

図10

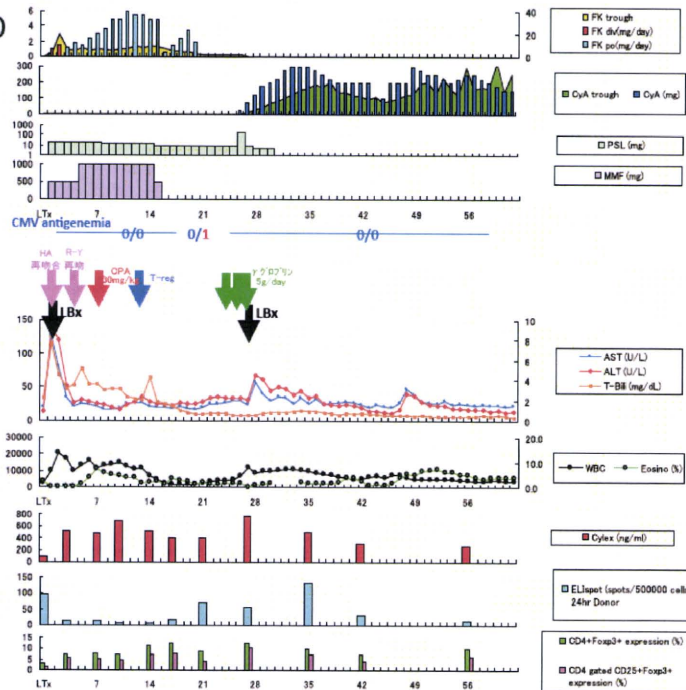
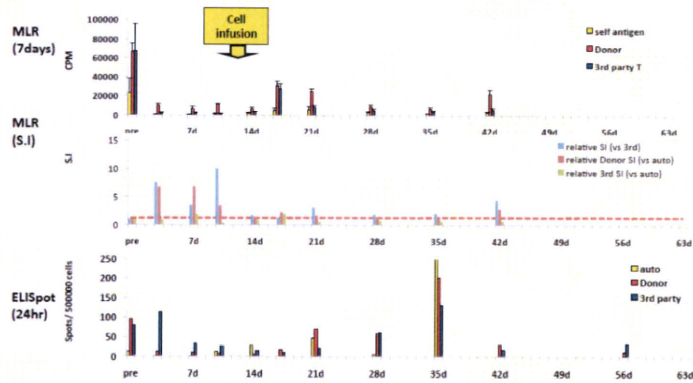


図11



MMFの3剤で免疫抑制を開始した。症例1および症例2においてCPAによるWBC減少が著しく、過量投与と考え、本症例では術後7日目に、30 mg/kgを1回投与とした。CPA投与によりWBCは1700/mm³まで低下した。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。培養細胞輸注後は末梢血液中の制御性T細胞 (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺、CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺、CD4⁺CD45RA⁻Foxp3⁺) は上昇した。術後15日目にセルセプトを中止した。TACは5-6 mg/day、trough 6-9 ng/ml

で維持していたが、神経毒性の副作用が疑われ、術後20日目にプログراف投与を中止し、ステロイド単独での免疫抑制を行った。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が、術後26日目よりAST/ALT値が軽度上昇し、ネオーラル(CsA)投与を開始した。肝生検を施行するも拒絶反応を認めず、脂肪肝と診断された。ステロイドを術後30日目に中止した。現在、術後2ヶ月半経過し、免疫抑制はCsA単剤で維持(現在、200 mg/day、trough 100-150 ng/ml)している。

D. 考察

本臨床試験は北海道大学病院倫理委員会の承認を経て行っているが、委員会から制御性 T 細胞の *ex vivo* 誘導や誘導細胞の安全性について東京女子医大データのみならず、当科でも予備試験を念入りに行い、それら結果をもってして、試験開始する旨の指示があった。この事情から、本年度は 5 例の臨床試験を予定していたが、予備試験の必要性から、最終的に 3 例の施行にとどまった。

成分採血法にて採取した末梢単核球細胞を抗 CD80 抗体および抗 CD86 抗体存在下に 2 週間共培養することで、制御性 T 細胞が高率に誘導された。これらの結果は予備試験結果および東京女子医大において先行する臨床試験結果と遜色はなかった。また、培養細胞の輸注に伴う副作用は全例で認められず、本細胞治療は安全であると考えられた。

本臨床試験を行った 3 症例において、経過中 2 例で急性拒絶反応を認めたが、1 例は免疫抑制剤を早期に完全中止中、他の 1 例は免疫抑制剤減量中であり、両症例ともその程度は mild であった。現在、全例においてカルシニューリン阻害剤単独投与で良好な肝機能を維持しており、引き続き注意深い経過観察が必要であるが、今後、免疫抑制剤の漸減が期待されると考えられる。

当臨床試験症例において、主に Cylex、MLR、IFN- γ ELISPOT、抗原特異的 CD4⁺CD154⁺ T 細胞を用いた免疫モニタリングを行い、mild ACR を来した 2 例中 1 例で、拒絶反応を来した際に、ドナー抗原に対す

る MLR および IFN- γ ELISPOT 反応の上昇が認められた。Cylex は抗ドナー反応には非特異的だが、over immunosuppression、CMV 感染や HCV 再発などに伴い ATP 値の低下が認められ、このような患者状態を判断する上で cylex は有用なアッセイと考えられた。単一のアッセイでは判断に迷うが、これらの検査結果を総合的に判断すれば、免疫状態のモニタリング、免疫抑制療法の適正化に有用である可能性があり、今後症例を重ね解析が必要と考えられる。

症例 1 は CMV 既感染ドナーから CMV 既感染レシピエントへの移植例であったが、経過中に CMV hepatitis を来した。当科では、CMV 既感染ドナーから CMV 未感染レシピエントへの移植例で無い限り、原則的に肝移植後の CMV 感染予防的治療は行っていない。しかし、以降の症例においてガンシクロビルもしくはヴァルガンシクロビルの予防的投与を行うこととした。症例 2 以降では CMV antigenemia は一過性に陽性となったものの、CMV disease を発症することはなかった。本免疫抑制プロトコールでは、CMV 感染予防が必要であると考えられる。CMV 感染症は術後 CPA 投与の弊害が疑われた。

