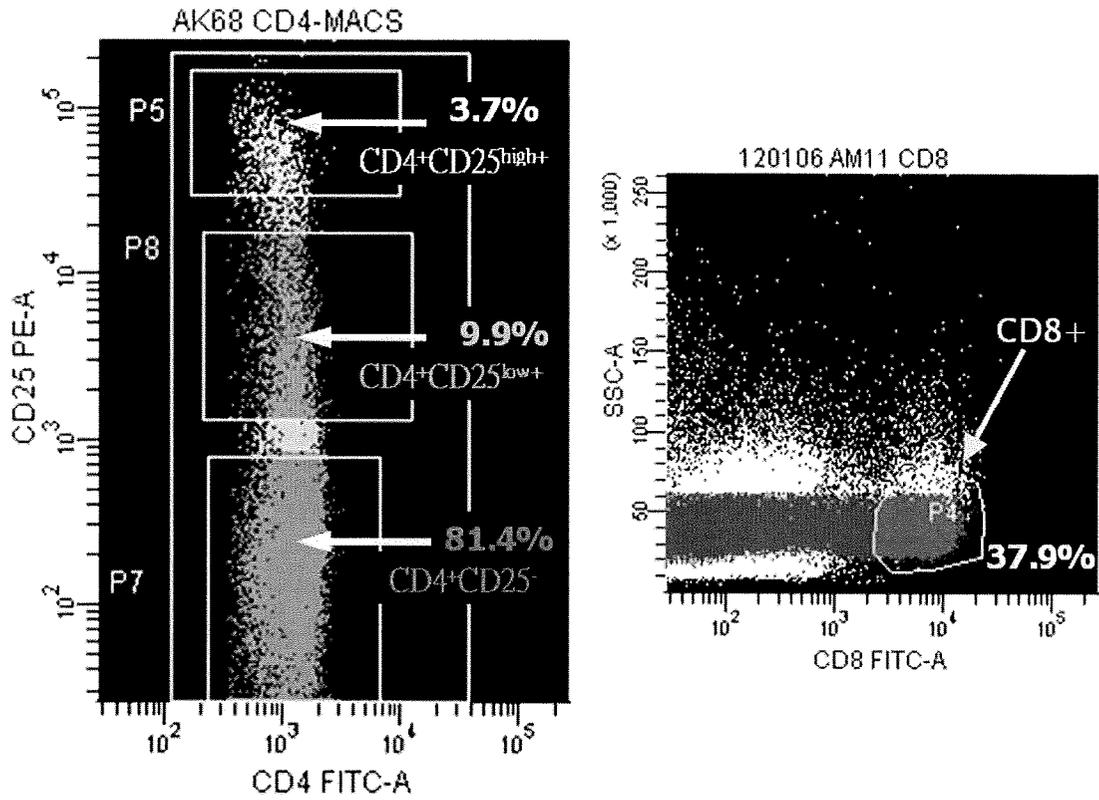


CD4+CD25^{high+}Tregs細胞の定義

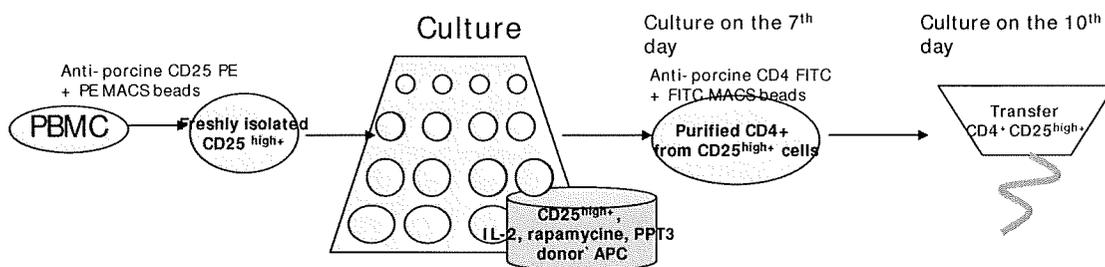


代表的な、CD4CD25染色、CD8染色を示す。

FACS ドットアナリシスでの CD4+CD25^{high+}, CD4+CD25^{low+}, CD4+CD25⁻, CD8⁺ の定義を示す。

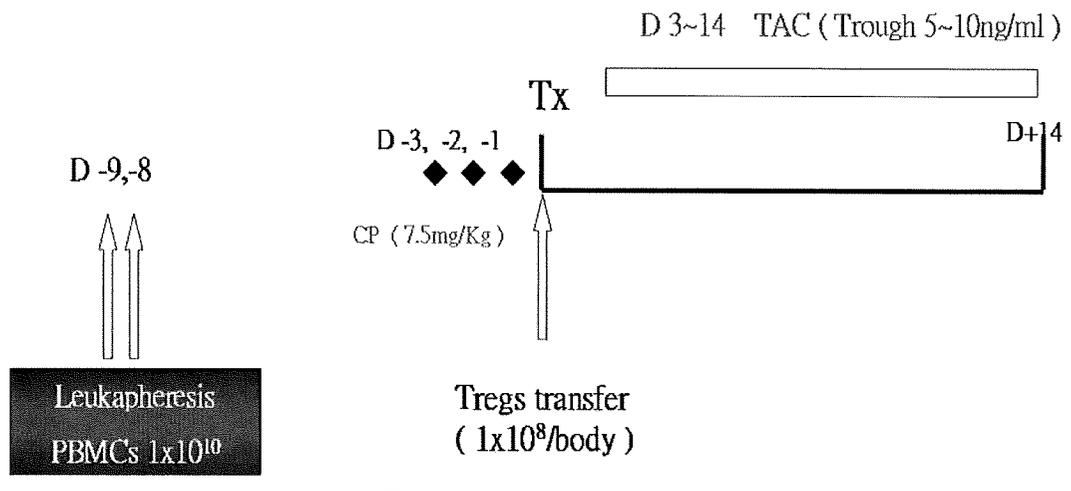
Tregs のドナー抗原との培養

- Isolated CD25^{high+} cells from PBMC cells
 - ✓ (MACS Beads)
- Co- Culture CD25^{high+} cells with:
