

20102303/A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

抑制性 T 細胞類似の細胞による免疫寛容誘導の試み

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 寺岡 慧

平成 23 (2011) 年 5 月

目 次

I.	総括研究報告書	
	抑制性 T 細胞類似の細胞による免疫寛容誘導の試み ……………	3
II.	分担研究報告書	
	1. 抑制性 T 細胞類似の細胞による免疫寛容誘導の試み ……	19
	奥村 康	
	2. 分子レベルでの研究 ……………	20
	清野 研一郎	
	3. 細胞レベルでの免疫学的研究 ……………	21
	垣生 園子	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 ……………	23
IV.	研究成果の刊行物・別刷 ……………	27

I. 総括研究報告書

抑制性 T 細胞類似の細胞による免疫寛容誘導の試み

研究代表者 寺岡 慧 国際医療福祉大学熱海病院 病院長・移植外科教授

研究要旨 我々は自己リンパ球由来の調節性 T 細胞様の細胞を生体外で誘導し、この細胞を腎移植後のアカゲサルに移入することにより、移植医療における究極の目標である免疫寛容を導入することに成功した。具体的にはアカゲサルの実験的腎移植モデルにおいて、レシピエントの T リンパ球とドナーの抗原提示細胞を、抗 CD80/ CD86 抗体の存在下に 14 日間混合培養して強い免疫抑制活性を有する CD4+CD25+CTLA4+調節性 T 細胞様細胞を誘導し、この細胞を腎移植後レシピエントサルに移入することにより、ドナー特異的免疫寛容を誘導することに成功した (J Clin Invest, 2005)。サルを用いた臓器移植において免疫寛容状態を誘導する手法は、我々の提唱したもの以外には世界でもきわめて限られている。その後ヒトリンパ球においても CD4+CD25+CTLA4+Foxp3+リンパ球 (TReg) を誘導することに成功し、このリンパ球がドナー特異的、かつ容量依存性にリンパ球混合培養 (MLR) を抑制することが明らかとなった (平成 21 年度度総括研究報告書)。

我々の研究は、このレシピエント自己リンパ球から誘導されたドナー抗原特異的調節性 T 細胞 (donor-specific regulatory T cell, DS-TReg) を腎移植レシピエントに投与することによりドナー特異的免疫寛容の導入を試みるものである。ドナー特異的免疫寛容が誘導されたか否かの確認は、ドナー抗原に対する MLR が第三者に対する MLR (D/3rdP MLR) に比して十分に低いことを確認した上で免疫抑制薬を減量し、最終的に免疫抑制薬を中止することによって確認する。この過程において、血清クレアチニン値、超音波ドップラー検査、リンパ球サブセット、MLR、必要に応じて移植腎生検による組織所見などを検討し、総合的に判断しつつ慎重に進めることにより患者の安全性を確保しうる。平成 23 年 3 月末の時点で、総計 13 例にこの方法を用いて腎移植を実施し、D/3rdP MLR ではドナー特異的低応答性が認められたが、免疫抑制剤の減量の過程で 12 例中 7 例に拒絶反応が発生した。全例とも治療により拒絶反応は寛解したが、今後完全な免疫抑制薬の中止を目指すには、同種移植抗原移入時において免疫記憶を抑制しうる何らかのプロトコールの変更が必要と考えられた。検討の結果、導入時に抗ヒト胸腺細胞ウサギ抗体および rituximab を追加することとし、新たなプロトコールのもとで本プロジェクトを遂行する予定である。

研究分担者

奥村 康 順天堂大学アトピーセンター長

垣生園子 順天堂大学免疫学教授

清野研一郎 北海道大学遺伝子病制御研究所
病態研究部門免疫生物分野教授

研究協力者

小山一郎 東京女子医科大学腎臓外科助教

A. 研究目的

レシピエント T リンパ球とドナー抗原定時細胞を抗 CD80/86 抗体存在下に混合培養し、CD4+CD25+CTLA-4+Foxp3+ドナー特異的調節性 T 細胞 (DS-TReg) を誘導し、

これらの細胞を腎移植後のレシピエントに投与してドナー特異的免疫寛容の導入を試みる。

B. 研究方法

1. インフォームド・コンセントの取得

本法による腎移植の実施に関して、その概要、合併症、危険性、長期予後などを十分に説明して、書面による同意を得た。

2. 対象患者

平成 23 年 3 月末までに、インフォームド・コンセントが得られた 13 例の患者に本法による腎移植を実施した。13 例の内 1 例は腎移植後 2 ヶ月で肺塞栓を併発したため、その後は標準的な免疫抑制法に切り替え、本試験から除外した。12 例のレシピエントの年齢、性別、移植年月日、原疾患、透析期間、ドナーとの続柄、血液型、HLA ミスマッチ抗原数を表 1 に示す。

3. リンパ球採取とリンパ球混合培養

腎移植予定日の 2 日前にドナー、レシピエント双方に lymphocytapheresis を行い、それぞれ 1×10^{10} 個、 5×10^9 個のリンパ球を得た。得られたそれぞれのリンパ球をカルチャーバッグ (87-301A-100N) に入れ、ドナーリンパ球に 30Gy の放射線を照射した。以下のドナーおよびレシピエントリンパ球浮遊液の調整は東京女子医科大学 Cell Processing Unit (CPU) 内で行った。

リンパ球比重分離液の上に、採取したレシピエントリンパ球を重層させ、2000rpm、20 分間遠心した。中間層に貯まったレシピエントリンパ球分画を採取して、ALyS505N 液で洗浄後 10% 血清加 ALyS505N 液に suspend し、10% 血清加 ALyS505N 液をナイロンウールに通過させ、レシピエント

T リンパ球を分離採取し細胞数をカウントした。レシピエント T リンパ球をカルチャーバッグ (87-301A-100N) 内の ALyS505N 液 1000mL に suspend し、血清 15mL および抗 CD80 抗体 (2D10) 15mg、抗 CD86 抗体 (IT2.2) 15mg を添加した。

採取後放射線照射 (30Gy) したドナーリンパ球をリンパ球比重分離液の上に重層させ、2000rpm、20 分間遠心した。中間層に貯まった分画を採取し、ALyS505N 液で洗浄した後に ALyS505N 液 500mL に suspend し、これを上記のカルチャーバッグ内に注入して、レシピエント T リンパ球と 37°C インキュベーターで 1 週間混合培養した。

