

20102304/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

制御性T細胞治療による臨床肝移植における 免疫寛容誘導法の開発

(H22-免疫-一般-010)

平成22年度 研究成果報告書

平成23（2011）年5月

研究代表者 藤 堂 省

(北海道大学 大学院医学研究科・移植外科・教授)

目次

I. 総括研究報告

「制御性T細胞治療による臨床肝移植における免疫寛容誘導法の開発」全体研究（平成22年度）	6
藤堂 省	

II. 分担研究報告

1. 抗CD80抗体および抗CD86抗体を用いた制御性T細胞の誘導.....	27
奥村 康、場集田 寿、清野 研一郎	
2. 制御性T細胞治療による臨床肝移植後の免疫寛容誘導の試み.....	40
藤堂 省、山下 健一郎、寺岡 慧、上本 伸二	
3. 制御性T細胞を用いた肝移植症例の免疫モニタリング.....	55
山下 健一郎、清野 研一郎、垣生 園子	

I. 総括研究報告

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）
総括研究報告書

「制御性T細胞治療による臨床肝移植における免疫寛容誘導法の開発」全体
研究（平成22年度）

研究代表者：藤堂 省
北海道大学 大学院医学研究科 移植外科講座・教授

研究要旨：肝移植は末期肝不全患者に対する治療法として普及してきたが、拒絶反応制御の為に免疫抑制剤を終生服用しなければならず、免疫抑制剤を中止しても正常なグラフト機能を維持できる免疫寛容の誘導が必要である。臓器移植における免疫寛容の誘導は現在、世界中で散発的に種々の試みが行われているが、成果は不確実である。共同研究者奥村らは、抗CD80および抗CD86抗体を用いドナー抗原特異的な制御性T細胞の誘導法を独自に開発し、サル腎移植モデルにおいて免疫寛容の誘導に成功している。また、共同研究者寺岡らは、奥村らの方法を応用し、腎移植患者で現在、免疫抑制剤の減量に成功している。肝臓は他の臓器と比べ免疫寛容が誘導され易い移植臓器の1つである。本研究は肝移植患者を対象とし、ドナー抗原特異的な制御性T細胞を用いた細胞治療を臨床応用し、より安全で確実な免疫寛容誘導法の確立が目的である。初年度となる本年は、臨床検体を用いた予備試験を経て、生体肝移植患者3例について本治療法を施行した。これら臨床試験症例において、抗CD80および抗CD86抗体存在下に放射線照射ドナー末梢血単核球細胞（PBMC）とレシピエントPBMCを2週間共培養することで、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T細胞は培養開始時に比べ2.7から8.8倍上昇した。また、レシピエントPBMCに培養細胞を添加することでin vitroにおいてドナー抗原に対するmixed lymphocyte reaction (MLR)は抑制された。肝移植後はステロイド・MMF・カルシニューリン阻害剤（CNI）の3剤で免疫抑制を開始し、術後13日目に培養細胞を輸注した。全症例で培養細胞輸注に伴う副作用は認められなかった。ステロイドおよびMMFはそれぞれ術後4週間、2週間内に中止可能であった。経過中、2例で軽微な拒絶反応を認めたものの治療に反応し、現在は全例、CNI単剤での免疫抑制で肝機能は良好である。初例は術後6ヶ月経過し、CNI減量を予定している。本臨床試験の効果判定には、今後の経過観察と症例追加が必要である。

研究分担者：

奥村 康（順天堂大学大学院医学研究科、アトピー疾患研究センター、教授）
垣生 園子（順天堂大学医学部、免疫学講座、教授）
寺岡 慧（国際医療福祉大学 熱海病院、病院長）
場集田 寿（順天堂大学医学部、免疫学講座、助教）
山下 健一郎（北海道大学大学院医学研究科、移植外科学講座、准教授）
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、教授）
上本 伸二（京都大学大学院医学研究科、移植外科講座、教授）

A. 背景と目的

肝臓移植は末期肝不全患者に対する究極の治療法として広く普及してきた。年間に海外では2万例以上、我が国でも500例以上の症例を数える。しかし、これら患者は拒絶反応制御の為、免疫抑制剤を生涯服用しなければならず、感染症・発癌・薬剤による副作用等の危険性に常に晒され、医学的にも又、医療経済の上からも重要な問題である。従って、これらの問題を払拭するためには、免疫抑制剤を中止してもグラフトが正常に機能する、いわゆる免疫寛容の誘導が必須である。

(1) 肝移植における従来の免疫抑制療法の問題点

肝臓移植は末期肝不全患者に対する究極の治療法として広く普及してきた。この肝移植の発展は手術手技・臓器保存・術前術後管理などの進歩によるが、中でも免疫抑制剤の改良が大きく貢献してきた。これまでに用いられた、アザチオプリン（1960-70年代）、シクロスポリン（1980年代）、タクロリムス（1990年代以降）により、1年および5年患者生存率はそれぞれ35%と20%、70%と60%、80%と70%と飛躍的に向上してきた^{1,2)}。1963年に世界初の臨床肝移植が行われたが、これまでに約30万件以上、現在では、年間に海外で2万例以上、我が国でも500例以上の症例を数える。しかし、これら患者は拒絶反応制御の為、免疫抑制剤を生涯服用しなければならず、感染症・発癌・薬剤による副作用等の危険性に常に晒され、医学的にも又、医療経済の上からも未解決の重要な問題である。従って、

免疫抑制剤を中止してもグラフトが正常に機能する、いわゆる免疫寛容の誘導が必須である。

(2) 免疫寛容と制御性 T 細胞

1970年代初頭より、小動物を用いた自己免疫疾患や臓器移植モデルにおいて免疫寛容状態にあるレシピエントには抑制性

（suppressor）T細胞が存在することが見いだされ、このリンパ球をnaïveな宿主に移入（adoptive transfer）することで、免疫寛容を移すことができる（infectious tolerance）ことなどからも、suppressor T細胞の研究は進んだ。共同研究者の奥村は³⁾このsuppressor T細胞を1970年代初頭に世界に先駆けて発表した移植免疫学分野における第一人者のひとりである。抑制性T細胞に関する研究は、その細胞学的同定法の確立が困難であったことからいったん衰退したが、最近、CD4⁺CD25⁺やFoxp3⁺といったphenotype/markerの発見から、再び制御性T細胞（regulatory T cell: Treg）として注目されるようになり⁴⁾、*in vitro*や小動物移植モデルを中心に同細胞を用いた有効性が多数報告されている⁵⁾。