 - human recombinant IL- 2 (4ug/ ml) rapamycin (100nM) anti- porcine CD3e(PPT3, 5ug/ ml) donor's APC (irradiated donor's PBMC) in full RPMI medium
- After 7 days culture, CD4⁺ cells were purified from cultured CD25^{high+} cells
 - ✓ (MACS Beads)
- On 10th day, purified CD4⁺CD25^{high+} cells were transferred to the recipient pig



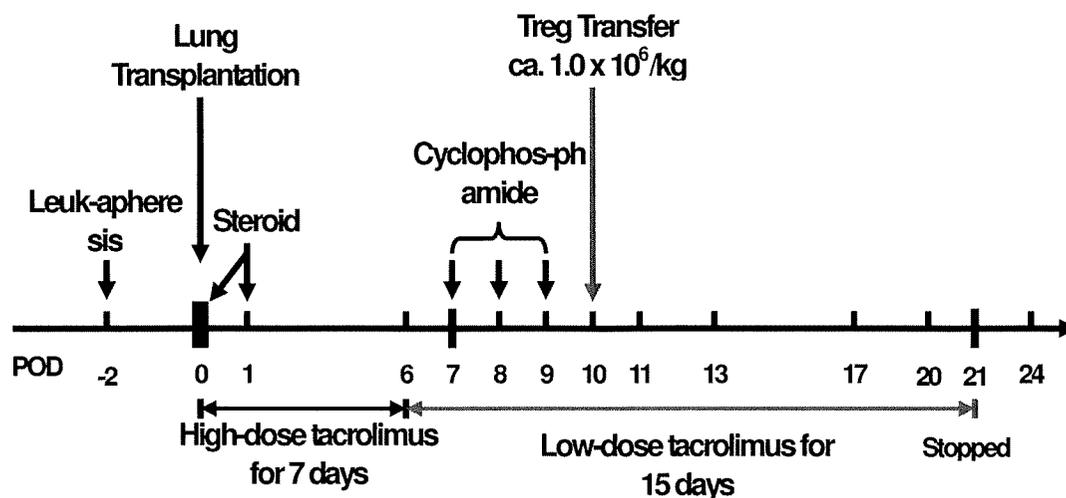
ミニブタ末梢血から分離した CD4⁺CD25^{high+} 細胞のドナー抗原との培養の過程を示す。