CPA は先行する東京女子医大での腎移植症例のプロトコール同様の投与量および投与回数で症例 1 および 2 では投与を行ったが、これら症例では WBC 低下が著しく、症例 2 では連日 G-CSF 投与が必要となった。また、これらの症例では WBC 再上昇を認めたものの長期にわたり WBC は比較的低値で推移していたため、症例 3 では、エンドキサンを 30 mg/kg で 1 回投与とした。この症例では、術後 WBC 値

が高値で推移したこともあり、WBC 値は 1700/mm³ を底値とし、速やかに再上昇した。この WBC 減少が本細胞治療において十分か否か今後の経過を見守る必要があるが、非代償性肝硬変で門脈圧亢進症となっている多くの肝移植レシピエントの場合、エンドキサンの投与量・投与回数は検討の余地があると考えられる。

抗 CD80 および抗 CD86 抗体により誘導した制御性 T 細胞を輸注後から、全例において末梢血中の制御性 T 細胞 phenotype (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺, CD4⁺CD45RA⁻Foxp3⁺) の割合が増加していた。これら制御性 T 細胞が細胞輸注後どの程度の期間維持され、免疫寛容誘導に寄与するかは今後さらなる検討と各症例の経過を観察する必要がある。

E. 結論

- ・ 3例の肝移植症例において、制御性T細胞を用いた新しい免疫抑制療法の臨床試験を施行した。
- ・ 成分採血法にて採取した末梢単核球細胞を抗 CD80 抗体および抗 CD86 抗体存在下に 2 週間共培養することで、制御性 T 細胞が高率に誘導され、安全に細胞治療を施行することが可能であった。
- ・ 本臨床試験症例中 2 例で拒絶反応が認められたものの、いずれも拒絶反応の程度は軽微であった。
- ・ 免疫寛容誘導効果を判断するためには、今後、さらなる経過観察と症例の追加が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

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
なし

I. 分担研究報告

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）
分担研究報告書

「抗CD80抗体および抗CD86抗体を用いた制御性T細胞の誘導」

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

研究分担者：場集田 寿

順天堂大学医学部 免疫学講座・助教

研究分担者：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

研究要旨：我々は抗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サル腎移植モデルにおいて免疫抑制フリーの状態でも移植腎が長期生着し、ドナー抗原特異的免疫寛容が誘導されることを報告してきた。本研究では、生体肝移植患者を対象とし、抗CD80抗体および抗CD86抗体を用いた制御性T細胞の誘導法を確立することを目的とし、種々の検討を行った。レシピエントおよびドナーより成分採血法にて採取した末梢単核球細胞を抗CD80抗体および抗CD86抗体存在下に2週間共培養することで、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性T細胞が高率に誘導された。培養細胞の安全性の検討として、抗CD80抗体および抗CD86抗体遺残の有無を検討した。輸注前に細胞を4回洗浄することで抗体残存なく、安全であることが確認された。実際、肝移植症例3例において、同培養法で制御性T細胞が誘導され、細胞輸注後も明らかな副作用を認めず、安全に細胞治療を施行することが可能であった。本細胞治療による効果については、今後も経過観察が必要である。

A. 目的

生体肝移植患者を対象とし、抗CD80抗体および抗CD86抗体を用いた制御性T細胞の誘導法を確立することを目的とし、以下の検討を行った。

- 1) 細胞の培養方法と至適培養条件
- 2) 抗CD80抗体および抗CD86抗体により誘導される制

御性T細胞誘導効率と細胞種の変化

- 3) 培養細胞後の回収した細胞の安全性
- 4) 健常人によるヒトリンパ球を用いた細胞培養臨床前試験
- 5) 生体肝移植ドナーおよびレシピエント末梢単核球細胞をもちいた制御性T細胞の誘導と細胞治療

B. 方法

1) 細胞培養

1)-1 予備試験

培養液は ALyS505N-0 IL-2 不含 (細胞科学研究所) を使用した。血清は Human Serum, Normal (Millipore) を使用した。培養フラスコは Tissue Culture Flask with Vented Cap 25 cm²(IWAKI) を非動化して使用した。比重分離液は Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare) を使用した。抗 CD80 抗体 (2D10.4) および抗 CD86 抗体 (IT2.2) はそれぞれ 10 µg/ml で使用した。ヒト末梢血細胞は、血液を比重遠心で分離した細胞を使用した。また、ドナー細胞は 30Gy で放射線照射した細胞を使用した。レシピエント細胞は 3~5x10⁶/ml で、ドナー細胞 2 x10⁶/ml の濃度でおこなった。培養の手順は以下の通りに行った。

- ① レシピエントおよびドナーの末梢血細胞を比重遠心で回収し、ドナー細胞は 30Gy で放射線照射を加えた。
- ② 血清を培養液に 10%(v/v) になるように加え、回収したレシピエント細胞とドナー細胞および抗 CD80 抗体と抗 CD86 抗体を加え共培養を 1 週間した。
- ③ 1 週間後に培養細胞を回収し細胞を洗浄。
- ④ 培養細胞、ドナー細胞、抗 CD80 抗体、抗 CD86 抗体および 10%(v/v) 血清を培養液に加え更に 1 週間共培養した。
- ⑤ 2 週間培養した細胞を用いてそれぞれの解析を行った。

1)-2 臨床試験

培養液は ALyS505N-0 B10 (IL-2 不含) 1000 mL カルチャーバック入り (細胞科学研究所) を使用した。血清はレシピエント細胞で回収された血清を非動化して使用した。比重分離液は Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare) を使用した。抗 CD80 抗体 (2D10.4) および抗 CD86 抗体 (IT2.2) はそれぞれ 10 µg/ml で使用した。ヒト末梢血細胞はアフエレーシスを行い回収した細胞を使用した。また、ドナー細胞は 30Gy で放射線照射した細胞を凍結保存し、培養時に解凍して使用した。