(3) 制御性 T 細胞の *ex vivo* 誘導・増殖

同種臓器移植において移植片拒絶反応は主にレシピエントの細胞性免疫によって引き起こされる。この細胞性免疫はドナー抗原特異的な反応で、樹状細胞などの抗原提示細胞によって提示されたドナー抗原をヘルパーCD4 T細胞が認識し、エフェクターCD8 T細胞が

活性化されて、最終的に拒絶反応が引き起こされる。ヘルパーT細胞の活性化には副刺激

(costimulation) が必要であることが1990年代始めに知られるようになったが、奥村らのグループはT細胞上のCD28と抗原提示細胞上のCD80/CD86が結合することでこの副刺激が伝わること、細胞培養液中に抗CD80抗体および抗CD86抗体を添加することで、レシピエントTリンパ球はドナー抗原提示細胞に対して免疫反応を起こさないこと、その結果、ドナー抗原特異的に不応答(anergy)の状態に陥ることを見いだした。最近の研究では、anergyとなったT細胞はドナー抗原特異的な制御性T細胞

(Treg)として作用することが判明している。また、共同研究者の奥村・場集田・清野らは、抗CD80抗体および抗CD86抗体をリンパ球培養液に添加することでex vivoにおいて抗原特異的Treg様細胞の誘導に成功し、本細胞を輸注することで移植片の長期生着をマウス

心移植モデルで確認している⁶⁾。しかも、前臨床試験として同様のプロトコールをサル腎移植モデルで試みた研究で、末梢血単核細胞(PBMC)をドナー脾細胞と抗CD80/CD86抗体下に共培養し誘導されたTreg様細胞を移植後2週間前後にレシピエントに輸注することで、免疫抑制剤Cyclosporineの早期離脱をもたらし、免疫抑制フリーの状態でも移植腎は長期生着(>600日)し、ドナー抗原特異的免疫寛容誘導に成功している⁷⁾。

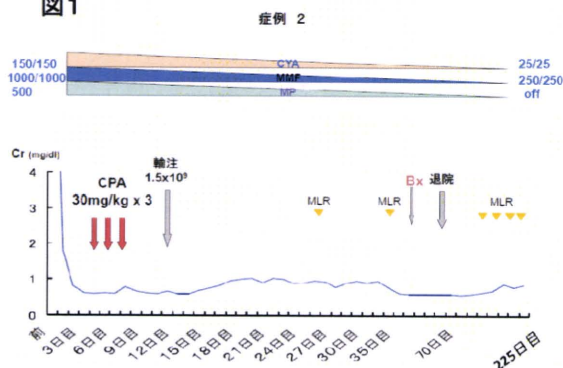
(4) 制御性T細胞用いた腎移植患者における免疫寛容誘導の臨床研究
誘導した制御性T細胞を用いた細胞治療の前臨床試験の結果にもとづき、東京女子医大腎センターにおいて共同研究者の寺岡らは2008年8月から2009年10月までに9例の生体腎移植患者に対し、同治療法を試みている⁸⁾(表1)。症例2(図1)にみられるように、術後2週目に制御性T細胞

表1 患者背景

	年齢 性	移植 年月日	原疾患	透析歴	ドナー	血液型	HLA mm
1	42 M	2008/8/28	IgA腎症	未導入	妹	A→A	3
2	46 F	2009/2/5	ミトコンドリア 遺伝子異常 DM	2y3m	夫	O→B	6
3	53 M	2009/4/9	CGN	1y2m	姉	O→AB	1
4	41 F	2009/5/21	IgA腎症	2y7m	母	AB→AB	2
5	26 M	2009/6/18	IgA腎症	2y5m	母	A→A	3
6	36 M	2009/7/9	CGN	7y10m	母	B→AB	3
7	47 F	2009/8/13	IgA腎症	11m	妹	O→O	3
8	53 M	2009/9/3	IgA腎症	17y4m	妻	A→A	3
9	34 M	2009/10/1	CGN	7y8m	父	B→B	2

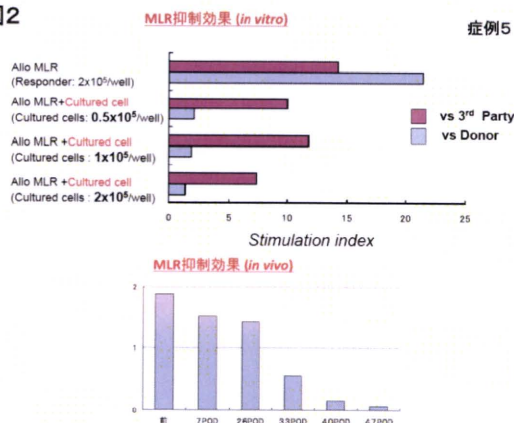
を輸注し、移植直後の免疫抑制剤
(cyclosporin (CYA) : 300 mg/day、
mycophenolate mofetil (MMF) :
2000 mg/day、methylprednisolone
(MP) : 500 mg/day) を漸減して、
現在、225 日目の投与量は CYA 50
mg/day、MMF 500 mg/day であり
MP は完全に中止している。同期間

図 1



中、腎機能および腎生検で急性拒絶反応や明らかな副作用認められていない。その他の症例も免疫抑制剤の投与量は 1/2-1/5 に減量が成功している。これらの症例も、症例 2 と同様に腎機能および腎生検で急性拒絶反応や明らかな副作用認められていない。誘導した制御性 T 細胞は、*in vitro* においても、また、腎移植患者（症例 5）においてもドナー抗原特異的にリンパ球増殖を抑制した（図 2）。

図 2



参考資料・文献リスト

1. Todo S, Fung JJ, Starzl TE, Tzakis A, Doyle H, Abu-Elmagd K et al. Single-center experience with primary orthotopic liver transplantation with FK 506 immunosuppression. Ann Surg 1994;220(3):297-308; discussion 308-299.
2. Furukawa H, Todo S. Evolution of immunosuppression in liver transplantation: contribution of cyclosporine. Transplant Proc 2004;36(2 Suppl):274S-284S.
3. Okumura K, Herzenberg LA, Murphy DB, McDevitt HO. Selective expression of H-2 (i-region) loci controlling determinants on helper and suppressor T lymphocytes. J Exp Med 1976;144(3):685-698.
4. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol 1995;155(3):1151-1164.
5. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. Nat Rev Immunol 2003;3(3):199-210.
6. Bashuda H, Seino K, Kano M, Sato K, Azuma M, Yagita H et al. Specific acceptance of cardiac allografts after treatment with antibodies to CD80 and CD86 in mice. Transplant Proc 1996;28(2):1039-1041.
7. Bashuda H, Kimikawa M, Seino K, Kato Y, Ono F, Shimizu A et al. Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates. J Clin Invest 2005;115(7):1896-1902.