免疫寛容誘導プロトコール



CP ; サイクロフォスファミド
TAC; タクロリムス

免疫寛容誘導プロトコル2



ミニブタ肝移植の成績

Date	ID	CIT (min)	WIT (min)	IS	Survival	Death Reason
8/22	BL73	55	31	-	31	GI bleeding
8/28	BL72	54	32	-	10	Artery thrombosis
9/24	BN56	55	28	-	34	Rejection
9/26	BM36		43	-	65	GI bleeding
11/11	BO35	58	49	Low dose	99	Sacrificed
12/2	BO37	49	34	Low dose	119	Sacrificed
12/19	BP81	65	42	Low dose	13	Artery thrombosis
1/29	BO44	171	51	Low dose	1	PNF
2/6	BN64	65	34	Low dose	76	Rejection

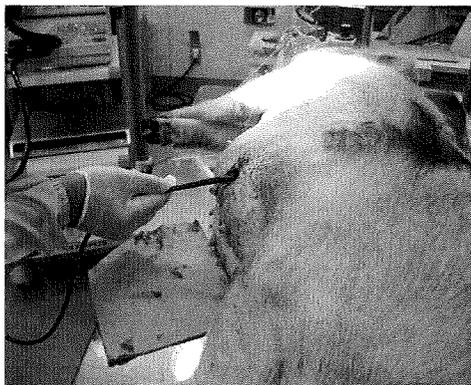
The one-week survival rate: 89%(8/9).

