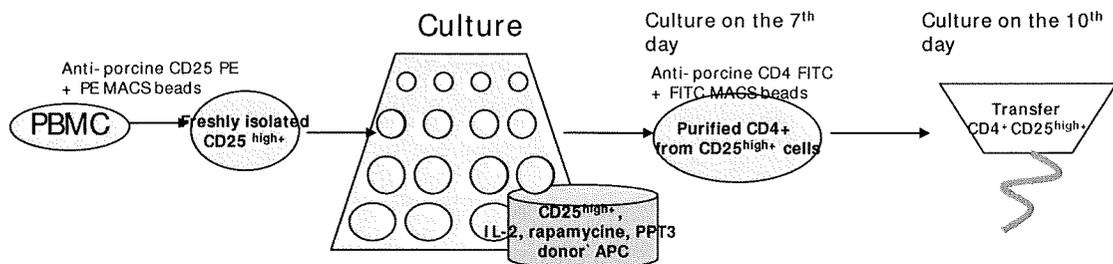


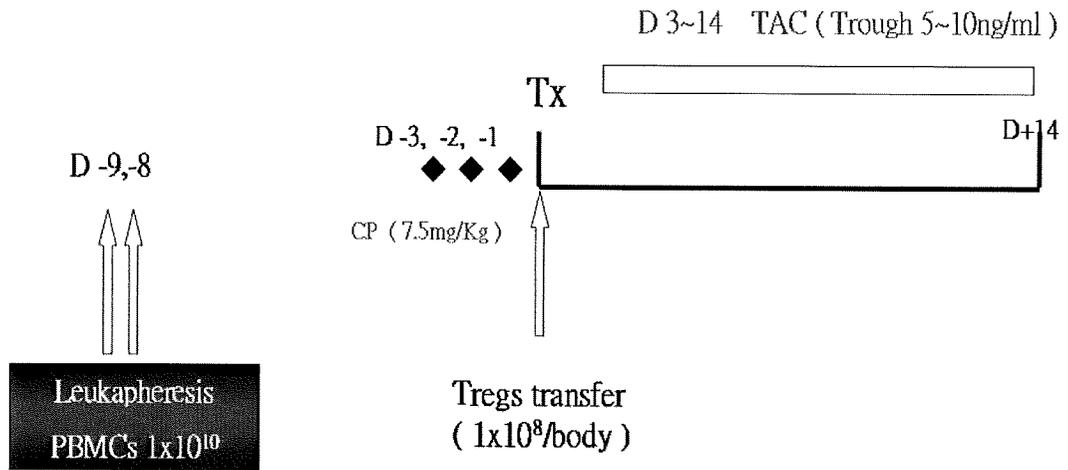
Tregs のドナー抗原との培養

- 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



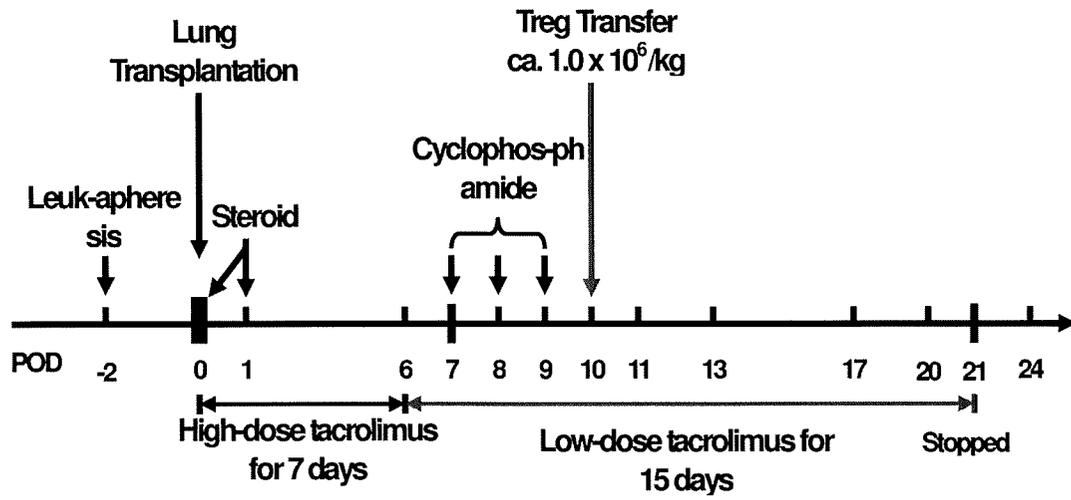
ミニブタ末梢血から分離した CD4⁺CD25^{high+} 細胞のドナー抗原との培養の過程を示す。

