

13. Junghans T, Bohm B, Grundel K, Schwenk W, Muller JM (1997) Does pneumoperitoneum with different gases, body positions, and intraperitoneal pressures influence renal and hepatic blood flow? *Surgery* 121:206–211
14. Richter S, Olinger A, Hildebrandt U, Menger MD, Vollmar B (2001) Loss of physiologic hepatic blood flow control (“hepatic arterial buffer response”) during CO₂-pneumoperitoneum in the rat. *Anesth Analg* 93:872–877
15. Alexakis N, Gakiopoulou H, Dimitriou C, Albanopoulos K, Fingerhut A, Skalistira M, Patsouris E, Bramis J, Leandros E (2008) Liver histology alterations during carbon dioxide pneumoperitoneum in a porcine model. *Surg Endosc* 22:415–420
16. Meierhenrich R, Gauss A, Vandenesch P, Georgieff M, Poch B, Schutz W (2005) The effects of intraabdominally insufflated carbon dioxide on hepatic blood flow during laparoscopic surgery assessed by transesophageal echocardiography. *Anesth Analg* 100:340–347
17. Sharma KC, Brandstetter RD, Brensilver JM, Jung LD (1996) Cardiopulmonary physiology and pathophysiology as a consequence of laparoscopic surgery. *Chest* 110:810–815
18. Guven HE, Oral S (2007) Liver enzyme alterations after laparoscopic cholecystectomy. *J Gastrointest Liver Dis* 16:391–394
19. Nickkholgh A, Barro-Bejarano M, Liang R, Zorn M, Mehrabi A, Gebhard MM, Buchler MW, Gutt CN, Schemmer P (2008) Signs of reperfusion injury following CO₂ pneumoperitoneum: an in vivo microscopy study. *Surg Endosc* 22:122–128
20. Valenza F, Aletti G, Fossali T, Chevillard G, Sacconi F, Irace M, Gattinoni L (2005) Lactate as a marker of energy failure in critically ill patients: hypothesis. *Crit Care* 9:588–593
21. Ozawa K, Aoyama H, Yasuda K, Shimahara Y, Nakatani T, Tanaka J, Yamamoto M, Kamiyama Y, Tobe T (1983) Metabolic abnormalities associated with postoperative organ failure. A redox theory. *Arch Surg* 118:1245–1251
22. Williamson DH, Lund P, Krebs HA (1967) The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J* 103:514–527
23. Caban A, Wiaderkiewicz R, Kaminski M, Oczkowicz G, Ziaja J (2000) Arterial ketone index in assessing liver function and its detoxicative capability after ischemia-reperfusion injury. *Acta Biochim Pol* 47:1137–1146
24. Qian T, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ (1997) Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol* 273:1783–1792
25. Jaeschke H, Lemasters JJ (2003) Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 125:1246–1257
26. Sakka SG, van Hout N (2006) Relation between indocyanine green (ICG) plasma disappearance rate and ICG blood clearance in critically ill patients. *Intensive Care Med* 32:766–769
27. Yavuz Y, Ronning K, Bakkelund K, Lyng O, Aadahl P, Marvik R, Gronbech JE (2006) Hemodynamic and tissue blood flow responses to long-term pneumoperitoneum and hypercapnia in the pig. *Surg Endosc* 20:1394–1401

高力価HBs抗体含有免疫グロブリン大量投与の アロ免疫応答に対する影響

田中友加・大段秀樹*

特集 B型肝炎・肝移植後の再発予防法の現状

Immunological effects of high-dose hepatitis B immunoglobulin on allo-immune responses after liver transplantation

成人生体肝移植後にリンパ球混合試験を応用した免疫モニタリングを用い、レシピエントの抗ドナー低応答性を確認しつつ免疫抑制療法の最適化を行ったところ、免疫抑制剤の完全離脱 (operational tolerance) を4例経験した。これらの寛容症例には、共通してB型肝炎感染症患者で、肝移植後早期にHBIG大量投与療法がなされていた。最近、免疫グロブリン由来のregulatory T epitopeに制御性T細胞を増加させる効果があることが報告された。本稿では、HBIGによる制御性T細胞誘導とアロ免疫応答に対する影響の可能性を考察する。

Tanaka Yuka・Ohdan Hideki*

key words : 免疫グロブリン製剤, B型肝炎, 制御性T細胞

B型肝炎肝移植患者における operational tolerance

臓器移植後の感染症や悪性腫瘍の発生に関する問題を考慮すると、個々の免疫状態を適切に監視し、至適免疫抑制療法の実践を行うことが望まれる。筆者らの施設では、肝移植後の免疫学的指標として、Carboxyfluorescein diacetate succinidyl ester (CFSE) 蛍光色素染色法を用いたリンパ球混合試験 (CFSE-MLR) による抗ドナー細胞免疫応答モニタリングに基づく必要最小限の免疫抑制療法を、肝移植後のレシピエントに対して施行している¹⁻³⁾。

その方法は、レシピエント、ドナー、サードパーティ健康人ボランティアの末梢血単核球には放射線を照射し stimulator とする。肝移植後のレシピエント単核球はCFSE色素でラベリングし、両者を数日間混合培養し、フローサイトメトリーを用いてリンパ球の分裂回数をCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞別に解析し、抗ドナー応答の定量化を行う。

同時に、拒絶反応の有用な指標であるCD25の表出を伴いながら分裂増殖するCD8⁺T細胞の細胞集団の存在比率を評価している。得られたデータを用いて免疫抑制剤の最適化を図るためのアルゴリズムによって、レシピエントの免疫状態を4段階に分類し、それに即した免疫抑制剤の増減を行っている (図1)³⁾。

アルゴリズムによってCD4、CD8T細胞応答のstimulation index および抗ドナー反応性CD8T細胞のCD25表出率の解析結果による免疫状態のカテゴリー分類に基づき免疫抑制剤の減量を試みたところ、現在までに4例において免疫抑制剤完全離脱 (operational tolerance) に成功した。これらの患者は、一貫して抗ドナー低応答状態を維持しており、共通して肝移植後早期に高力価HBs抗体含有免疫グロブリン (hepatitis B immunoglobulin : HBIG) 療法がなされていた。さらに、末梢血中には制御性T細胞 (regulatory T cell : Treg) の有意な増加を認めた (図2)。また、non-operational tolerance 症例でも、原疾患別に肝移植後抗ドナーstimulation index を比較すると、HBIG療法を受けたB型肝炎症例で抗ドナー応答の低下傾向を認めた (図3)。

*Department of Surgery, Division of Frontier Medical Science, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University 広島大学大学院医歯薬学総合研究科先進医療開発科学講座外科

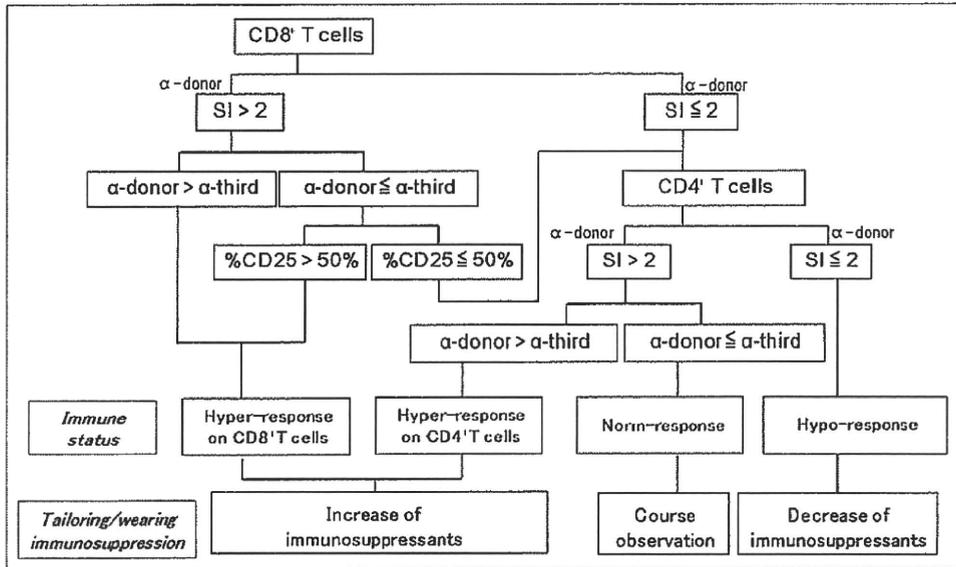


図1 CFSE-MLRに基づくアルゴリズムによる免疫抑制剤増減の指標

感作のない同種異系の組み合わせにおけるSIは平均2前後であるため、これを基準とし、抗ドナーおよび抗サードパーティのCD4⁺、CD8⁺T細胞の各SI、さらに、拒絶反応の有効な指標である反応性CD8⁺T細胞のCD25の表出率を用いて、四つのレシビエント免疫抑制状態に分類した。