IS: immunosuppressant

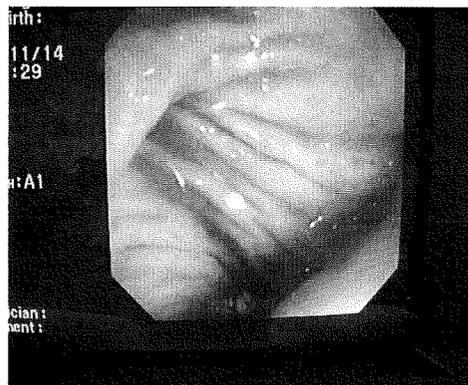
小腸移植後の内視鏡



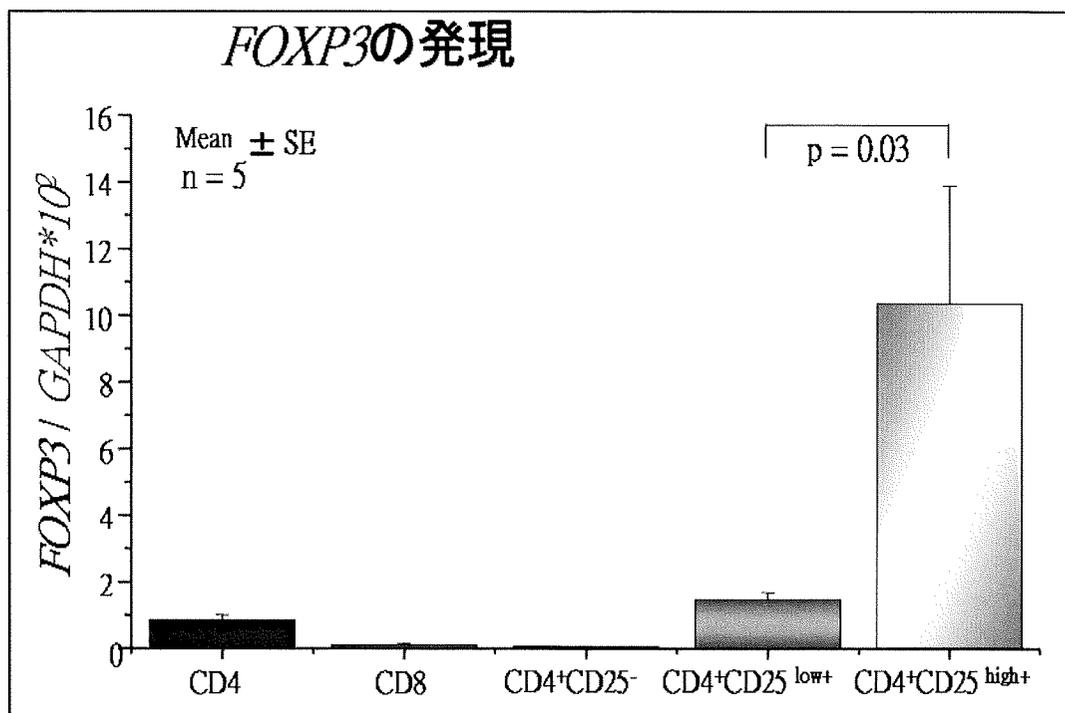
術中写真



ストーマからの内視鏡の挿入

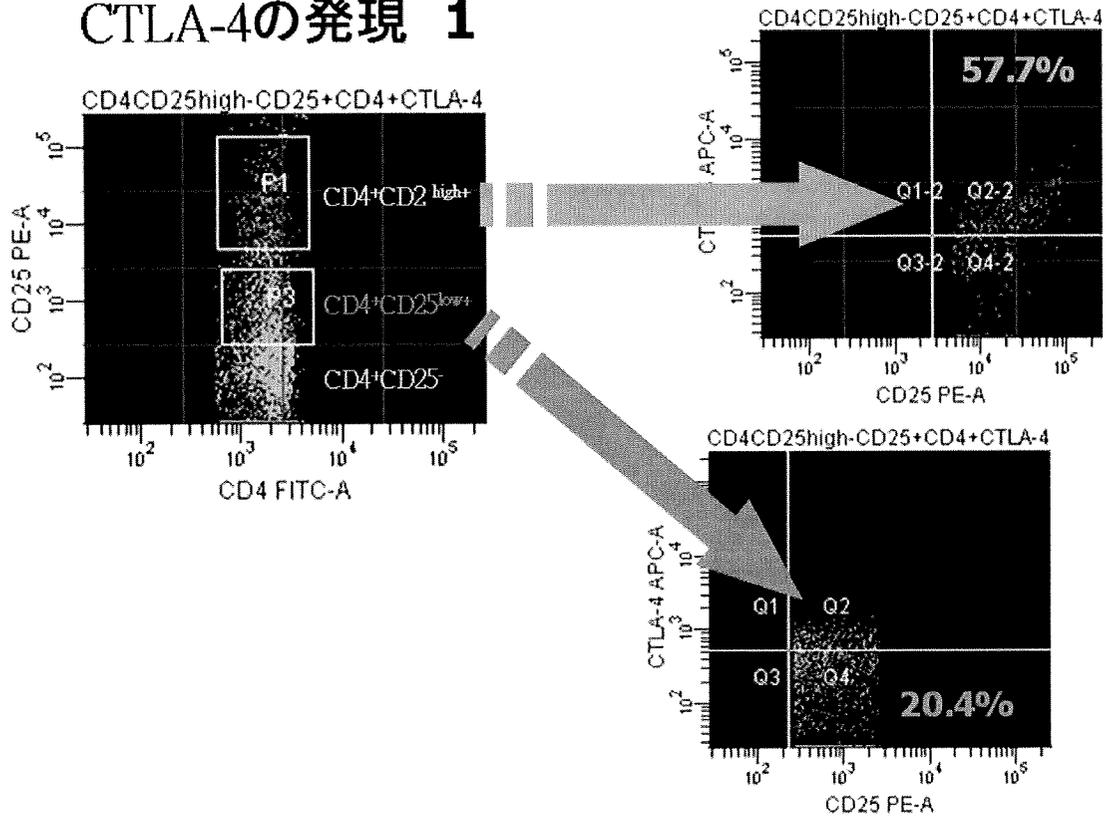


グラフト粘膜の観察

