

図6 CD45RA⁺CD25⁺細胞はFOXP3を強発現する

CD45RA陽性CD25陽性細胞(CD45RA⁺CD25⁺)は制御性T細胞として認識されてきたCD45RA陰性CD25強陽性の細胞(CD45RA⁻CD25^{hi})とは異なるが、CD45RA陰性CD25弱陽性(CD45RA⁻CD25^{lo} 図5-c)、CD45RA陰性CD25陰性(CD45RA⁻CD25⁻ 図5-d)、CD45RA陽性CD25陰性(CD45RA⁺CD25⁻ 図5-e)と比較して強いFOXP3の発現を認める。

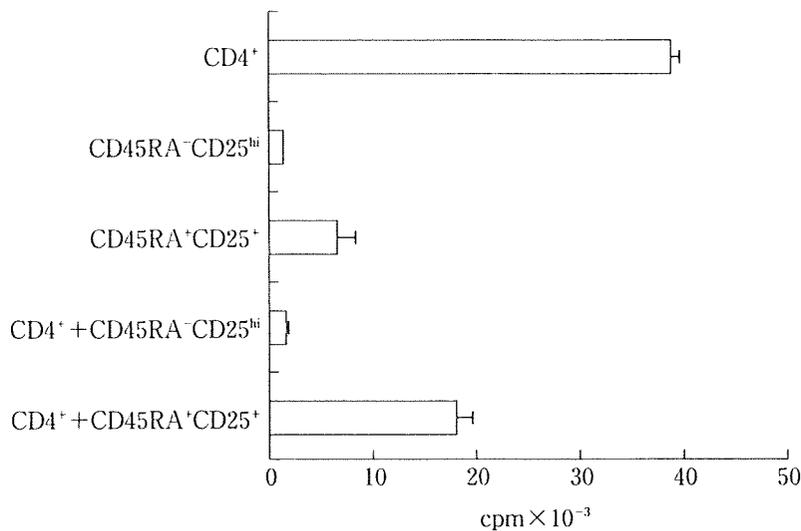


図7 CD45RA⁺CD25⁺細胞は不応答性でもなく、強い免疫抑制能もない

CD45RA陽性CD25陽性細胞(CD45RA⁺CD25⁺)は制御性T細胞として認識されている分画であるCD45RA陰性CD25強陽性の細胞(CD45RA⁻CD25^{hi})が不応答性である(図上から2つ目のバー)のとは異なり、弱いながらアロ抗原の刺激により増殖する(図上から3つ目のバー)。CD45RA⁻CD25^{hi}はCD4⁺の増殖(図上から1つ目のバー)を強く抑制する(図上から4つ目のバー)。一方、CD45RA⁺CD25⁺のCD4⁺に対する抑制は弱い(図上から5つ目のバー)。

CD25⁺細胞の割合はCD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞に比べて多い。CD45RA⁺CD25⁺細胞の割合は年齢とともに徐々に減少し、一方、CD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞は増加するので、

成人においてはCD45RA⁺CD25⁺細胞の割合とCD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞の割合は逆転する。これらの事実より著者らは、CD45RA⁺CD25⁺細胞をCD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞の

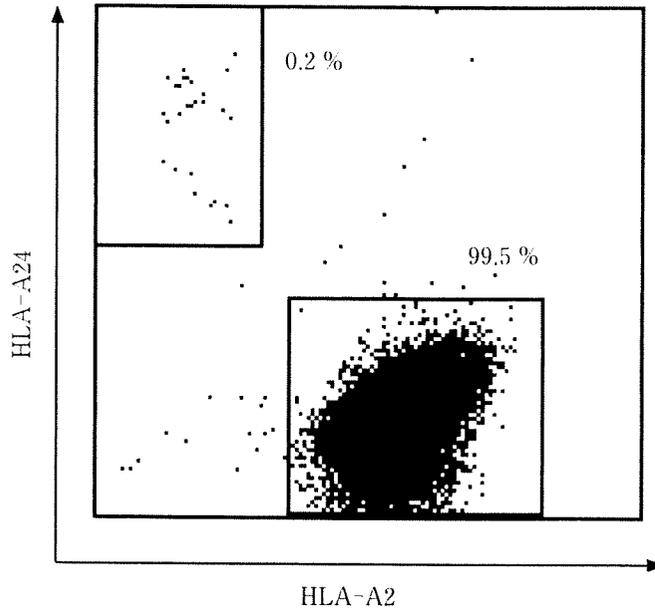


図 8 CD45RA⁺CD25⁺ cells は増殖する能力をもつが、
制御性 T 細胞は増殖しない

HLA-A2⁻A24⁺, HLA-A2⁺A24⁻の2人の健常人末梢血から、それぞれ CD45RA⁻CD25^{hi}と CD45RA⁺CD25⁺の細胞分画を分離し、1:1に混合して CD3-CD28 抗体にて刺激したところ、14日後にほとんどの細胞が HLA-A2⁺A24⁻, すなわち CD45RA⁺CD25⁺由来であった。

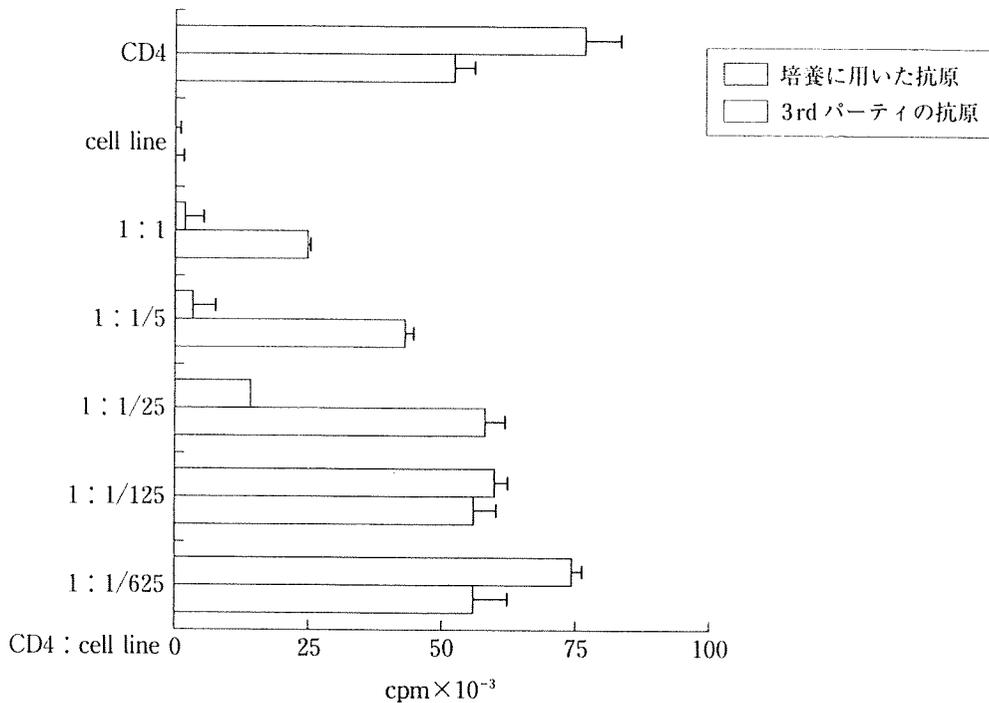


図 9 CD45RA⁺CD25⁺細胞は培養により不応答性および
強い抗原特異的免疫抑制能を獲得する

CD45RA⁺CD25⁺は培養後、それ自体不応答となり(上から2番目; cell line), 培養に用いたアロ抗原との培養により得られた細胞(cell line)を1:1, 1:1/5, 1:1/25, 1:1/125, 1:1/625と混合する培養細胞(cell line)の割合を徐々に減らし培養に用いた抗原と, 3rdパーティの抗原に対する増殖を調べた。

3rdパーティの抗原に対しては, 1:1/25の段階で, CD4⁺細胞に対する cell lineの制御が解除される(□)が, アロ抗原に対しては, 1:1/125の段階で制御の解除がみられる(□)。