細胞傷害性であるCD8⁺T細胞の抗ドナーSIが2以上で、サードパーティより有意にCD25の表出率が高い場合は、強い抗ドナー免疫応答が進行していることが予測される。すなわち、拒絶反応の存在や今後起こりうる可能性が示唆される。しかし、抗サードパーティ応答より抑制され、CD25の表出率も低いか、あるいは、SIが2以下である場合は、解析時での抗ドナー細胞傷害性は乏しいと考え、ヘルパーCD4⁺T細胞の応答を重視する。CD4⁺T細胞のSIが2を超え、抗サードパーティ応答よりも強い場合、潜在的感作状態が示唆される。しかし、抗サードパーティ応答よりも抑制されている場合、normal responseと考える。さらに、CD4⁺、CD8⁺T細胞ともにSIが低い場合は、非特異的な免疫過剰抑制状態であり、免疫抑制剤の減量が可能であるとした。

SI: stimulation index. α-donor: anti-donor response. α-third: anti-third party response. % CD25: % of CD25 expressing cells among proliferating CD8⁺T cells

この特異的抗ドナー低応答性は、B型肝炎そのものが影響するのか、あるいは投与されたHBIGが関連するのか興味を持たれる。

興味深いことには、HBIGを投与されたB型肝炎肝移植患者の急性拒絶発症率が有意に低いことが、すでに報告されている⁴⁻⁶⁾。この報告⁴⁾ではさらに、アロリンパ球混合培養系にHBIGを添加すると、抗原提示能が抑制され(共刺激分子の表出が低下)、T細胞応答が抑制されたことも示され、HBIGそのものの免疫制御機構の存在を示唆して

いる。

免疫グロブリン療法は、感染症にとどまらず自己免疫などの免疫関連疾患や炎症に対しても良好な臨床効果が得られるが、メカニズムは不明な点が多い。最近、静脈内免疫グロブリン投与(intravenous immunoglobulin: IVIG)によってTregの増加を認める報告や⁷⁻⁹⁾、IgG-Fc領域由来の合成蛋白(regulatory T-eitope: Tregitope)によるTreg誘導の報告¹⁰⁾がなされた。免疫グロブリンが投与され抗原と結合すると、それを取り込んだ抗原提示細

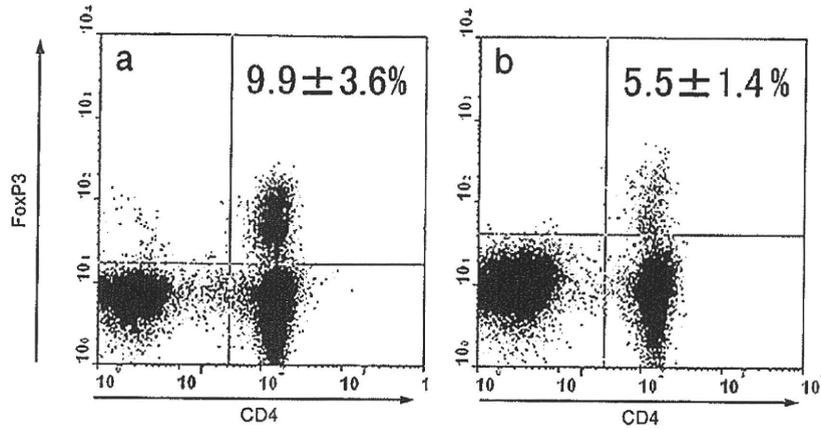


図2 Operational tolerance 症例の制御性 T 細胞の存在比率
Operational tolerance 症例 (a: n=3, 術後 5~7 年) の末梢血中 Treg 存在が高率であった。
b は Non-operational tolerant 症例

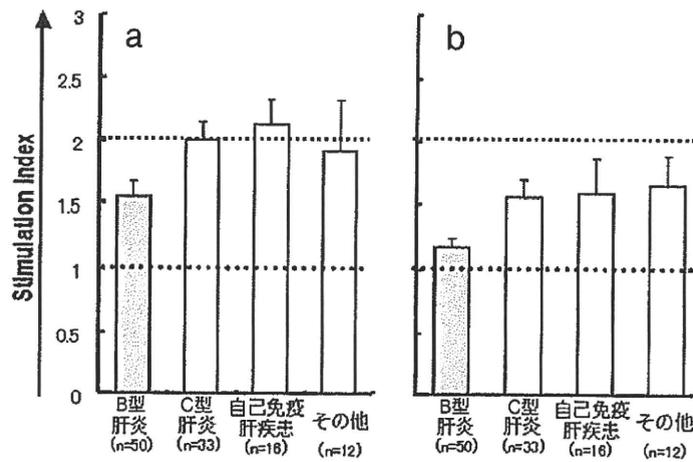


図3 肝移植後長期における原疾患別での抗ドナー免疫応答性
a: CD4T 細胞. b: CD8T 細胞
CFSE-MLR assay, Stimulation index: 1 = same as anti-self response

胞は、その主要組織適合複合体 (major histocompatibility complex: MHC) 上に標的抗原と regulatory T-eitope を表出し、抗原特異的な Treg が誘導されるものと考えられる (図 4)。

このような報告から推測するに、B 型肝炎肝移植患者に投与された HBIG によって Treg が誘導され、患者によっては免疫寛容が誘導された可能性が考えられる。

IgG-Fc 領域由来の regulatory T-eitope による免疫制御機構

免疫グロブリン可変領域 (V 領域) と結合した抗原に対する T 細胞応答の抑制は、過剰な免疫応答を制御する機構として知られる。その機序は不明であったが、最近、Treg を誘導しうるエピトープ "Tregitopes" が、IgG の Fc 領域に存在することが