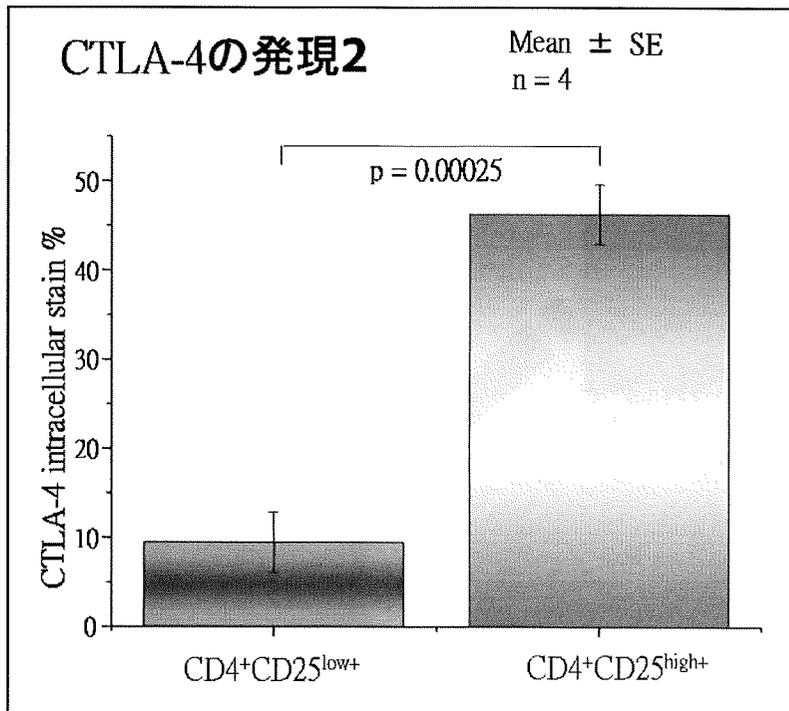


各分画 (CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25⁻, CD4⁺CD25^{low+}, CD4⁺CD25^{high+}) の *FOXP3* mRNA の発現を示す。他の分画と比較して CD4⁺CD25^{high+} で有意に高い *FOXP3* mRNA の発現を認める。