培養手順は以下の通りに行った。

- ① ドナーにアフエレーシスを行い、回収した細胞に 30Gy で放射線照射を行い、2 分割し凍結保存した。
- ② レシピエントにアフエレーシスを行い、細胞を回収。回収する際、レシピエントの血清を非動化した。
- ③ 培養液に非動化したレシピエントの血清を 10%(v/v) になるように加え、レシピエント細胞、解凍したドナー細胞、抗 CD80 抗体および抗 CD86 抗体を加え 1 週間共培養した。
- ④ 1 週間後に、培養細胞を回収し細胞を洗浄。
- ⑤ 培養細胞、ドナー細胞、抗 CD80 抗体、抗 CD86 抗体および 10%(v/v) 血清を培養液に加え更に 1 週間共培養した。
- ⑥ 2 週間培養した細胞を用いて

てそれぞれの解析を行った。

- 2) 制御性 T 細胞の誘導の確認
制御性 T 細胞の確認については表面抗原を染色して BD FACS Calibar を用いて確認を行った。抗体は BD Bioscience の PE-CyTM5 Mouse Anti-Human CD4 (RPA-T4), FITC Mouse Anti-Human CD25 (M-A251), FITC Mouse Anti-Human CD127 (HIL-7R-M21), PE Mouse Anti-Human FoxP3 (259D/C7) および PE Mouse Anti-Human CD152(BNI3) を用いて染色し Flow Jo にて解析を行った。実験は 4 回行った。
- 3) 培養細胞の分画についての検討
培養後の細胞について表面抗原を解析し、培養細胞に含まれる細胞分画について検討した。抗体は BD Bioscience の FITC Mouse Anti-Human CD3, PE-CyTM5 Mouse Anti-Human CD4 (RPA-T4), PE-CyTM5 Mouse Anti-Human CD8 (RPA-T4), FITC Mouse Anti-Human CD14 (M5E2), PE Mouse Anti-Human CD19 (HIB19), TriTEST CD3 FITC/CD16+CD56 PE/CD45 PerCP, Lineage Cocktail 1(Lin 1), PE Mouse Anti-Human CD11c (B-ly6), PE Mouse Anti-Human CD123 (9F5), PE Mouse Anti-Human HLA-DR (L234) を用いて染色し Flow Jo にて解析を行った。実験は 4 回行った。
- 4) 培養細胞の至適濃度の検討
効率よく培養細胞を回収するため、細胞濃度を $5 \times 10^6/\text{ml}$, $8 \times 10^6/\text{ml}$, $10 \times 10^6/\text{ml}$ にて 1 週間培養した細胞の生細胞率を確認した。

5) 培養細胞回収後の残留抗体の検討

患者へ投与する最終試験物に、培養使用する抗体が残留することは好ましくない。そのため、本試験における試験物製造工程においては、洗浄回数を検討するため、小規模試験において洗浄回数と抗体残留量の検討を行った(n=4)。本試験で用いる抗ヒト CD80 及び CD86 抗体はアイソタイプがマウス IgG であり、これらの抗体残留量はマウス IgG を ELISA 法にて測定することで検討した。洗浄は計 4 回行い、各回での残留抗体濃度を計 4 回の試験で検討した。

6) 健常人による臨床前試験

健常成人 2 名から成分採血法 (アフエレーシス) により末梢血単核細胞を採取し、1 方をドナー、他方を患者 (レシピエント) に見立て、実際の細胞治療と同じ大量細胞を用い、製造方法、使用する抗体等も同一の条件として制御性 T 細胞の誘導実験を実施した。また、培養前後の細胞につき、細胞数表面抗原の解析を行った。安全性の確認のため、Endosafe-PTS (Wako) を用いて最終産物のエンドトキシン測定をおこなった。

C. 結果/D. 考察

1) 制御性 T 細胞の誘導の確認

総リンパ球数は培養前の $23.89 \pm 11.39 \times 10^6$ から 2 週間培養後に $6.80 \pm 7.46 \times 10^6$ となった。

フローサイトメトリーの結果、 $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ 細胞は、 $0.21 \pm 0.04\%$ から $2.73 \pm 1.27\%$ と上昇した。更に $CD4^+$ 細胞中の比率を見ると、 $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ 細胞は $1.29 \pm 0.60\%$ から $6.16 \pm 2.01\%$ 、 $CD4^+ CD25^+ CTLA4^+$ 細胞は $1.90 \pm 1.27\%$ から $4.68 \pm 1.49\%$ 、 $CD4^+ CD127^{lo} Foxp3^+$ 細胞は $1.04 \pm 0.79\%$ から $2.40 \pm 2.24\%$ へとそれぞれ上昇した (表 1, 図 1)。

図1. 培養細胞中の制御性T細胞の割合

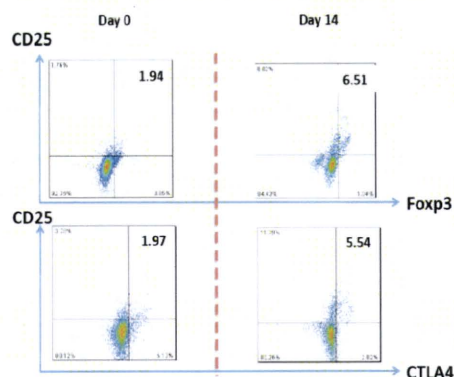


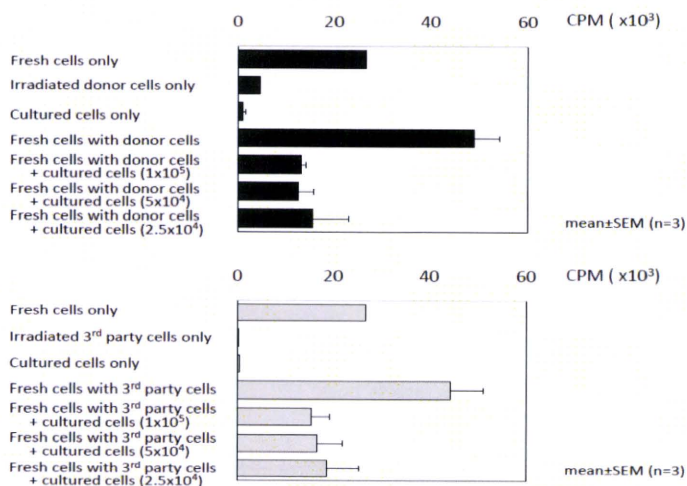
表1. 培養細胞のデータ(細胞数・Treg phenotype)