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

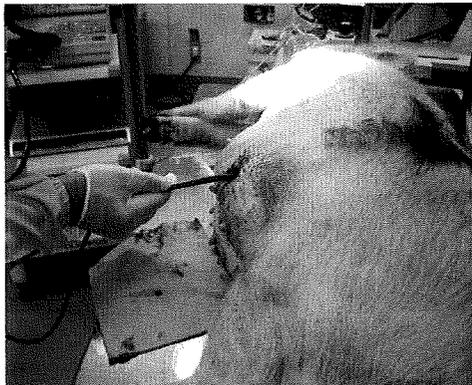
The one-week survival rate: 89%(8/9).

IS: immunosuppressant

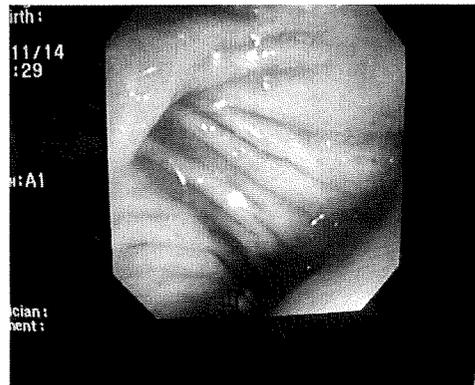
小腸移植後の内視鏡



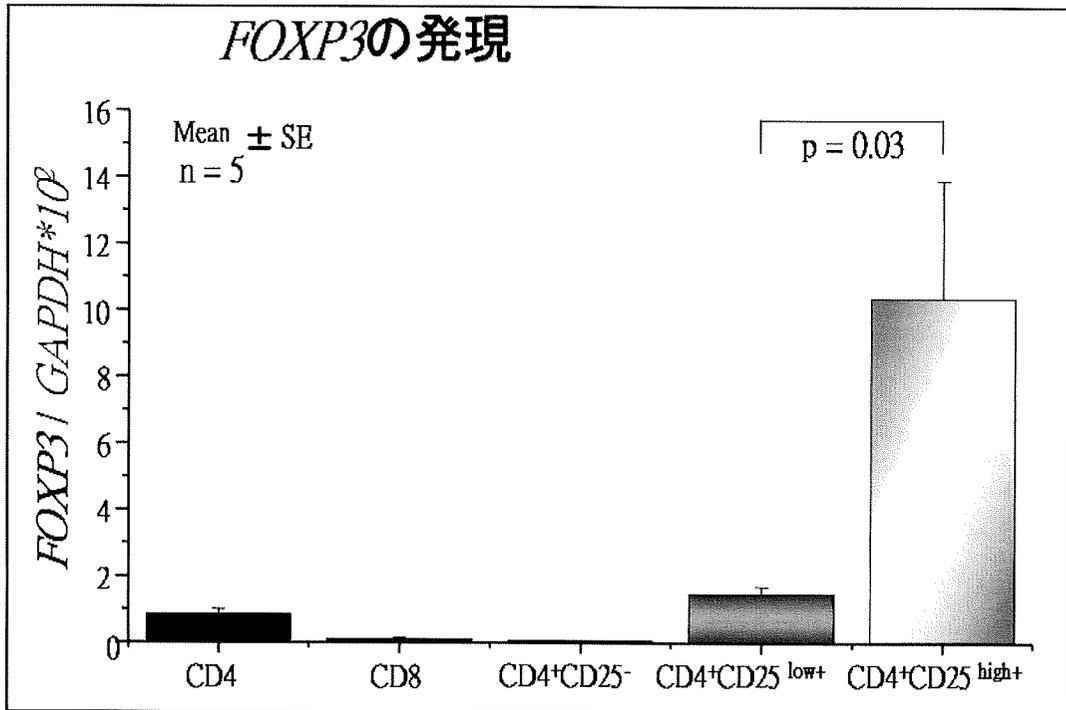
術中写真



ストーマからの内視鏡の挿入