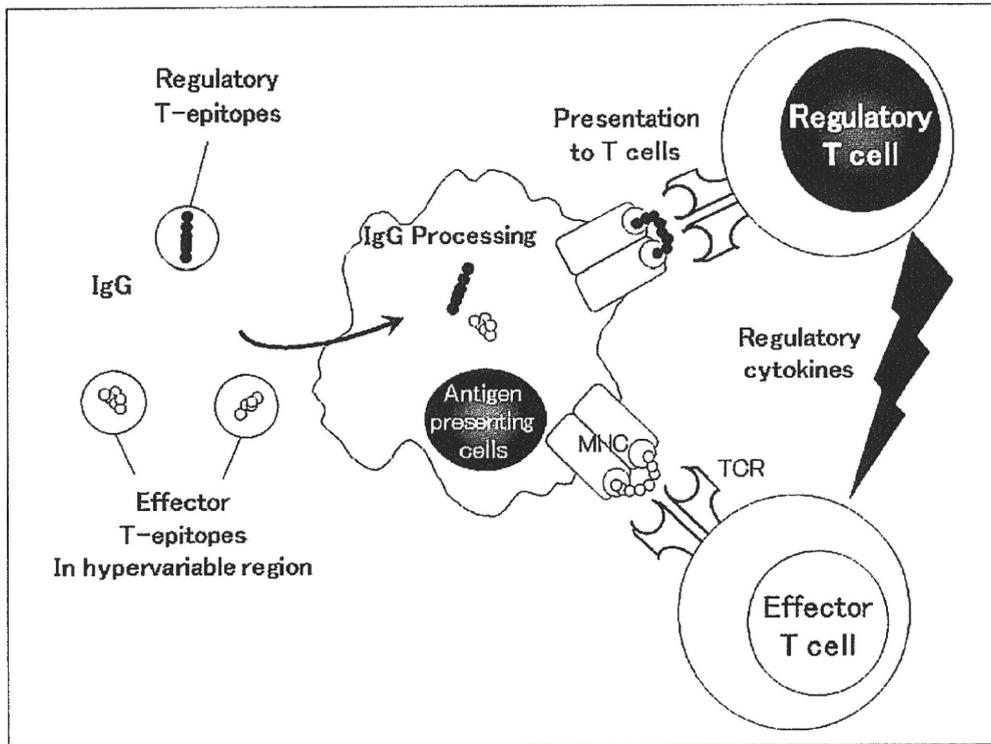


図4 IgG-Fc 領域由来の合成蛋白 (regulatory T-epitope) による制御性 T 細胞誘導機構

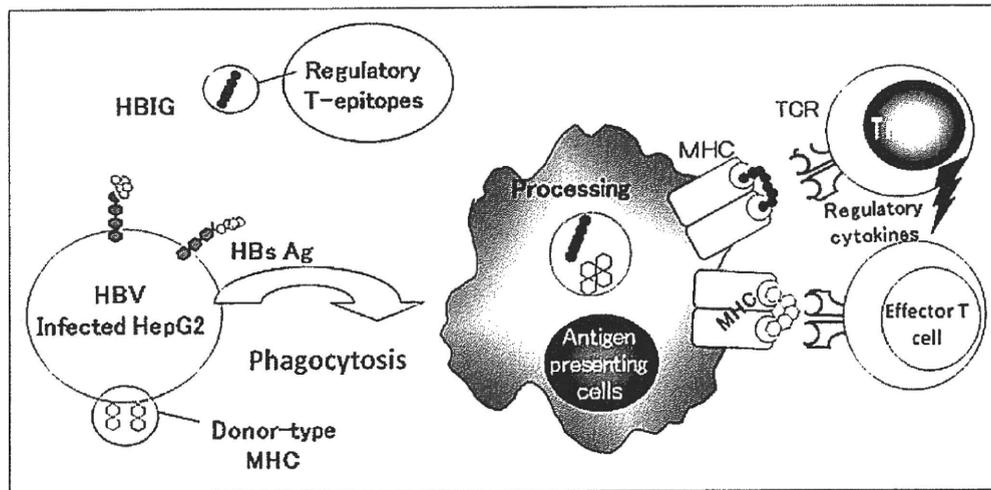


図5 抗原提示細胞への作用機序および制御性 T 細胞誘導能の仮説
TCR : T cell receptor

報告された。すなわち、IgGのC末端H鎖Peptide 289とN末端H鎖Peptide167にT細胞に対する免疫制御能があることが示された(図5)。

上述のTregitopes理論に基づいて、B型肝炎肝移植患者のアロ免疫応答を考察してみた。

投与されたHBIGがB型肝炎ウイルス(HBV)感染肝細胞に結合し傷害されると、その断片を抗原提示細胞が取り込み、IgG-Fc領域由来のTregitopeがclass II分子に表出し、それを認識したT細胞がTregへと分化する可能性が考えられる。同時にドナーHBV感染肝細胞に由来したHLA抗原もまた、抗原提示細胞のclass II上に表出され、T細胞にシグナルが伝えられる。しかし、近傍にTregが存在するため、アロ応答は特異的に抑制されている可能性があると考えられる。

現段階では、きわめて推論的ではあるが、この仮説が証明されれば、特異的免疫寛容を誘導する新たな方法へと展開される可能性が期待できる。筆者らは現在、研究を継続している。

文 献

- 1) Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T et al. : Low incidence of acute rejection after living-donor liver transplantation : immunologic analyses by mixed lymphocyte reaction using a carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling technique. *Transplantation* 79 : 1262-1267, 2005.
- 2) Tahara H, Tanaka Y, Ohdan H et al. : Successful hepatitis B vaccination in liver transplant recipients with donor-specific hyposponsiveness. *Transpl Int* 22 : 805-813, 2009.
- 3) 田中友加, 大段秀樹, 田代裕尊, 浅原利正 : 細胞質染色法を応用したリンパ球混合試験に基づくアルゴリズムを用いたシクロスポリン投与量の最適化. *今日の移植* 20 : 572-575, 2007.
- 4) Kwekkeboom J, Tha-In T, Tra WM et al. : Hepatitis B immunoglobulins inhibit dendritic cells and T cells and protect against acute rejection after liver transplantation. *Am J Transplant* 5 : 2393-2402, 2005.
- 5) Farges O et al. : Incidence of rejection and infection after liver transplantation as a function of the primary disease : possible influence of alcohol and polyclonal immunoglobulins. *Hepatology* 23 : 240-248, 1996.
- 6) Couto CA, Bittencourt PL, Farias AQ et al. : Human polyclonal anti-hepatitis B surface antigen immunoglobulin reduces the frequency of acute rejection after liver transplantation for chronic hepatitis B. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 43 : 335-337, 2001.
- 7) Amal E, Souleima C et al. : Expansion of CD4+ CD25+ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin : a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* 11 : 715-722, 2008.
- 8) Furuno K et al. : CD25+ CD4+ regulatory T cells in patients with Kawasaki disease. *J Pediatr* 145 : 385-390, 2004.
- 9) Kessel A et al. : Intravenous immunoglobulin therapy affects T regulatory cells by increasing their suppressive function. *J Immunol* 179 : 5571-5575, 2007.
- 10) Groot AS, Moise L et al. : Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide "Tregitopes". *Blood* 112 : 3303-3311, 2008.

肝移植の免疫抑制療法におけるセルセプトの役割

大 段 秀 樹*

索引用語：肝移植，免疫抑制，拒絶反応，C型肝炎，腎障害

1 ミコフェノール酸モフェチル
(Mycophenolate mofetil: MMF)

MMFは、細胞の核酸(プリン体)合成を阻害する代謝拮抗薬に属する免疫抑制剤である。ミコフェノール酸(mycophenolic acid: MPA)は1896年にPenicillium属の発酵生産物の一つとして発見され、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、免疫抑制作用を持つことが明らかにされてきた。MPAは経口吸収不良のため、経口吸収可能なエステル化誘導体MMFがプロドラッグとして開発された。MMFの2-モルフォリノエチルエステルは体内で加水分解され、MPAへと変じ作用をあらわす(図1)。生体内でのプリン代謝は*de novo*系とsalvage系の二系統の生合成経路が存在することが知られており、MPAは*de novo*系律速酵素であるイノシンモノホスフェイト合成酵素を可逆的かつ特異的に阻害する。リンパ球でのプリン代謝は*de novo*系生合成に強く依存しているために、MPAの作用により細胞のグアノシンヌクレオシドプールが枯渇す

ることで、活性化Tリンパ球およびBリンパ球に対して代謝抑制効果が強く現れる。グアノシンヌクレオシドプールの枯渇はDNA合成を抑制するため、リンパ球は細胞周期の細胞分裂期であるG1期からS期で増殖を停止する。このように、プリン合成のデ・ノボ経路を可逆的に抑制するMPAは、リンパ球に対して特異性が高く、その可逆性ゆえ、投薬の中止によるリンパ球への反応性の迅速な回復が期待される。

本薬剤は、米国の腎臓移植においてシクロスポリン(cyclosporine: CYA)の併用薬として検討されたり、アザチオプリン(acathioprine: AZA)と比べ、強い拒絶反応の発症抑制が確認され1995年に腎移植における拒絶反応抑制薬として許可された。その後、肝移植や他の臓器移植へと拒絶反応抑制薬として適応が拡大された。

2 肝移植後の免疫抑制療法

肝移植に用いられる免疫抑制剤には、
a) CYA, タクロリムス(tacrolimus: TAC)

Hideki OHDAN: The role of mycophenolate mofetil in immunosuppressive regimen after liver transplantation

*広島大学大学院先進医療開発科学講座外科学 [〒734-8551 広島県広島市南区霞 1-2-3]

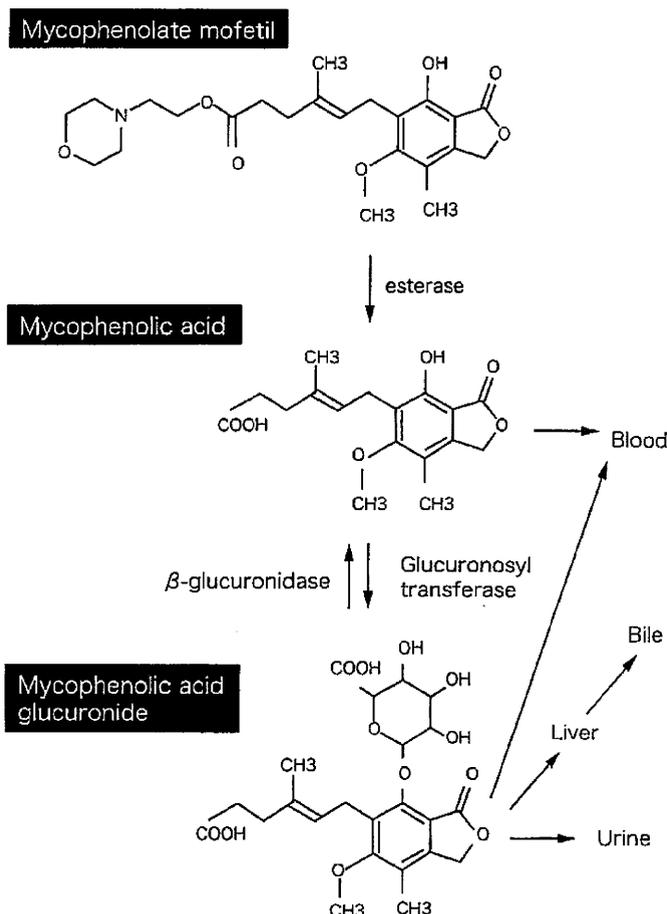


図1 ミコフェノール酸モフェチル(Mycophenolate mofetil)の構造と代謝
MMFの2-モルフォリノエチルエステルは体内で加水分解され、MPAへと変じ作用をあらわす。