8. 小山一郎. SS3-8 腎移植における末梢性免疫寛容の導入. 第 45 回日本移植学会総会 2009.
9. Shapiro R, Jordan ML, Basu A, Scantlebury V, Potdar S, Tan HP et al. Kidney transplantation under a tolerogenic regimen of recipient pretreatment and low-dose postoperative immunosuppression with subsequent weaning. *Ann Surg* 2003;238(4):520-525; discussion 525-527.
10. Thomson AW, Mazariegos GV, Reyes J, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Bentelejewski C et al. Monitoring the patient off immunosuppression. Conceptual framework for a proposed tolerance assay study in liver transplant recipients. *Transplantation* 2001;72(8 Suppl):S13-22.
11. Martinez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A et al. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* 2007;7(2):309-319.

B. 研究対象と方法

1. 対象患者（レシピエント）とそのドナー

(1) 患者（レシピエント）

北海道大学病院第一外科に入院中の末期肝不全患者を対象とし、以下の選択基準をすべて満たし、かつ除外基準のいずれにも該当しない場合を適格とする。

(a) 選択基準

- ①北海道大学病院第一外科および専門医師集団（内科・放射線科・麻酔科・精神科・病理など）で生体肝移植の適応と認められた患者。
- ②北海道大学大学院医学研究科「医の倫理委員会」で、生体肝移植の実施に関して承認を受けた患者。
- ③同意取得時において、年齢が20歳以上の成人患者。
- ④研究の参加にあたり、研究に関して十分な説明を受けた後、研究内容を十分理解の上で、本人の自由意志により文書で同意が得られた患者。

(b) 除外基準

- ①研究に参加にあたり、十分な判断力がないまたは意識がない患者。
- ②その他、医学的理由等により、研究責任者または研究分担者（以下、研究担当者）が不適切と判断した患者

(2) ドナー

以下の選択基準をすべて満たし、かつ除外基準のいずれにも該当しない場合を適格とする。

(a) 選択基準

- ①レシピエントの2親等または配偶者

②心身ともに健康で、自発的な臓器提供意思がはっきりしている者

③同意取得時において、年齢が20歳以上の成人。

④血液型が、患者と一致ないし適合した者。

⑤北海道大学病院第一外科および専門医師集団（内科・放射線科・麻酔科・精神科・病理など）で生体肝移植のドナーとして適切であると認められたドナー。

⑥北海道大学大学院医学研究科「医の倫理委員会」で、生体肝移植の実施に関して承認を受けたドナー。

⑦研究の参加にあたり、研究に関して十分な説明を受けた後、研究内容を十分理解の上で、本人の自由意志により文書で同意が得られたドナー。

(b) 除外基準

- ①研究に参加にあたり、十分な判断力がないドナー。
- ②その他、医学的理由等により、研究担当者が不適切と判断したドナー。

2. 研究の方法

(1) 研究の種類・デザイン

非対照、非盲検による探索的臨床試験（第2相臨床試験）

(2) 試験のアウトライン

患者およびドナーリンパ球を所定量で採取し、抗CD80抗体、抗CD86抗体存在下で14日間培養し、制御性T細胞を誘導・増殖させ、患者に投与する。免疫抑制療法を規定に従って行い、免疫寛容状態が得られたかを評価する。

(3) 患者およびドナーの適格性の

判定

「1. 対象患者、ドナーおよび適格性の基準」に従って、患者およびドナーの適格性を判定する。

(4) 制御性T細胞の誘導方法

試験物の調製方法は、別に規定する「試験物標準書」に従って実施する。ここでは概要を示す。

(a) ドナーリンパ球の採取

採取は、日本造血細胞移植学会および日本輸血・細胞治療学会のガイドラインを遵守し、院内の「造血細胞採取標準作業手順書」の規定に従って、以下の手順で実施する。採取担当者は、検査・輸血部（または高度先進医療支援センター、造血細胞治療センター）の医師とし、本研究の研究担当者はその指示に従うものとする。

- ①手術5日前までに、成分採血装置（COBE Spectra）を用いて、検査・輸血部内の自己血採血室にてリンパ球を採取する。
- ②採取はMNCモードとし、採取量はドナー体重換算 150 ml/kgを目安とし、採取時間は120分以内とする。ただし、ドナーの状態により、採取担当者の判断で150分を上限にして延長できる。
- ③採取中はドナーの状態に注意し、血管迷走神経反射等の出現により採取の継続が困難となった場合は、採取担当者の判断で採取を中止する。
- ④採取目標値は、白血球数で 4×10^9 以上とする。目標値に到達しなかった場合は、翌日、同一ドナーから再度、成分採血装置を用いて採取を行う。
- ⑤採取した細胞は、採取担当者から本研究の研究担当者へ引き渡す。

(b) ドナーリンパ球の凍結保存

凍結保存は、院内の「末梢血単核球凍結保存標準作業手順書」の規定に従って、以下の手順で実施する。以下の工程のうち、③④は高度先進医療支援センター細胞プロセッシングルーム無菌培養室（以下、無菌培養室）で行う。

- ①凍結保存前に、検査・輸血部内の照射装置により、採取細胞に 30Gyの放射線照射を行う。
- ②採取細胞から検体を採取し、白血球数および生細胞率の測定を行う。
- ③凍結保存は規定された方法で実施する。細胞は、 2×10^9 以上で2つの凍結バッグに分けて保存する。
- ④凍害保護液はCP-1（極東製薬）を用い、DMSO 5%、HES 6%の凍結条件とする。CP-1は医薬品ではないが、造血細胞移植の際には、広く日本国内で使用されている。
- ⑤凍害保護液を加えた細胞は、 -80°C の冷凍庫に静置して凍結し、そのまま使用時まで高度先進医療支援センター細胞プロセッシングルーム細胞保存室（以下、細胞保存室）内の -80°C の冷凍庫に保管する。
- ⑥凍結保存細胞の一部を採取し、無菌検査を実施する。

(c) 患者リンパ球の採取

採取は、日本造血細胞移植学会・日本輸血学会のガイドラインを遵守し、院内の「造血細胞採取標準作業手順書」の規定に従って、以下の手順で実施する。採取担当者は、検査・輸血部（または高度先進医療支援センター、造血細胞治療センター）の医師とし、本研究の研究担当者はその指示に従う