	N	培養開始時	2週間培養後
リンパ球数 ($\times 10^6$)	4	23.89 ± 11.39	6.80 ± 7.46
$CD3^+ CD4^+$ (%)	4	40.83 ± 3.52	55.01 ± 5.39
$CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ (%)	4	0.21 ± 0.04	2.73 ± 1.27
$CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ / CD4^+$ (%)	4	1.29 ± 0.60	6.16 ± 2.01
$CD4^+ CD25^+ CTLA4^+ / CD4^+$ (%)	4	1.90 ± 1.27	4.68 ± 1.49
$CD4^+ CD127^{low} Foxp3^+ / CD4^+$ (%)	4	1.04 ± 0.79	2.40 ± 2.24

次に、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。 1×10^5 /well のレスピエント細胞、照射したドナー細胞に、培養細胞 (0.25×10^5 /well, 0.50×10^5 /well, 1.00×10^5 /well) を加え共培養を行いチミジンの取り込みで評価した。MLR の結果(mean \pm

SEM) は、培養細胞を加えない (control) 群 (48984 ± 5200)、培養細胞を 0.25×10^5 /well 加えた群 (15696 ± 7380)、培養細胞を 0.50×10^5 /well 加えた群 (12687 ± 5614)、培養細胞を 1.00×10^5 /well 加えた群 (13356 ± 1438) であった。

図2. 培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



2) 抗 CD80 抗体および抗 CD86 抗体を添加した細胞培養の分画

培養後の細胞のうち、CD4⁺T 細胞が 55.01 ± 5.39%、CD8⁺T 細胞が 26.5 ± 4.68% と T 細胞が 80%以上を占めた。これに対し、B 細胞、NK 細胞はそれぞれ 5.98 ± 0.85%、2.81 ± 1.45%であった。また、単球は 4.83 ± 3.41%であった。さらに、樹状細胞が 2.3%、顆粒球が 0.2%程度認められた (表 2)。

3) 細胞培養の至適細胞濃度
細胞濃度を 5x10⁶/ml,

8x10⁶/ml, 10x10⁶/ml にて 1 週間培養した細胞の生細胞率は 73.3%, 62.3%, 47%と細胞濃度依存性に低下した。これに、遠心操作を 2 回加えると生細胞率は 77.4%, 72.3%, 74.6%と改善を認めた。回収された生細胞数から 8x10⁶/ml が上限と判断できた。

4) 培養細胞後の回収した細胞の安全性についての研究

患者へ投与する最終試験物に、培養使用する抗体が残留することは好ましくない。そのため、本試験における試験

表2. 培養細胞のデータ(細胞のphenotype)

Phenotype	細胞種	N	2週間培養後 (%)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4 ⁺ T cell	4	55.01 ± 5.39
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	4	26.52 ± 4.68
CD3 ⁺ CD19 ⁺	B cell	4	5.98 ± 0.85
CD3 ⁺ CD16 ⁺ 56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	4	2.81 ± 1.45
CD14 ⁺ SCC ^{mid}	Monocyte	4	4.83 ± 3.41
Lin1 ⁺ CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	4	1.00 ± 1.65
Lin1 ⁺ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	4	1.29 ± 1.95
Lin1 ⁺ CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	Granulocyte	4	0.16 ± 0.09

物製造工程においては、洗浄回数を検討するため、小規模試験において洗浄回数と抗体残留量の検討を行った(n=4)。本試験で用いる抗ヒト CD80 及び CD86 抗体はアイソタイプがマウス IgG であり、これらの抗体残留量はマウス IgG を ELISA 法にて測定することで検討した。洗浄は計 4 回行い、各回での残留抗体濃度を計 4 回の試験で検討した。1 回の洗浄では全例で抗体遺残が認められたが、2 回洗浄で抗体は 4 例中 3 例で検出されず、3 回以上の洗浄では全例において抗体残留を認めなかった。従って、本試験における試験物製造工程において 4 回洗浄を行うことで、試験物に抗体が残留し患者体内に混入する危険性を回避し得ることが示された (図 3)。

図3. 培養液洗浄後の抗CD80/CD86抗体濃度

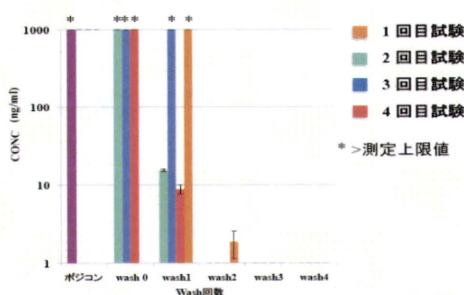


表4. 培養細胞のデータ(細胞数・Treg phenotype)

	培養開始時	2週間培養後
リンパ球数 (x10 ⁹)	10.95	3.14
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	43.32	54.42
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)	0.36	4.41
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	1.20	9.22
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	0.68	14.11
CD4 ⁺ CD127 ^{low} Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	1.63	3.25

5) 健常人による臨床前試験

健常成人 2 名から成分採血法 (アフエレーシス) により末梢血単核細胞を採取し、1 方をドナー、他方を患者 (レシピエント) に見立て、実際の細胞治療と同じ大量細胞を用い、製造方法、使用する抗体等も同一の条件として制御性 T 細胞の誘導実験を実施した。また、培養前後の細胞につき、細胞数表面抗原の解析を行った。

安全性の確認のため、Endosafe-PTS (Wako)を用いて最終産物のエンドトキシン測定をおこなった。最終試験物はエンドトキシン濃度<0.05 EU/mL と感出検度以下を示した。