培養開始 1 週間後、カルチャーバッグから培養リンパ球を回収して、ALyS505N 液で洗浄し細胞数をカウントした。この際死細胞が多い場合は、リンパ球比重分離法により死細胞を除去した。こうして得られた培養リンパ球を ALyS505N 液 1000mL に suspend し、カルチャーバッグ内に注入した。

同時に初回の lymphocytapheresis の 1 週間後に、再度 lymphocytapheresis を行いドナー末梢血から 5×10^9 個のリンパ球を採取し、カルチャーバッグに注入して 2500rad の放射線照射後、CPU に搬送した。

すでに述べた同様の方法で、上記のドナーリンパ球を比重遠心分離し、中間層の分画を採取して洗浄後 ALyS505N 液 500mL に suspend した。このドナーリンパ球浮遊液に血清 10mL、抗 CD80 抗体 10mg、抗 CD86 抗体 10mg を添加し、上記の培養リンパ球浮遊液の入ったカルチャーバッグ内に注入後、37°C インキュベーターでさらに

1 週間混合培養した。

4. 腎移植と免疫抑制法

ドナーから腹腔鏡下腎摘術で摘出された腎臓を、レシピエント腸骨窩に所定の方法で移植した。症例 1~9 までは同時に脾摘を行った。症例 10~12 については脾摘を行わなかった。

免疫抑制法については移植前 2 日から cyclosporine (CsA) 8mg/kg/日、mycophenolate mofetil (MMF) 2000mg/日の投与を開始し、移植当日より同量の CsA および MMF を継続しつつ、methylprednisolone (MPS) 500mg/日の経口投与を開始した。抗 CD25 受容体 α 鎖に対する単抗体である basiliximab は使用しなかった。症例 10~12 については脾摘を行わなかったため、移植の 2 日前に rituximab 200mg を約 1 時間で静脈内投与した。

MPS は急速に減量して移植後 7 日目で 20mg/日とし、以後 20mg/日 3 日間、16mg/日 3 日間、12mg/日 3 日間投与した後に 8mg/日で 1 ヶ月間維持した。その後は後に詳述するリンパ球混合反応 (MLR) の低下を確認しつつ漸減した。

CsA については連日血中濃度を測定し、移植後 3 ヶ月間は trough level (Co) を 150~300ng/mL の範囲内に維持するよう投与量を調節した。その後は MLR の低下を確認しつつ漸減した。

MMF については移植後 1 ヶ月間は 2000mg/日で維持し、その後 2 週毎に 250mg ずつ減量し、移植後 2 ヶ月半で 1000mg/日とし、以後 1000mg/日で維持した。その後は MLR の低下を確認しつつ漸減した。

腎移植後 6 日目から cyclophosphamide

(CPA) 25~30mg/kg/日を 3 日間静脈内投与し、末梢血リンパ球数を連日測定した。

CPA 投与後、末梢血中白血球数が 1500/mm³ 以下、好中球数が 1000/mm³ 以下となった場合は、granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) を投与した。

5. 培養リンパ球の輸注

2 週間培養したリンパ球をカルチャーバッグから回収し、生理食塩水で 2 回洗浄し、細胞数をカウントした。死細胞が多い場合はリンパ球比重分離法で除去し、生理的食塩水でさらに 2 回洗浄した後に細胞数をカウントした。同時に培養液の一部を採取してエンドトキシン定性試験で陰性であることを確認した。

上記で得られた培養リンパ球を生理的食塩水 100mL に suspend し、輸血用フィルターを通してレシピエントに静脈内投与した。投与に際しては、レシピエントの vital sign を経時的に観察し、発熱、悪寒戦慄、血圧低下などの症状が出現した場合は直ちに投与を中止することとした。

12 症例における CPA 投与日および投与量、培養リンパ球輸注日および輸注細胞数を表 2 に示す。

6. 免疫学的モニタリング

(1)混合リンパ球反応 (MLR) の実施

腎移植前および腎移植後経時的に、ドナーリンパ球、または 3rd party のリンパ球を stimulator とし、レシピエントリンパ球を responder として、所定の方法で混合リンパ球反応 (MLR) を実施し、それぞれの stimulation index (SI) を算出した (それぞれ MLR 1way DmR SI, MLR 1way 3rd PmR SI)。レシピエントリンパ球の対ドナーリンパ球反応性 (MLR 1way DmR SI)、

ならびに対 3rd party リンパ球反応性 (MLR 1way 3rd PmR SI) の比 (D/3rdP MLR SI 比) を算出した。

(2) 末梢血リンパ球サブセット

移植前および移植後経時的に、抗 CD4 単抗体、抗 CD25 単抗体、抗 CTLA-4 単抗体、抗 Foxp3 単抗体、抗 CD95 単抗体、抗 granzyme 単抗体を用いて Flow cytometry 法 (FCM) による末梢血リンパ球サブセットを検査し、CD4、CD25、CTLA-4、Foxp3、CD95、granzyme 陽性細胞数を測定した。

(3) リンパ球交差試験および抗 HLA 抗体の検出

移植前および移植後経時的に、complement-dependent cytotoxicity (CDC) 法および FCM 法によりドナー T、B リンパ球に対するレシピエント血中抗体の検出、ならびに FlowPRA Screening Test キットおよび FlowPRA Single Antigen キットを用いて FCM 法による panel reactive antibody (PRA) の検出を行った。

7. 免疫抑制薬の減量

移植後経時的に MLR を実施し、D/3rdP MLR SI 比の低下が得られた場合は、まず MPS および CsA を、ついで MMF を漸減した。

8. 拒絶反応の診断と治療

通常の方法により拒絶反応をモニターし、拒絶反応が疑われた場合は移植腎生検を行い、診断が確定した場合は MPS パルス療法を行い、免疫抑制薬の減量を中止することとした。

9. 副作用および合併症

腎移植に付随する重篤な合併症、培養リンパ球輸注に伴う副作用の出現時には、直ちに本試験を中止し、標準的な腎移植後の

免疫抑制法に切り替えることとし、解析対象から除外した。

腎移植後 2 ヶ月目に肺塞栓を併発した症例については、以後は標準的な免疫抑制法に切り替え本試験から除外したため、解析対象から除外した。

C. 研究結果

移植後 68 日目に肺塞栓を併発した症例については、D/3rdP MLR SI 比の低下が得られ、移植腎機能自体も血清クレアチニン値 (sCr) 0.56mg/dL と良好であったが、本試験の継続を断念し、解析対象から除外した。