ものとする。

- ①手術前日に、成分採血装置 (COBE Spectra) を用いて、検査・輸血部内の自己血採血室にてリンパ球を採取する。
- ②採取はMNCモードとし、採取量は患者体重換算 200ml/kgを目安とし、採取時間は150分以内とする。ただし、患者の状態により、採取担当者の判断で180分を上限にして延長できる。
- ③採取中は患者の状態に注意し、血管迷走神経反射等の出現により採取の継続が困難となった場合は、採取担当者の判断で採取を中止する。
- ④採取した細胞は、採取担当者から本研究の研究担当者へ引き渡す。
- ⑤採取細胞から検体を採取し、白血球数および生細胞率の測定を行う。また、検体の一部を用い、細胞免疫学的検査を行う。
- ⑥採取目標値は、白血球数で 5×10^9 以上とする。採取細胞数が目標値に到達しないことに対する対応は以下の通りとする。

<採取細胞数の不足への対応>

- i) 患者リンパ球の事前採取と保存
患者の末梢血リンパ球数が少ないなどの理由から、1回の採取で目標細胞数に達しないことが予想される場合は、手術5日前までに事前採取を行う。この場合、手順は (c) 患者リンパ球の採取の方法に準じて行い、採取した細胞は (b) ドナーリンパ球の凍結保存の方法に準じて凍結保存する。
- ii) 脾臓リンパ球の採取

事前採取した細胞と手術前日に採取した細胞の合計は目標値に到達していない場合は、手術時に患者から脾臓を摘出し、そのリンパ

球を加える。

脾臓のリンパ球を使用する場合は、以下の手順で実施する。作業は、高度先進医療支援センター細胞プロセッシングルーム細胞処理解析室で行う。

- ①対象患者より肝移植術中に脾臓を摘出し、細胞処理解析室に搬入する。
- ②摘出脾臓を細切し、Hanks培養液内に浮遊した細胞を回収する。
- ③浮遊細胞をnylon meshに通し single cell suspensionとする。
- ④トリス塩化アンモニウム溶液により赤血球を溶解した後、Hanks液で3回洗浄する。
- ⑤細胞の一部を用いて、無菌検査を実施する。

(d) リンパ球培養 (制御性T細胞の誘導と増殖)

以下の作業は、高度先進医療支援センター細胞プロセッシングルーム無菌培養室で行う (ただし、②⑤④の作業は無菌培養室外の細胞プロセッシングルーム内で行う)。

- ①患者の採取細胞から、比重遠心法にてリンパ球 (単核細胞) を分離する。その際、血漿60mlを分取する。
- ②分取した血漿を、 56°C にて30分間加温し、非動化する。
- ③①で分離した細胞をPBSで2回洗浄する。
- ④洗浄後、培養バッグにALyS505N液500mlを用いて浮遊させ、更に非動化した患者血漿 50ml、抗CD80抗体 (2D10.4) 15 mg、抗CD86抗体 (IT2.2) 15 mgを加える。
- ⑤凍結保存されたドナー細胞 (1バッグ、 2×10^9 相当) を、 37°C 恒温槽で解凍する。

- ⑥解凍したドナー細胞から、比重遠心法にてリンパ球（単核細胞）を分離する。
- ⑦⑥で分離した細胞をPBSで2回洗浄する。
- ⑧洗浄後、培養バッグにALyS505N液500mlを用いて浮遊させ、④の培養バッグに加える。
- ⑨1週間、37℃インキュベーターで培養する。
＜1週間後＞
- ⑩培養バッグから細胞液を回収し、遠心する。培養液を除去後、細胞を50 mlのALyS505N液に再浮遊する。
- ⑪再浮遊した細胞から、比重遠心法にてリンパ球（単核細胞）を分離する。
- ⑫⑪で分離した細胞をPBSで2回洗浄する。
- ⑬洗浄後、培養バッグにALyS505N液 500 mlを用いて浮遊させ、更に非動化した患者血漿 10 ml、抗 CD80 抗体（2D10.4）10 mg、抗CD86抗体(IT2.2)10 mgを加える。
- ⑭凍結保存されたドナー細胞（1バッグ、 2×10^9 相当）を、37℃恒温槽で解凍する。
- ⑮解凍したドナー細胞から、比重遠心法にてリンパ球（単核細胞）を分離する。
- ⑯⑮で分離した細胞をPBSで2回洗浄する。
- ⑰洗浄後、培養バッグにALyS505N液 500 mlを用い浮遊させ、⑬の培養バッグに加える。
- ⑱1週間、37℃インキュベーターで培養する。
- ⑲培養3日目に培養液の一部を採取する（別途、微生物検査を実施）。

(e) 培養リンパ球の輸注

以下の作業は、高度先進医療支援センター細胞プロセッシングルーム無菌培養室で行う（ただし、⑤は患者病室内で行う）

- ①培養バッグから細胞を回収、遠心、PBSにて洗浄した後、細胞を50 mlのALyS505N液に浮遊する。
- ②培養液の一部を採取する（別途、微生物検査およびエンドトキシン検査を実施）。
- ③細胞浮遊液から比重遠心法にて、リンパ球（単核細胞）を分離し、ALyS505N液で洗浄する。細胞回収後、さらに生理食塩水で4回洗浄する。
- ④細胞を100 mlの生理食塩水に浮遊し、検査用検体を採取する（別途、細胞数の検査を実施）。
- ⑤輸血用フィルターを通して患者に静脈内投与する。投与に際しては患者のバイタルサインに注意する。予期不能な血圧低下などの症状が出現したら直ちに投与を中止する。

(5) 制御性T細胞の品質基準

調製した細胞について、以下の品質試験を実施し、被験者への投与を行う。

対象物	試験項目	試験方法	判定基準
中間試験物	無菌検査	一般細菌、真菌培養	菌が検出されないこと
	エンドトキシン検査	比濁分析法	感度以下

	マイコプラズマ	培養法	検出されないこと
最終試験物	細胞数検査	血球計測装置	1×10^8 個以上
	細菌検査	一般細菌、真菌培養	菌が検出されないこと
	エンドキシン検査	比色法	感度以下
	マイコプラズマ	培養法	陰性

(6) 生体肝移植の実施方法

生体ドナーの肝グラフト採取術および対象患者の肝移植術、ならびに生体ドナーと肝レシピエントの術後管理法は現在、北海道大学病院第一外科にて行っている標準的肝移植術および術後管理法に準じる。