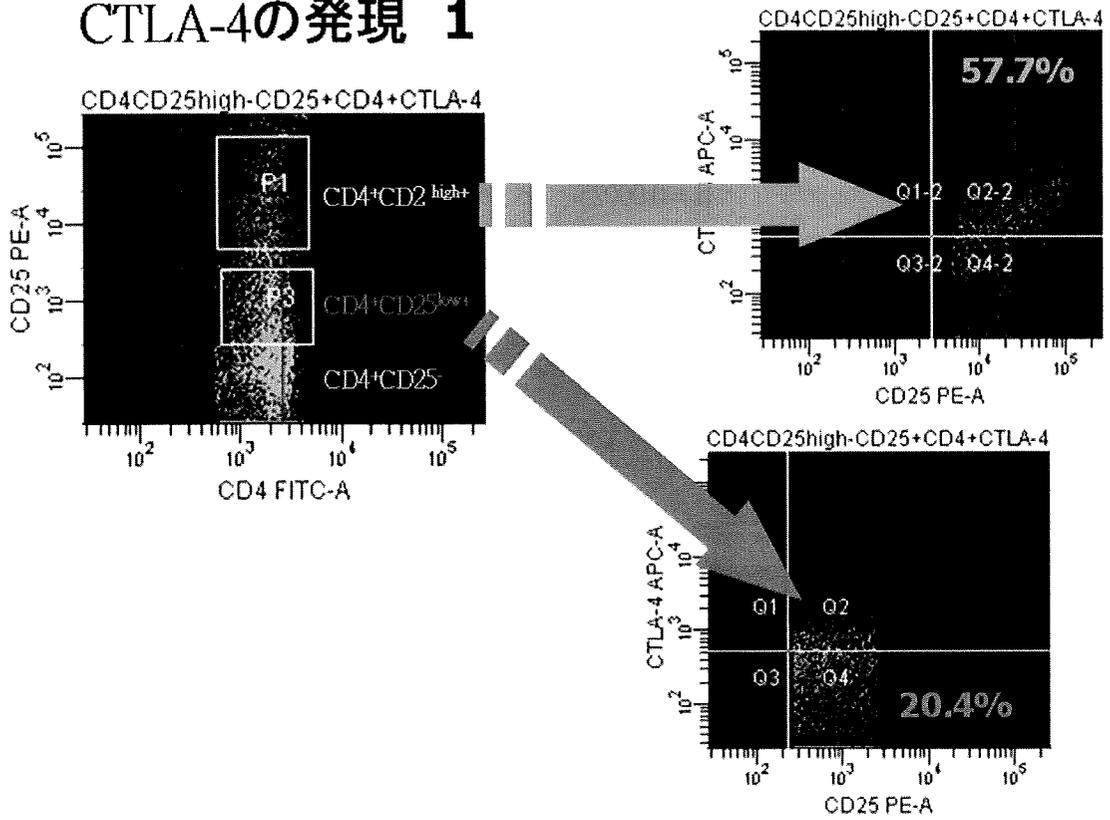


グラフト粘膜の観察

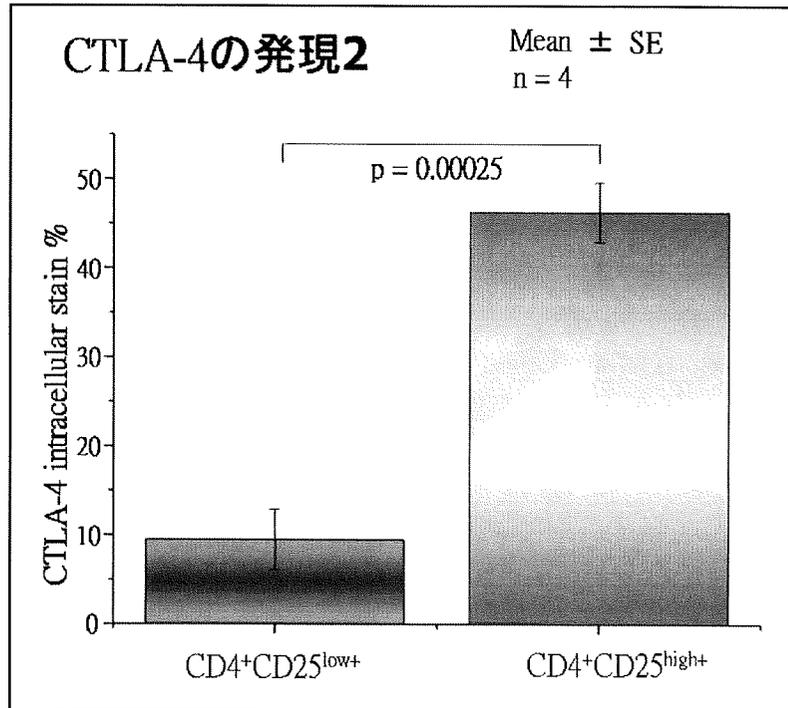


各分画 (CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25⁻, CD4⁺CD25^{low+}, CD4⁺CD25^{high+}) の *FOXP3* mRNA の発現を示す。他の分画と比較して CD4⁺CD25^{high+} で有意に高い *FOXP3* mRNA の発現を認める。