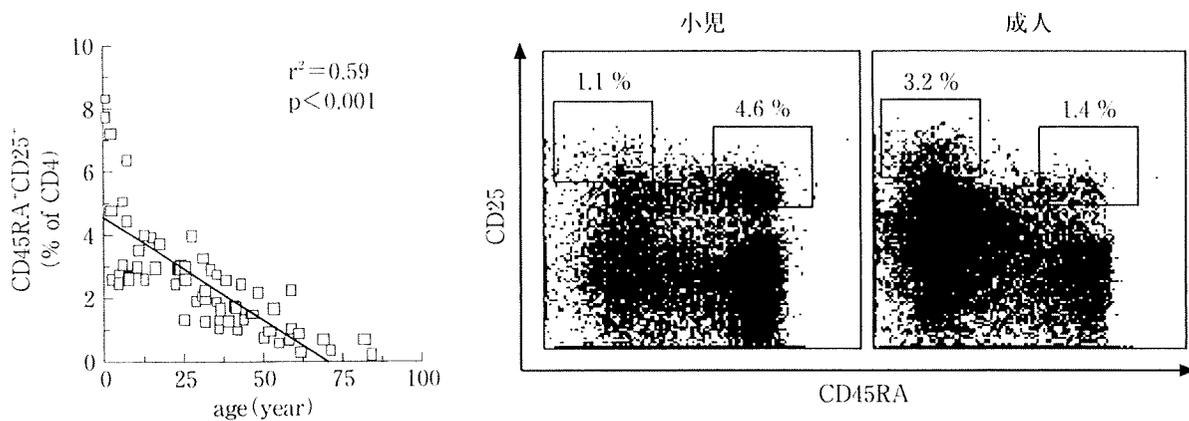


図10 CD45RA⁺CD25⁺細胞の割合は年齢とともに減少する

健康人の小児において、末梢血CD4⁺細胞の中のCD45RA⁺CD25⁺の割合はCD45RA⁻CD25^{hi}と比べて多い(小児)。ところが、CD45RA⁺CD25⁺の割合は年齢とともに減少し(左の図)、成人においては両者の比率は逆転する(成人)。

前駆体と位置づけた。CD45RA⁺CD25⁺細胞は年齢とともに各種アロ、セルフ抗原に曝露する過程で、CD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞へ分化するものと予想される。

CD45RA⁺CD25⁺細胞はいったんCD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞に移行すれば、増殖を示さないことから、CD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞ではなくCD45RA⁺CD25⁺細胞をターゲットに制御性T細胞の増殖を行うべきである。このようにして、著者らは制御性T細胞の前駆細胞を用いて、ヒトの制御性T細胞を分化・増殖させる培養系を確立した¹⁴⁾。既に、坂口らにより、マウスの系では制御性T細胞を試験管の中でドナーの抗原に特異的に免疫を制御する形で増殖させ再度体内に移入する細胞養子免疫により、異系の皮膚移植の生着を延長し得ることが示された¹⁵⁾。今回の、ヒトの制御性T細胞の培養系の確立により、細胞養子免疫のヒトへの応用が現実的となった。また、この培養系は、その上清に免疫抑制剤を添加して、その制御性T細胞に対する分化・増殖促進効果を確認することで、制御性T細胞の分化・増殖に最適化された免疫抑制剤のレジメンを考案するスクリーニング系としての用途が大きい。更に、HTS(high through screening)によりスクリーニングの範囲を新規の薬剤にまで広げれば、制御性T細胞の誘導・増殖を促す画期的な薬剤の開発へとつ

ながる可能性がある。著者らは、小児の生体肝移植の患者の末梢血のCD45RA⁺CD25⁺細胞とCD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞の割合の移植前後における時間的な変化を調べた。図11に示すように小児の健康人と同様に術前、術早期(1カ月、3カ月)の小児の生体肝移植の患者の末梢血においてはCD45RA⁺CD25⁺細胞はCD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞に比べて多い。しかし、CD45RA⁺CD25⁺細胞の割合は、術後6カ月の時点では減少して、その後CD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞の割合と同程度となる。これらの事実から、肝移植においては巨大なアロ抗原(移植肝)の存在下に術後6カ月以内に急速に制御性T細胞の前駆体であるCD45RA⁺CD25⁺細胞が、CD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞に分化すると予想される。いったんCD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞に分化すると不応性となってしまふことを考慮すると、増殖力をもつCD45RA⁺CD25⁺細胞が増殖するに最適化された免疫抑制剤が投与されることが肝要である。CD45RA⁺CD25⁺細胞の増殖がIL-2に依存することを考えると、術後早期にIL-2の産生を強力に抑制するカルシニューリンインヒビターの使用は制御性T細胞による免疫寛容の成立を妨げる可能性が否定できない¹²⁾。

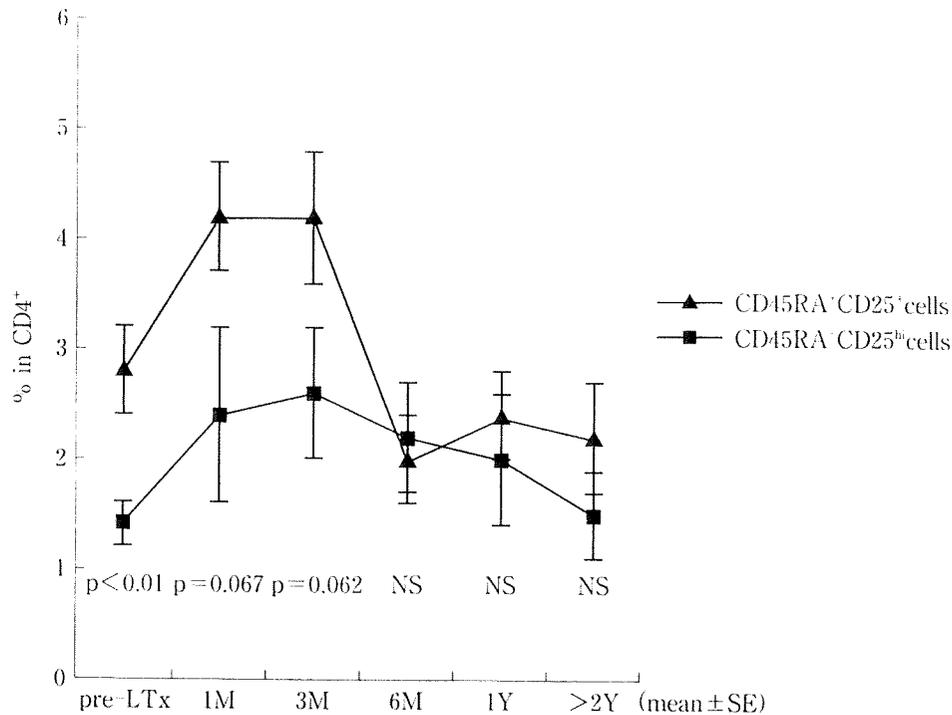


図 11 小児生体肝移植後、CD45RA⁺CD25⁺細胞と CD45RA⁻CD25^{hi} Tregs の割合の変化

健康人の小児と同様に、生体肝移植を受ける小児の術前の末梢血 CD4⁺細胞中の CD45RA⁺CD25⁺の割合は CD45RA⁻CD25^{hi}と比べて多い。この傾向は、術後3カ月までみられるが、術後6カ月の時点で CD45RA⁺CD25⁺の割合は減少し、CD45RA⁻CD25^{hi}との差がなくなる。それ以後、両者の割合に差を認めない。使用は制御性T細胞による免疫寛容の成立を妨げる可能性が否定できない¹²⁾。

■ 文 献

- 1) 小柴貴明ほか：クリニカルピックス 生体肝移植と免疫寛容. *Bio Clinica* 18: 1296-1301, 2003.
- 2) Sheiner PA, et al: Severe or multiple rejection episodes are associated with early recurrence of hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1: 30-34, 1995.
- 3) Bishop GA, McCaughan GW: Immune activation is required for the induction of liver allograft tolerance: implications for immunosuppressive therapy. *Liver Transpl* 3: 161-172, 2001.
- 4) Qian S, et al: Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts: evidence for deletion of cytotoxic T cells and implications for tolerance induction. *J Immunol* 10: 4654-4661, 1997.
- 5) Calne RY, et al: Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 223 (5205): 472-476, 1969.
- 6) Takatsuki M, et al: Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation* 72(3): 449-454, 2001.
- 7) Wood KJ, Sakaguchi S: Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 3(3): 199-210, 2003.
- 8) Li Y, et al: Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 4(12): 2118-2125, 2004.
- 9) Yoshizawa A, et al: The roles of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in operational tolerance after living donor liver transplantation. *Transplant Proc* 37(1): 37-39, 2005.
- 10) Li Y, et al: Presence of regulatory T cells within tolerant graft of human liver and intestinal transplantation. *Am J Transplant* 6(Suppl 2): 584, 2006.
- 11) Koshiba T, et al: Clinical, immunological, and pathological aspects of operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation. *Transplant Immunology*. (in press)

- 12) Sakaguchi S: Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* **22**: 531–562, 2004.
- 13) Yagi H, et al: Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int Immunol* **16**(11): 1643–1656, 2004.
- 14) Ito A, et al: FOXP3⁺ CD45RA⁺ CD25⁺ CD4⁺ T cells in human peripheral blood as precursor regulatory T cells. *Am J Transplant* **6**(Suppl 2): 875, 2006.
- 15) Nishimura E, et al: Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int Immunol* **16**(8): 1189–1201, 2004.