(7) 免疫抑制療法

本研究での免疫抑制療法（制御性 T 細胞を用いた免疫抑制療法）

北海道大学病院第一外科ではこれまでに 200 例以上に生体肝移植を行い、これらの症例に用いられた標準的免疫抑制剤は以下の通りである（図 3）。

- ①プログラフ：移植術後 3 日目から投与（1 日 2 回）開始し、血中トラフ濃度 8-12 ng/ml を維持する。全身状態や肝機能検査、拒絶反応の有無などにより血中トラフ濃度を 5-7 ng/ml まで漸減した後は、これを維持する。
- ②セルセプト：移植手術翌日から 500 mg/day を内服開始し、1 週間後に 1000 mg/day へ増量する。必要に応じて 2000 mg/day まで増量する場合がある。
- ③ステロイド：再灌流時-1000 mg, 術翌日からは 20 mg/day を 1 週間投与する。基本的には 1 週間毎に 5 mg/day ずつ減量する。
- ④シムレクト(抗 CD25 抗体)：移植手術終了時および術後 4 日目に、一回 20 mg を静脈内投与する。

図3 通常の免疫抑制プロトコール

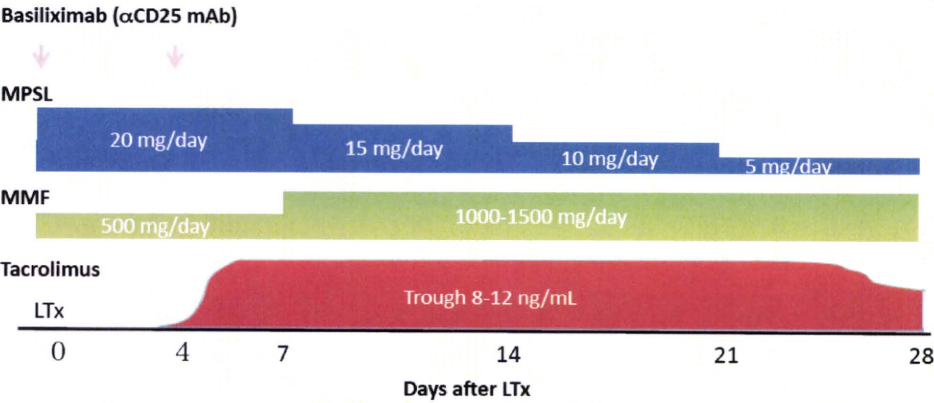
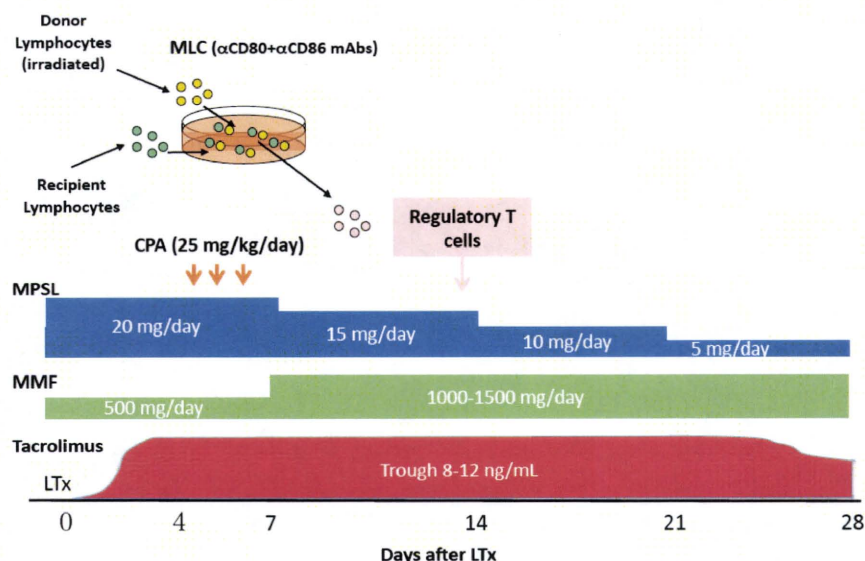


図4 制御性T細胞治療による免疫寛容誘導プロトコール



上記の標準的免疫抑制療法に加え、以下の治療を行う。(図7)。ただし、シムレクト(抗CD25抗体)：は制御性T細胞に対する影響が不明瞭あるため、使用しない。サイクロフォスファミドは、制御性T細胞を輸注する前に、レシピエントのリンパ球を減少させる目的で使用する。

- ①サイクロフォスファミド：術後4日目から25 mg/kg/dayを2日間
- ②培養リンパ球(制御性T細胞)：術後13日目に誘導細胞を輸注

(8) 免疫抑制剤からの離脱

定期的に血液生化学検査や免疫学的検査および必要に応じて肝生検を行い、グラフト機能、拒絶反応の有無や免疫状態を注意深くモニタリングし、免疫抑制剤(コルチコステロイド>ミコフェノール・モフェチール>タクロリムス)を段階的に減量する。

免疫抑制剤の減量は以下の通りとする。

(a) ステロイド

現行の標準的免疫抑制プロトコールに従い、20 mg/dayの初期量から1週間ごとに5 mg/dayを減量し、術後5週目に中止する。

(b) セルセプト

現行の標準的免疫抑制プロトコールに従い、500 mg/dayの初期量から1週間に1000 mg/day、2週間に1500 mg/dayまで増量する。術後5週目から500 mg/dayを1ヶ月ごとに減量し、術後4ヶ月目に中止する。

(c) タクロリムス

術後6ヶ月間は、2分割/日投与による血中トラフ濃度を8-12 ng/mLで維持し、その後は半量に漸減する。その後は、ピッツバーグ大学の漸減スケジュールを遵守して行う⁹⁾。

- ①1日一回(2-3ヶ月間)
- ②1日おき(2-3ヶ月間)
- ③週3回(2-3ヶ月間)
- ④週2回(2-3ヶ月間)
- ⑤週1回(2-3ヶ月間)
- ⑥投与中止

(9) 拒絶反応の診断と治療

(a) 拒絶反応の診断

①身体所見

発熱・全身倦怠などの出現に注意をはらう。

②血液/生化学的検査

T-Bil/AST/ALT/ γ -GTP などのいずれかが基準値の2倍以上に上昇した場合、拒絶反応を疑い、直ちに肝生検を行い、迅速診断で確認する。その後永久標本で確認する。免疫組織染色、浸潤細胞の解析用に凍結切片を保存しておく。

③生検肝の病理学的診断

Glisson 鞘の細胞浸潤、胆管上皮細胞異形、細胆管壁内リンパ球浸潤、中心静脈炎などの所見により拒絶反応の組織診断を行う。特に免疫抑制療法中止後は、肝機能検査が正常でも肝繊維化や慢性拒絶の存在があり得るので¹⁰⁾、免疫抑制剤中止直前、中止後1年以内は3ヶ月毎、2年目は6ヶ月毎、その後は1年毎に肝生検を定期的に行う。