CTLA-4の発現 1

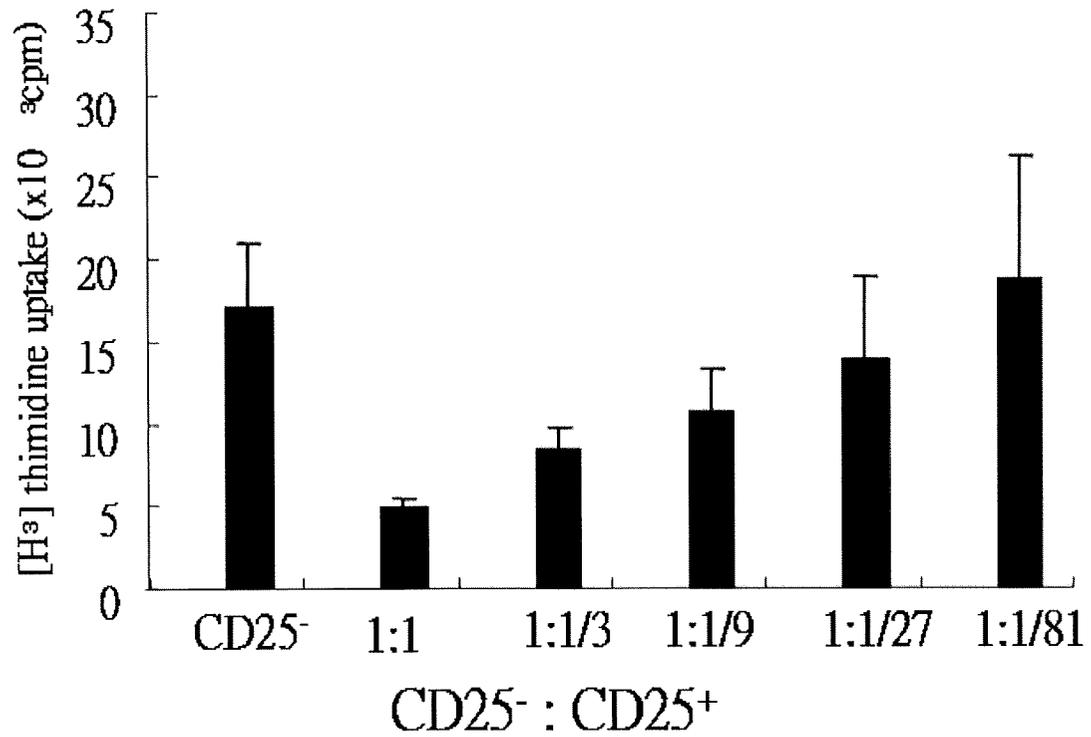


CD4+CD25^{high}, CD4+CD25^{low} の細胞内 CTLA-4 の発現を示す(代表例)。



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。

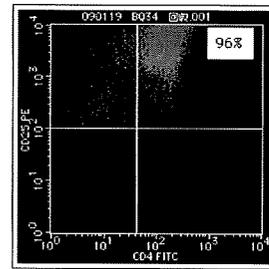
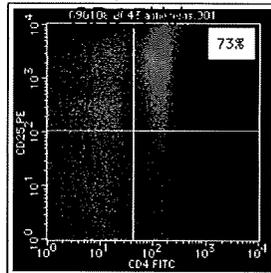
制御性T細胞の免疫抑制効果



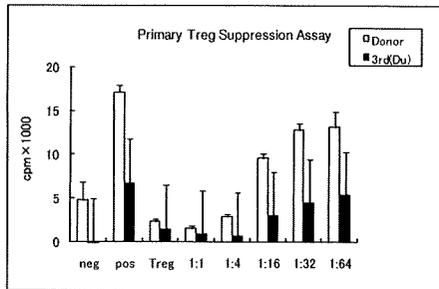
CD4⁺CD25⁺ 細胞 はCD4⁺CD25⁻細胞のアロ抗原に対する増殖を用量依存的に抑制する。