特別企画

● 制御性 T 細胞の制御と治療への応用 ●

臓器移植後の免疫寛容における制御性 T 細胞の役割

京都大学大学院医学研究科・先端領域融合医学研究機構

小柴 貴明

研究背景：優れた免疫抑制剤の開発により臓器移植の成績は著しく向上したが、感染症や免疫抑制剤の副作用は残された大きな課題である。免疫寛容が誘導されれば、移植の成績はさらに向上すると期待される。FOXP3⁺ CD4⁺ CD25⁺ 制御性 T 細胞が臓器移植後の免疫寛容に重要な働きをしているとの知見が動物実験レベルで集積されつつある。

免疫寛容症例における制御性 T 細胞の検討：マウスの場合、CD4 陽性細胞群 (CD4⁺) では CD25 の陽性細胞分画 (CD25⁺)、陰性細胞分画 (CD25⁻) の区別はフローサイトメータ上明確であるが、ヒトの場合、CD25⁻、CD25 強陽性 (CD25^{high+}) の中間にエフェクター細胞である CD25 中等度陽性 (CD25^{intermediate+}) が存在するため、CD25^{high+} の範囲が明確ではない。ところがヒトの臍帯血は、細菌やウイルスなどの抗原に暴露されたことのない胎児血液を代表するため、エフェクター細胞である CD25^{intermediate+} がほとんど存在せず、CD25⁻、CD25^{high+} は明確に区別できる。われわれは、ヒトの臍帯血を用いてフローサイトメータの解析上 CD25^{high+} の細胞を定義した。京都大学での小児生体肝移植症例のうち、最終的に免疫抑制剤投与が中止可能となり免疫寛容が成立したと考えられる症例が、生存症例の 15% に及ぶ。上記の CD25^{high+} 細胞の定義を用い、免疫寛容が成立した症例、免疫抑制剤を投与中の症例、年齢が一致した健常人の 3 群間で、CD4⁺ CD25^{high+} 細胞の末梢血リンパ球中の割合を検討した。その結果、免疫寛容例において有意に CD4⁺ CD25^{high+} 細胞の割合が高いことが確認された。また、CD25⁻ 細胞と CD25^{high+} 細胞を分離し、CD25⁻ 細胞の数を一定に保ち CD25^{high+} 細胞の混合する数を変えてリンパ球混合試験 (MLR) を検討したところ、ドナー抗原に対して特異的に CD25^{high+} 細胞が CD25⁻ 細胞の MLR を抑制することがわかった。さらに、肝生検組織中の FOXP3 の発現を検討した。免疫寛容症例のグラフトのなかの FOXP3 の発現は、mRNA のレベルで正常肝に比べて増加していた。FOXP3 の mRNA の発現は、慢性拒絶例のグラフトにおいても増加していた。しかし、FOXP3 の蛋白の発現を免疫染色で検討したところ、免疫寛容例のグラフトでは FOXP3 蛋白が発現している細胞が存在したが、慢性拒絶例ではグラフト内に FOXP3 陽性の細胞は認めなかった。

制御性 T 細胞の臨床応用の展望：脳死移植とは異なり、生体肝移植の場合はあらかじめドナーが確定している。そのため、ドナーの血球とレシピエントの末梢血から分離した制御性 T 細胞をあらかじめ共培養してドナーの抗原に特異的な免疫抑制能を有する制御性 T 細胞を増殖させ、移植の時期に体内に戻す細胞養子免疫療法が可能である。同一ドナーから肝臓を移植すると、ドナー抗原に特異的な抑制能をもつ制御性 T 細胞が拒絶を抑制し、免疫寛容が誘導されると期待される。すでに細胞養子免疫療法の有効性は、マウスの移植モデルでは証明されている。制御性 T 細胞を細胞養子

疫療法に応用するには、制御性 T 細胞を試験管内で培養する技術が必要となるが、制御性 T 細胞は不応答性で増殖能はない。ヒトの末梢血に存在する制御性 T 細胞は CD4⁺ CD25⁺ で、かつメモリー表現型を有する細胞である。フローサイトメータでヒトの末梢血を検討すると制御性 T 細胞の細胞分画とは別に、CD4⁺ CD25⁺ でありながらナイーブ表現型陽性の細胞が存在する。この細胞分画は、制御性 T 細胞の特徴である不応答性を有しておらず、増殖能を有するにもかかわらず、制御性 T 細胞よりも高い FOXP3 mRNA の発現を示した。この分画を IL-2 の存在下にアロアンティジェンと培養すると、強いアロアンティジェン特異的抑制能を獲得した。このことから、ナイーブ表現型陽性の CD4⁺ CD25⁺ 細胞が制御性 T 細胞の前駆体細胞と考えられた。制御性 T 細胞は不応答性で増殖能がないため細胞培養には適さないが、この前駆体細胞は増殖能があり、試験管内にて培養できることは非常に重要である。臨床での制御性 T 細胞の細胞養子免疫療法の応用をめざして、前臨床モデルのミニブタ移植モデルでトランスレーショナルリサーチを開始した。

結語：制御性 T 細胞が、臨床の免疫寛容の成立に重要な役割を果たしている可能性が強く示唆された。免疫寛容を臨床で積極的に誘導する方法として、制御性 T 細胞を用いた養子免疫のトランスレーショナルリサーチを進めている。

参考文献

- 1) Nishimura, E., Sakihama, T., Setoguchi, R., *et al.*: Induction of antigen-specific immunologic tolerance by *in vivo* and *in vitro* antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells. *Int. Immunol.* 16(8): 1189-1201, 2004.
- 2) Li, Y., Koshiba, T., Yoshizawa, A., *et al.*: Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am. J. Transplant.* 4(12): 2118-2125, 2004.
- 3) Koshiba, T., Li, Y., Takemura, M., *et al.*: Clinical, Immunological, and pathological aspects of operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation. *Transpl. Immunol.* 17(2): 94-97, 2007.

Clinical, immunological, and pathological aspects of operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation

Takaaki Koshiba^{a,*}, Ying Li^a, Mami Takemura^b, Yanling Wu^a, Shimon Sakaguchi^c, Nagahiro Minato^d, Kathryn J. Wood^e, Hironori Haga^f, Mikiko Ueda^b, Shinji Uemoto^b

^a Department of Transplantation and Immunology, Horizontal Medical Research Organization, Faculty of Medicine, Kyoto University, 54 Kawaramachi-Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto city 606-8507, Japan

^b Division of Hepatobiliary Pancreatic Surgery and Transplantation, Kyoto University Hospital, 54 Kawaramachi-Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto city 606-8507, Japan

^c Department of Experimental Pathology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, 53 Kawaramachi-Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto city 606-8507, Japan

^d Department of Immunology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Kyoto University, Yoshida-Konoemachi, Sakyo-ku, Kyoto city 606-8501, Japan

^e Nuffield Department of Surgery, University of Oxford, The John Radcliffe Hospital, Headington, Oxford, OX3 9DU, UK

^f Department of Diagnostic Pathology, Kyoto University Hospital, 54 Kawaramachi-Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto city 606-8507, Japan

Received 25 October 2006; accepted 25 October 2006

Abstract

In the setting of our pediatric living-donor liver transplantation (LDLT), 87 patients (15.0% of all the patients: significantly higher proportion, compared with those of other transplant centers) achieved complete withdrawal of immunosuppression, which is referred to as “operational tolerance”. Immunosuppressants were completely discontinued for 54 patients as scheduled, and for 33 because of EBV infection or other complications.

Immunological analyses of the peripheral blood derived from operationally tolerant patients demonstrated that non-deletional tolerance takes place in which potentially reactive T cells to donor-antigens remain physically in the immune repertoire, but specifically suppressed by certain mechanisms. Not only CD4⁺CD25^{high+} T cells were increased in the proportion in the tolerant patients’ peripheral lymphocytes and suppressed MLR specifically to the donor antigen, but also *FOXP3* expressing cells were present within the tolerant liver. Thus, among several mechanisms accounting for non-deletional tolerance, Tregs are likely to involve at least in part in our tolerant patients. Vδ1γδT cells, a subset of γδT cells, which otherwise reside mainly in the intestine, emerge into the peripheral blood during successful pregnancy but not abortive pregnancy. Since Vδ1γδT cells produce massive IL-10, it is proposed that Vδ1γδT cells induce fetomaternal tolerance by promoting Th2 immune deviation. Consistent with pregnancy, IL-10 producing Vδ1γδT cells emerge into the blood of our tolerant patients. This may reflect a common feature between fetomaternal tolerance and transplant tolerance.

We began protocol biopsy in post-LDLT patients who exhibit normal liver function from January 2003. Operationally tolerant patients, albeit showing normal liver function, exhibited decrease in size and increase in number of the bile duct and the fibrosis to a greater extent, compared with patients on maintenance immunosuppression. This warrants serial protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression even in the presence of normal liver function.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Operational tolerance; Liver transplantation; Regulatory T cells; Protocol biopsy; γδT cells

1. Clinical aspects

1.1. The development of elective protocols has enabled a substantial number of patients to be weaned off immunosuppressants, but yielded no penalty in terms of immune graft loss

From June 15th, 1990 to May 20th, 2005, 659 cases of LDLT (living-donor liver transplantation) were performed for 581 pediatric patients who were younger than 18 years old at Kyoto

Abbreviations: APCs, Antigen presenting cells; EBV, Epstein–Barr virus; FOXP3, Forkhead box P 3; IEL, Intra-epithelial lymphocyte; IL, Interleukin; LDLT, Living-donor liver transplantation; MLR, Mixed Lymphocyte Reaction; TGF-β, Transforming Growth Factor-beta; Tregs, Regulatory T cells.