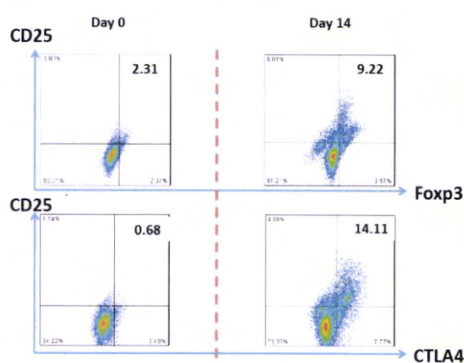
総リンパ球数は培養前の 10.95×10^9 から 2 週間培養後に 3.14×10^9 となっている (表 4)。この細胞数の減少は、小規模培養試験と同様、本培養系で生存できないリンパ球の特定の分画が死滅したことが理由と考えられる。

表面抗原の解析により、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、43.3%から 54.4%

と約 11%の上昇を認めた。一方、制御性 T 細胞である CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺細胞は、0.36%から 4.41%と 12 倍以上の比率に上昇した (図 4)。これにより、小規模試験の結果と同様、制御性 T 細胞が本培養系により、選択的に誘導されていると考えられた。

更に CD4⁺細胞中の比率を見ると、CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺細胞は 1.2%から 9.2%、CD4⁺ CD25⁺ CTLA4⁺細胞は 0.7%から 14.1%、CD4⁺ CD127^{lo} Foxp3⁺細胞は 1.6%から 3.3%へとそれぞれ上昇した (表 4、図 4)。

図4. 培養細胞中の制御性T細胞の割合



培養後に制御性 T 細胞であ

る CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺細胞の比率は著明に上昇しているが、その頻度は数%に留まる。試験物の性状を把握するため、培養後細胞につき、表面抗原を解析し、試験物に含まれる細胞分画を検討した。培養後細胞のうち、CD4⁺ T 細胞が 54.4%、CD8⁺ T 細胞が 30.0%と T 細胞が 84%以上を占めた。これに対し、B 細胞、NK 細胞はそれぞれ 6.5%、7.4%であった。また、単球は 1%であった。さらに、樹状細胞が 0.2%、顆粒球が 0.1%程度認められた。

これらの結果は、小規模試験とほぼ同等であった。

6) 臨床試験 1 例目

総リンパ球数は培養前の 3.43×10^9 から 2 週間培養後に 0.61×10^9 となった (表 6)。表面抗原の解析により、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、30.0%から 42.2%と約 12%の上昇を認めた (表 7)。

一方、制御性 T 細胞である CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺細胞は、

表5. 培養細胞のデータ(細胞phenotype)

Phenotype	細胞種	2週間培養後 (%)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4 ⁺ T cell	54.42
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	30.01
CD3 ⁻ CD19 ⁺	B cell	6.52
CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	7.42
CD14 ⁺ SCC ^{mid}	Monocyte	1.02
Lin1 ⁻ CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	0.12
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	0.07
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	Granulocyte	0.13

表6. 臨床試験1例目の培養細胞のデータ(細胞数・Treg phenotype)

	培養開始時	1週間培養後	2週間培養後
リンパ球数 (x10 ⁹) (生細胞率:%)	3.43 (99)	2.09 (90.95)	0.605 (89.5)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	30.00	-	42.20
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)	0.78	-	5.11
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	4.54	-	12.20
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	3.50	-	25.00
CD4 ⁺ CD127 ^{low} Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	0.21	-	16.00

表7. 臨床試験1例目の培養細胞のデータ(細胞phenotypeのTable)

Phenotype	細胞種	培養前 (%)	2週間培養後 (%)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4 ⁺ T cell	30	42.2
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	27.5	43.5
CD3 ⁺ CD19 ⁺	B cell	2.63	1.46
CD3 ⁺ CD16 ⁺ 56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	6.17	5.39
CD14 ⁺ SSC ^{mid}	Monocyte	8.1	6.5
Lin1 ⁻ CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	0.005	0.0008
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	0.306	0.0002
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	Granulocyte	0.009	0.01

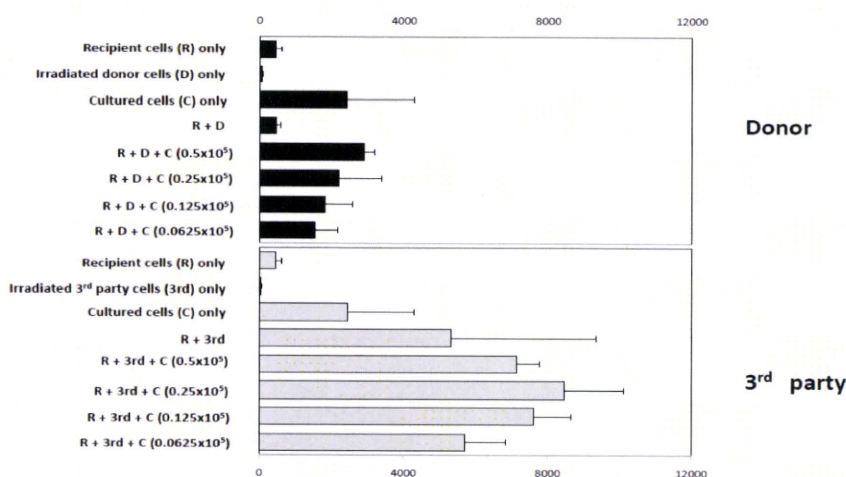
0.8%から 5.1%と上昇した。
更に CD4⁺細胞中の比率を見ると、CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺細胞は 4.5%から 12.2%、CD4⁺ CD25⁺ CTLA4⁺細胞は 3.5%から 25.0%、CD4⁺ CD127^{low} Foxp3⁺細胞は 0.2%から 16.0%へとそれぞれ上昇した。

表面抗原を解析の結果、CD4⁺ T 細胞が 42.2%、CD8⁺ T 細胞が 43.5%と T 細胞が 85%以上を占めた。これに対し、B 細胞、NK 細胞はそれ

ぞれ 1.5%、5.4%であった。また、単球は 6.5%であった。さらに、樹状細胞が 0.001%、顆粒球が 0.01%程度認められた。

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。1x10⁵/well のレシピエント細胞、照射したドナー細胞に、培養細胞(0.0625x10⁵/well, 0.125x10⁵/well, 0.25x10⁵/well, 0.50x10⁵/well)を加え共培養を