などのカルシニューリンインヒビター (calcineurin inhibitor: CNI), b) AZAやMMFなどの代謝拮抗剤, c)メチルプレドニゾロン(methylprednisolone)やプレドニゾロン(prednisolone)などのステロイド, d)ムロモナブ-CD3 (OKT3), バシリキシマブ(basiliximab)などの抗リンパ球抗体などがある。各施設により薬剤の選択, 用法・用量や目標血中濃度に多少の違いはあるが, 肝移植

後の免疫抑制療法としては, a)「TACあるいはCYAといったCNIとステロイドの2剤併用」, b)「CNIとステロイドの併用にAZAまたはMMFを追加する方法」が一般的である。以下では, 肝移植後免疫抑制療法におけるMMFの位置づけについてレビューした。

3

肝移植におけるCNIの併用薬としてのMMF

肝移植におけるCNIの併用薬としてのMMF
脳死肝移植後の退院時において、MMFを含んだ3剤併用療法(MMF+TAC+ステロイド)で維持された症例において、TAC+ステロイドで維持された症例に比べ、急性拒絶反応の発症率を下げ、グラフト生着率と患者生存率を改善することも報告されている²⁾。この報告では、3剤併用療法の優位性は、レシピエントのHCV感染の有無に関わらなかったことが明記されている。さらに、肝移植後の免疫抑制療法においてMMFを含む3剤併用療法は2剤併用療法に比べ、移植後6カ月以降の晩期急性拒絶反応の発症率を軽減することが報告されている。晩期急性拒絶反応を経験した症例では、早期拒絶(移植後6カ月以内の発症)を経験した症例や拒絶無発症例に比べ有意に生存率(移植4年後)が低下するため、MMFを免疫抑制レジメに含めることが推奨されている³⁾。

4

C型肝炎ウイルス(HCV)感染患者への肝移植後に使用される場合

HCV性肝硬変は肝移植の最も頻度の高い適応疾患の一つであるが、移植後HCV肝炎の再発が高率に起こり、また肝炎の進行も移植患者以外と比較すると急速であることが分かっている⁴⁻⁶⁾。このC型肝炎の再発は、肝移植後の免疫抑制剤投与が大きく影響していると考えられているもののその原因究明や予防法は依然確立されておらず脳死肝移植、生体肝移植における世界的な研究課題となっている。ステロイドの投与によりHCVの増殖が促進される可能性が報告されていることから、ステロイド投与-早期中止あるいはステロ

イド非投与プロトコールが検討されてきた。

HCV肝炎再発の軽減を目的にステロイドフリーレジメを検討した結果として、ステロイド投与の有無自体は術後1年の肝線維化の進行に影響を認めなかったが、急性拒絶の発症は線維化の進行に有意に関与していたことが報告された⁷⁾。また、MMFが免疫抑制レジメに含まれている場合に、急性拒絶の発症率は有意に低下したため、HCV肝炎再発による肝線維化の抑制にTAC+MMF+コルチコステロイドまたはDaclizumabによる免疫抑制療法が推奨されている。また、HCV肝炎感染患者に対する肝移植後の免疫抑制において、MMFとCNI減量療法で管理された症例は、CNIのみで管理された症例に比べ、血清中HCVウイルス値に差を認めないものの、ALTレベルが低値で組織検査においても肝線維化/炎症が有意に抑制されたことが報告された⁸⁾。すなわち、MMFは肝線維化/炎症を抑制する効果を有するが、HCVに対する抗ウイルス効果については確認できていない。

一方で、HCV感染患者に対する肝移植後の免疫抑制療法において、3剤併用療法(MMF+TAC+ステロイド)は2剤併用療法(TAC+ステロイド)に比べ、急性拒絶発症率、グラフト生着率、患者生存率、HCVウイルス量、肝線維化のいずれにおいても有意な差を認めなかったとの報告もある⁹⁾。このように、MMFの直接的な抗HCV作用は、臨床においては有意でないと考えられている。

5

腎機能障害患者の対策として肝移植後に使用される場合

腎障害は、肝移植後のCNIを含んだ長期免疫抑制療法の主要な副作用の一つである。腎機能障害を認める肝移植患者において、CNI投与量を維持したレジメとMMF併用による

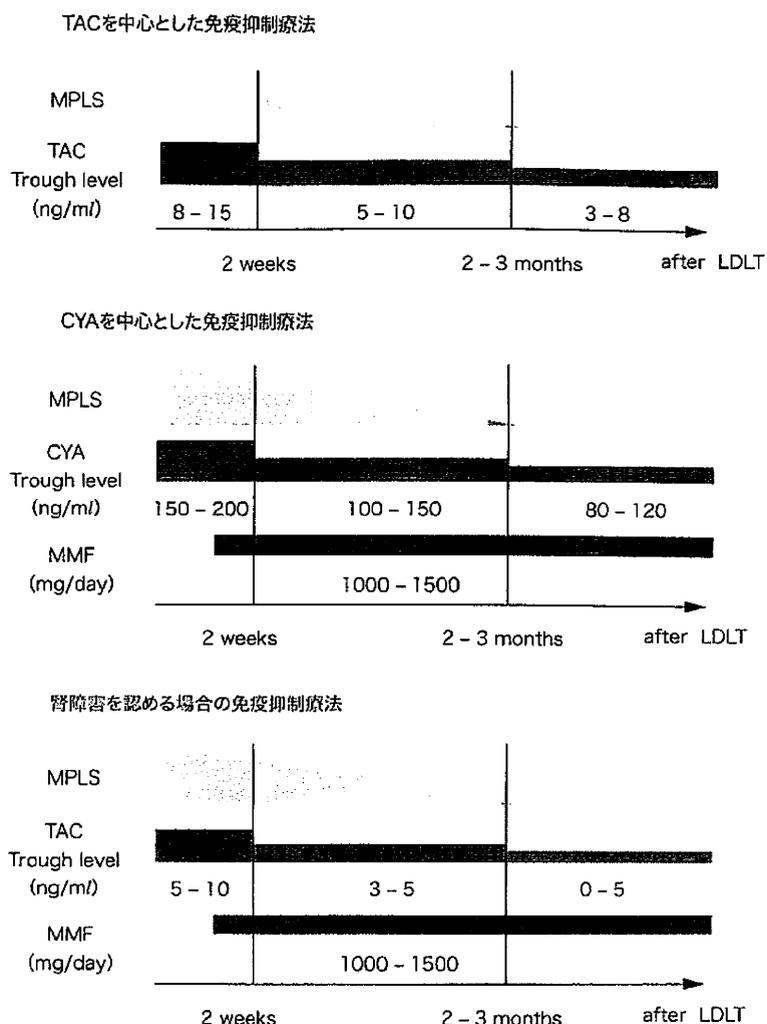


図2 広島大学病院における生体肝移植後免疫抑制プロトコール

CNI減量レジメを無作為試験で比較した結果、CNI減量レジメでは試験開始後6カ月の血清クレアチニン、尿酸、収縮期および拡張期血圧が有意に低く、拒絶反応の発症率には差を認めないことが明らかとなった¹⁰⁾。しかし、CNI減量レジメによっても、脂質代謝への影響は少なかったようである。

このように、CNIによる腎障害に対する治療戦略としては、CNIからラハマイシンあるいはMMFへのコンバージョンであり、いくつかの検討で腎機能の改善という点において良好な結果をあげた。しかし、完全なCNIの離脱は拒絶反応の発症率をあげてしまうことが懸念され、それゆえ、低用量のCNI（通常

量の50%低容量)とMMFの併用により、拒絶のリスクを避けつつ、腎障害のリスクを軽減することが一般的となっている¹¹⁻¹⁵⁾。当施設での腎機能障害の有無別の肝移植後免疫抑制療法のレジメを示す(図2)。

6 その他のMMFの効果

前述と類似の検討において、腎障害を有する肝移植患者においてCNIからMMFにコンバートしてIL-2レセプター抗体(Daclizumab)の単回投与を行った患者では、有意に腎機能が改善している¹⁶⁾。この検討では、コンバート後1カ月間は75%のCD25分子がブロックされ、それゆえ、末梢血中CD4+CD25+T細胞の存在比率が低下したが、CD4+CD25+Foxp3+T細胞の存在比率は保たれたと報告されている。MMFにコンバート後6カ月ではCD4+CD25+Foxp3+T細胞の存在比率は有意に上昇し、単核球のFOXP3 mRNAの発現も有意に上昇したとされている。CNIのIL-2産生抑制作用による制御性T細胞へのネガティブな影響が解除されたためと解釈される。MMFへのコンバートにより、制御性T細胞を介した免疫抑制機構の増強が期待できることが示唆される。

MMFの肝虚血再灌流障害に対する効果も報告された¹⁷⁾。MMFの前投与は、mitogen-activated protein kinases経路の活性化やvascular cell adhesion molecule-1の発現を抑制し、肝虚再灌流による微小循環障害を軽減するという動物実験結果が示され、今後の展開に期待がかかる。