CTLA-4の発現 1

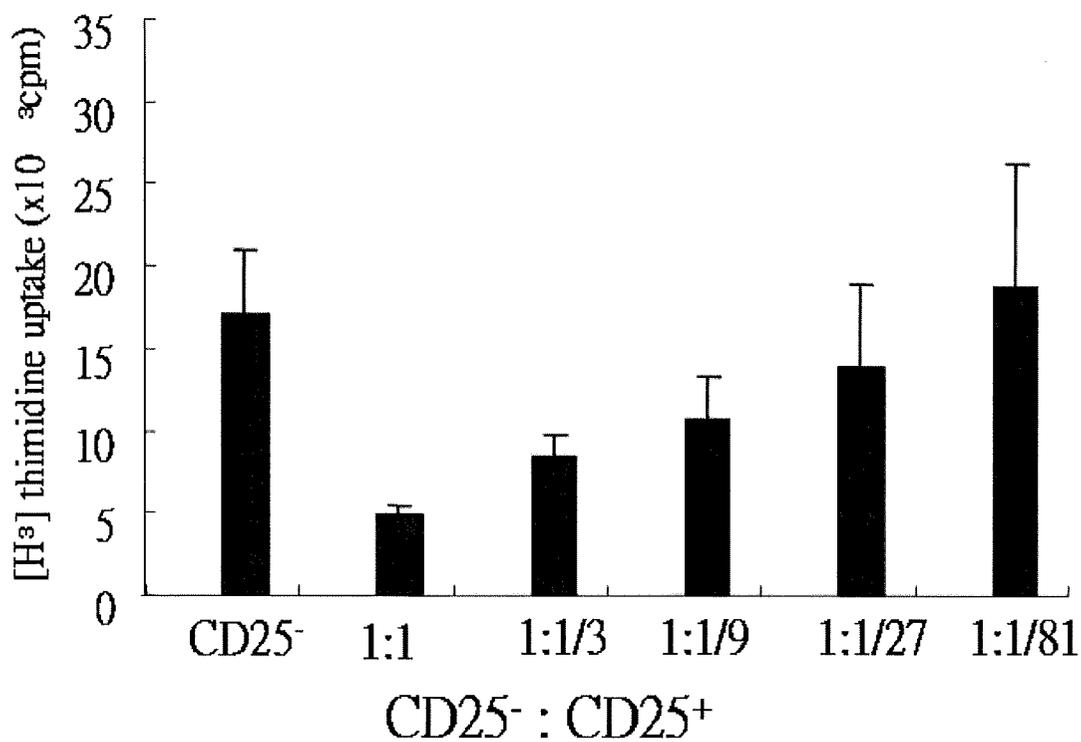


CD4⁺CD25^{high+}, CD4⁺CD25^{low+} の細胞内 CTLA-4 の発現を示す(代表例)。



細胞内CTLA-4 の 発現は、CD4+CD25^{low+} 細胞に比べ、CD4+CD25^{high+} 細胞で有意に高かった。

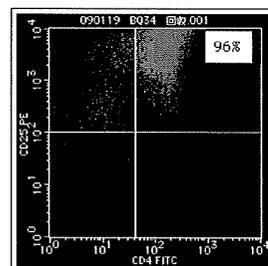
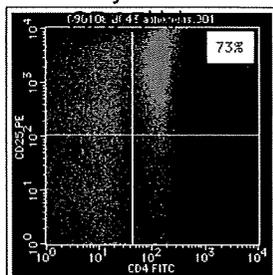
制御性T細胞の免疫抑制効果



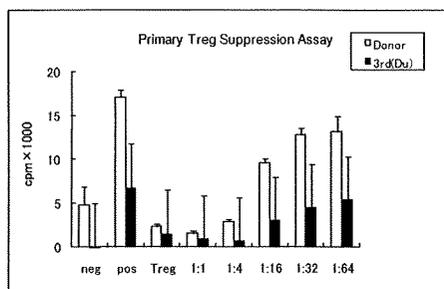
CD4⁺CD25⁺ 細胞 は CD4⁺CD25⁻ 細胞のアロ抗原に対する増殖を用量依存的に抑制する。

制御性T細胞のドナー抗原特異的免疫抑制効果、純度

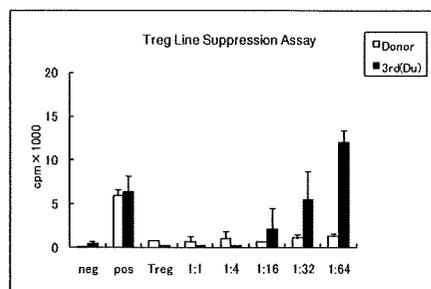
Freshly isolated



Primary Treg Function



Treg Line Suppression Assay



末梢血から分離時の CD4⁺CD25^{high} 細胞の純度、培養後の純度を示す (上)。

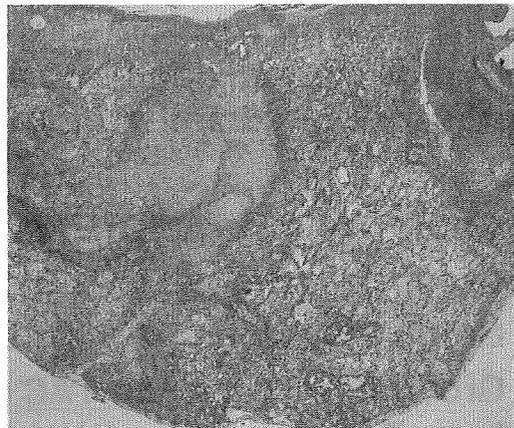
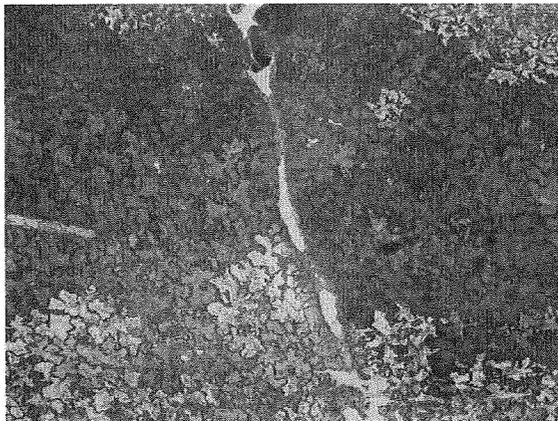
末梢血から分離時の CD4⁺CD25^{high} 細胞、培養後の CD4⁺CD25^{high} 細胞の