図5. 臨床試験1例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



行いチミジンの取り込みで評価した。MLRの結果(mean±SD)は、培養細胞を加えない(control)群(481±107)、培養細胞を0.0625x10⁵/well加えた群(1549±628)、培養細胞を0.125x10⁵/well加えた群(1830±754)、培養細胞を0.25x10⁵/well加えた群(2207±1163)、培養細胞を0.50x10⁵/well加えた群(2910±288)であった(図5)。この結果は小規模試験とは逆の結果であったが、Control群の反応がないことから培養細胞

のみが増殖した結果と判断された。以降、2例目よりレシピエント細胞を培養時に凍結してMLR時に解凍して使用することとした。

7) 臨床試験2例目

総リンパ球数は培養前の6.9×10⁹から2週間培養後に2.54×10⁹となった(表8)。

表面抗原の解析により、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、48.0%から65.3%と約17%の上昇を認め

表8. 臨床試験2例目の培養細胞のデータ(細胞数・Treg phenotype)

	培養開始時	1週間培養後	2週間培養後
リンパ球数 (x10 ⁹) (生細胞率:%)	4.19 + 2.69 (100) (99.6)	3.81 (95.6)	2.54 (93.2)
Donorリンパ球数 (x10 ⁹) (生細胞率 %)	3.27 (94.9)	3.27	-
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	48.00	-	65.30
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)	1.17	-	19.46
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	3.21	-	28.10
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	4.02	-	21.70
CD4 ⁺ CD127 ^{low} Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	0.41	-	23.40

表9. 臨床試験2例目の培養細胞のデータ(細胞phenotype)

Phenotype	細胞種	培養前 (%)	2週間培養後 (%)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4 ⁺ T cell	48	65.30
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	212.4	24.60
CD3 ⁻ CD19 ⁺	B cell	2.66	7.90
CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	4.57	1.98
CD14 ⁺ SCC ^{mid}	Monocyte	19.4	6.28
Lin1 ⁻ CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	0.32	0.50
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	0.37	0.12
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	Granulocyte	0.32	0.20

た。

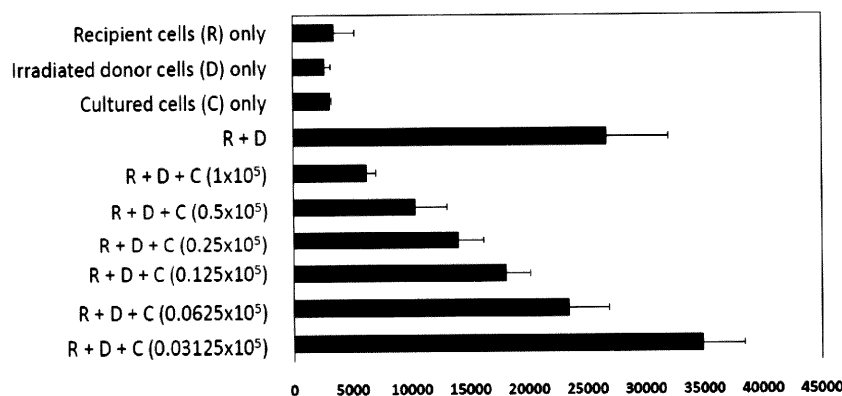
一方、制御性 T 細胞である CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺細胞は、1.2%から 19.5%と上昇した。更に CD4⁺細胞中の比率を見ると、CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺細胞は 3.2%から 28.1%、CD4⁺ CD25⁺ CTLA4⁺細胞は 4.0%から 21.7%、CD4⁺ CD127^{lo} Foxp3⁺細胞は 0.4%から 23.4%へとそれぞれ上昇した(表8)。

表面抗原を解析の結果、CD4⁺ T細胞が 65.3%、CD8⁺ T細胞が 24.6%と T細胞が 89%以上を占めた。これに対し、B細胞、NK細胞はそれ

ぞれ 7.9%、2.0%であった。また、単球は 6.3%であった。さらに、樹状細胞が 0.6%、顆粒球が 0.2%程度認められた(表9)。

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6)。1x10⁵/well のレシピエント細胞、照射したドナー細胞に、培養細胞(0.03125x10⁵/well, 0.0625x10⁵/well, 0.125x10⁵/well, 0.25x10⁵/well, 0.50x10⁵/well, 1.0x10⁵/well)を加え共培養を行いチミジンの取り込みで評価した。MLRの結果(mean±SD)は、培養細胞

図6. 臨床試験2例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



を加えない(control)群(26735 ± 5216)、培養細胞を0.03125x10⁵/well 加えた群(34924 ± 3526)、培養細胞を0.0625x10⁵/well 加えた群(23441 ± 3469)、培養細胞を0.125x10⁵/well 加えた群(18124 ± 2080)、培養細胞を0.25x10⁵/well 加えた群(14070 ± 2102)、培養細胞を0.50x10⁵/well 加えた群(10364 ± 2690)、培養細胞を1.0x10⁵/well 加えた群(6275 ± 785)であった。この結果は小規模試験と同様の結果が得られ、免疫抑制効果を示すこと

が示唆された。

8) 臨床試験 3 例目

総リンパ球数は培養前の 9.4 ×10⁹ から 2 週間培養後に 0.8 ×10⁹ となった (表 10)。表面抗原の解析により、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、30.6%から 66.6%と約 36%の上昇を認めた。一方、制御性 T 細胞である CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺細胞は、1.1%から 10.1%と上昇した (表 11)。更に CD4⁺細胞中の比率を見ると、CD4⁺ CD25⁺