* Corresponding author. Tel.: +81 75 751 4328; fax: +81 75 751 4328.

E-mail address: tkoshiba@kuhp.kyoto-u.ac.jp (T. Koshiba).

University Hospital. Out of them, 87 patients (15.0% of all the patients) had been completely weaned off immunosuppressants. This is significantly higher proportion, compared with those of other transplant centers. Immunosuppressants were completely discontinued as scheduled for 54 patients. All those patients fulfilled the following criteria when they began being weaned off FK506; 1) pediatric patients 2) normal liver function 3) survived for more than 2 years 4) no single episode of rejection during the preceding 12 months 5) the presence of parental permission [1]. The other 33 patients had to stop immunosuppressants non-electively mainly due to EBV infection and other complications. Eight patients had biopsy-proven acute rejection during the weaning process, which was counteracted by increasing in the dosage of the FK506 and/or corticosteroid pulse therapy. Three of these patients are again being weaned off immunosuppressants; the other 5 are being treated with FK506 monotherapy and show normal liver function. In 4 patients, immunosuppression returned to the previous steps of weaning without histology due to a slight increase in transaminases. One patient experienced early chronic rejection during the cessation of immunosuppressants for EBV infection, which was successfully treated with 3-drug immunosuppression therapy. Thus, of note, any immunological penalty such as graft loss has never been encountered during weaning process [2].

2. Immunological aspects

2.1. Regulatory T cells (Tregs) appear to operate in a subset of operationally tolerant patients

Recently suppressor/regulatory T cells have regained much interest in non-deletional type of tolerance [3,4]. Naturally occurring and induced alloantigen-specific Tregs have been shown to protect from autoimmunity and from rejection [3,4]. Similar to rodent models, it has been proposed that CD4⁺

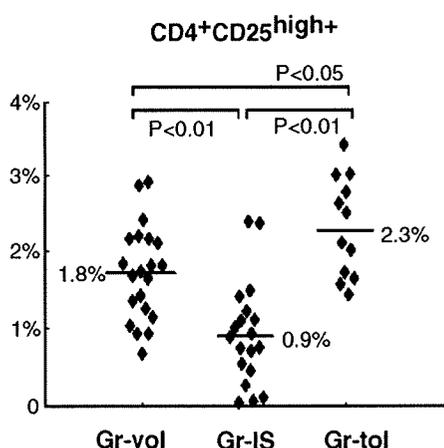


Fig. 1. Analyses for CD4⁺CD25^{high+} cells in age-matched volunteers (Gr-vol), LDLT patients on IS (Gr-IS) and operationally tolerant patients (Gr-tol). Using FACS analysis, the percentage of CD4⁺CD25^{high+} cells in the peripheral lymphocyte was determined. Gr-tol demonstrated an increase in the percentage of CD4⁺CD25^{high+} cells (Gr-Tol, Gr-IS and Gr-vol; 2.3±0.6%, 0.9±0.7% and 1.8±0.6%; Gr-tol vs. Gr-IS; $p<0.01$; Gr-tol vs. Gr-vol; $p<0.05$).

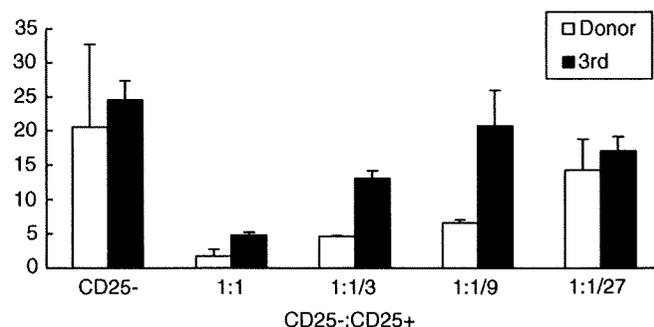


Fig. 2. Functional analysis for CD4⁺CD25⁺ T cells in operationally tolerant patients. CD4⁺CD25⁺ (CD25⁺) T cells and CD4⁺CD25⁻ (CD25⁻) T cells were isolated with a cell sorter. CD25⁻ T cells alone or serially diluted number of CD25⁺ T cells with an equal number of CD25⁻ T cells were incubated at an indicated ratio in the presence of irradiated donor APCs and 3rd party APCs to perform MLR. The suppressive property of CD25⁺ T cells was proven to be donor-antigen specific. Similar results were obtained in four tolerant patients.

CD25^{high+} cells represent Tregs in human [5]. Consistent with the findings of Salama and Louis in the settings of human renal transplantation [6,7], we demonstrated that operationally

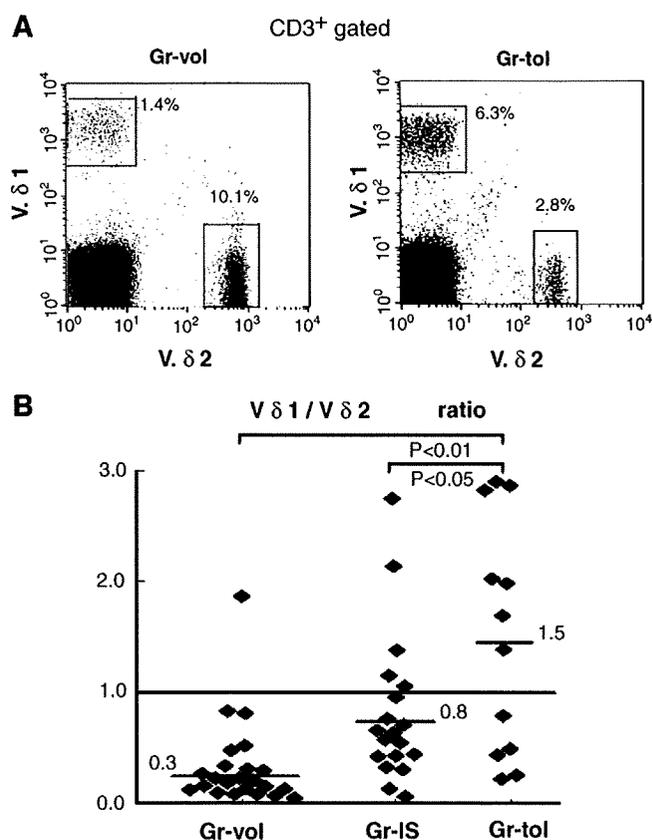


Fig. 3. Analyses for Vδ1 and Vδ2 γδ T cells in age-matched volunteers (Gr-vol), LDLT patients on IS (Gr-IS) and operationally tolerant patients (Gr-tol). Using FACS analysis, the percentage of Vδ1 and Vδ2 γδ T cells was determined within the peripheral T lymphocyte. (A) In Gr-vol, Vδ2 γδ T cells predominated while Vδ1 γδ T cells were rare. In quite a contrast, however, Vδ1 rather than Vδ2 predominated in Gr-tol. (B) Thus, the conversed ratio of Vδ1/Vδ2 γδ T cells was observed in mostly Gr-tol patients. However, this was less frequently found in Gr-IS than in Gr-tol (Gr-tol, Gr-IS and Gr-vol; Vδ1/Vδ2 γδ T cells ratio, 1.5, 0.8 and 0.3; Gr-tol vs. Gr-vol; $p<0.01$; Gr-tol vs. Gr-IS, $p<0.05$).

tolerant LDLT patients exhibited significantly higher proportion of CD4⁺CD25^{high+} cells within peripheral blood lymphocytes, compared with patients on immunosuppressants and age-matched healthy volunteers (Fig. 1) [8]. In addition, peripheral lymphocytes derived from operationally tolerant patients were divided into CD4⁺CD25⁺ (CD25⁺) fraction and CD4⁺CD25⁻ (CD25⁻) fraction, and serially diluted doses of CD25⁺ cells were added to a CD25⁻ fraction to examine MLR to both of donor and third party alloantigens. As shown in Fig. 2, decrease of the proportion of CD25⁺ cells to CD25⁻ cells resulted in increase of MLR to both of the donor and the 3rd party. In a subset of tolerant patients, this tendency was more remarkable to the donor than to the 3rd party [9]. These data imply that potentially reactive T cells to donor-antigens are physically present in the tolerant recipient immune repertoire – a phenomenon referred to as “non-deletional” tolerance – but specifically suppressed by Tregs at least in a subset of tolerant patients. Recently, we demonstrated high expression of *FOXP3* in liver grafts derived from tolerant patients, implying the presence of Tregs within tolerant grafts [10]. To further address the question as to where and how Tregs exert their suppressive activity, we are currently determining balance between *FOXP3* and innate/adaptive immunities, and linkage between *FOXP3* and cytokines/co-stimulatory factors in tolerant graft.