症例 4 は移植前に continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) で維持されていたことによる腹水貯留のため、症例 7 は移植後の急性尿細管壊死 (ATN) のため、症例 9 は脾摘後の膈液瘻のため CPA 投与をそれぞれ術後 11~13 日目、術後 26~27 日目、術後 14~15 日目に遅らせ、それに伴って培養リンパ球輸注日をそれぞれ術後 19 日目、術後 33 日目、術後 21 日目に遅らせた (表 2)。したがってドナー・レシピエントのリンパ球の混合培養の期間がそれぞれ 21 日間、35 日間、23 日間となった。

CPA 投与の副作用としては脱毛、白血球減少が認められ、全例に G-CSF の投与を要している。培養リンパ球の輸注時の発熱、悪寒戦慄、血圧低下などはいっさい認められなかった。

本試験を継続した全 12 症例において移植腎は生着しており、症例 9 を除く 11 症例において D/3rdP MLR SI の低下 (ドナー特異的免疫学的低応答性) が得られた (表 3)。12 症例のうち 4 例 (症例 1、2、5、9) に

移植後抗 HLA 抗体が認められ (抗 class I 抗体が 1 例、抗 class II 抗体が 3 例)、そのうち 1 例はドナー特異的抗体 (DSA) であった (表 3)。

培養リンパ球の輸注後、D/3rdP MLR SI 比の低下を確認しつつ免疫抑制薬の減量を行った。症例 1 と症例 7 については配偶者間の移植であるため (HLA 抗原ミスマッチ数はそれぞれ 6、3 抗原)、D/3rdP MLR SI 比の低下は認められているが、免疫抑制薬の減量を比較的慎重に行った。また症例 9 においても、D/3rdP MLR SI 比の低下が認められなかったため免疫抑制薬の減量は慎重に行った。

全 12 症例の不適合 HLA 抗原数、D/3rdP MLR SI、抗 HLA 抗体の有無、血清クレアチニン値、(最小値および最新値)、最少免疫抑制薬投与量を表 3 に示す。2 例において少量 CsA のみ (10mg/日単独、25mg/日単独)、6 例において低容量 CsA および MMF のみ (20mg/125mg、25mg/250mg、35mg/250mg、35mg/500mg、75mg/500mg、100mg/500mg : いずれも 1 日投与量) まで減量を行った。

12 例中 11 例に移植腎生検を行ったが、そのうち 7 例において biopsy-proven acute rejection (BPAR) が認められた。BPAR の 7 例のうち、IIB が 2 例、IIA が 1 例、IA が 4 例 (いずれも cellular type) であった。7 例全例に MPS パルス療法を行い、IIA の 1 例 (症例 5) および IIB の 1 例 (症例 10) に対しては muromonab CD3 (OKT3) も併せて投与した。その他 3 例に borderline change が認められたが、いずれも治療を要しなかった (表 3)。

免疫抑制薬の投与量と BPAR との関連に

ついては、CsA 10mg/日のみ (症例 8、307 日目)、CsA 25mg/日のみ (症例 3、330 日目)、CsA 20mg/日および MMF 125mg/日 (症例 5、378 日目)、CsA 25mg/日および MMF 250mg/日 (症例 1、302 日目)、CsA 35mg/日および MMF 250mg/日 (症例 6、335 日目)、CsA 125mg/日、MMF 500mg/日および MP 2mg/日 (症例 4、220 日目)、CsA 225mg/日、MMF 2000mg/日および MP 8mg/日 (症例 10、14 日目) であった (表 3、図 1,2)。

抗 HLA 抗体陽性例 4 例のうち 2 例 (50%) が BPAR を発症 (IIB が 2 例、他は IA) したが、他の 2 例は borderline change であった。抗 HLA 抗体陰性例 7 例のうち 5 例 (71.4%) が BPAR を発症 (IIB が 1 例、IA が 4 例) し、他は borderline change が 1 例、異常所見なしが 1 例であった。IIB で治療に OKT3 投与を要した 1 例は DSA 陽性例であった。

また D/3rdP MLR SI 比 0.1 未満 (ドナーに対する反応性が 3rd party に対する反応性の 1/10 未満に抑制されている) の 7 例のうち 5 例 (71.4%) に BPAR が認められたが、それ以外の症例では 2 例 (40%) に BPAR が認められた。

BPAR を発症した症例については、全例とも治療により速やかに移植腎機能の改善が得られた。治療による改善後、免疫抑制薬を増量し、全例とも移植腎は生着中である。

全 12 症例、および同時期に標準的な免疫抑制法 (basiliximab、CsA、MMF および MPS) により実施された血液型適合者間腎移植における移植後 3、6、9、12、15 および 18 ヶ月における CsA の平均投与量、

MMF の平均投与量をそれぞれ図 3、4 に示す。移植後どの時期においても、本研究群（培養リンパ球注入群）における CsA および MMF の平均投与量は、標準的治療法によるそれと比較して少量であった。本研究群における移植後 3、6、9、12、15 および 18 ヶ月における CsA の平均投与量は標準的治療群のそれぞれのそれぞれ、90.4、67.9、49.0、40.3、59.1、51.2% であった。それぞれの時期における本研究群の MMF の平均投与量は標準的治療群の、74.1、50.9、37.0、45.6、56.1 および 51.0% であった。

D. 考察

腎移植におけるドナー特異的免疫寛容の導入を目的として、レシピエント T リンパ球とドナー抗原提示細胞を抗 CD80/86 抗体の存在下に混合培養し、MLR をドナー特異的かつ容量依存性に抑制する CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺Foxp3⁺細胞(DS-TReg) を誘導して、これを腎移植レシピエントに静脈内投与した。

移植前および移植後経時的に、ドナーおよび 3rd party のリンパ球を stimulator とし、レシピエントリンパ球を responder としてそれぞれ MLR を行った。レシピエントリンパ球のドナーリンパ球に対する反応性 (MLR 1way DmR SI) が、3rd party のリンパ球に対する反応性に比して低下していること (D/3rdP MLR SI 比の低下) を確認することによって、ドナー特異的免疫学的低応答性が誘導されたか否かを検討し、これを確認しつつ免疫抑制薬の減量を行った。

