi, E.: Engineered Rats for Experimental Microsurgery. The 9th Congress of the International Society for Experimental Microsurgery (第九回国際実験顕微外科大会) Oct.30-Nov.2,2008 Shanghai China

Iwasaki, J., Hata, T., Hishikawa, S., Uemoto, S., Kobayashi, E.: Non-invasive bioimaging of developing fetal pancreas in the rat segmental intestine. The 9th Congress of the International Society for Experimental Microsurgery (第九回国際実験顕微外科大会) Oct.30-Nov.2,2008 Shanghai China

Hata, T., Iwasaki, J., Hishikawa, S., Uemoto, S., Kobayashi, E.: Microsurgical technique of Portocaval Shunt using Segmental Intestinal Graft in Rats. The 9th Congress of the International Society for Experimental Microsurgery (第九回国際実験顕微外科大会) Oct.30-Nov.2,2008 Shanghai China

Hishikawa, S., Kobayashi, E., Ysauda, K., Kawarazaki, H.: Double hepatic artery anastomoses in living donor liver transplantation. The 9th Congress of the International Society for Experimental Microsurgery (第九回国際実験顕微外科大会) Oct.30-Nov.2,2008 Shanghai China

菊地健志、根岸幸司、松木大作、堀田淳、村上孝、小林英司： Luciferase Transgenic ラットを用いたスクリーニング法—心臓チップ保存における ATP 残存量と primary non-function との関係— 第35回日本臓器保存生物医学会定期学術集会 2008年11月22日 東京 (Organ Biology 15(3) 260, 2008)

根岸幸司、松木大作、菊地健志、堀田淳、村上孝、小林英司： Luciferase Transgenic ラットを用いたスクリーニング法—分譲草島の保存検討— 第35回日本臓器保存生物医学会定期学術集会 2008年11月22日 東京 (Organ Biology 15(3) 266, 2008)

堀田淳、菊地健志、小林英司： Luciferase Transgenic ラットを用いたスクリーニング法—腎臓チップを用いた臓器保存液の保存効果評価— 第35回日本臓器保存生物医学会定期学術集会 2008年11月23日 東京 (Organ Biology 15(3) 278, 2008)

菊地健志、根岸幸司、松木大作、堀田淳、村上孝、小林英司： Luciferase Transgenic ラットを用いたスクリーニング法—肝保存における ETP Kyoto 液への cAMP 添加による効果— 第35回日本臓器保存生物医学会定期学術集会 2008年11月23日 東京 (Organ Biology 15(3) 279, 2008)

松木大作、根岸幸司、菊地健志、堀田淳、村上孝、小林英司： Luciferase Transgenic ラットを用いたスクリーニング法—UW 液を用いた小腸保存における条件の検討— 第35回日本臓器保存生物医学会定期学術集会 2008年11月23日 東京 (Organ Biology 15(3) 280, 2008)

小林英司： ミニ豚における制御性 T 細胞と臓器移植 第108回日本外科学会定期学術集会 ランチョンセミナー 司会 2008年5月17日 長崎 (抄録集 p79)

小林英司： 移植領域における免疫抑制剤の最前線—異種スカルフォードを利用した臓器発生法と免疫制御法— 第26回日本肝移植研究会 サテライトシンポジウム 2008年6月19日 パシフィコ横浜 会議センター

畑 俊行、岩崎純治、堀 智英、秦浩一郎、上本伸二、小林英司： 肝硬変に対する肝機能をもつシャント・グラフトの開発(第一報)。第26回日本肝移植研究会 2008年6月19～20日 パシフィコ横浜 (抄録集 p104)

村田聡一郎、久倉勝治、福永 潔、アンドリーミロノヴィッチ、齋藤敏之、安江 博、今野兼次郎、小林英司、大河内信弘： プタ過大肝切除モデルにおける血小板/TPOの肝保護作用。第4回広島臓器プロジェクト研究センター シンポジウム 2008年7月11日 広島大学廣 被仁会館

小林英司: CPCF Research Grant 2008 受賞者からの研究内容発表 司会 CPCF2008 (Ciclosporin Pharmaco-Clinical Forum) 2008年8月2日 名古屋

小林英司: 移植・再生医療における、最近の話題と新たなる展開 第2回移植医療のための次世代テクノロジー交流会 司会 インTRODクシオン 第44回日本移植学会総会 2008年9月19日 大阪国際会議場 (移植P14)