2.2. A common feature exists between transplant tolerance and fetomaternal tolerance

The fetus has paternal antigens which can evoke strong allogeneic T cell responses. However, in general, unlike any other mismatched organ and tissue transplantations, the semi-allogeneic fetus is not usually rejected, which indicates the existence of active tolerance mechanisms that prevent rejection. $\gamma\delta$ T cells express one of the three different V δ gene segments, V δ 1, V δ 2 or V δ 3, representing distinctive functional subsets [11]. It has been reported that V δ 1 $\gamma\delta$ T cells, a subset, sharing a similar phenotype with intra-epithelial lymphocyte (IEL), which are otherwise rare, become a dominating population in the peripheral blood lymphocytes during successful, but not abortive pregnancy [12]. We confirmed that V δ 2 $\gamma\delta$ T cells predominated, and that V δ 1 $\gamma\delta$ T cells were rare in the peripheral blood of normal individuals (Fig. 3). Thus, V δ 1/V δ 2 $\gamma\delta$ T cells ratio was less than 1.0 in most normal individuals. However, similar to successful pregnancy, V δ 1 $\gamma\delta$ T cells rather than V δ 2 $\gamma\delta$ T cells, predominated in the peripheral blood of tolerant patients. This made V δ 1/V δ 2 $\gamma\delta$ T cells ratio of tolerant patient more than 1.0, in contrast to normal individuals. The V δ 1/V δ 2 $\gamma\delta$ T cells ratio in patients on immunosuppressant was in the middle of normal individuals and tolerant patients (Fig. 3) [8]. As far as function of V δ 1 $\gamma\delta$ T cells is concerned, V δ 1 $\gamma\delta$ T cells in the deciduas during early pregnancy were reported to produce IL-10 and TGF- β , which suggests a direct role of V δ 1 $\gamma\delta$ T cells in maintenance of fetomaternal tolerance by promoting Th2 immune-deviation [13]. Consistent with V δ 1 $\gamma\delta$ T cells during successful pregnancy, we demonstrated that V δ 1 $\gamma\delta$ T cells in the peripheral blood of tolerant patients produced massive IL-10 (data not shown).

3. Pathological aspects

3.1. Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression

It is generally assumed that operational tolerance with normal graft function is accompanied by normal graft morphology, but this has not been studied in detail. From January 2003, we began protocol biopsy in long-term post-LDLT patients exhibiting normal liver function. Despite normal liver function, protocol biopsy revealed decrease in size and increase in the number of the bile duct, and the presence of fibrosis in patients in whom immunosuppressant had been completely withdrawn, compared to patients on maintenance immunosuppression (data not shown). This warrants protocol biopsies during the weaning process (even in the presence of normal liver test). Operational tolerance may not be necessarily protected from morphological changes of the graft [14].

Acknowledgements

We thank Ms. Narumoto, Ms. Eguchi and Dr. Yoshizawa for their technical assistance and Ms. Shiomi and Ms. Nagamizo for their preparation of the manuscript.

A part of this work was presented at World Transplant Congress (WTC) 2006, June 22–27, 2006, Boston, USA. Mami Takemura is a winner of a WTC International Young Investigator Award under the title: Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression following living-donor liver transplantation [14].

This work was supported by grants-in-aids from the Ministry of Education, Science, and Culture, and grants-in-aids from the Uehara Memorial Foundation.

Kathryn J. Wood holds Royal Society Wolfson Merit Award.

References

- [1] Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y, et al. Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation* 2001;72(3):449–54.
- [2] Ueda M, Oike F, Ogura Y, et al. Long-term outcomes of 600 living donor liver transplants for pediatric patients at a single center. *Liver Transplant* 2006;12(9):1326–36.
- [3] Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003;3(3):199–210.
- [4] Waldmann H, Graca L, Cobbold S, et al. Regulatory T cells and organ transplantation. *Semin Immunol* 2004;16(2):119–26.
- [5] Wing K, Ekmark A, Karlsson H, et al. Characterization of human CD25⁺CD4⁺T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology* 2002;106(2):190–9.
- [6] Salama AD, Najafian N, Clarkson MR, et al. Regulatory CD25⁺T cells in human kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(6):1643–51.
- [7] Louis S, Brouard S, Giral M, et al. The blood of “operationally tolerant” recipients of kidney allografts is characterized by an increase in CD4⁺CD25⁺T cell. *Am J Transplant* 2003;3:328.
- [8] Li Y, Koshiba T, Yoshizawa A, et al. Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2004;12(4):2118–25.
- [9] Yoshizawa A, Ito A, Li Y, et al. The roles of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in operational tolerance after living donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2005;37(1):37–9.

- [10] Li Y, Wu Y, Sakaguchi S, et al. Presence of regulatory T cells within tolerant graft of human liver and intestinal transplantation. *Am J Transplant* 2006;6 (12):1056.
- [11] Parker CM, Groh V, Band H, et al. Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *J Exp Med* 1990;171 (5):1597–612.
- [12] Barakonyi A, Kovacs KT, Miko E, et al. Recognition of nonclassical HLA class I antigens by gamma delta T cells during pregnancy. *J Immunol* 2002;168(6):2683–8.
- [13] Nagaeva O, Jonsson L, Mincheva-Nilsson L. Dominant IL-10 and TGF-beta mRNA expression in gammadelta T cells of human early pregnancy decidua suggests immunoregulatory potential. *Am J Reprod Immunol* 2002;48(1):9–17.
- [14] Yoshitomi M, Koshiba T, Sakashita H, et al. Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression following living-donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2006;6 (12):173.

特集「免疫寛容最前線」

肝移植における免疫寛容

—制御性T細胞による免疫寛容の誘導を目指して—

小柴貴明

 京都大学医学研究科先端領域融合医学研究機構
 生命・理工学融合分臓器移植免疫寛容グループ

肝移植における免疫寛容の

必要性・課題

肝移植においても他の臓器移植と同様に、拒絶反応を防ぐため免疫抑制剤が投与される。免疫抑制剤による非特異的な免疫の抑制下では、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となる。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患者にとって大変に好ましい。

肝移植における

免疫寛容の課題

生体肝移植を受けた小児の患者において、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る。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²⁾。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 600 例程度)。しかし、免疫抑制剤の減量に伴い拒絶が起きる症例もあり、免疫寛容の指標を明確にすることが望まれる。

また今後、成人症例を含めより多くの患者に免疫寛容が成立するようにすることが課題である。

肝移植と C 型肝炎ウイルス

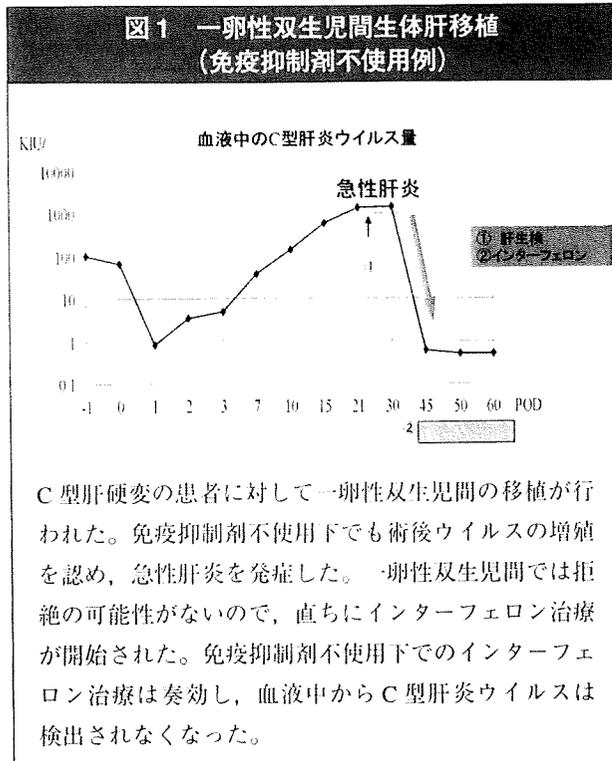
最近成人の症例が増加しているが、成人で生体肝移植を受ける患者のうち C 型肝炎による適応が最も

多い。また、これら C 型肝炎の患者の過半数は肝臓癌を合併している。グロブリンなど C 型肝炎ウイルスに対する治療薬がないため、肝移植後のほとんどの患者において移植肝への C 型肝炎ウイルスの再感染が起こる。免疫抑制剤の使用により C 型肝炎ウイルスの増殖が加速され、移植肝は短期間に慢性肝炎、肝硬変へと移行して、再度肝移植が必要となる症例もまれではない。また、C 型肝炎に合併していた肝臓癌の再発も免疫抑制剤の使用により促進すると考えられる。