制御性T細胞のドナー抗原特異的免疫抑制効果、純度

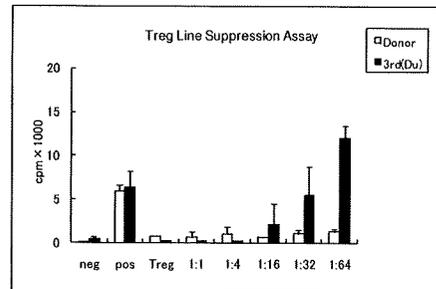
Freshly isolated



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)。

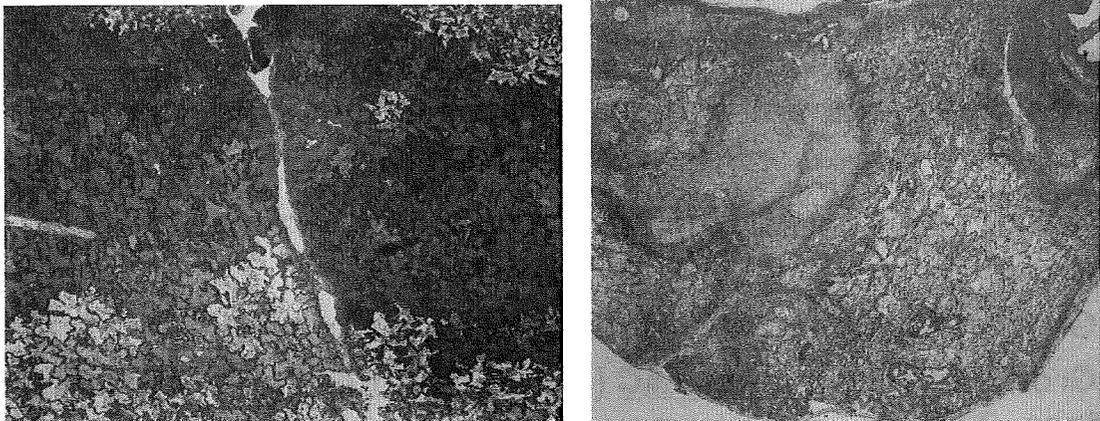
末梢血から分離時の CD4⁺CD25^{high} 細胞、培養後の CD4⁺CD25^{high} 細胞の

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移植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

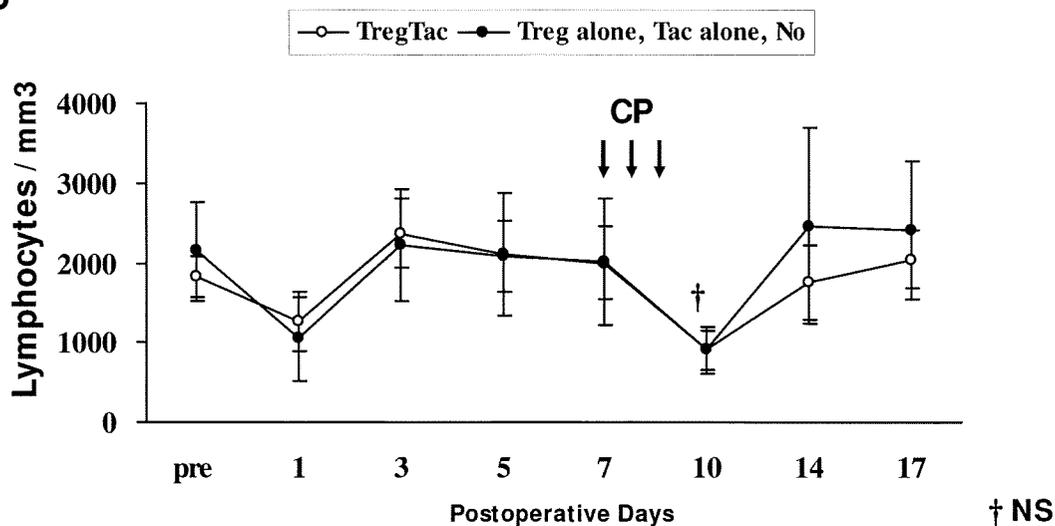
Group Tregs alone (n = 3): Tregs alone

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

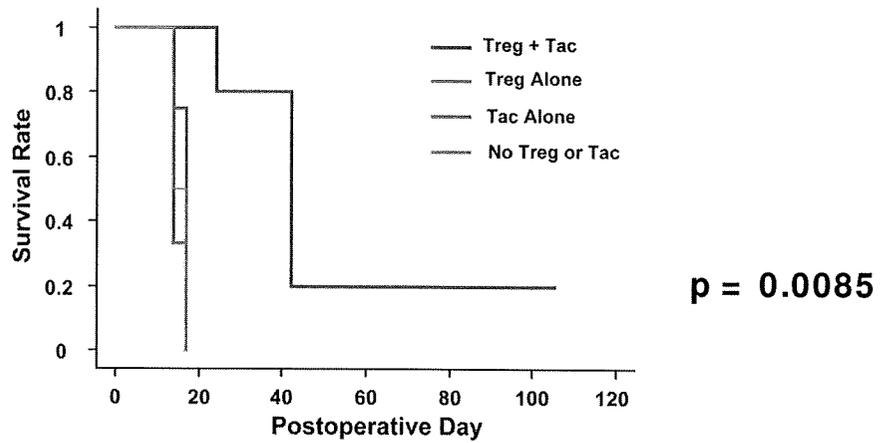
◆CP were administered on postoperative day 7, 8, and 9