最後に、肝移植の種類によるMMFの使用上の留意点を指摘した報告を紹介する。生体部分肝移植例では脳死全肝移植例に比べグルクロン酸抱合能が低下し、フリーMPAの血中濃度が高く維持されるため、投薬量を軽減

することが推奨されている¹⁸⁾。副作用の軽減を図るうえで参考になる指摘である。

文献

- 1) Sollinger HW : Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation* 60 : 225-232, 1995
- 2) Wiesner RH, Shorr JS, Steffen BJ et al : Mycophenolate mofetil combination therapy improves long-term outcomes after liver transplantation in patients with and without hepatitis C. *Liver Transpl* 11 : 750-759, 2005
- 3) Wiesner RH, Steffen BJ, David KM et al : Mycophenolate mofetil use is associated with decreased risk of late acute rejection in adult liver transplant recipients. *Am J Transplant* 6 : 1609-1616, 2006
- 4) Sheiner PA, Schwartz ME, Mor E et al : Severe or multiple rejection episodes are associated with early recurrence of hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 21 : 30-34, 1995
- 5) Rosen HR, Shackleton CR, Higa L et al : Use of OKT3 is associated with early and severe recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 92 : 1453-1457, 1997
- 6) Charlton M, Seaberg E : Impact of immunosuppression and acute rejection on recurrence of hepatitis C: results of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. *Liver Transpl Surg* 5 : S107-114, 1999
- 7) Kato T, Gaynor JJ, Yoshida H et al : Randomized trial of steroid-free induction versus corticosteroid maintenance among orthotopic liver transplant recipients with hepatitis C virus: impact on hepatic fibrosis progression at one year. *Transplantation* 84 : 829-835, 2007
- 8) Bahra M, Neumann UI, Jacob D et al : MMF and calcineurin taper in recurrent hepatitis C after liver transplantation: impact on histological course. *Am J Transplant* 5 : 406-411, 2005
- 9) Jain A, Kashyap R, Demetris AJ et al : A prospective randomized trial of mycophenolate mofetil in liver transplant recipients with hepatitis C. *Liver Transpl* 8 : 40-46, 2002

- 10) Schlitt HJ, Barkmann A, Böker KH et al : Replacement of calcineurin inhibitors with mycophenolate mofetil in liver-transplant patients with renal dysfunction: a randomised controlled study. *Lancet* 357 : 587-591, 2001
- 11) Pageaux GP, Rostaing L, Calmus Y et al : Mycophenolate mofetil in combination with reduction of calcineurin inhibitors for chronic renal dysfunction after liver transplantation. *Liver Transpl* 12 : 1755-1760, 2006
- 12) Ko HH, Greanya E, Lee TK et al : Mycophenolate mofetil in liver transplant patients with calcineurin-inhibitor-induced renal impairment. *Ann Hepatol* 7 : 376-380, 2008
- 13) Aw MM, Samaroo B, Baker AJ et al : Calcineurin-inhibitor related nephrotoxicity- reversibility in paediatric liver transplant recipients. *Transplantation* 72 : 746-749, 2001
- 14) Koch RO, Graziadei IW, Schulz F et al : Long-term efficacy and safety of mycophenolate mofetil in liver transplant recipients with calcineurin inhibitor-induced renal dysfunction. *Transpl Int* 17 : 518-524, 2004
- 15) Farkas SA, Schnitzbauer AA, Kirchner G et al : Calcineurin inhibitor minimization protocols in liver transplantation. *Transpl Int* 22 : 49-60, 2009
- 16) Demirkiran A, Sewgobind VD, van der Weijde J et al : Conversion from calcineurin inhibitor to mycophenolate mofetil-based immunosuppression changes the frequency and phenotype of CD4+FOXP3+ regulatory T cells. *Transplantation* 87 : 1062-1068, 2009
- 17) Liu YX, Jin LM, Zhou L et al : Mycophenolate mofetil attenuates liver ischemia/reperfusion injury in rats. *Transpl Int* 22 : 747-756, 2009
- 18) Shen B, Chen B, Zhang W et al : Comparison of pharmacokinetics of mycophenolic acid and its metabolites between living donor liver transplant recipients and deceased donor liver transplant recipients. *Liver Transpl* 15 : 1473-1480, 2009

* * *

臓器移植における B 細胞性免疫応答とその制御法 抗 HLA 抗体関連拒絶反応の克服

大段秀樹・井手健太郎・伊禮俊充・田澤宏文・田中友加・五十嵐友香*

Strategies for B cell regulation to prevent anti-HLA antibody-mediated rejection in organ transplantation

key words : HLA, antibody-mediated rejection, 腎移植, B 細胞

臓器移植における B 細胞性免疫応答は T 細胞依存性と非依存性に分類できる。血液型抗原などの糖鎖に反応する B 細胞は T 細胞非依存性に活性化する。連続する糖鎖抗原が B 細胞受容体を架橋すると、T 細胞からの刺激を要せず、活発な抗体産生が誘導されると考えられる。通常の B 細胞 (B-2 細胞) と異なる起源、特異性、組織局在を持つユニークな細胞集団である B-1 細胞にこのような応答が由来することを筆者らは報告した¹⁾。B-1 細胞は、自己抗体産生細胞として自己免疫疾患に関与することも知られ、B-2 細胞にくらべ強い細胞走化活性や抗原提示能などの特徴を有する。

一方、組織適合性抗原/HLA などペプチド抗原に反応する B 細胞は、T 細胞依存性に抗体産生細胞に成熟する。T 細胞と接触しながら、サイトカインの刺激を受け、増殖を繰り返してリンパ節に濾胞を形成し、免疫グロブリンのクラス変換を経て有効な抗体産生が誘導される。したがって、T 細胞応答の適切な抑制が、ペプチド抗原を標的とした B 細胞性拒絶反応の回避には重要となる。しかし、いったんクラス変換が進行し、抗体産生細胞に分化すると、もはや B 細胞受容体の表出が欠落するため抗原特異的な抑制シグナルが誘導されにくい。抗体関連拒絶反応が難治性である所以である。

本稿では、抗 HLA 抗体陽性例に対する腎移植経験を通じて B 細胞性免疫応答機構とその抑制戦略について概説する。

アロペプチド抗体関連拒絶反応に関わる現状

ドナー由来ペプチド抗原を認識する B 細胞は、同じペプチド抗原を認識した CD4⁺T 細胞から産生される IL-4, 5, 6 などのサイトカイン刺激により、抗体産生細胞へ分化する。また、CD8⁺T 細胞から産生される IFN- γ も B 細胞の抗体産生を促進する。CD4⁺T 細胞も CD8⁺T 細胞も樹状細胞などの抗原提示細胞に表出したドナー由来のペプチド抗原を認識し、活性化する。一方で B 細胞も、抗原提示細胞に表出したドナー由来のペプチド抗原を認識する。抗原提示細胞と T 細胞、B 細胞間での副刺激分子およびサイトカインを介したコミュニケーションにより、B 細胞は抗体産生細胞へと分化する (図 1a)。あるいは、ドナー抗原が B 細胞受容体を介して取り込まれ、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC/HLA) class II 分子上にアロペプチドを表出した B 細胞 (抗原提示 B 細胞) と CD4⁺T 細胞とのコミュニケーションによっても、抗体産生が促進される (図 1b)。

このように、T 細胞と接触しながらサイトカインの刺激を受け、B 細胞が増殖を繰り返してリンパ節に濾胞を形成して免疫グロブリンのクラス変換を経て抗体産生が誘導される。抗体関連拒絶反応のうち、最も注目を集めている要素が抗 HLA 抗体であるが、移植後 6 カ月以降の抗 HLA 抗体陽性率が 20%、抗体陽性患者のグラフトロスが 6.6%、陰性患者では 3.3% であり、抗 HLA 抗体陽性がグラフトロスのリスクファクターであると報告されている²⁾。また、抗 HLA class I 抗体は女性、出産、輸血に関連し、class II 抗体は移植腎機

* 広島大学大学院医歯薬学総合研究科先進医療開発科学講座外科学

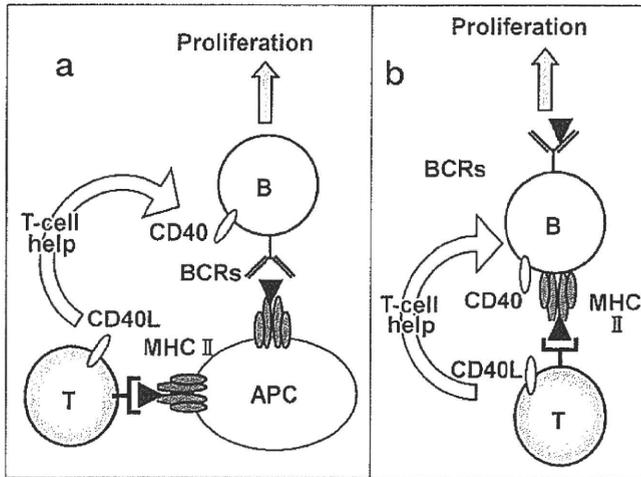


図1
T細胞依存性 antibody-mediated rejection 機構
a CD4⁺T細胞は抗原提示細胞(APC)に表出したドナー由来のペプチド抗原を認識し、活性化する。一方でB細胞も、APCに表出したドナー由来のペプチド抗原を認識する。APCとT細胞、B細胞間での副刺激分子(CD40-40L)およびサイトカイン(IL-4, 5, 6)を介したコミュニケーションにより、B細胞は抗体産生細胞へと分化する。
b B細胞受容体(BCRs)を介してドナー抗原を取り込み、MHC class II分子上にアロペプチドを表出したB細胞と、CD4⁺T細胞とのコミュニケーションによって抗体産生が促進される。