症例 4、7 および 9 において培養リンパ球の輸注がそれぞれ移植後 19、33 および 21

日目に行われ、結果として培養期間がそれぞれ 21 日間、35 日間、23 日間となり、輸注細胞数はそれぞれ $0.8 \times 10^9/\text{mm}^3$ 、 $0.075 \times 10^9/\text{mm}^3$ 、 $0.3 \times 10^9/\text{mm}^3$ であり、培養期間が延長するにつれて、培養細胞数は減少した。とくに培養期間が 21 日を超えた症例 7 および症例 9 においては、培養細胞数は $0.3 \times 10^9/\text{mm}^3$ 以下であった。このことより今回の方法では培養期間は 21 日以内が限界であり、それ以上となると培養細胞が減少すると考えられた。

6 抗原ミスマッチ (MM) の 1 例 (配偶者間)、3MM の 1 例、1MM の 2 例の計 4 例に、移植後、抗 HLA 抗体を認めた。class I 抗体が 1 例、class II 抗体が 3 例であり、そのうち 1 例 (症例 5) はドナー特異的抗体 (DSA) であった。

移植後抗 HLA 抗体の産生は、DS-TReg の注入が移植後 12~33 日後であるという本プロトコール自体に起因するものと考えられた。すなわち、移植から DS-TReg の注入によるドナー特異的な免疫応答抑制が得られるまでの期間における免疫抑制が不十分であり、その間に感作が成立してメモリー細胞が産生されることが原因と推察された。本プロトコールでは注入する DS-TReg に対する影響を考慮して、導入期に basiliximab 投与を行っていないが、今後 basiliximab に代わる、そして DS-TReg に影響しない、何らかの抗体製剤の併用が必要と考えられた。

症例 10 において移植後 16 日目において、まだ免疫抑制薬が減量されていないにもかかわらず BPAR (IIB、mixed type) が発生した事実もこのことを裏付けていると考えられた。

D/3rdP MLR SI 比が低下しているにもかかわらず免疫抑制薬の減量過程で BPAR を併発したことは、D/3rdP MLR SI 比がドナー移植抗原に対するレシピエントのドナー特異的応答性の一定の低下を意味するものの、免疫抑制薬から完全に離脱できるほどの低下を意味するものではないことを示していると考えられる。

また投与したドナー抗原特異的調節性 T 細胞 (DS-TReg) の量が不足している、あるいは同種拒絶反応を完全に制御するにはその制御能が不十分である可能性が考えられる。さらに投与した DS-TReg の制御能の持続期間の問題も推定される。すなわち治療を要した拒絶反応の発生時期は、移植後 16 日目 (DS-TReg 投与直後) の 1 例を除いて移植後 220~378 日であり、DS-TReg の制御能が持続しえなかった可能性も否定できない。

BPAR の発症と投与された DS-TReg 投与量との関係については、輸注細胞数 $1.0 \times 10^9 / \text{mm}^3$ 以上の 6 例中 3 例 (50%) に BPAR が発生し、 $1.0 \times 10^9 / \text{mm}^3$ 以下の 5 例中 3 例 (60%) に発生しており (移植後 16 日目、すなわち DS-TReg 投与後 2 日目に BPAR が発生した症例 10 は除く)、輸注細胞数と BPAR の発生頻度には有意な差は認められなかった。

免疫抑制薬と BPAR の発生との関係については、CsA 低容量 (10~25mg/日) 単独 (移植後 307~330 日) においては 2 例中 2 例 (不適合抗原数 2 抗原)、低容量 CsA (20~35mg/日) および低容量 MMF (125~250mg/日) の 4 例中 3 例 (不適合抗原数 3~6 抗原) においては BPAR が発生したが (移植後 302~378 日)、他の 1 例 (不適合

抗原数 1 抗原) においては BPAR は発生していない。上記の結果は免疫抑制薬投与量と不適合抗原数が BPAR の発生に関係していることを示唆していると推定される。症例数が少ないため、今後さらに検討が必要である。

症例 9 を除いて D/3rdP MLR SI 比が経過と共に低下しており、免疫抑制薬投与量を一定程度減量できていることから、DS-Treg 輸注については、同種移植抗原に対する患者の反応性を長期にわたり抑制しうるが、完全に免疫抑制薬の中止するほどの抑制効果を得るには不十分であると推定された。

また DS-Treg 輸注が移植後 12~33 日であるため、ドナー同種移植抗原による感作は成立しており、DS-Treg 輸注時にはすでにドナー同種移植抗原反応性のメモリー T および B 細胞が産生されており、これらが免疫抑制薬の減量の過程で、DS-Treg の制御能を上回ったため拒絶反応が惹起されたと推定された。

今後の課題として、上記の DS-Treg 輸注前のメモリー T および B 細胞の産生を抑制することが必要と考えられ、導入期の免疫抑制レジメンの再検討が必要と考えられた。

種々のプロトコールを検討した結果、今後の症例については導入時に抗ヒト胸腺細胞ウサギ抗体 (rATG) および少量の rituximab の投与を予定している。

rATG は主として末梢血及び末梢リンパ組織 (脾臓、リンパ節、腸管リンパ組織など) における T 細胞を強力に抑制するが、胸腺中の T 細胞を抑制せず、Treg の産生は抑制しないとされている。また移植時の同種移植抗原に対する感作は末梢リンパ組織、

とくに脾臓を場として成立するとされており、この意味でも有用と考えられる。また rATG 投与により 1~2 週間、末梢血リンパ級数が減少することから、rATG の投与により CPA 投与を省略することが可能と考えられる。さらに 1 例において DS-Treg 輸注後 4 日目の移植後 16 日目に拒絶反応を発生しており (症例 10)、この症例については導入時の免疫抑制が不十分であったと考えられることから、この点でも rATG の投与は有効と考えられる。

rituximab は CD20 に対するモノクローナル抗体であり、投与後 6 ヶ月以上にわたり末梢血およびリンパ組織における B 細胞を抑制する。したがって rituximab 投与により、移植後早期のメモリー B 細胞の産生を抑制しうるのではないかと考えられる。

E. 結論

抗 CD80/86 抗体存在下にレシピエント T リンパ球とドナー抗原提示細胞の混合培養を行って得られた培養細胞の phenotype は、CD4+CD25+CTLA-4+Foxp3+であり、ドナーとレシピエントの間の MLC を特異的、かつ容量依存性に抑制した。腎移植におけるドナー特異的免疫寛容の導入を目的として、この培養細胞 (DS-Treg 細胞) を腎移植後にレシピエントに輸注した。

経時的にドナーおよび 3rd party とレシピエントリンパ球とで MLR を行い、D/3rd party SI 比の低下を確認し、ドナー特異的に免疫応答性の低下を誘導することが可能であった。