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日でリンパ球の nadir を認める。

Group Tregs+TAC とその他の Group とで、術後10日でリンパ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

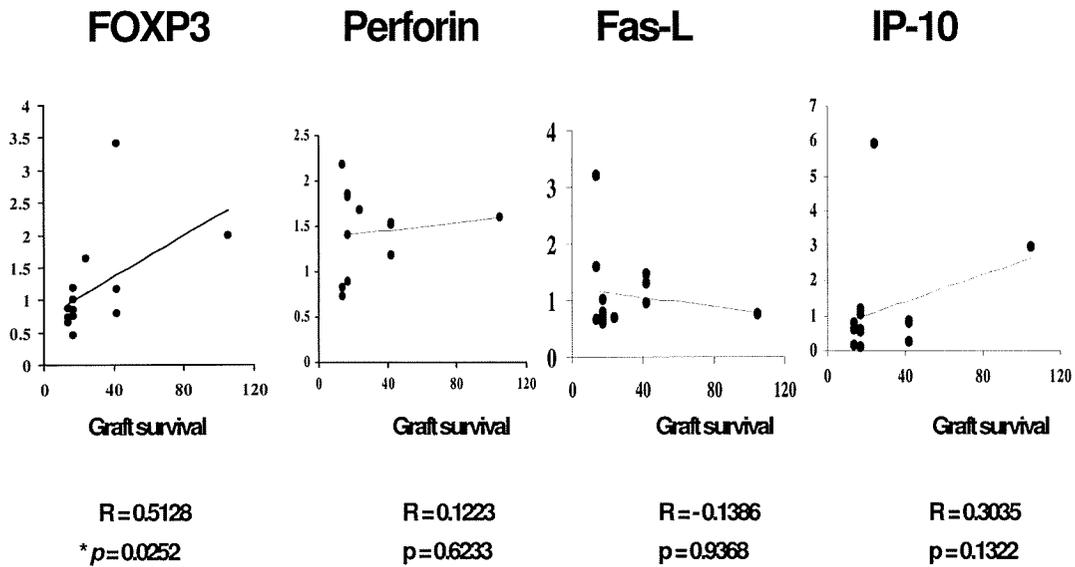
Treg Alone (n = 3): 15.0 ±1.0 days

Tac Alone (n = 4): 16.3 ±0.8 days

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

グラフト内各種遺伝子発現

Correlation between Graft Survivals and POD14/ POD10 Ratio



グラフト内、*FOXP3*mRNA の発現は、グラフト survival と相関した。しかし、グラフト内、*perforin*, *Fas-L*, *IP-10*mRNA の発現は、グラフト survival と相関しなかった。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小柴 貴明	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		再生医療へ進む最先端の幹細胞研究	羊土社		2008	199

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
李 穎	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	16(5)	84	2009
Yoshitomi M	Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression following liver transplantation.	Transplantation	87(4)	606	2009
Satoda N	Value of FOXP3 Expression in Peripheral Blood as Rejection Marker after Miniature Swine lung transplantation	J Heart Lung Transplant	27(12)	1293	2008
Li Y	The presence of FOXP3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients.	Transplantation	86(12)	1837	2008
小柴 貴明	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—	日本臨床	65(3)	557	2007
小柴 貴明	臓器移植後の免疫寛容における制御性T細胞の役割	Biotherapy	21(5)	289	2007
Koshiha T	Clinical, immunological, and pathological aspects of operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation.	Transplant Immunol	17	94	2007
小柴貴明	肝移植における免疫寛容の誘導を目指して	移植	41(2)	88	2006

13. 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—

小柴貴明，李 穎，呉 艶玲，湊 長博，坂口志文，上本伸二，ジャック・ピレンネ

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．筆者らは，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・ $\gamma\delta$ 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．

はじめに

1980年代のシクロスポリン，'90年代のタクロリムスなどの優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．したがって，免疫寛容 = tolerance^{6) 1)}（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きわ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

[キーワード&略語]

免疫寛容，臨床臓器移植，制御性T細胞， $\gamma\delta$ T細胞，PD-1

PTLD：post-transplant lymphoproliferative disease

QOL：quality of life

※1 免疫寛容 (= tolerance)