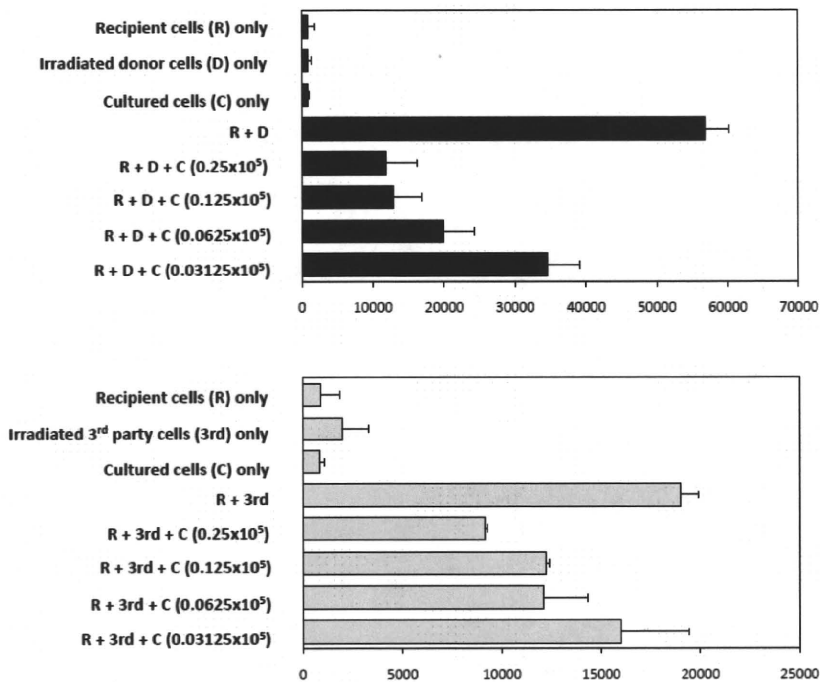
表10. 臨床試験3例目の培養細胞のデータ(細胞数・Treg phenotype)

	培養開始時	1週間培養後	2週間培養後
リンパ球数 (x10 ⁹) (生細胞率:%)	5.05 + 4.38 (99.6) (99.5)	4.002 (77.4)	0.785 (77.2)
Donorリンパ球数 (x10 ⁹) (生細胞率 %)	3.625 (99.7)	3.625	-
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	30.6	-	66.6
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)	1.12	-	10.05
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	2.35	-	18
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	1.96	-	33.1
CD4 ⁺ CD127 ^{low} Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	2.46	-	13.2

表11. 臨床試験3例目の培養細胞のデータ(細胞phenotype)

Phenotype	細胞種	培養前 (%)	2週間培養後 (%)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4 ⁺ T cell	30.6	66.6
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	14.9	16.4
CD3 ⁻ CD19 ⁺	B cell	7.41	4.8
CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	3.92	5.87
CD14 ⁺ SCC ^{mid}	Monocyte	27.4	18.2
Lin1 ⁻ CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	0.76	0.068
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	0.29	0.017
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	Granulocyte	0.79	0.013

図7. 臨床試験3例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



Foxp3⁺細胞は 2.35% から 18.0%、CD4⁺ CD25⁺ CTLA4⁺細胞は 1.96% から 33.1%、CD4⁺ CD127^{lo} Foxp3⁺細胞は 2.5% から 13.2%へとそれぞれ上昇した。

表面抗原を解析の結果、CD4⁺ T細胞が 66.6%、CD8⁺ T細胞が 16.4%と T細胞が 83%以上を占めた。これに対し、B細胞、NK細胞はそれぞれ 4.8%、5.9%であった。また、単球は 18.2%であった。さらに、樹状細胞が 0.9%、顆粒球が 0.01%程度認められた。

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7)。1x10⁵/wellのレシピエント細胞、照射したドナー細胞に、培養細胞(0.03125x10⁵/well, 0.0625x10⁵/well, 0.125x10⁵/well, 0.25x10⁵/well)を加え共培養を

行いチミジンの取り込みで評価した。MLRの結果(mean±SD)は、培養細胞を加えない(control)群(56821±3355)、培養細胞を0.03125x10⁵/well加えた群(34581±4484)、培養細胞を0.0625x10⁵/well加えた群(19904±4462)、培養細胞を0.125x10⁵/well加えた群(12781±4069)、培養細胞を0.25x10⁵/well加えた群(11895±4265)であった。更に、ドナー細胞を3rd partyに変更して同様のMLRを行った。3rd partyのMLRの結果は、培養細胞を加えない(control)群(19024±915)、培養細胞を0.03125x10⁵/well加えた群(16008±3434)、培養細胞を0.0625x10⁵/well加えた群(12088±2214)、培養細胞を0.125x10⁵/well加えた群(12222±175)、培養細胞を0.25x10⁵/well加えた群(9142

±129)であった。この結果は小規模試験と同様の結果であった。

E. 結論

成分採血法にて採取した末梢単核球細胞を抗 CD80 抗体および抗 CD86 抗体存在下に 2 週間共培養することで、CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 制御性 T 細胞が高率に誘導された。輸注前に細胞を 4 回洗浄することで抗体残存なく、安全であることが確認された。肝移植症例 3 例において、同培養法で制御性 T 細胞が誘導され、細胞輸注後も明らかな副作用を認めず、安全に細胞治療を施行することが可能であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

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
なし

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後の免疫寛容誘導の試み」

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
研究分担者：山下 健一郎
北海道大学 大学院医学研究科 移植外科・准教授
研究分担者：寺岡 慧
国際医療福祉大学 熱海病院・教授
研究分担者：上本 伸二
京都大学 大学院医学研究科 移植外科・教授

研究要旨：生体肝移植において、抗CD80抗体および抗CD86抗体を用いex vivoで誘導した制御性T細胞を用いた新しい免疫抑制療法の臨床試験を3症例に対し施行した。細胞輸注に伴う副作用は認められず、これら症例において安全に臨床試験を施行し得た。肝移植直後はプログラフ・セルセプト・ステロイドの3剤で免疫抑制を維持したが、全例において術後1ヶ月以内にセルセプトおよびステロイドは中止し得た。3症例中2例で拒絶反応が認められたものの、いずれも免疫抑制剤中止もしくは減量最中であり、その程度も軽微で、治療に速やかに反応し肝機能は安定した。初例でCMV肝炎が認められたが、2例目以降はガンシクロビルの予防的投与によりCMV diseaseの発症は認められなかった。肝移植症例では、エンドキサン投与量・回数について今後検討の余地があることが示唆された。初例は術後6ヶ月経過したが、本臨床試験の効果、特に免疫寛容誘導効果を判定するためには、今後の症例追加に加え、これら3症例の経過観察が必要ある。

A. 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。

本研究では、生体肝移植においてドナー抗原特異的な制御性T細胞を体外(ex-vivo)で誘導してこれを肝移植後に輸注し、免疫抑制剤の減少に対する効果と本治療法の安全性を評価する。