(b) 拒絶反応の治療

①細胞性拒絶反応

ステロイドパルス療法を行い、これに不応性の場合は OKT3 モノクローナル抗体を静脈内投与する。ステロイドパルス療法は、ソルメドロール 200mg の静脈内投与し、その後 40 mg/day で漸減・減量する。

②液性拒絶反応

ステロイドパルス療法を行い、その後直ちに血漿交換を行う。必要に応じてリツキシマブ 375 mg/m²、OKT3 モノクローナル抗体を静脈内投与する。

③拒絶反応後の治療

上記の方法により拒絶反応と診断・治療された場合には、本プロトコルからによる免疫寛容導入療法は中止となり、従来の免疫抑制療法へと移行する。すなわち、カルシニューリンインヒビター、

代謝拮抗薬、ステロイドによる免疫抑制療法が再開とする。

(10) 免疫学的モニタリング

(a) 制御性 T 細胞の免疫学的検討 (*in vitro*)

Ex vivo にて誘導した制御性 T 細胞 (CD4⁺CD25⁺) を輸注直前に MACS を用いて negative selection し、放射線照射 (30 Gy) したドナーおよびレシピエントリンパ球と共に 5-7 日間混合培養し、リンパ球増殖の抑制反応をチミジン取り込み法で検討する。なお、誘導した制御性 T 細胞はマイクロアレイ・プロテオミクス解析のため凍結保存する。

(b) レシピエントの免疫学的モニタリング

(i) 末梢血リンパ球：移植後 0, 3, 7, 10, 14, 21, 28 日および以降は月に 1-2 回、以下の項目につき検討を行う。採血量は 1 回あたり 10-20 ml とする。

① Immuknow (cylex)

② MLR: (レシピエント vs ドナー・third party)

③ ELISPOT (IFN- γ): (レシピエント vs ドナー・third party)

④ Flow cytometry による phenotype 解析 (CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺, CD4⁺CD154⁺, $\gamma\delta$ -T cell, DC-1/2 など)

⑤ Trans-vivo DTH

⑥ リンパ球クロスマッチおよび抗ドナー抗体 (Flow-PRA)

(ii) グラフト肝組織：肝生検時に以下の項目につき検討を行う。なお、生検肝組織はマイクロアレイ

イ・プロテオミクス解析¹¹⁾のため凍結保存する。

- ① 免疫化学組織染色 (CD4, CD8, Foxp3など)
- ② PCRによるmRNA解析 (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β , Foxp3など)

(11) 主要評価項目 (エンドポイント)

- ① 移植1年後のタクロリムス、ステロイド、セルセプトの減少率 (historical controlとの比較)
- ② 移植2、3、4、5年後のタクロリムス、ステロイド、セルセプトの減少率 (historical controlとの比較)
- ③ 移植後の免疫抑制剤の5年後の終了割合、終了した場合はその時期
- ④ 培養後細胞の制御性T細胞を含めた免疫学的特性
- ⑤ 培養制御性T細胞治療の安全性 (有害事象の頻度と程度)
- ⑥ *in vitro*における免疫抑制効果

(12) 被験者の人権に対する配慮および個人情報の保護の方法

本研究のすべての担当者は、「ヘルシンキ宣言 (2008年10月修正)」および「臨床研究に関する倫理指針 (平成20年7月31日改正、以下臨床研究倫理指針)」を遵守して実施する。

研究実施に係る試料等を取扱う際は、被験者の個人情報とは無関係の番号を付して管理し、被験者の秘密保護に十分配慮する。研究の結果を公表する際は、被験者を特定できる情報を含まないようにする。また、研究の目的以外に、研究で得られた被験者の試料等を使用しない。

本研究実施に係わる生データ類および同意書等を扱う際には、患者の秘密保護に十分配慮し、個人情報とは外部には公開しない。患者に関する個人情報と個人識別情報はパスワードを設定して別々に保管管理する。解析されたデータは匿名化を行い、個人情報が特定されないように配慮する。

研究結果の学術的発表に際しては、個人を特定できる情報は公表しない。

(13) 同意取得方法

研究担当者は、審査委員会で承認の得られた同意説明文書を被験者に渡し、文書および口頭による十分な説明を行い、被験者の自由意思による同意を文書で取得する。

研究担当者は、被験者の同意に影響を及ぼす情報が得られたときや、被験者の同意に影響を及ぼすような実施計画等の変更が行われるときは、速やかに被験者に情報提供し、研究に参加するか否かについて被験者の意思を予め確認するとともに、事前に審査委員会の承認を得て同意説明文書等の改訂を行い、被験者の再同意を得ることとする。

(14) 被験者の研究参加予定期間

各被験者は同意後、5年の観察期間で参加する

C. 研究結果

(1) 制御性T細胞のex vivo誘導

臨床肝移植症例での制御性T細胞の誘導結果を表2に示す。

各症例において総リンパ球数は培養開始時の 3.4×10^9 、 6.9×10^9 、 9.4×10^9 から2週間培養後には $0.6 \times$

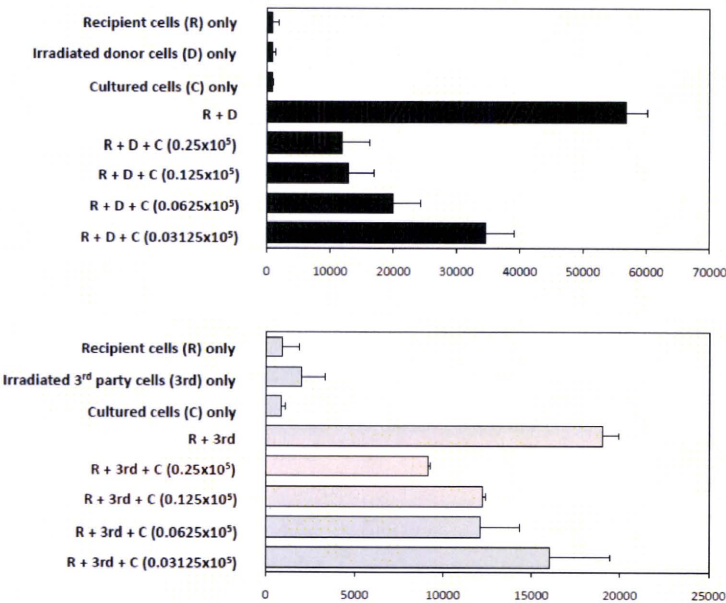
10⁹、2.5×10⁹、0.8×10⁹ 個へと減少した。一方、これらのリンパ球の表現型解析を行うと、CD3⁺CD4⁺細胞は2週間培養により、30%、48%、30%から42%、65%、67%へ増加が認められた。また、制御性T細胞であるCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞は、4.5%、3.2%、2.6%から