1953年 Billingham は，マウスにドナーの骨髄を投与すると免疫抑制剤非投与下に異系の皮膚は拒絶されるが骨髄ドナーと同系の皮膚は拒絶されないことを見出し，免疫寛容 (= tolerance) という概念を提唱した¹⁰⁾．

Mechanisms of tolerance after human transplantation — regulatory T cell, $\gamma\delta$ T cell, PD-1

Takaaki Koshiba¹⁾/Ying Li¹⁾/Yanling Wu¹⁾/Nagahiro Minato²⁾/Shimon Sakaguchi³⁾/Shinji Uemoto⁴⁾/Jacques Pirenne⁵⁾ ; Innovation Center for Immunoregulation Technologies and Drugs, Graduate School of Medicine, Kyoto University¹⁾/Department of Immunology and Cell Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University²⁾/Department of Experimental Pathology, Institute for Frontier Medical Science, Kyoto University³⁾/Division of Hepatobiliary Pancreatic Surgery and Transplantation, Graduate School of Medicine, Kyoto University⁴⁾/Abdominal Transplant Surgery Department, Leuven University Hospital, Belgium⁵⁾ (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¹⁾/京都大学大学院医学研究科感染免疫医学講座²⁾/京都大学再生医科学研究所生体機能調節学分野³⁾/京都大学大学院医学研究科肝胆臓・移植外科⁴⁾/ルーベン大学病院腹部移植外科⁵⁾)

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、小腸はかつて“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・ル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、拒絶が全く起きなかった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きわ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^{*2)}の状態である。筆者らは、これらのきわめて貴重な症例に対し免疫学的なアプローチを行い、免疫寛容およびprope toleranceのメカニズムを追求してきた。免疫寛容およびprope 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。

1 制御性T細胞, $\gamma\delta$ T細胞, PD-1

筆者らは、制御性T細胞, $\gamma\delta$ T細胞, PD-1の3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果たしているとの知見が集積されつつある。筆者らは、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わかった¹²⁾。

$\gamma\delta$ 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1つであるV δ 1 $\gamma\delta$ 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 $\gamma\delta$ 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 $\gamma\delta$ T細胞は末梢血に多い。したがって、V δ 1 $\gamma\delta$ T細胞/V δ 2 $\gamma\delta$ T細胞比 (V δ 1/V δ 2比) は、健常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比は逆転していることがわかった (>1)¹¹⁾。

PD-1は活性化リンパ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パ球の細胞内に送り、免疫を制御している¹⁵⁾。

2 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

1) 方法

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。一方、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 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・自己の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^{*3)} (制御性T細胞特異的遺伝子)、V δ 1 $\gamma\delta$ T細胞、V δ 2 $\gamma\delta$ 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。

※2 prope tolerance

ラテン語のpropeは英語のalmostである。免疫抑制剤をその副作用がない程度に少ない量投与して、拒絶が起きない場合にprope toleranceという場合がある。Calneにより使用された用語である²⁰⁾。

※3 FOXP3

制御性T細胞の特異的な遺伝子で、同細胞の分化と機能に関わるマスターコントロール遺伝子である。現在、最も信頼性の高い制御性T細胞のマーカーと考えられている²¹⁾。

表 患者プロフィール

肝移植 (京都)	小腸移植 (ルーベン)
<ul style="list-style-type: none"> ● 免疫寛容群 (免疫抑制剤完全中止) 15名 (男3, 女12) 年 齢: 10 ± 4 歳 移植後: 8 ± 3 年 現疾患: 胆道閉鎖症13名, その他2名 ● コントロール群 (非移植正常肝) 12名 ドナー年齢: 33 ± 7 才 	<ul style="list-style-type: none"> ● 免疫寛容群 (prope tolerance) 4名 (男1, 女3) 年 齢: 55, 57, 2, 26歳 移植後: 6, 5, 2, 2年 現疾患: 上腸間膜動脈血栓, 回旋異常, 慢性偽腸閉塞 ● コントロール群 (自己非移植正常小腸) 3名 年 齢: 55, 57, 26歳

2) 結果 (図参照)

FOXP3の発現は、肝移植ではコントロール群に比較して、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、コントロール群に比較して、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に比較して、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に比較して、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はコントロール群に比較して、免疫寛容群で有意に低かった ($p < 0.05$)。肝移植・小腸移植の両者でCD4, CD8, CD25, CD56, Va24はいずれも2群間に差を認めなかった (NS)。CD19は肝移植・小腸移植の両者でコントロール群に比較して、免疫寛容群で高かった ($p = 0.055$, $p < 0.01$)。