B. 方法

(1) ドナーの検査

ドナーとしての適格性を判定するため、移植前に以下の諸検査を行う。

(a) 1次スクリーニング

①CT・超音波（肝胆膵）

CTは multi-detector 3phase CTにて3次元での血管分岐形態を確認。

②採血（CBC、肝機能、HBV、HCV、腫瘍マーカー）

(b) 2次スクリーニング

①精神科受診

②第3内科受診

③胸腹部XP

④ECG・呼吸機能検査

⑤採血（ウイルス検査、腫瘍マーカー、凝固系、血液型、不規則抗体等）

⑥麻酔科受診

⑦自己血輸血(必要ならば行う)

(2) 患者（レシピエント）の検査

レシピエントとしての適格性を判定するため、移植前に以下の諸検査を行う。

(a) 血液検査、尿・便検査

①一般：CBC、血液像、血液型、不規則抗体スクリーニング

②肝機能：TP、Alb、T-Bil、D-Bil、ZTT、TTT、GOT、GPT、LDH、ALP、 γ -GTP、LAP、ChE、T-Cho、TG、CPK、NH₃、胆汁酸

③内分泌：FT₃、FT₄、TSH、TgAb、TPOAb、TSH receptor Ab、S-Amy、U-Amy、FBS、HBA1c

④腎機能：BUN、Cr、UA、Na、K、Cl、Ca、Mg、P、Na,Ccr

⑤凝固系：PT、PT-s、INH、aPTT、Fbg、AT-III、FDP、D-dimer

⑥感染症：HBsAg、HBcAb (←+ならHBsAb、HBeAg、HbeAb、HB-DNA(PCR法))*¹、HCV-Ab(HCV-RNA(定量,定性)、HCV-genotype)*²、HTLV-1、HIV、梅毒RPR法定性、梅毒TPLA定性

⑦ウイルス：CMV-IgG、CMV-IgM*³、HSV-IgG、HSV-IgM、VZV-IgG、VZV-IgM、EBV-IgG、EBV-IgM*⁴

⑧真菌、原虫：カンジダ抗原、 β -Dグルカン*⁵、トキソIgG、トキソIgM

⑨腫瘍マーカー：CEA、AFP、AFP-L3、CA19-9、PIVKA-II、DUPAN-II

⑩免疫系：PPD（ツ反）、ツIgG、IgM、IgA、IgE、CH-50、C3、C4

⑪自己抗体系：抗核抗体、RF、ASO、CRP、AMA(AMA-M2)*⁶

⑫その他：血清鉄、フェリチン、S-Cu、U-Cu、セルロプラスミン(一日尿中Cu)*⁸、中ラズミン1アンチトリプシン(1アンチキモトリプシン)*⁷、prealbumin、RBP、transferrin、レニン、アルドステロン、VitD、PTH-i、オステオカルシン、血中 β 2-MG

⑬尿検査：尿糖、尿蛋白、尿沈渣、尿中NTx、尿中 β 2-MG、25(OH)-VitD

⑭便潜血：オルトトリジン、グアヤック、ラテックス

*1 HBsAg(+),もしくはHBcAb(+)の場合にHBsAb, HbeAg, HbeAb, HB-DNA(PCR法)を測定する。

*2 HCVAb(+)の場合にはHCV-RNA 定量、定性、HCV-genotype (検査科にgenotype測定を依頼)を測定する。

- *3 CMV-IgM(+)の時には CMV antigenemia C10, C11 を測定する。
- *4 EBV-IgM(+)の時には EBV PCR を測定する。(SRL に校費負担で提出)
- *5 真菌感染が疑われる場合、PCR(三菱)による抗原検査を実施する。
- *6 PBC の場合抗ミトコンドリア抗体分画 (AMA-M2) を追加。
- *7 α 1-AT 欠損症の場合は α 1-アンチキモトリプシンを測定する。(校費負担)
- *8 Wilson 病の場合、1 日尿中 Cu 排出量を測定。(治療前と治療後)

その他

1) シトルリン血症の場合は血中シトルリン濃度と肝組織中アルギニノコハク酸合成酵素を測定する。

2) HCV の genotype

(b) 画像診断

①胸部 X-ray、腹部 X-ray

②腹部 US：放射線科依頼一門脈の開存性、径、血流方向。腫瘍の有無など。

③胸部～腹部 CT：胸部～骨盤腔を含める。

*上腹部は血管走行を見るため下記の Multidetector row CT による 3 phase 画像

胸部、下腹部、骨盤腔は delay phase のみで良い。

④腹部 dynamic MRI

⑤頭部 MRI (精神科受診)

⑥脳波 (精神科受診)

⑦上部消化管内視鏡

<画像診断の追加検査>

・40 才以上の女性の場合：マンモグラフィー

・40 才以上の場合：大腸内視鏡

・肝細胞癌の場合

各種検査、他科受診の前に脈管侵襲の有無をまずチェックする。

次いで遠隔転移の有無 (骨シンチ、胸部 CT、頭部 MRI) を検査する。Micrometastasis の概念から末梢血、骨髓血の AFP-mRNA について 3 回検索する。

Multidetector row CT による 3 phase 画像を行う。

CT-AP に関しては、患者によりその施行を決定する。

脈管の閉塞、異常が疑われた場

合：MRI-Angio、血管造影、超音波血管内エコー

(c) 呼吸循環器系検査

①呼吸機能検査(DLCO 検査を同時に実施する)

②肺内シャント率測定：A-aDO₂ ならびに PaO₂ (FiO₂ 1.0) も評価する

③心電図

④心エコー：30 才以上は必須。小児の場合は小児科心臓班に依頼する。

⑤血液ガス分析：room air で検査する。

<肺高血圧症が疑われた場合>

収縮期肺動脈圧(SPAP)が 30mmHg 以上の場合：術前に Prostacycline の持続投与が必要になるため、右心カテでの測定が必要となる。

(d) 他科受診による評価

①循環器内科：成人の心エコー検査

②耳鼻科：中耳炎、副鼻腔炎などの耳鼻科的感染症、疾患の有無。