京都大学では、一卵性双生児間で生体肝移植が行われたことがある。レシピエントは C 型肝炎の患者であった。一卵性双生児間では免疫抑制剤を使用しなくても拒絶が起きないと考えられるので、術中のステロイドを含め全く免疫抑制剤を使用せずに移植が行われた。図 1 に示すように術後一旦減少した血中の C 型肝炎ウイルスは、次第に増加し、1 か月以内に急性肝炎を来した。一卵性双生児間であるためインターフェロンの投与で免疫が賦活され拒絶が起きる可能性はないとの判断のもとに、ただちにインターフェロン治療を開始したところ、免疫抑制剤の使用されない状況下でのインターフェロン治療が奏効して、血中の C 型肝炎ウイルスは検出されなくなった³⁾。これらの事実より、仮に C 型肝炎の患者に免疫寛容が成立すれば術後早期のインターフェロン治療にて C 型肝炎が治癒するのかもしれない。

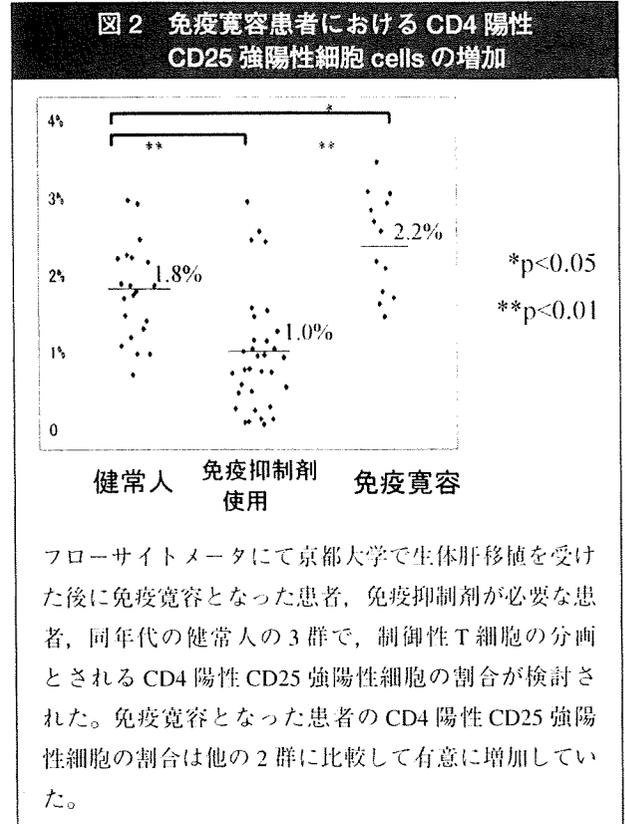
肝移植後の免疫寛容における 制御性 T 細胞の役割

CD4 陽性 CD25 強陽性のフェノタイプを有する制



御性T細胞は、生理的には自己免疫疾患の発症を抑制しているが、臓器移植後の免疫寛容にも重要な役割を果たしているとの知見が動物実験のレベルで集積されつつある⁴⁾。京都大学で生体肝移植後に免疫寛容の成立した小児患者の末梢血から単核球を分離し、フローサイトメーターにてリンパ球のなかのCD4陽性CD25強陽性細胞の割合を検討した。

図2に示すように、現在免疫抑制剤を使用中の患者、同年代の健常人と比較して、免疫寛容の患者のCD4陽性CD25強陽性細胞の割合は有意に増加していた⁵⁾。また、免疫寛容の患者のCD4陽性CD25強陽性細胞とCD4陽性CD25陰性細胞を細胞分離装置にて分離して、CD4陽性CD25陰性細胞の数を一定にして、そこに混在させるCD4陽性CD25強陽性細胞の量を変えて、ドナー、3rdパーティの単核球に対するリンパ球混合試験を施行した。図3に示すように、CD4陽性CD25陰性細胞とCD4陽性CD25強陽性細胞を1:1に混合するとドナー、3rdパーティに対するCD4陽性CD25陰性細胞の増殖はCD4陽性CD25強陽性細胞に抑制されている。CD4陽性CD25陰性細胞に対してCD4陽性CD25強陽性細胞の割合を減らしていくと、CD4陽性CD25強陽性細胞の割合が1/9となった段階で3rdパーティに対する反応の抑制は解除される。一方、ドナーに対してはCD4陽性CD25強

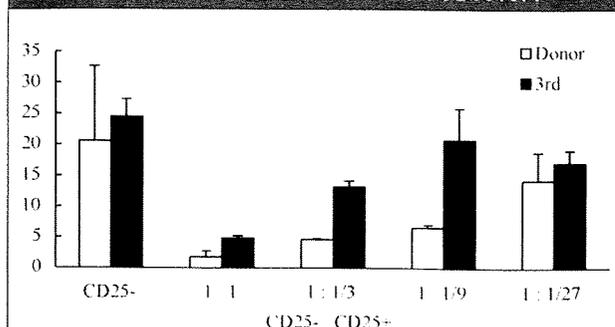


陽性細胞の割合が1/9の段階では抑制が効いており、1/27となったときに抑制が解除される。

これらの所見は、CD4陽性CD25強陽性細胞の抑制効果が3rdパーティの抗原より、ドナーの抗原に対して強いことを意味しており、制御性T細胞のドナー抗原特異的免疫抑制効果を示すものである。制御性T細胞のドナー抗原特異的免疫抑制効果は調べられた5名の免疫寛容患者のうち4名で認められた⁶⁾。以上のことより、生体肝移植後に免疫寛容の成立した患者において制御性T細胞が重要な働きをしている場合が多いと考えられる。

ところが、CD25は活性化マーカーであり、感染症などの免疫の賦活や免疫抑制剤の使用により発現が上下する場合があるため、CD4陽性CD25強陽性細胞の割合は制御性T細胞の割合を正確に反映していない可能性がある。そこで、免疫寛容患者の末梢血におけるFOXP3の発現をリアルタイムPCRを用いて調べ、末梢血におけるFOXP3が免疫寛容の指標として有用であるかどうか検討した。FOXP3は制御性T細胞の分化と機能を決定するマスターコントロール遺伝子で、制御性T細胞に特異性が高いとされている。しかし、図4に示すように、単核球、CD4分画のレ

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



免疫寛容の患者の末梢血から、CD4 陽性 CD25 陰性 (CD25⁻) 細胞と CD4 陽性 CD25 陽性 (CD25⁺) 細胞を分離して、以下の割合で CD25⁻ 細胞と CD25⁺ 細胞を混合された。

- CD25⁻ : CD25⁺ : CD25⁺ = 1 : 0
- 1 : 1 : CD25⁻ : CD25⁺ = 1 : 1
- 1 : 1/3 : CD25⁻ : CD25⁺ = 1 : 1/3
- 1 : 1/9 : CD25⁻ : CD25⁺ = 1 : 1/9
- 1 : 1/27 : CD25⁻ : CD25⁺ = 1 : 1/27

おのおのにドナーの単核球(□), 3rd パーティの単核球(■)を添加して、リンパ球混合試験を行った。1:1, 1:1/3 の段階ではドナー, 3rd パーティに対する反応はともに抑制されているが, 1:1/9 の段階では 3rd パーティに対する反応性の抑制が解除される。一方, ドナーに対しては 1:1/9 の段階では反応が抑制されており, 1:1/27 の段階で初めて解除される。これらより, CD25⁻ 細胞の抑制は 3rd パーティに対する場合に比較して, ドナーに対してより強いことが示された。5 名の免疫寛容の患者が調べられ, うち 4 名が同様の結果であった。

ベルでは, 免疫寛容の患者の FOXP 3 の発現は, 健常人の FOXP 3 の発現と比較して増加していなかった。FOXP 3 は制御性 T 細胞の機能の大小と直接相関するものではないため, 免疫寛容の指標とはならないのかもしれない。制御性 T 細胞の量と, 機能を正確に示すマーカーの確立が望まれる。

■ 制御性 T 細胞による免疫寛容の誘導を目指して

制御性 T 細胞が免疫寛容の成立に重要な働きをしているのであれば, 制御性 T 細胞を用いて免疫寛容を誘導する方法として少なくとも次の 2 つのストラテジーが考えられる。①患者の末梢血から分離した細胞からドナー抗原に対して抑制効果を持つ制御性 T 細胞を培養・増殖させ, 再度患者の体内に戻す (細胞養子免疫)。②制御性 T 細胞が体内で増殖するために最適化された免疫抑制療法を考案する。あるいは, 制御性 T 細胞の体内での増殖を促す新規薬剤を開発する。以上のことを実現するため, われわれの研究室ではヒト制御性 T 細胞の試験管内での培養系を確立するための研究を進めてきた。

ヒト制御性 T 細胞は胸腺で作られ末梢へ分布してその機能を果たしていると考えられているが, その分化様式は不明である。ヒト制御性 T 細胞はそれ自体不応答性であるにもかかわらず, どのようにして体内で増加するのであろうか?