3) 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方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に

よる妊娠の維持は、すなわち母にとって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) といわれる。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, Va24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、immuno-privilegeの肝移植とhighly immunogenic (拒絶のきわめて起きやすい) な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可能性が想定される。

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討から、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わかってい

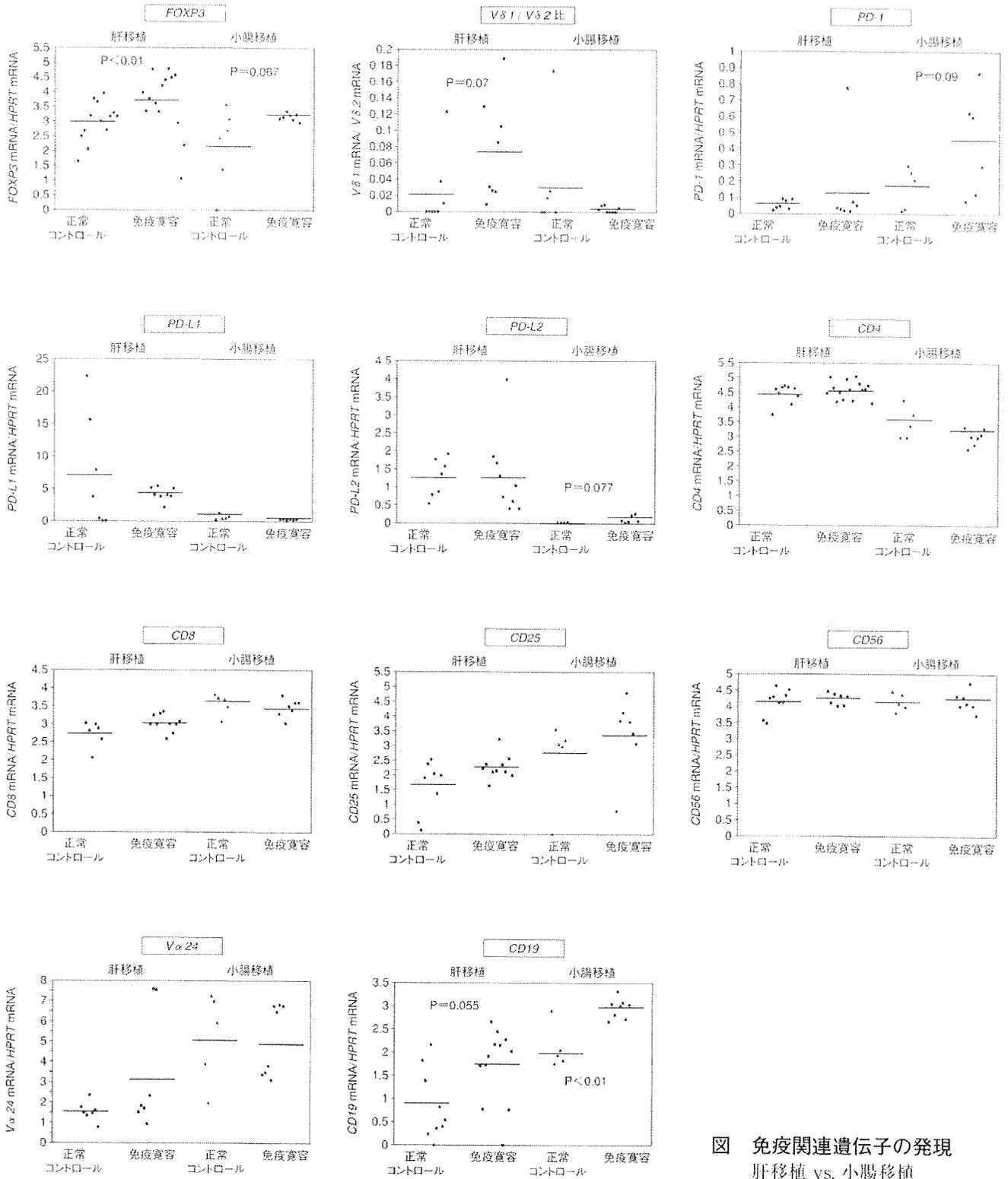


図 免疫関連遺伝子の発現
肝移植 vs. 小腸移植

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⁾。したがって、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。

おわりに

免疫寛容のメカニズムを解明することは、免疫寛容のバイオマーカーを見つけるうえで重要である。そればかりか、免疫寛容を誘導する次世代の新しい薬剤を開発する手掛かりをつかむことができると期待される。