CD4⁺ 細胞のアロ抗原に対する増殖の抑制効果を示す。培養により、ドナー抗原特異的抑制

効果

を獲得する (下)。

エンドキサン投与による疎血再 還流障害の悪化



エンドキサンを術前3,2,1日に投与した場合の肺切除直後の阻血再灌流障害。術後7日での生検像を示す。単核球の浸潤がないにもかかわらず、はげしい出血、浮腫、壊死を認める。

実験群

In all groups, leukapheresis and the administration of steroid, high-dose tacrolimus (TAC) and cyclophosphamide (CP) were performed

All pigs were divided into 4 groups according to the presence of administration of Tregs or low-dose Tac

Group Tregs+ TAC (n = 5): Tregs and low-dose Tac

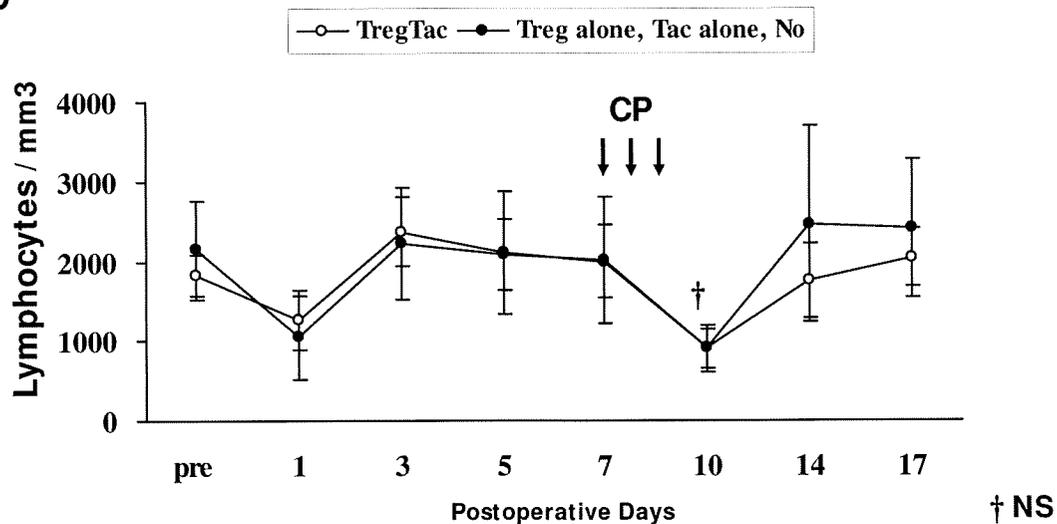
Group Tregs alone (n = 3): Tregs alone

Group TAC alone (n = 4): Low-dose TAC alone

Group non Tregs,non TAC (n = 2):Neither Tregs nor low-dose TAC

エンドキサンの効果

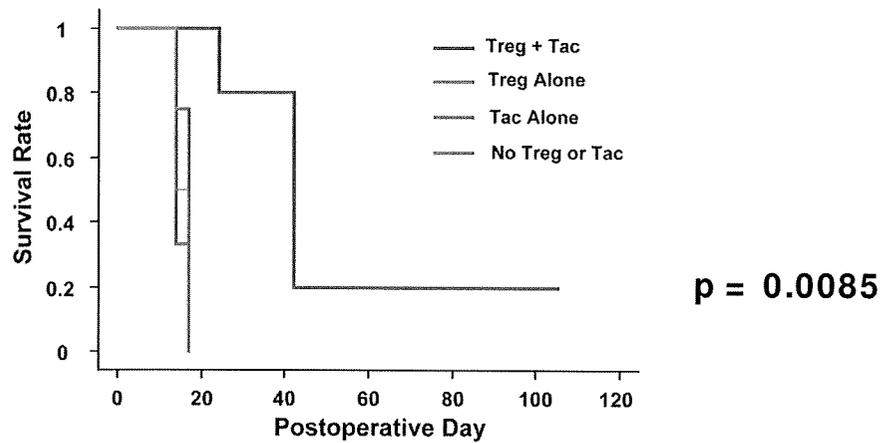
◆CP were administered on postoperative day 7, 8, and 9