能の悪化に関連し、class I/class II抗体ともに陽性である場合に最もグラフトロスに陥る確率が高いとの報告もある³⁾。

理論的には、T細胞のアロ応答を完全に抑制できれば抗HLA抗体は産生されない。したがって、カルシニューリン阻害剤やステロイドの予防的投与が肝要であることは周知の事実であるが、移植前にすでに感作が成立している既存抗体陽性例にはもはやT細胞制御のみでは効果は期待しえない。また、既存抗体陰性例であったとしても、一次的でも免疫抑制が不十分な状態に陥り、いったん抗HLA抗体の産生応答が進行すれば、もはやT細胞応答を抑制しても抗体産生に歯止めが効かず、抗体関連拒絶反応はカルシニューリン阻害剤、ステロイドやムロモナブCD3(OKT3)を用いた治療に対して抵抗性を示すことが少なくない。

抗体関連拒絶反応の治療には、抗体除去目的の血漿交換やガンマグロブリン大量療法(IVIG)を併用することが有効であることが知られている。想定されるガンマグロブリンの作用機構としては、①マクロファージFcγ受容体のブロックによる抗体依存性細胞傷害の抑制、②補体介在性傷害の減弱、免疫複合体介在性炎症の抑制やIL-1産生の抑制といった抗炎症作用、③抗イディオタイプ作用やB細胞のFc受容体を介した抗体産生抑制作用などがあげられる。

ガンマグロブリンは、移植後の抗体関連拒絶の制御のみならず、パネルテスト陽性/クロスマッチ陽性例に対しても使用されている。最近、HLA抗原に対する高感作例に対し、リツキシマブとIVIGの併用による減感作を図り、腎移植を行った報告がなされた⁴⁾。リツキシマブによる一過性のB細胞除去と、ガンマグロブリンFc部と新たに分化したB細胞のFcγ受容体を介した抗体産生抑制効果を期待したレジメと考えられる。

既存抗体陽性例に対する腎移植

パネルテスト陽性/クロスマッチ陽性例は、本邦における献腎移植では禁忌であるが、生体腎移植では脱感作療法に成功すれば理論的には可能と考えられている。広島大学病院では術前脱感作療法のあとにクロスマッチが陰転化し、無事に生体腎移植を施行した症例を経験しているので紹介し、考察を加える。

症例は42歳の女性で、4回の妊娠歴があった。2006年1月、IgA腎症による慢性腎不全のため血液透析導入。近医で週3回の血液透析を受けていたが、シャントトラブルを繰り返し、長期留置型カテーテルが留置され、抗凝固療法が行われていた。2008年9月、夫をドナーとする生体腎移植が予定されていたが、術直前に大量の鼻出血による貧血のため輸血を受け、その輸血を契機にリンパ

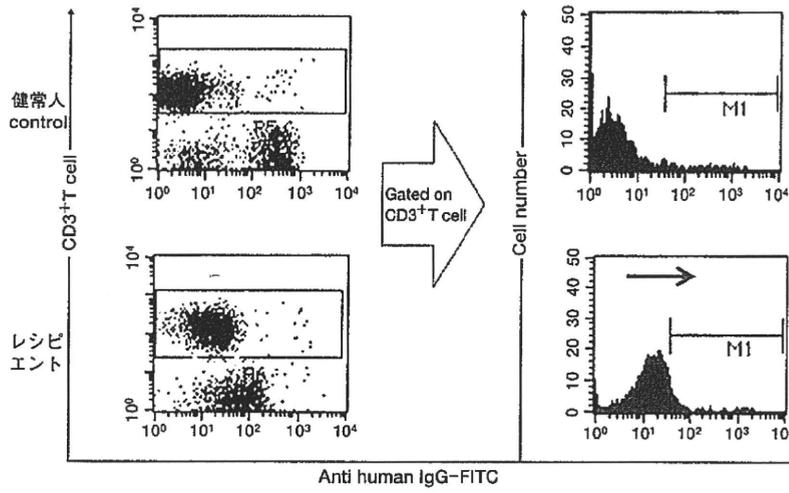


図2
リンパ球クロスマッチによる抗ドナー抗体の解析
FCXMにより、ドナーCD3⁺リンパ球に対する既存抗体の存在が示された。

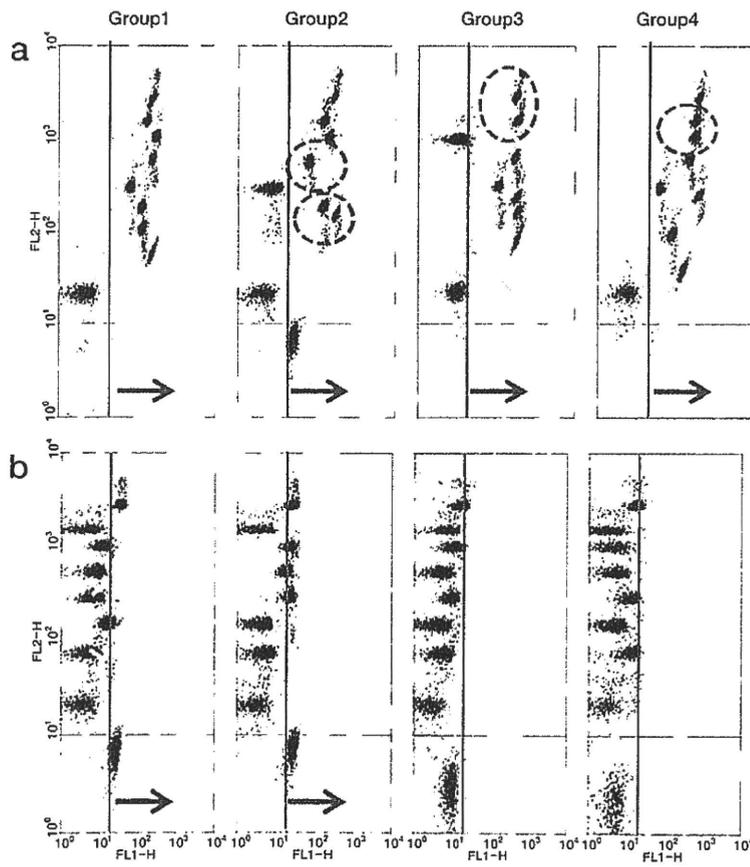


図3
Flow-PRAによる抗HLA抗体の解析
a: Class I, b: Class II.
グレイ破線円は陽性、ブラック破線円はドナーHLAに対する陽性を示す

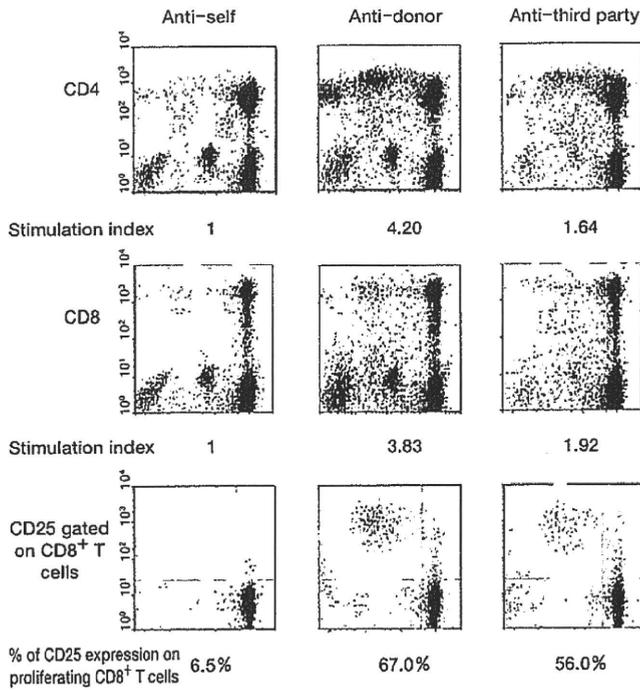


図4 MLRによる細胞性免疫応答の解析
CFSE細胞質染色法を応用したMLRによる抗ドナー免疫応答の評価。抗サードパーティ反応にくらべ、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞ともに強い抗ドナー免疫応答を認め、抗ドナー反応性分裂CD8⁺T細胞にCD25の表出を認めた(分裂CD8⁺CD25⁺T細胞は細胞傷害性を有する)。