ヒト制御性 T 細胞は図 5b に示すように, CD4 陽性 CD25 陽性細胞のなかでもメモリー表現系を有する分画であり, CD45RO 陽性または CD45RA (ナイーブ表現系) 陰性で CD4 陽性 CD25 強陽性 (CD45RA⁻ CD25^{high+}) の細胞に相当する。一方, 図 5a が示す細胞は,

図4 FOXP 3 : 制御性 T 細胞のマスター・コントロール遺伝子

免疫寛容の患者の末梢血の単核球と CD4 陽性細胞の FOXP 3 の発現がリアルタイム PCR にて検討された。免疫寛容の患者 FOXP 3 の発現は末梢血を調べる限り, 単核球のレベルでも CD4 陽性細胞のレベルでも, 健常人に比べて上昇していなかった。

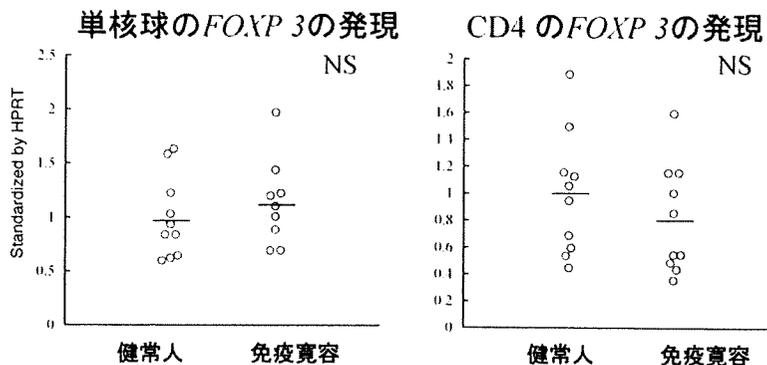
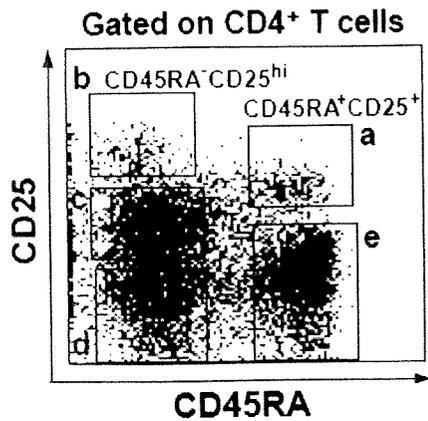


図5 制御性T細胞 (Tregs) はメモリー表現系を有する

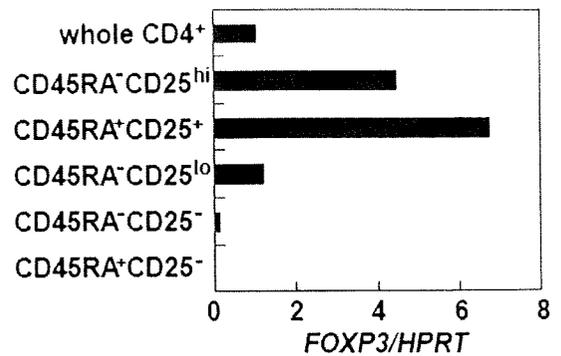


CD4でゲートした細胞をCD25とCD45RAで展開したフローサイトメータの図。bに示されるCD45RA陰性CD25強陽性の細胞(CD45RA⁻CD25^{hi})が制御性T細胞とされている。aに示されるCD45RA陽性CD25陽性細胞(CD45RA⁺CD25⁺)とは明確に区別される。

CD45RA (ナイーブ表現系) が陽性でCD4陽性CD25陽性(CD45RA⁺CD25⁺)で制御性T細胞(CD45RA⁻CD25^{hi})とは異なる⁹⁾。われわれは、図6に示すようにCD45RA⁺CD25⁺細胞もまた、CD45RA⁻CD25^{hi}細胞と同じくFOXP3を強発現している事実を突き止め、この細胞の性質を詳細に調べた。

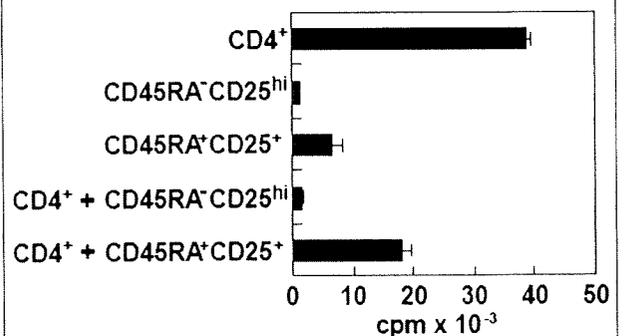
図7に示すようにCD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞とは異なり、CD45RA⁺CD25⁺細胞はアロ抗原の刺激により弱いながらも増殖活性を示した。また、全CD4⁺細胞の増殖に弱い抑制効果を示した。CD45RA⁻CD25⁺細胞はアロ抗原の存在下にIL-2を添加すると強い増殖を示し、40日の間に100倍以上に増加した。CD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞とCD45RA⁺CD25⁺細胞をそれぞれHLA-A2⁺/A24⁻、HLA-A2⁻/A24⁺の異なる2名の健常人から分離して1:1に混合してCD3・CD28抗体の刺激下にIL-2を添加して14日間培養したところ図8に示すようにCD45RA⁻CD25⁺細胞のみ増殖し、CD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞は増殖しなかった。図9に示すようにCD45RA⁺CD25⁺細胞は増殖の後では、不応答性ととも増殖に際して刺激に用いた、アロ抗原に特異的な強い免疫抑制効果を獲得した。また、増殖した細胞株のフェノタイプはCD45RO陽性であった。図10に示すように小児の健常人にお

図6 CD45RA⁺CD25⁺細胞はFOXP3を強発現する



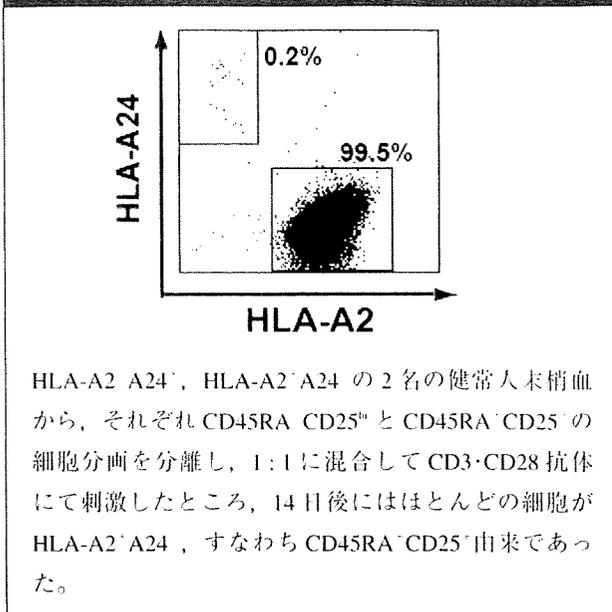
CD45RA陽性CD25陽性細胞(CD45RA⁺CD25⁺)は制御性T細胞として認識されている分画であるCD45RA陰性CD25強陽性の細胞(CD45RA⁻CD25^{hi})とは表現系が異なるが、CD45RA陰性CD25弱陽性(CD45RA⁻CD25^{lo}、図5c)、CD45RA陰性CD25陰性(CD45RA⁻CD25⁻、図5d)、CD45RA陽性CD25陰性(CD45RA⁺CD25⁻、図5e)と比較して強いFOXP3の発現を認める。

図7 CD45RA⁺CD25⁺細胞は不応答性でもなく、強い免疫抑制能もない



CD45RA陽性CD25陽性細胞(CD45RA⁺CD25⁺)は制御性T細胞として認識されている分画であるCD45RA陰性CD25強陽性の細胞(CD45RA⁻CD25^{hi})が不応答性である(図上から2つ目のバー)のとは異なり、弱いながらもアロ抗原の刺激により増殖する(図上から3つ目のバー)。CD45RA⁻CD25^{hi}はCD4⁺の増殖(図上から1つ目のバー)を強く抑制する(図上から4つ目のバー)。一方、CD45RA⁻CD25⁺のCD4⁺に対する抑制は弱い(図上から5つ目のバー)。

図8 CD45 RA⁺CD25⁺ cells は増殖する能力を持つが、制御性T細胞は増殖しない



いて CD4⁺細胞のなかの CD45RA⁺CD25⁺細胞の割合は CD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞に比べて多い。CD45RA⁻CD25^{hi}細胞の割合は年齢とともに徐々に減少し、一方、CD45RA⁺CD25⁺制御性T細胞は増加するので、成人においては CD45RA⁺CD25⁺細胞の割合と CD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞の割合は逆転する。これらの事実よりわれわれは、CD45RA⁺CD25⁺細胞を CD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞の前駆体と位置づけた。CD45RA⁺CD25⁺細胞は年齢とともに各種アロ、セルフ抗原に暴露する過程で、CD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞へ分化するものと予想される。