術後、7,8,9日にエンドキサンを投与すると Tregs 移入時の術後10日でリン球の nadir を認める。

Group-Tregs+TAC とその他の Group とで、術後10日でリン球の数に差を認めない。

グラフト生存



Treg + Tac Group (n = 5): 51.0 ±13.9 days

Treg Alone (n = 3): 15.0 ±1.0 days

Tac Alone (n = 4): 16.3 ±0.8 days

No Treg or Tac (n = 2): 15.5 ±1.5 days

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 肝臓学・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の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でき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型肝硬変である。ガンマグロブリンなど特効薬のない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型肝硬変で移植を受けた患者で仮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（小児の肝移植患者の総計およ

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[—]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康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[—]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[—]細胞のMLRはCD4+CD25[—]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[—]細胞のMLRはCD4+CD25[—]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[—]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

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、移植前に急性、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、移植肝内の制御性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肝でも、免疫寛容の移植肝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肝、免疫抑制剤内服中(減量前)の患者の移植肝の門脈域に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)。慢性拒絶の移植肝では門脈域に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+はわずかに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肝にはCD4+FOXP3+制御性T細胞が存在して、拒絶から移植肝を守っているのではないかと仮説が成り立つ。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は拒絶の移植肝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、免疫寛容の移植肝にも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な検討を要する。

ロッテルダムの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肝内の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、慢性拒絶の移植肝には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、慢性拒絶の移植肝内の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、慢性拒絶の移植肝において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

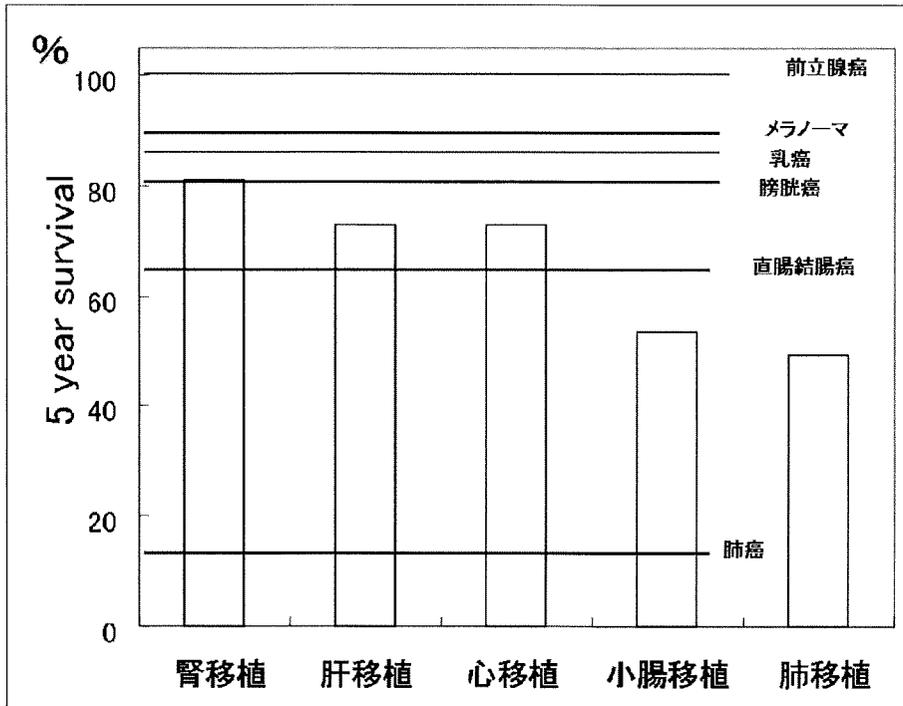
1. 論文発表

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.

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)