DS-Treg 細胞の輸注により、免疫抑制薬の減量が可能であったが、免疫抑制薬の減量中に 7 例において拒絶反応が発生し、本

法によりドナー特異的な免疫応答の抑制が得られ、免疫抑制薬の減量は可能であるが、完全な免疫抑制薬の中止は困難であると考えられた。

その原因として導入期の免疫抑制が不十分であり、輸注された DS-Treg 細胞によりドナー特異的な低応答性が得られるまでの期間中にメモリー細胞が産生され、これが拒絶反応を惹起する要因ではないかと推察された。

今後は導入時の免疫抑制レジメンに rATG および rituximab を追加し、さらに検討を続けてゆく予定である。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 我が国における臓器移植の現状と課題.
寺岡 慧. 日本臨床. 68: 2173-85. 2010
- 2) Islet transplantation using donors after cardiac death: report of the Japan Islet Transplantation Registry.
Saito T, Gotoh M, Satomi S, Uemoto S, Kenmochi T, Itoh T, Kuroda Y, Yasunami Y, Matsumoto S, Teraoka S; Working Members of The Japanese Pancreas and Islet Transplantation Association. Transplantation. 90: 740-7, 2010
- 3) Very low but stable glomerular filtration rate after living kidney donation: is the concept of "chronic kidney disease" applicable to kidney donors?
Kido R, Shibagaki Y, Iwadoh K, Nakajima I, Fuchinoue S, Fujita T, Teraoka S.

Clin Exp Nephrol. 14:356-62, 2010

4) Activation of the transcription factor c-Jun in acute cellular and antibody-mediated rejection after kidney transplantation.

Kobayashi A, Takahashi T, Horita S, Yamamoto I, Yamamoto H, **Teraoka S**, Tanabe K, Hosoya T, Yamaguchi Y. Hum Pathol. 41: 1682-93, 2010

5) The 5-year outcome of ABO-incompatible kidney transplantation with rituximab induction.

Fuchinoue S, Ishii Y, Sawada T, Murakami T, Iwadoh K, Sannomiya A, Koyama I, Kubota K, Tojimbara T, Nakajima I, **Teraoka S**.

Transplantation. (In press)

6) Medullary ray injury in renal allografts.

Kobayashi A, Yamamoto I, Ito S, Akioka Y, Yamamoto H, **Teraoka S**, Hattori M, Tanabe K, Hosoya T, Yamaguchi Y.

Pathol Int. (In press)

7) Renoprotective effect of erythropoietin against ischaemia-reperfusion injury in a non-human primate model.

Ishii Y, Sawada T, Murakami T, Sakuraoka Y, Shiraki T, Shimizu A, Kubota K, Fuchinoue S, **Teraoka S**.

Nephrol Dial Transplant. (In press)

8) De novo membranous nephropathy and antibody-mediated rejection in transplanted kidney.

Honda K, Horita S, Toki D, Taneda S, Nitta K, Hattori M, Tanabe K, **Teraoka S**, Oda H, Yamaguchi Y. Clin Transplant. (In press)

9) Natural history of mineral and bone disorders after living-donor kidney

transplantation: a one-year prospective observational study.

Kawarazaki H, Shibagaki Y, Fukumoto S, Kido R, Ando K, Nakajima I, Fuchinoue S, Fujita T, Fukagawa M, **Teraoka S**

Therapeutic apheresis and dialysis, 15: 481-7, 2011

10) Kidney transplantation restored uncoupled bone turnover in end stage renal disease/

Kawarazaki H, Shibagaki Y, Kido R, Nakajima I, Fuchinoue S, Ando K, Fujita T, Fukagawa M, **Teraoka S**, Fukumoto S.

Clin Nephrol. (In press)

11) Acute kidney injury as defined by the

RIFLE criteria is a risk factor for kidney transplant graft failure. Nakamura M, Seki G,

Iwadoh K, Nakajima I, Fuchinoue S, Fujita T,

Teraoka S.

Clinical transplantation, (In press)

2. 学会発表

1) 小山一郎、場集田寿、清野研一郎、中島一朗、湊之上昌平、奥村 康、**寺岡 慧**：腎臨床移植における免疫寛容導入の試み。第46回日本移植学会総会、仙台、2011年10月

2) 小山一郎、**寺岡 慧**、奥村 康：臨床腎移植における免疫寛容導入の試み。第44回日本臨床腎移植学会総会、宝塚、2011年1月

3) Koyama I, Bashuda H, Seino K, Yagi K, Fujii H, Nakajima I, Fuchinoue S, Okumura K, **Teraoka S**

Am Transplant Congress, Philadelphia,
April, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

No	年齢	性別	移植年月日	原疾患	透析期間	ドナー	血液型	HLAMM
1	46	F	2009/2/5	Mt 遺伝子異常	2y3m	夫	O→B	6
2	53	M	2009/4/9	CGN	1y2m	姉	O→AB	1
3	41	F	2009/5/21	IgA 腎症	2y7m	母	AB→AB	2
4	26	M	2009/6/18	IgA 腎症	2y5m	母	A→A	3
5	36	M	2009/7/9	CGN	7y10m	母	B→AB	3
6	47	F	2009/8/13	IgA 腎症	11m	妹	O→O	3
7	53	M	2009/9/3	IgA 腎症	17y4m	妻	A→A	3
8	34	M	2009/10/1	CGN	7y8m	父	B→B	2
9	35	M	20010/2/4	不明	9m	母	O→O	1
10	33	M	2010/5/13	腎硬化症	1y	母	A→A	0
11	28	M	2010/5/27	IgA 腎症	0	母	A→A	1
12	35	M	2010/6/24	腎硬化症	2m	父	A→A	2

表 1 患者背景とドナーおよび血液型・組織適合性

Mt : ミトコンドリア、CGN : 慢性糸球体腎炎、

HLAMM : HLA ミスマッチ抗原数

No	CPA	投与日	輸注細胞数	輸注日
1	30mg/kgx3	5,6,7	1.5×10^9	12
2	30mg/kgx3	5,6,7	1.2×10^9	12
3	25mg/kgx3	5,6,7	0.8×10^9	12
4	25mg/kgx3	11,12,13	0.8×10^9	19
5	25mg/kgx3	5,6,7	1.2×10^9	12
6	25mg/kgx3	5,6,7	1.2×10^9	12
7	25mg/kgx2	26,27	0.075×10^9	33
8	25mg/kgx3	5,6,7	0.9×10^9	12
9	25mg/kgx2	14,15	0.3×10^9	21
10	20mg/kgx2	4,5	1.0×10^9	12
11	25mg/kgx2	4,5	1.0×10^9	12
12	30mg/kgx2	4,5	1.0×10^9	12