小林英司: 明日の医療を担うものこそ移植医療を考えよう! U-Talk企画 司会 第44回日本移植学会総会 2008年9月20日 大阪国際会議場 (移植P16)

小林英司: 挑戦! 一移植可能な臓器を作るー 司会 第44回日本移植学会総会 2008年9月20日 大阪国際会議場 (移植P50)

畑俊行、岩崎純台、上本伸二、菱川修司、小林英司: 移植可能な肝臓作成を目指して、第44回日本移植学会総会 シンポジウム 2008年9月20日 大阪国際会議場 (移植P193)

横尾隆、小林英司: 腎臓を作ろう、第44回日本移植学会総会 シンポジウム 2008年9月20日 大阪国際会議場 (移植P192)

小林英司: 臓器移植における新しい免疫制御法 座長 第36回日本臨床免疫学会ワークショップ 2008年10月17日 東京 (日本臨床免疫学会誌 P216、P268-270)

小林英司: 発生学を利用した臓器作り 特別講演 第6回北関東甲信越肝移植談話会 2008年10月18日 東京

小林英司: イスタンブール宣言の背景 第6回臓器移植法研究会 2008年10月19日 東京

小林英司: 日本における腎移植と再生の現状 日本大学 大学院特別講義 2008年10月20日 神奈川

小林英司: Stealing project for renal regeneration therapy. The 5th Nikko International Symposium 2008 2008年10月25日 JMU Information and In-service Training Center

小林英司: 消化器外科における再生医療の未来(肝臓) 日本臨床外科学会総会 シンポジウム 2008年11月28日 東京ホテルニューオオタニ (日本臨床外科学会雑誌p55, 296)

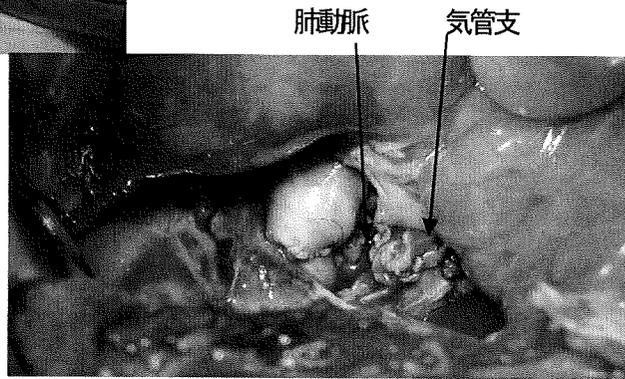
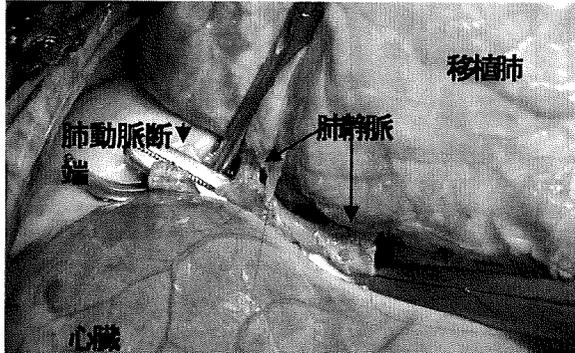
小林英司: 臓器保存液開発における画期的システム-Liciferase Transgenic ラットを用いたスクリーニング法ー シンポジウム「臓器移植関連の生体イメージング」第35回日本臓器保存生物医学会定期学術集会 2008年11月23日 東京 (Organ Biology 15(3) 207, 245, 2008)

村上孝、小林英司: ラット生体内イメージングがもたらす臓器移植研究の進歩 シンポジウム「臓器移植関連の生体イメージング」第35回日本臓器保存生物医学会定期学術集会 2008年11月23日 東京 (Organ Biology 15(3) 248, 2008)

小林英司： 再生医療 2 座長 第 35 回日本  
臓器保存生物医学会定期学術集会 2008 年 11  
月 23 日 東京 (Organ Biology 15(3) 207,  
2008)

小林英司： 学術委員会企画シンポジウム「臓  
器移植関連の生体イメージング」 座長 第  
35 回日本臓器保存生物医学会定期学術集会  
2008 年 11 月 23 日 東京 (Organ Biology  
15(3) 207, 2008)