12.2%、28.1%、18%へ上昇し、培養開始時に比べ2.7～8.8倍増加した。同様に、制御性T細胞の表現型とされるCD4⁺CD25⁺CTLA4⁺細胞およびCD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺細胞の割合も表2に示す通り、2週間培養で共に上昇した。即ち、抗CD80および抗CD86抗体存在下に

表2. 臨床試験症例における培養細胞のデータ

	培養開始時	2週間培養後
症例1		
リンパ球数 (x10 ⁹)	3.43	0.61
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	30.0	42.2
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)	4.5	12.2
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺ (%)	3.5	25.0
CD4 ⁺ CD127 ^{lo} Foxp3 ⁺ (%)	0.21	16.0
症例2		
リンパ球数 (x10 ⁹)	6.88	2.54
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	48.0	65.3
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)	3.21	28.1
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺ (%)	4.0	21.7
CD4 ⁺ CD127 ^{lo} Foxp3 ⁺ (%)	0.4	23.4
症例3		
リンパ球数 (x10 ⁹)	9.43	0.79
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	30.6	66.6
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)	2.6	18.0
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺ (%)	2.0	33.1
CD4 ⁺ CD127 ^{lo} Foxp3 ⁺ (%)	2.5	13.2

図5. 臨床試験3例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



放射線照射ドナー末梢血単核球細胞 (PBMC) とレシピエント PBMC を 2 週間共培養する本培養系により、制御性 T 細胞が選択的に誘導されていた。

誘導された制御性 T 細胞を含む細胞が免疫抑制効果を示すか、MLR 法を用いて検討した。図 5 に症例 3 の結果を示す。上のグラフは制御性 T 細胞培養に使用したドナーの抗原（放射線照射リンパ球）に対する反応を、下のグラフは第三者の抗原（放射線照射リンパ球）を用いた MLR の結果である。各グラフの上 1 から 3 列目までは、レシピエントリンパ球、放射線照射リンパ球および 2 週間培養リンパ球をそれぞれ単独で培養した際の細胞増殖を示している。4 列目は抗原（放射線照射リンパ球）と共培養し刺激を加えた際のレシピエントリンパ球の細胞増殖である（コントロール）。この系に 2 週間培養した細胞を 1/4 量（ 0.25×10^5 個）、1/8 量、1/16 量、1/32 量を添加した結果が 5 から 8 列目であるが、培養細胞を添加することにより、ドナー抗原に対する MLR は強力に抑制された。第三者抗原

に対する反応も培養細胞添加により抑制されたが、ドナー抗原に対する反応と比べその程度は軽度であり、培養制御性 T 細胞は抗原特異性が高い細胞であることが示唆された。

（2）肝移植症例における培養制御性T細胞を用いた免疫抑制療法

初年度となる本年は、臨床検体を用いた予備試験を経て、生体肝移植患者 3 例について本治療法を施行した。

症例 1 は 39 歳、男性。C 型肝硬変 (Child C、MELD : 16) に対し、弟の肝左葉グラフトを用いた生体肝移植術を施行した。HLA typing はレシピエントは A-24/-、B-52/54、Cw-01/12、DRB1-04/15、DQB1-03/06、ドナーは A-24/-、B-52/54、Cw-01/12、DRB1-04/15、DQB1-03/06 であった。術後経過および免疫モニタリングの結果を図 6、図 7 に示す。プロトコール通りにタクロリムス (TAC)、ステロイド、MMF の 3 剤で免疫抑制を開始し、術後 4 および 5 日目に、サイクロフォスファミド (CPA) 25 mg/kg を投与した。血清肝逸脱酵素値は順調に低下し、術後 7 日

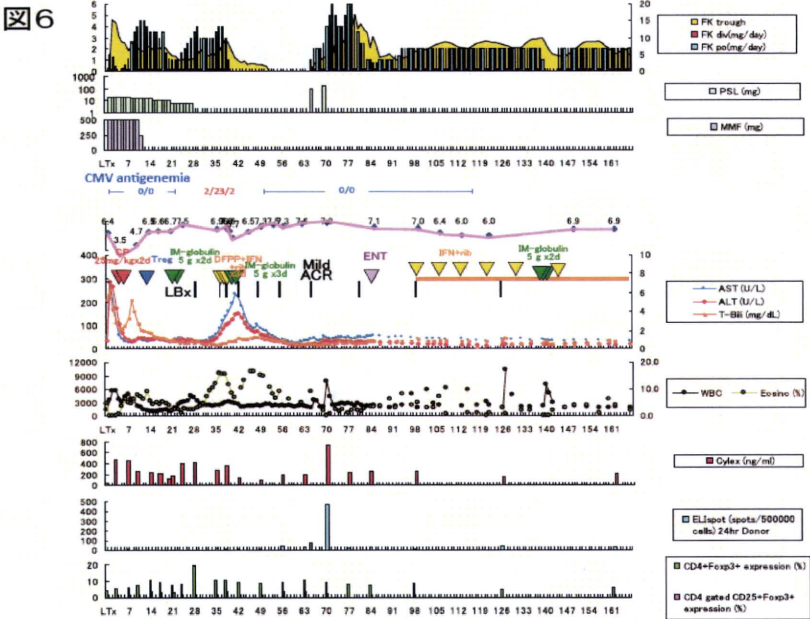
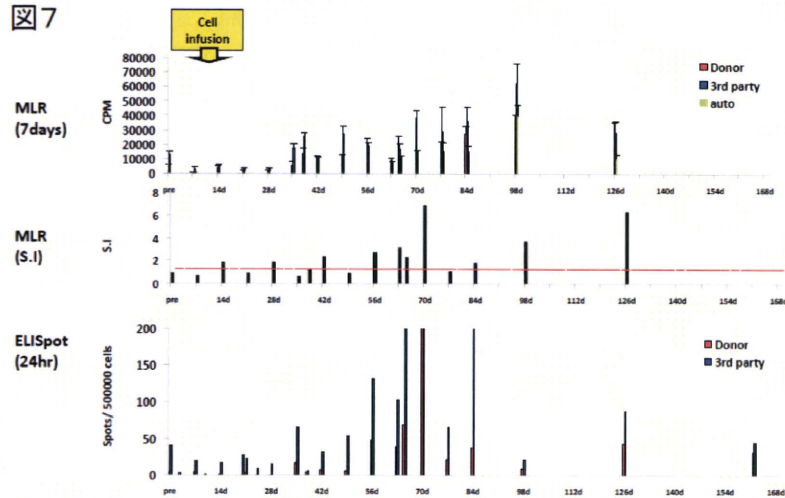