表 2 CPA 投与と輸注培養リンパ球数および輸注日

CPA : cyclophosphamide

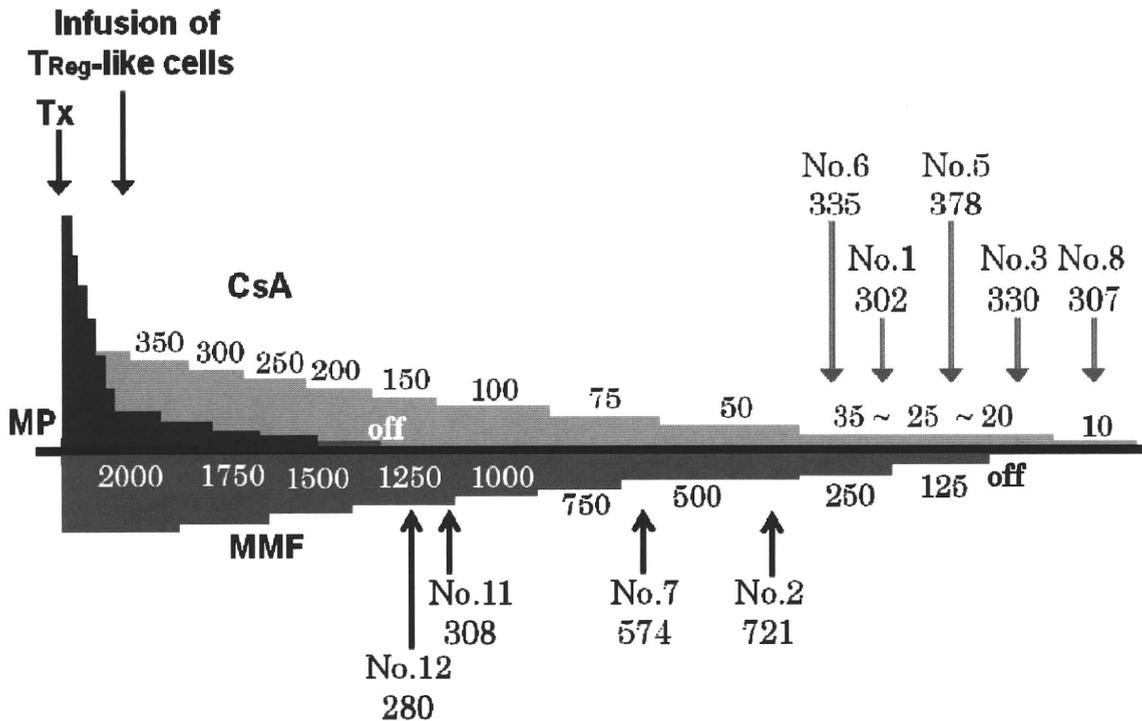


図1 免疫抑制薬投与量と拒絶反応（症例 1,2,3,5,6,7,8,11,12）

Tx：腎移植、MP：methylprednisolone、CsA：cyclosporine、MMF：mycophenolate mofetil

↓：拒絶反応（）内は移植後日数 ↑：拒絶反応なし

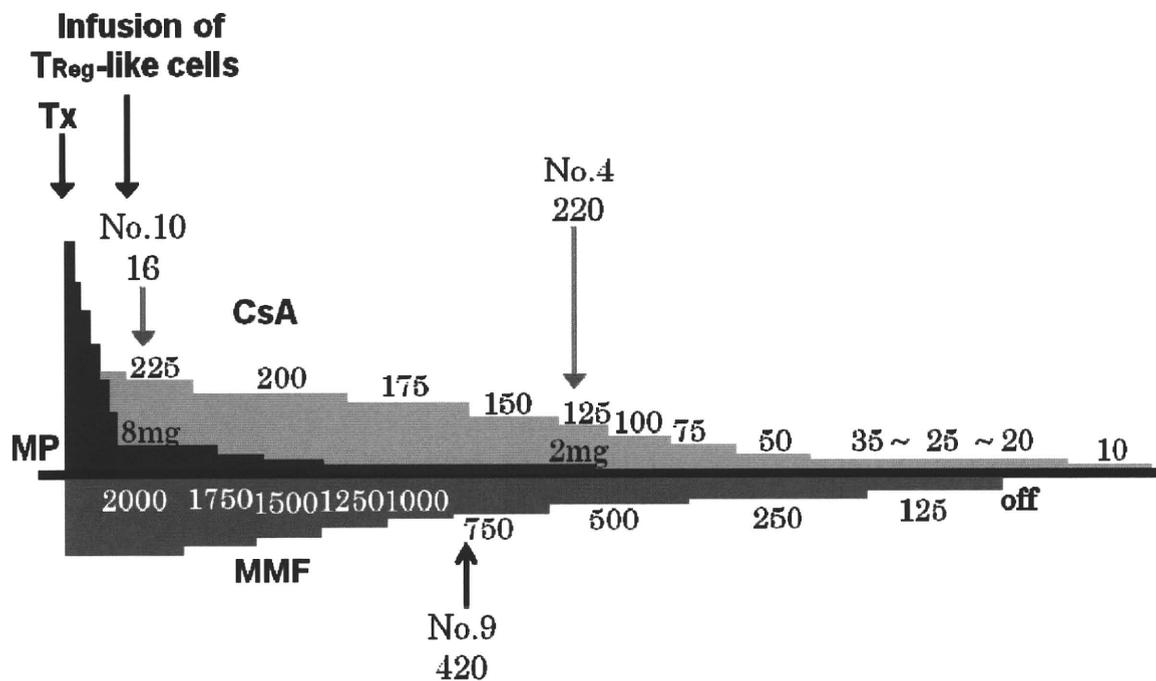


図2 免疫抑制薬投与量と拒絶反応（症例 4,9,10）

Tx：腎移植、MP：methylprednisolone、CsA：cyclosporine、MMF：mycophenolate mofetil

↓：拒絶反応（）内は移植後日数 ↑：拒絶反応なし

CsA (mg/day)