この仮説が正しければ、CD45RA⁺CD25⁺細胞は一旦 CD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞に移行すれば、増殖を示さないことから、CD45RA⁻CD25^{hi}制御性T細胞そのものではなく CD45RA⁺CD25⁺細胞（制御性T細胞の前駆体）をターゲットに制御性T細胞の製造・増殖を行うべきである。このようにして、われわれは制御性T細胞の前駆細胞を用いて、ヒトの制御性T細胞を分化・増殖させる培養系を確立した¹⁰⁾。すでに、坂口らにより、マウスの系では制御性T細胞を試験管のなかでドナーの抗原に特異的に免疫を制御するかたちで増殖させ再度体内に移入する細胞養子免疫により異系の皮膚移植の生着を延長しうることが示された¹¹⁾。今回の、ヒトの制御性T細胞の培養系の確立により、細胞養子免疫のヒトへの応用が現実的となった。また、この培養系は、その上清に、免疫抑制

図9 CD45 RA⁺CD25⁺細胞は培養により不応答性および強い抗原特異的免疫抑制能を獲得する

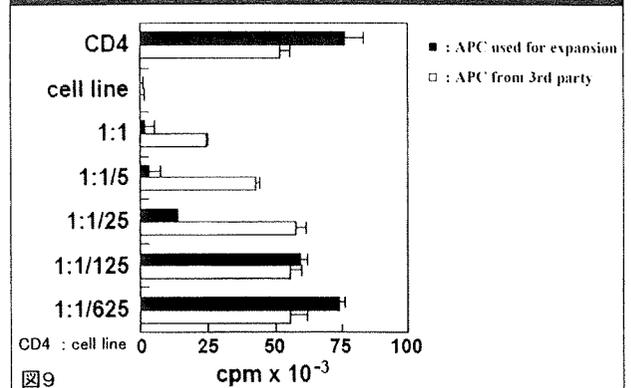
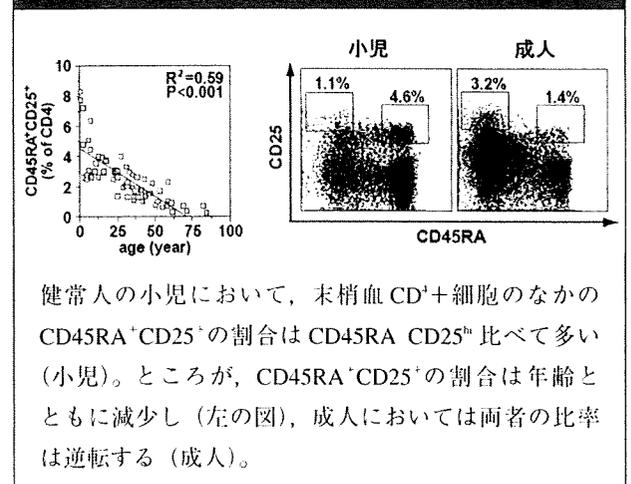


図9

CD45RA⁺CD25⁺は培養後、それ自体不応答となり（上から2番目; cell line）、培養に用いたアロ抗原に特異的な免疫抑制を示す。CD4⁺細胞とアロ抗原との培養により得られた細胞 (cell line) を 1:1, 1:1/5, 1:1/25, 1:1/125, 1:1/625 と、混合する培養細胞 (cell line) の割合を徐々に減らし培養に用いた抗原と、3rdパーティの抗原に対する増殖を調べた。3rdパーティに対しては、1:1/25の段階で、CD4⁺細胞に対する cell line の抑制が解除される(□)が、アロ抗原に対しては、1:1/125の段階で抑制の解除が見られる(■)。

図10 CD45 RA⁺CD25⁺細胞の割合は年齢とともに減少する



健常人の小児において、末梢血 CD4⁺細胞のなかの CD45RA⁺CD25⁺の割合は CD45RA⁻CD25^{hi} 比べて多い(小児)。ところが、CD45RA⁺CD25⁺の割合は年齢とともに減少し(左の図)、成人においては両者の比率は逆転する(成人)。

剤を添加して、その制御性T細胞に対する分化・増殖促進効果を確認することで、制御性T細胞の分化・増殖に最適化された免疫抑制剤のレジメンを考案するスクリーニング系としての用途が大きい。さらに、スクリーニングの範囲を新規の薬剤にまで広げれば、制御性T細胞の誘導・増殖を促す画期的な薬剤の開発へとつながる可能性がある。

われわれは、小児の生体肝移植の患者の末梢血の CD45RA⁺CD25⁻細胞と CD45RA⁻CD25^{high}+制御性T細胞の割合の移植前後における時間的な変化を調べた。図 11 に示すように小児の健常人と同様に術前、術早期（1カ月、3カ月）の小児の生体肝移植の患者の末梢血においては CD45RA⁺CD25⁻細胞は CD45RA⁻CD25^{high}+制御性T細胞に比べて多い。しかし、CD45RA⁺CD25⁻細胞の割合は、術後6カ月の時点では減少して、その後 CD45RA⁻CD25^{high}+制御性T細胞の割合と同程度となる。これらの事実から、肝移植においては巨大なアロ抗原（移植肝）の存在下に術後6カ月以内に急速に制御性T細胞の前駆体である CD45RA⁺CD25⁻細胞が、CD45RA⁻CD25^{high}+制御性T細胞に分化すると予想される。一旦 CD45RA⁻CD25^{high}+制御性T細胞に分化すると不応答性となってしまふ。このことを考慮すると、制御性T細胞が体内ですできるだけ効率よく増殖するためには、増殖力を持つ CD45RA⁺CD25⁻細胞が分化するまでのあいだに、CD45RA⁺CD25⁻細胞が増殖するに最適化された免疫抑制剤が投与されることが肝要である。CD45RA⁺CD25⁻細胞の増殖がIL-2に依存することを考えると、術後早期にIL-2の産生を強力に抑制するカルシニューリンインヒビターの

使用は制御性T細胞による免疫寛容の成立を妨げる可能性が否定できない¹⁰⁾。

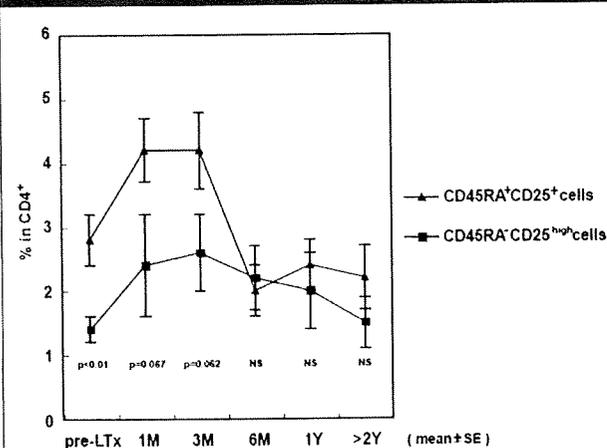
謝 辞

以下の共同研究者に感謝の意を表します。伊藤淳（京都大学大学院医学研究科先端領域融合医学研究機構）、坂口志文（京都大学再生医科学研究所生体機能調節学分野・教授）

文 献

- 1) 小柴貴明, 李 穎, 吉澤 淳, 他. クリニカルトピックス 生体肝移植と免疫寛容. *Bio Clinica* 2003; 18: 1296-1301.
- 2) Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y, *et al.* Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation* 2001; 72: 449-454.
- 3) Yoshizawa A, Fujimoto Y, Takada Y, *et al.* Living donor liver transplantation between identical twins for HCV liver cirrhosis: 2 cases report. *Transplantation* 2004; 78 (Suppl 1): 363-364.
- 4) Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 199-210.
- 5) Li Y, Koshiba T, Yoshizawa A, *et al.* Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 2118-2125.
- 6) Yoshizawa A, Ito A, Li Y, *et al.* The roles of CD25+CD4+ regulatory T cells in operational tolerance after living donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 37-39.
- 7) Yoshizawa A, Itoh A, Koshiba T, *et al.* The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in operational tolerance after living donor liver transplantation. *Transplantation* 2004; 78(Suppl 1): 70.
- 8) Sakaguchi S. Naturally arising Foxp 3-expressing CD 25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-352.
- 9) Yagi H, Nomura T, Nakamura K, *et al.* Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004; 16: 1643-1656.
- 10) Ito A, Yoshitomi M, Narumoto M, *et al.* FOXP3+CD

図 11 小児生体肝移植後、CD45RA⁺CD25⁻細胞と CD45RA⁻CD25^{high}+Tregs の割合の変化



健常人の小児と同様に、生体肝移植を受ける小児の術前の末梢血 CD4⁺細胞のなかの CD45RA⁺CD25⁻の割合は CD45RA⁻CD25^{high}+に比べて多い。この傾向は、術後3カ月まで見られるが、術後6カ月の時点で CD45RA⁺CD25⁻の割合は減少し、CD45RA⁻CD25^{high}+との差がなくなる。それ以後、両者の割合に差を認めない。

45RA+CD25+CD4+ T cells in human peripheral blood as precursor regulatory T cells. Am J Transplant (Submitted).

11) Nishimura E, Sakihama T, Setoguchi R, *et al.* Induc-

tion of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. Int Immunol 2004; 16: 1189-1201.