図7



目にはほぼ正常値まで復した。術後11日目にMMFを中止、13日目に予定通り培養リンパ球を輸注した。細胞輸注に伴う明らかな副作用は認められなかった。ステロイドは漸減し、28日目にはタクロリムス単剤での免疫抑制となった。細胞輸注後は末梢血中の制御性T細胞 ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T細胞および $CD4^+CD127^{lo}Foxp3^+$ T細胞) の割合は増加した。術後34日目よりCMV感染症のため、いったん免疫抑制を完全に中止した。移植後早期に400 ng/ml台で推移していたはCylex値は、CMV感染罹患時には100 ng/ml台まで低下した。CMV感染症軽快後も免疫抑制中止のまま経過観察を行った。MLRでは術後6週目以降ドナー抗原に対する反応は漸増し、術後8週目頃より、IFN- γ ELISPOTでdirectおよびindirect responseともにドナー抗原に対する反応は上昇した。術後65日目にAST/ALT値が軽度上昇し、肝生検にてMild ACRと診断され、TACによる免疫抑制を再開した。術後98日目の肝生検でC型肝炎再発が疑われ、インターフェロン・リバビリン治療を開始した。現在、術後約6ヶ月経過しているが、TAC 2 mg/day (trough 7 ng/m

l)単剤で肝機能は安定しており、TAC減量を予定している。

症例2は63歳、男性で、アルコール性肝硬変(Child C、MELD:14)に対し、息子の肝左葉グラフトを用いた生体肝移植術を施行した。本症例は過小グラフト (GV 344g、GV/SV 28.6%) のため、門脈—下大静脈シャントを増設した。術後経過および免疫モニタリングの結果を図8、図9に示す。プロトコル通りにTAC、ステロイド、MMFの3剤で免疫抑制を開始し、術後4および5日目に、CPA 25 mg/kgを投与した。

本症例ではCPA投与によりWBCは400 mm³まで低下し、G-CSF投与が必要であった。11日目にセルセプトを中止し、13日目に予定通り、培養リンパ球を輸注した。細胞輸注に伴う明らかな副作用は認めず、培養細胞輸注後は末梢血液中の制御性T細胞が検討を行った全ての phenotype

($CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 、 $CD4^+CD127^{lo}Foxp3^+$ 、 $CD4^+CD45RA^+Foxp3^+$) において上昇し、術後8-10週目まで術前値以上の割合が維持された。免疫抑制剤はさらにステロイドを漸減し、

図8

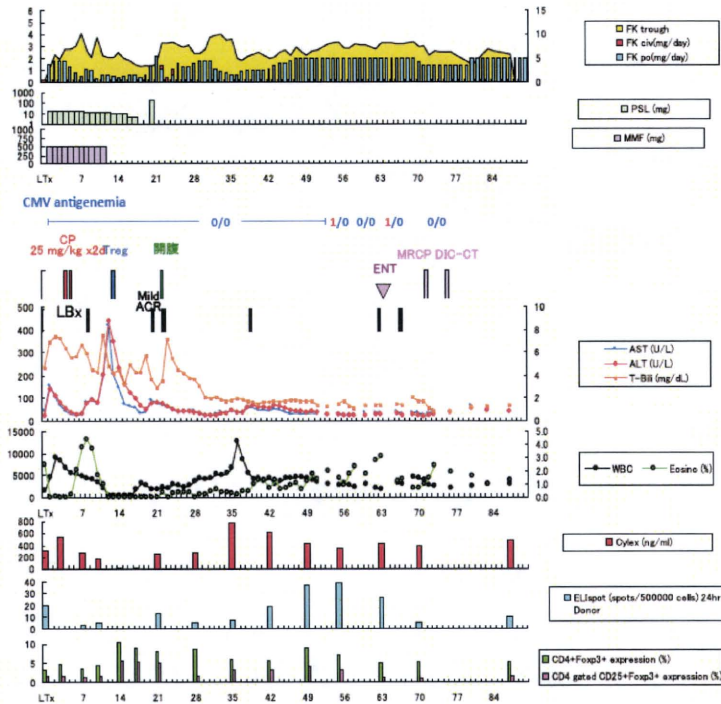
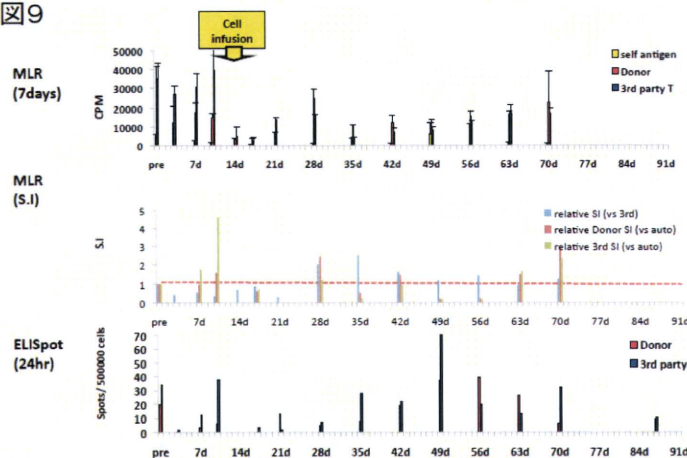


図9



17日目にはTAC単剤での免疫抑制となった。術後20日目にAST/ALT値が軽度上昇したが、MLR、IFN- γ ELISPOTともにドナー抗原に対する反応は陰性であった。肝生検ではMild ACRと診断され、ソルコーテフ投与後、プログラフをtrough 7-8 ng/mlまで増量した。術後22日目に門脈一下大静脈シャント閉鎖術を施行。一過性に再上昇していたAST/ALTはその後漸減した。現在、術後約3ヶ月経過しているが、TAC 2 mg/day

(trough 6 ng/ml)単剤で肝機能は安定している。

症例3は56歳、男性で、NASH肝硬変(Child C、MELD:18)に対し、息子の肝左葉グラフトを用いた生体肝移植術を施行した。HLA typingはレシピエントはA-02/-、B-40/40、Cw-03/-、DRB1-04/04、DQB1-04/04、ドナーはA-02/24、B-40/40、Cw-03/15、DRB1-04/11、DQB1-03/04であった。術後経過および免疫モニタリングの結果を図10、図11に示す。プロトコール通りにTAC、ステロイド、