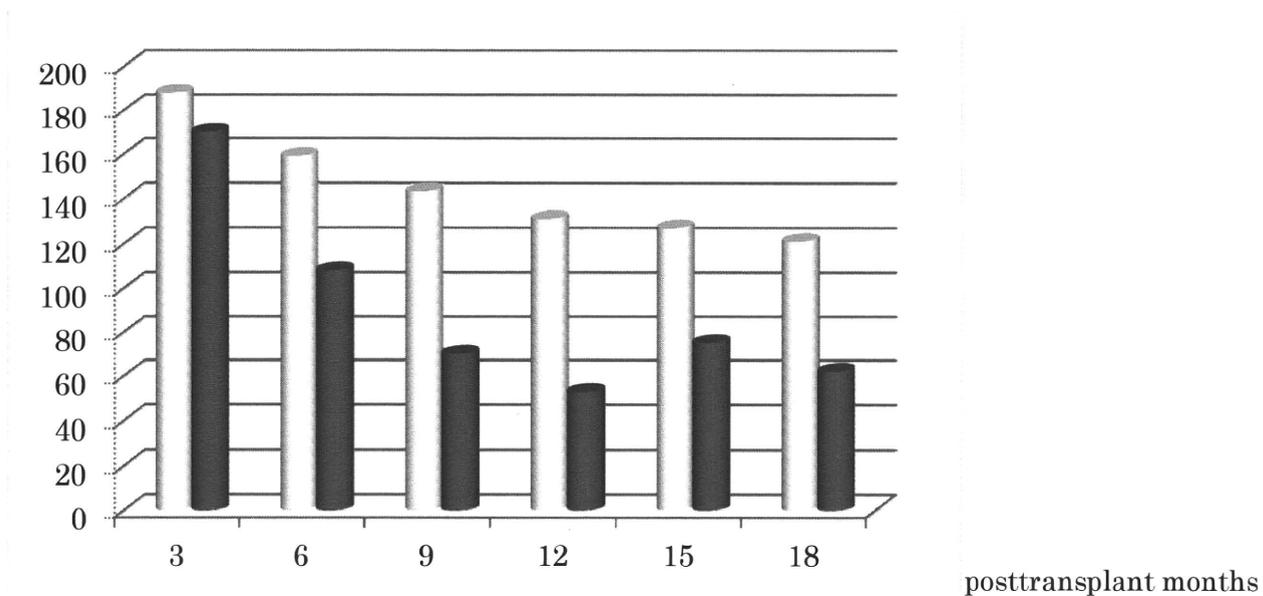


図3 移植後 CsA 投与量の推移 □ conventional ■ TReg infusion

MMF (mg/day)

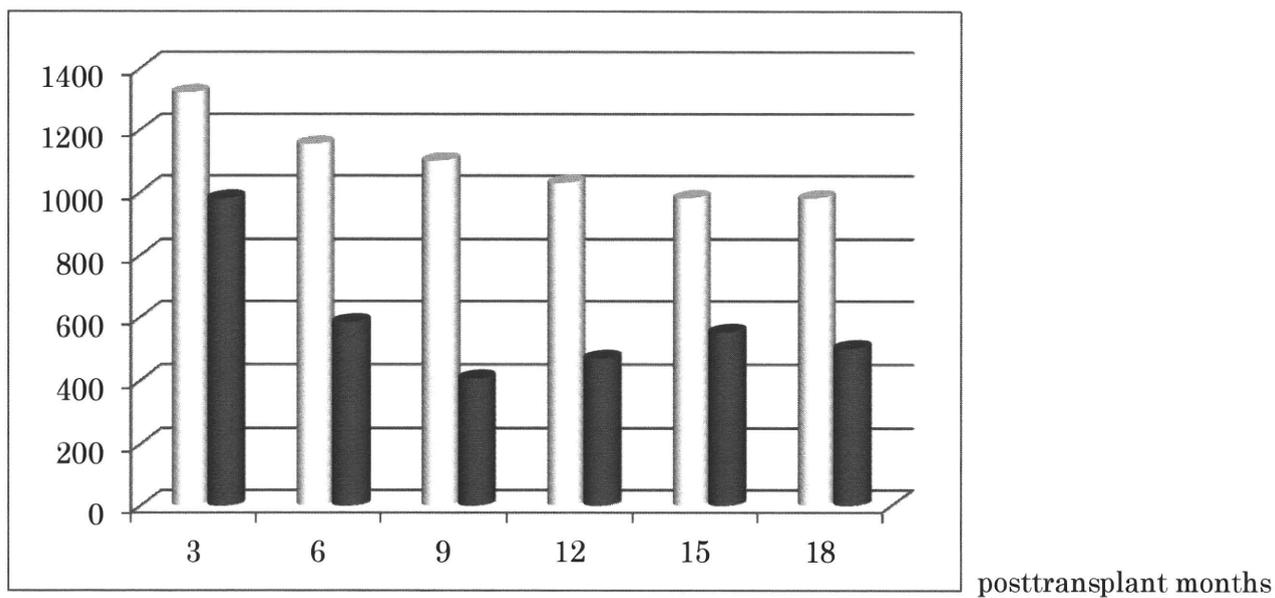


図4 移植後 MMF 投与量の推移 □ conventional ■ TReg infusion

No	HLA MM	MLR D/3 rd P SI 比		抗 HLA 抗体	免疫抑制薬投与量			病理所見		拒絶 POD	治療	sCr		
		最低値	直近値		CsA	MMF	MP	Banff	Type			pre	max	post
1	6	0.22	0.490	class II	25	250	0	IIB	mixed type	302	MP pulse	1.01	1.27	1.07
2	1	0.07	0.090	class II	25	250	0	borderline			none	1.31		
3	2	0.02	0.060	-	25	0	0	IA	cellular	330	MP pulse	1.19	1.57	1.25
4	3	0.1	0.600	-	125	500	2	IA	cellular	220	MP pulse	1.43	2.16	1.29
5	3	0.006	0.040	class II*	20	125	0	IIB	mixed type	378	MP pulse+OKT3	1.30	2.53	1.68
6	3	0.08	0.110	-	35	250	0	IA	cellular	335	MS minipulse	1.15	1.28	1.19
7	3	0.03	0.720	-	75	500	4	borderline			none	1.03		
8	2	0.06	0.100	-	10	0	0	IA	cellular	307	MS pulse	1.46	1.67	1.57
9	1	1.040	-	class I	175	750	4	borderline			none	1.84		
10	0	0.650	-	-	225	2000	8	IIB	mixed type	16	MP pulse+OKT3		3.45	
11	1	0.290	-	-	100	1500	0	negative			none	1.67		
12	2	0.280	0.610	-	150	1250	0	negative			none	0.61		