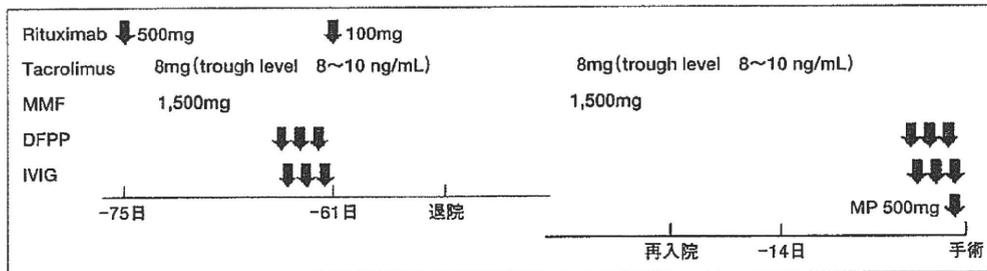


図5 脱感作療法プロトコール
MMFは下痢のため一時休薬した。

球クロスマッチテスト陽性、抗ドナー抗体陽性となったため当院紹介となった。

来院時のリンパ球クロスマッチテストは、補体依存性細胞傷害試験(CDC)で抗T細胞抗体陽性(10%)、抗B細胞抗体(warm)陽性(50%)、抗B細胞抗体(cold)(100%)であった。フローサイトメトリークロスマッチ(FCXM)でもCD3⁺抗T細胞抗体陽性であった(図2)。Flow-PRA(flowcytometry panel-reactive antibody: パネル反応抗体)では、

ドナータイプのHLAを含め複数のHLA class Iおよびclass II抗原に対する抗体が検出された(図3)。さらに、輸血による感作から日が浅いためか、リンパ球混合試験(MLR)でも、ドナーリンパ球刺激に対するCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞ともに応答が亢進していた(図4)。

術前脱感作療法は、抗CD20抗体(リツキシマブ)、タクロリムス、ミコフェノール酸モフェチル(MMF)の3剤併用で行った(図5)。リツキシマブ

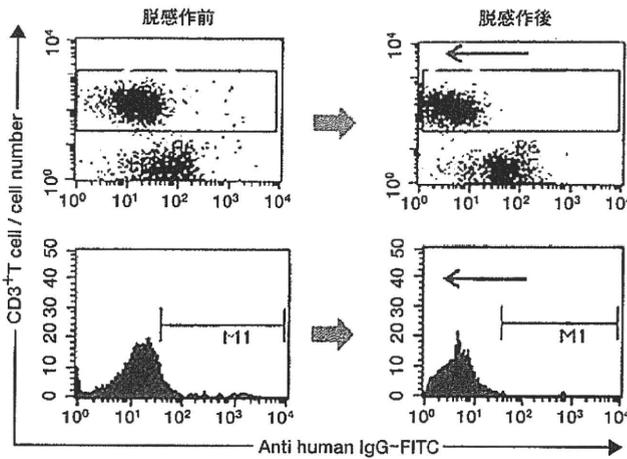


図6
リンパ球クロスマッチによる
抗ドナー抗体陰転化の確認
FCXMにより、ドナー CD3⁺リン
パ球に対する既存抗体の消失が示
された。

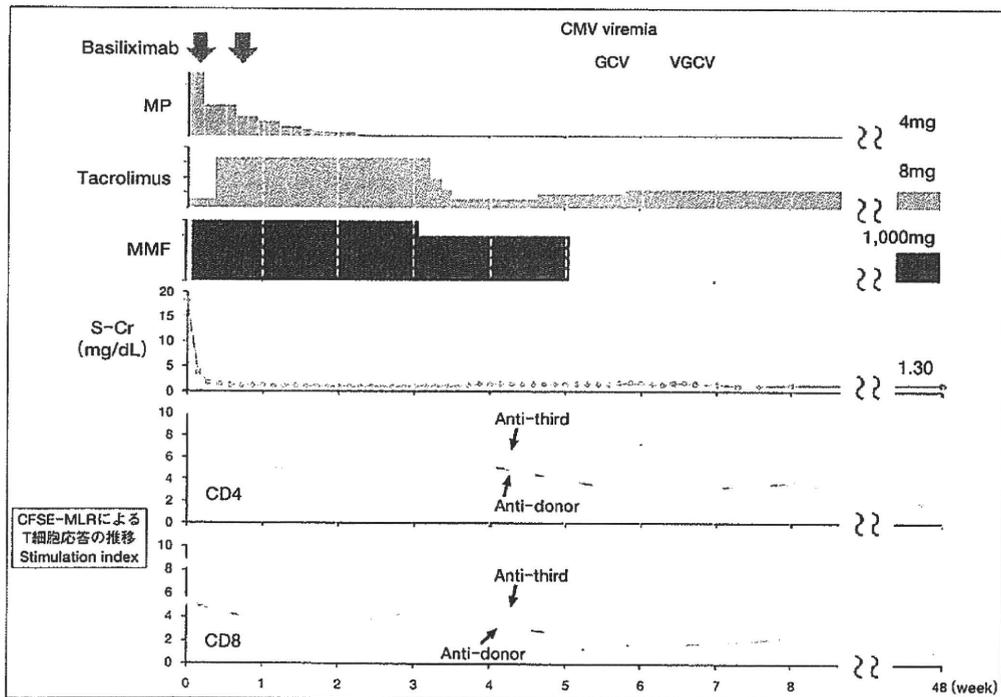


図7 術後免疫抑制療法と経過

は感作 B 細胞に対して、タクロリムスは感作 T 細胞に対して、MMF は抗体産生プラズマ細胞に対する抑制を目的に使用した。しかし、投薬開始 2 週間後に二重濾過血漿交換 (DFPP) と IVIG を施行したが、抗 HLA 抗体の低下は一過性に止まり、

リンパ球クロスマッチテストも陰性化しなかった。そこでタクロリムスと MMF の投与を継続し、投薬開始 10 週間後に再び DFPP と IVIG を施行したところ、持続的な抗 HLA 抗体の低下とリンパ球クロスマッチテストの陰性が確認できた (図 6)。

投薬開始 75 日後に、予定通り夫をドナーとする生体腎移植を施行し、術後の免疫抑制は通常通りの 4 剤併用療法(タクロリムス+ステロイド(メチルプレドニゾロン:MP)+MMF+抗 CD25 抗体(バシリキシマブ))で行った。抗体関連拒絶も細胞性拒絶もきたさず順調に経過している(図 7)。

抗体関連拒絶反応に対する今後の治療手段

当施設では、提示症例にくらべ短期間で脱感作しえた症例を経験しているが、逆に 6 カ月以上の脱感作によっても CDC および FCXM が陰転化しない症例も経験している。リツキシマブ+タクロリムス+MMF の脱感作療法は、有効な症例もあるが、すべての症例に効果を期待できる治療法とはいえず、たとえ効果があっても脱感作までには相当の日数を要する。胚中心で T 細胞からシグナルを受け体細胞突然変異(ソマティックハイパーミューテーション)を受けた HLA 抗体産生形質細胞が長寿命を獲得しているためと類推されるが、この長寿命 HLA 抗体産生形質細胞をいかに制御するかが、今後の脱感作の改善の要点と考えられる。

最近、難治性血液悪性腫瘍、特に多発性骨髄腫患者の治療として臨床使用されているプロテアソーム阻害薬の Bortezomib が、長寿命形質細胞に抑制的効果をもたらすことが確認された。Bortezomib の骨髄腫細胞の感度が免疫グロブリン合成率と相関を示したことから、蛋白合成の活発な正常形質細胞もまた、プロテアソーム阻害剤に感受性が高いのではないかという仮説が証明され、Bortezomib により短寿命および長寿命形質細胞が速やかに除去されることが報告された⁵⁾。

この知見に基づき、臓器移植における抗体関連拒絶反応の治療薬として Bortezomib の有効性が検討され、腎移植後に認められた抗 HLA 抗体の抑制効果と抗体関連拒絶反応の改善が報告された^{6,7)}。さらに、既存抗体陽性例への適応の可能性も検討されはじめ⁸⁾。今後プロテアソーム阻害剤による脱感作療法という新しい治療戦略に期待がかかる。

文 献

- 1) Zhou W, Ohdan H, Tanaka Y, Hara H, Tokita D, Onoe T et al. NOD/SCID mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes can be a model for investigating B cells responding to blood group A carbohydrate determinant. *Transpl Immunol* 12(1) : 9-18, 2003.
- 2) Terasaki PI, Ozawa M : Predicting kidney graft failure by HLA antibodies : a prospective trial. *Am J Transplant* 4 (3) : 438-443, 2004.
- 3) Campos EF, Tedesco-Silva H, Machado PG, Franco M, Medina-Pestana JO, Gerbase-DeLima M : Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. *Am J Transplant* 6 (10) : 2316-2320, 2006.
- 4) Vo AA, Lukovsky M, Toyoda M, Wang J, Jordan SC et al. Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation. *N Engl J Med* 359 (3) : 242-251, 2008.
- 5) Neubert K, Meister S, Moser K, Weisel F, Voll RE et al. The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis. *Nat Med* 14(7) : 748-755, 2008.
- 6) Perry DK, Burns JM, Pollinger HS, Amiot BP, Stegall MD et al. Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production. *Am J Transplant* 9(1) : 201-209, 2009.
- 7) Trivedi HL, Terasaki PI, Feroz A, Everly MJ, Dave SD et al. Abrogation of anti-HLA antibodies via proteasome inhibition. *Transplantation* 87(10) : 1555-1561, 2009.
- 8) Wahrmann M, Haidinger M, Körmöczí GF, Weichhart T, Böhmig GA et al. Effect of the proteasome inhibitor bortezomib on humoral immunity in two presensitized renal transplant candidates. *Transplantation* 89 (11) : 1385-1390, 2010.

解明されたシクロスポリンの新規作用

B-1 細胞への分化抑制作用

大 段 秀 樹*

ネオオーラル 10 周年シンポジウム “ネオオーラル 10 年の歩み”

CPCF 2010

Cyclosporine blocks differentiation to B-1 cells responding to blood group A antigens

Hideki Ohdan*

key words : cyclosporin, B-1 細胞, 血液型不適合移植

血液型糖鎖抗原に反応する B 細胞は、T 細胞非依存性に活性化し、連続する糖鎖抗原が B 細胞受容体を架橋すると、T 細胞からの刺激を要せず、活発な抗体産生が誘導されると考えられる。ペプチド抗原に反応する B 細胞 (B-2 細胞) とは異なる起源、特異性、組織局在を持つユニークな細胞集団である B-1 細胞にこのような応答が由来する。

筆者らは、この T 細胞非依存性 B-1 細胞への分化がシクロスポリン (cyclosporin : CsA) により抑制されることを確認した¹⁾。本稿では、B-1 細胞および B-2 細胞の分化機構の違いとカルシニューリン阻害剤の感受性の違い、そしてその臓器移植との関わりについて概説する。

B-1 細胞と B-2 細胞 lineage

抗体性応答を担う B 細胞は、B-1 細胞と B-2 細胞の 2 亜群が存在し、それぞれの分化も機能も異なる。一般に、B-1 細胞は自然免疫応答の一部としての抗体産生を、B-2 細胞は獲得免疫応答としての抗体産生を司ると考えられている。

B-2 細胞は骨髄の血液前駆細胞 (hematopoietic

precursor cells : HPC) から分化し、成熟した末梢中の B-2 細胞は抗原と暴露し、ヘルパー T 細胞からのシグナルを受けて follicular B 細胞へと分化し、Ig クラススイッチング、ソマティックハイパーミューテーション、プラズマ細胞への分化をきたす。臓器移植におけるアロペプチド抗体関連拒絶反応を担うのが、このタイプの B 細胞応答である。

このような B-2 細胞の分化は出生後に発生するが、B-1 細胞の分化は胎生期より起こる。出生後の B-1 細胞の分化機構には、二つのモデルが提唱されている (図 1)^{2,3)}。

一つは Lineage モデルで、B-1 細胞の前駆細胞は B-2 細胞の前駆細胞とは異なり、胎生期より存在する前駆細胞から生後も分化しつづけるというものである。もう一つは Selection モデルで、共通の骨髄由来前駆細胞から、暴露する抗原種の違いによって B-1 細胞か B-2 細胞に分化するというものである。どちらのモデルにせよ、B-1 細胞は、自然免疫様に迅速な応答を示し、T 細胞非依存性の抗原応答を司ると考えられている。B-1 細胞は、B-1a 細胞 (IgM^{high}CD11b⁺CD5⁺) と CD5⁻ B-1b 細胞 (IgM^{high}CD11b⁺CD5⁻) に細分されるが、両者の B 細胞受容体のレパートリーの違いが報告されている⁴⁾。

シクロスポリンによる B-1a 細胞への分化抑制

ABO 血液型不適合移植では、臓器血管内皮に存在する A, B 血液型抗原が、また、ブタ-ヒト間の異種移植では、Gal α 1,3Gal (Gal) 抗原が標的となり抗原抗体反応により移植臓器が廃絶され

*Department of Surgery, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Science, Hiroshima University 広島大学大学院医歯薬学総合研究科先進医療開発科学講座外科

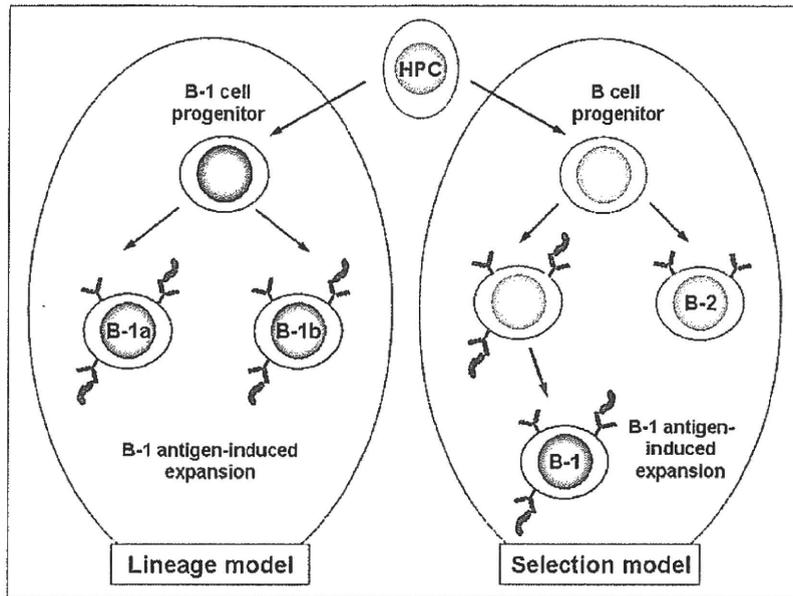


図1 B-1細胞分化モデル

B-2細胞は、骨髄のHPCから分化し、成熟した末梢中のB-2細胞は抗原と暴露し、ヘルパーT細胞からのシグナルを受けて分化し、抗体産生細胞へと分化をきたす。B-1細胞の分化機構には、二つのモデルが提唱されている。

Lineageモデル：B-1細胞の前駆細胞はB-2細胞の前駆細胞とは異なり、胎生期より存在する前駆細胞から生後も分化しつづける。

Selectionモデル：共通の骨髄由来前駆細胞から、暴露する抗原種の違いによってB-1細胞かB-2細胞に分化する。B-1細胞は、自然免疫様に迅速な応答を示し、T細胞非依存性の抗原応答を司る。B-1細胞は、レパートリーの違いにより、CD5⁺B-1a細胞とCD5⁻B-1b細胞に細分される。

(Montecino-Rodriguez E et al. : Trend Immunol 27 : 428-433, 2006²⁾ ; Dorshkind K et al. : Nat Rev Immunol 7 : 213-219, 2007³⁾より改変)

る⁵⁾。A, B血液型抗原あるいはGal抗原はいずれも糖鎖抗原であるが、これらに反応するB細胞を特異的に制御しうるプロトコールの確立が求められている。

筆者らはA, B血液型抗原とGal抗原に反応性を示すB細胞の特性を解析してきた。その結果、血液型抗原反応性B細胞はCD11b⁺CD5⁺B-1a細胞に⁶⁾、Gal抗原反応性B細胞はCD11b⁺CD5⁻B-1b細胞にそれぞれ分類された⁷⁾(図2)。いずれも、連続した糖鎖抗原でB細胞受容体が架橋され、T細胞からの補助シグナルがなくともB細胞が活性化し抗体産生細胞へと分化する。

B-1細胞は、thymus-independent type-2抗原の

認識によってイムノグロブリン遺伝子のアレンジメントを通して分化することが報告されている。マウスでは、phosphatidyl choline (PitC) に応答するB細胞はB-1a細胞に分化することが知られている。抗PitC-B細胞が多く存在するイムノグロブリントランスジェニックマウスにおいて、CsAの投与によって抗PitC-B細胞は、B-0/B-2フェノタイプのまま止まり、B-1a細胞への分化が阻害されることが証明された(図3)⁸⁾。また、B-1a細胞への分化にはB細胞固有のNFATc1活性化を要するとの報告もあり、カルシニューリン阻害剤がNFATc1経路を抑制する事実から、CsAがB-1a細胞の分化を抑制する可能性が考えられた⁹⁾。