## 肺移植術中写真



レシピエント手術の脈管の吻合を上に表示。

## 胸部レントゲングレード

<b>GRADE 0:</b>	No infiltrates
<b>GRADE 1:</b>	Bronchovascular shadow alone
<b>GRADE 2:</b>	Bronchovascular shadow with the small lung area of aeration loss
<b>GRADE 3:</b>	Large aeration loss in most part of the graft. Aeration remains in small part
<b>GRADE 4:</b>	Total loss of aeration

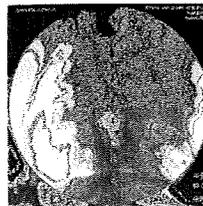
(Satoda N, et al. JHLT 2008;27:1293-1301)



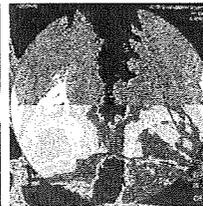
Lung field for  
evaluation



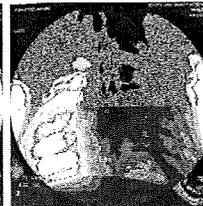
Grade 1



Grade 2



Grade 3



Grade 4



里田らの、肺移植後胸部写真の分類を示す。

## 拒絶の病理学的グレード

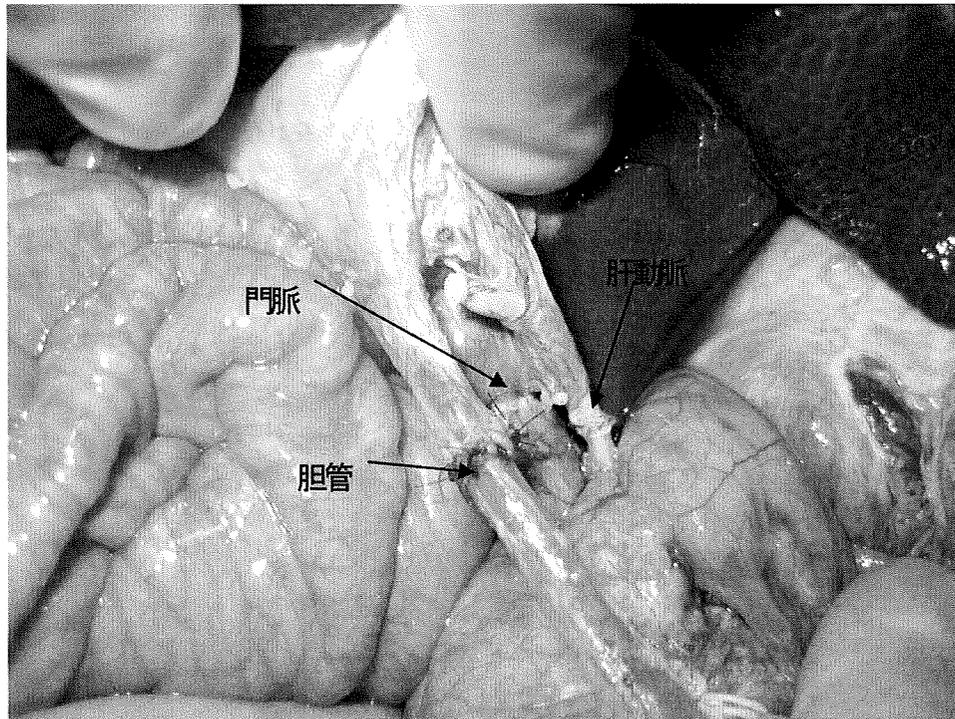
Table Grading of acute interstitial rejection in porcine lung allografts

Grade	Histology
0	No interstitial infiltrate, hemorrhage, or necrosis
1	Minimal; scattered infrequent perivascular mononuclear infiltrates (not obvious at *40)
2	Mild; frequent perivascular mononuclear infiltrates (easily seen at *40)
3	Moderate; dense mononuclear cuffing with expansion into alveolar septa; endothelialitis
4	Severe; as above with necrosis and hemorrhage

Allan JS, Wain JC, Schwarze ML, et al. Modeling chronic lung allograft rejection in miniature swine. *Transplantation*. 2002 Feb 15; 73(3):447-53

アランのミニブタ肺移植、急性拒絶の分類

## 肝移植術中写真



ミニブタ肝移植、レシピエントにおける関門部、臨床の全肝移植を模倣して、胆管胆管吻合、肝動脈肝動脈吻合を行っている。