表3 HLA ミスマッチ抗原数、MLR、抗 HLA 抗体、免疫抑制薬投与量（拒絶反応発生時）、移植腎生検組織所見、拒絶反応発症までの期間（日数）、治療および血清クレアチニン値（前値、最高値、治療後）
HLA MM:HLA 不適合抗原数、MLR:混合リンパ球反応、SI:stimulation index、D/3rdP SI 比:MLR 1way DmR SI/MLR 1way 3rdPmR SI、CsA : cyclosporine、MMF : mycophenolate mofetil、MP : methylprednisolone、OKT3 : muromonab CD3、sCr:血清クレアチニン値

* :ドナー特異的抗体

II. 分担研究報告書

抑制性T細胞類似の細胞による免疫寛容誘導の試み

研究分担者 奥村 康 順天堂大学アトピーセンター

研究要旨

臓器移植後に免疫寛容を誘導する試みについて、抑制性T細胞類似の細胞を生成し、ヒト腎臓移植の系に応用した。

研究分担者氏名；奥村 康

所属研究機関名：順天堂大学アトピーセンター、センター長

A. 研究目的

臓器移植における免疫寛容誘導の手法は確立されていない。当研究施設においてその手法を考案し、臨床応用する一つの手段とする。

B. 研究方法

レシピエント、ドナーからきめられた個数のリンパ球を採り、抗CD80/CD86抗体の存在下で2週間培養した。移植後は決められた量の免疫抑制剤を用いるが、徐々に減量してゆく。一定期間ごとにレシピエントからリンパ球を分離し、ドナー細胞に対する応答性をチェックした。その反応の程度により免疫抑制剤を減量してゆく手掛かりとした。

（倫理面への配慮）

東京女子医大の倫理委員会規定にのっとり実施した。

C. 研究結果

培養した細胞は*Foxp3*、*1-2mannosidase*発現は増強していた。移植後6~8カ月経過するとドナー抗原に対する応答性が低下し始めた。ただ、臓器生着には少量の免疫抑制剤は必要であった。

D. 考察

培養細胞は強い免疫抑制作用を有することが判明した。移植後6~8カ月経過し、免疫抑制剤投与量が少なくなった時点で、ドナー特異的に免疫抑制状態が顕著に

なると考えられた。

E. 結論

腎臓移植後、レシピエントに抑制性T細胞類似の細胞を注入することにより、免疫抑制剤を減量することは可能であった。しかし、免疫寛容の誘導には免疫抑制性細胞以外のもの、あるいは機序が必要である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Bashuda H, Shimizu A, Uchiyama M, Okumura K. Prolongation of renal Allograft survival by anergic cells: Advantages and limitations. Clin Transplant 2010 (Supp. 22): 6-10

2. 学会発表

ご記入ください

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

分子レベルでの研究

研究分担者 清野研一郎 北海道大学遺伝子病制御研究所

研究要旨

抑制性T細胞類似の細胞が生成される際に重要なT細胞のanergy誘導のメカニズムを解析した。さらに同様の分子が臨床腎移植後の患者においても働いているかどうか検討した。

A. 研究目的

臓器移植後免疫寛容誘導のために抑制性T細胞類似細胞を体外で誘導しレシピエント体内に戻すという試みを行っているが、この現象における分子メカニズムは明らかではない。本分担研究では抑制性T細胞類似細胞生成のメカニズムを検討し、さらに臨床腎移植症例において同様の分子メカニズムが働いているかどうかについて検討した。

B. 研究方法

T細胞の第2シグナルの阻害により同細胞はanergy（麻痺）の状態に陥る。本研究ではT細胞の亜群NKT細胞を用い、T細胞のanergy誘導にかかわる細胞内分子機構を解析した。また、同様の分子機構が臨床腎移植症例においても機能しているかどうかについて検討を行った。

（倫理面への配慮）

北海道大学倫理委員会の指針に従って実験を行った。

C. 研究結果

昨年までの研究により、マイクロアレイデータベースよりNKT細胞に高く発現する遺伝子をピックアップし、リアルタイムPCRによりbasic-helix-loop-helixモチーフを持つ遺伝子が自然免疫リンパ球に高く発現していることを確認した。同basic-helix-loop-helixモチーフを持つ遺伝子を強制発現させるとIFN- γ の発現が亢進し、同遺伝子を抑制すると低下することを確認した。本年の研究では、NKT細胞をNK1.1陰性CD44陽性、NK1.1陰性CD44陽性、NK1.1陽性CD44陽性画分に分け、それぞれにおけるbasic-helix-loop-helixモチーフを持つ遺伝子の発現を調べたところ、後者に行くにしたがって発現が高まっていることが判明した。即ち、NKT細胞の分化が進行するに従ってこの分子の発現が高まり、T細胞としての機能を発揮するのに重要な分子であると考えられた。また、寛容誘導後の患者PBMCを用い、NKT細胞のサイトカイン産生性を検討したところIL-10高産生の検体が存在することは昨年と同様であったが、症例数を増やしてもこの傾向が常に観察されるわけではなかった。

このIL-10産生とbasic-helix-loop-helix遺伝子との直接の関連は検出されなかった。

D. 考察

NKT細胞に高く発現するbasic-helix-loop-helixモチーフを持つ遺伝子はIFN- γ の産生制御を行うT-betと関係が深いことが予想されるが、T-bet Tgマウスでこの分子の発現に変化はなかった。つまり、T-betとは独立して、もしくはその上流で機能している可能性が高いと考えられた。

臨床例における検討では、IL-10産生が亢進している症例が存在したものの、いわゆる寛容誘導や免疫抑制剤の減量の程度との相関は認められなかった。別の因子の関与も考慮する必要があると考えられた。

E. 結論

NKT細胞のanergy制御に重要な因子の一つを同定した。臨床免疫寛容誘導における同分子の直接的な関与を今後さらに検討する。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Wada H, Kojo S, Kusama C, Okamoto N, Sato Y, Ishizuka B, Seino K. Successful differentiation to T cells, but unsuccessful B-cell generation, from B-cell-derived induced pluripotent stem cells. *Int Immunol*. 23:65-74, 2011

2. 学会発表

清野研一郎「iPS細胞の免疫学への応用」、第一回Synthetic Immunology研究会招請講演、2010年4月京都

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし