

78-h differentiation culture (A and B). Phase contrast images (A and C) and immunofluorescence analysis with anti-BrdU antibody (red in B), or Ki67 (red in D) of the same fields are shown in each row. Nuclei were stained with DAPI (blue in B and D). Scale bars, 50  $\mu\text{m}$ .

**Supplementary Figure 5** CDK4 and Cyclin D1 levels in cells exposed to doxycycline. KD3 cells were cultured for 2 d in medium containing 0.1% ethanol (vehicle) (lane 1) or medium containing 250 nM doxycycline (lane 2). TKD1 cells were cultured for 2 d in medium containing 0.1% ethanol (vehicle) (lane 3), and for 2 d (lane 4) or 5 d (lane 5) in medium containing 250 nM doxycycline. Fifteen  $\mu\text{g}$  of total proteins were subjected to immunoblotting analysis with antibodies against CDK4, cyclin D1, and  $\beta$ -tubulin.

**Supplementary Figure 6** Proliferation and differentiation capacity of immortalized myogenic cells derived from a Leigh disease patient. (A and B) Growth properties of mortal and immortal human myogenic cells derived from the biceps brachii muscle of a Leigh disease patient. Primary cultured human myogenic cell clone HM1-8 was isolated from cryopreserved primary cultured muscle cells of a Leigh disease patient (3-mo-old male). An immortalized multiclonal population, HM183, was established from HM1-8 by transduction with hTERT, cdk4R24C, and cyclin D1. Passage numbers and doubling times are shown in the panels. (C-E) Multipotentiality of immortalized human myogenic cells HM183. The cells were induced to undergo myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. (C) Cells were cultured for 5 d in the primary myocyte differentiation medium. MyHC was detected by

immunostaining with a horseradish peroxidase reaction product. Nuclei were detected with staining with hematoxylin (blue). Passage numbers are shown in the panels.

Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . (D) The cells were cultured for 9 d in serum-containing medium supplemented with  $\beta\text{GP}$  (10 mM). The cells were then stained with Alizarin Red S.

Whole 35 mm dishes are shown. Scale bar, 10 mm. (E) The cells were cultured for 5 d in serum-containing medium supplemented with  $\gamma$ -linolenic acid (100  $\mu\text{M}$ ).

Numerous lipid droplets (red) were stained with Oil Red O. Nuclei were stained with hematoxylin (blue). Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ .

# 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\*

ネオーラル 10 周年シンポジウム “ネオーラル 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. ペプチド抗原に応答する 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<sup>1)</sup>. 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)<sup>2,3)</sup>.

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 ( $\text{IgM}^{\text{high}}\text{CD11b}^+\text{CD5}^+$ ) と  $\text{CD5}^-$  B-1b 細胞 ( $\text{IgM}^{\text{high}}\text{CD11b}^+\text{CD5}^-$ ) 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<sup>4)</sup>.

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, ブターヒト間の異種移植では,  $\text{Gal}\alpha 1, 3\text{Gal}(\text{Gal})$  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

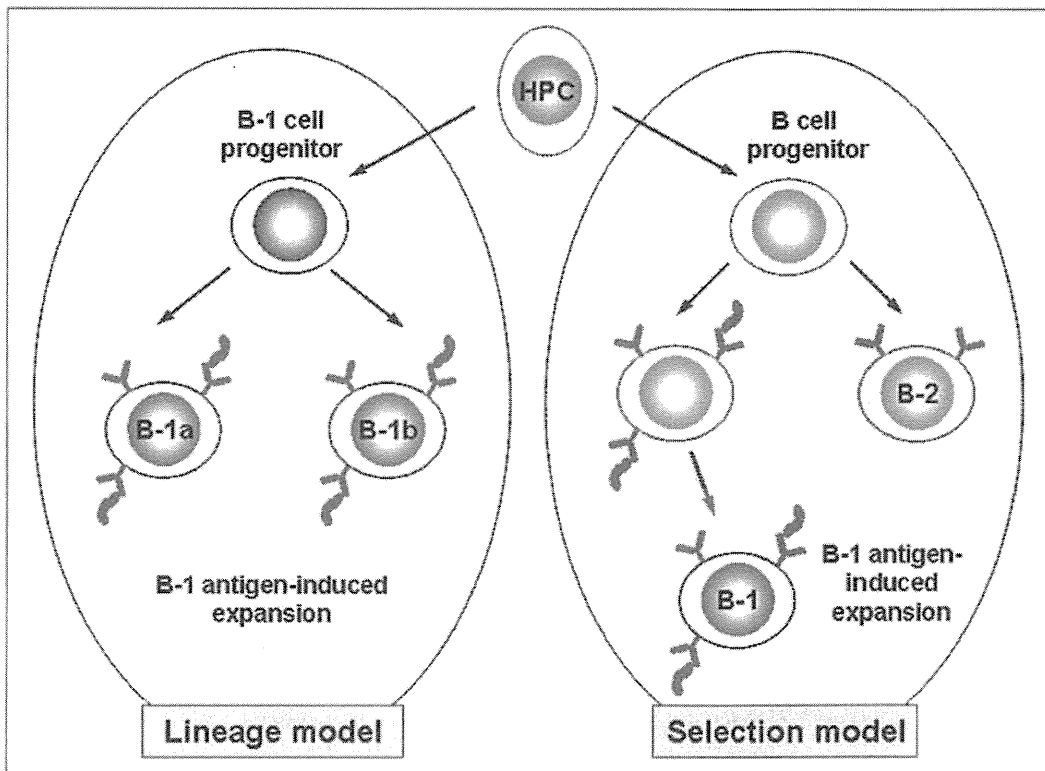


図1 B-1細胞分化モデル

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, 2006<sup>2)</sup> ;

Dorshkind K et al. : *Nat Rev Immunol* 7 : 213-219, 2007<sup>3)</sup>より改変)

る<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>、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<sup>7)</sup>(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 (PtC)に反応するB細胞はB-1a細胞に分化することが知られている。抗PtC-B細胞が多く存在するイム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PtC-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)<sup>8)</sup>。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<sup>9)</sup>。

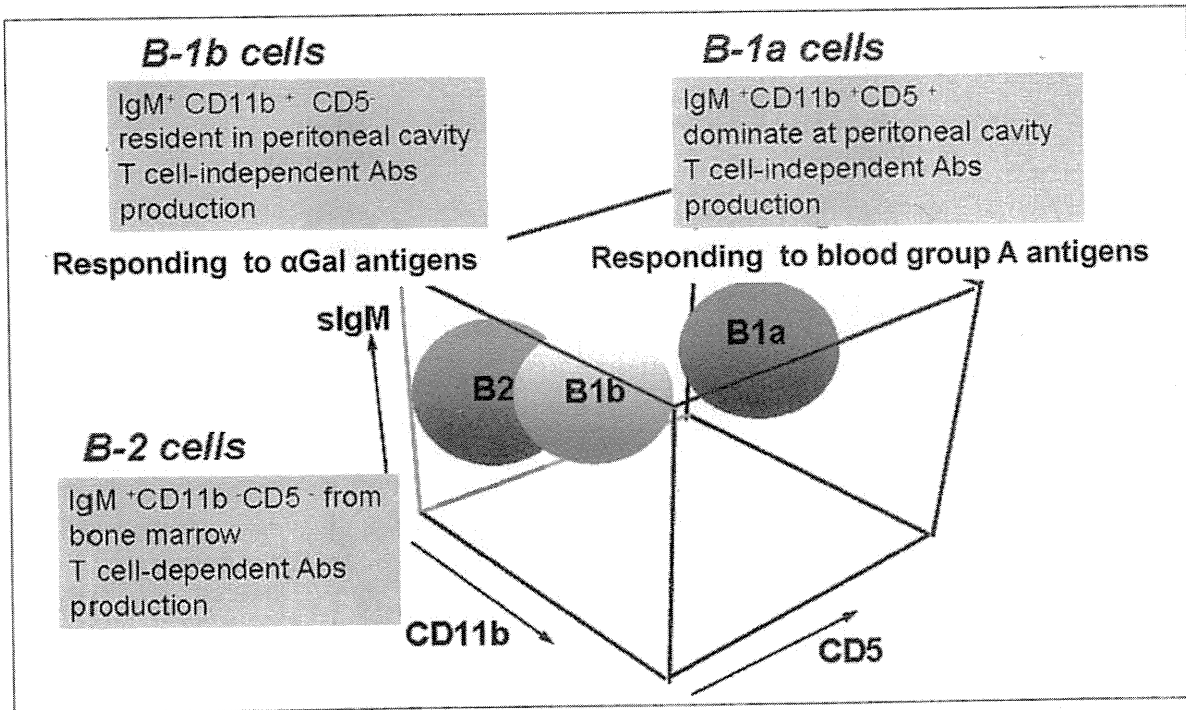


図2 B-1a細胞とB-1b細胞のフェノタイプ  
 血液型A抗原応答B細胞はCD11b<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>B-1a細胞に、Gal抗原応答B細胞はCD11b<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>B-1a細胞に分類される。

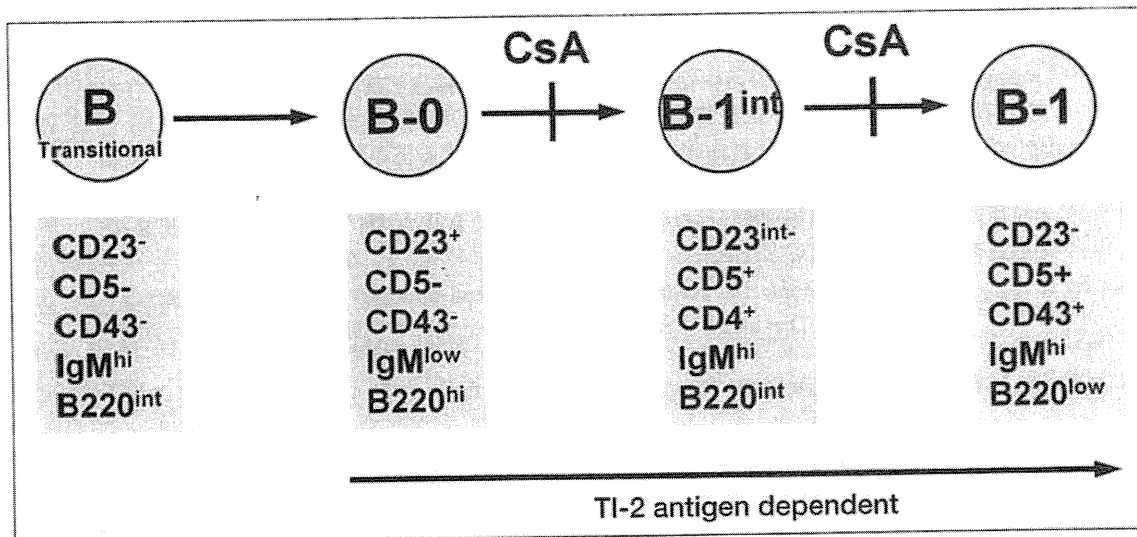


図3 未成熟B細胞からB-1a細胞への分化をカルシニューリン阻害剤(シクロスポリン)が抑制する  
 イムノグロブリントランスジェニックマウスにおいて、phosphatidyl cholineに反応するB細胞は、CsAの投与によってB-2フェノタイプのまま止まり、B-1a細胞への分化が阻害される。  
 (Arnold LW et al. : J Immunol 164 : 2924-2930, 2000<sup>8)</sup>より)

筆者らの検討では、CsAはT細胞非依存性B-1a細胞への分化を用量依存性に抑制したが、T細胞依存性B-2細胞の分裂を抑制しなかった(図4,5)<sup>1)</sup>。したがって、CsAは血液型抗原反応性B細胞への分化を抑制する可能性がある。In vivoでもマウス

にCsAを2週間投与すると、B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>B-1a細胞が有意に減少した(図6)。そして、同様な効果はタクロリムス(Tac)にも認められた<sup>10)</sup>。  
 一方で、すでに成熟した血液型抗原反応性B細胞と抗体産生細胞はCsAやTacに抵抗性を示し

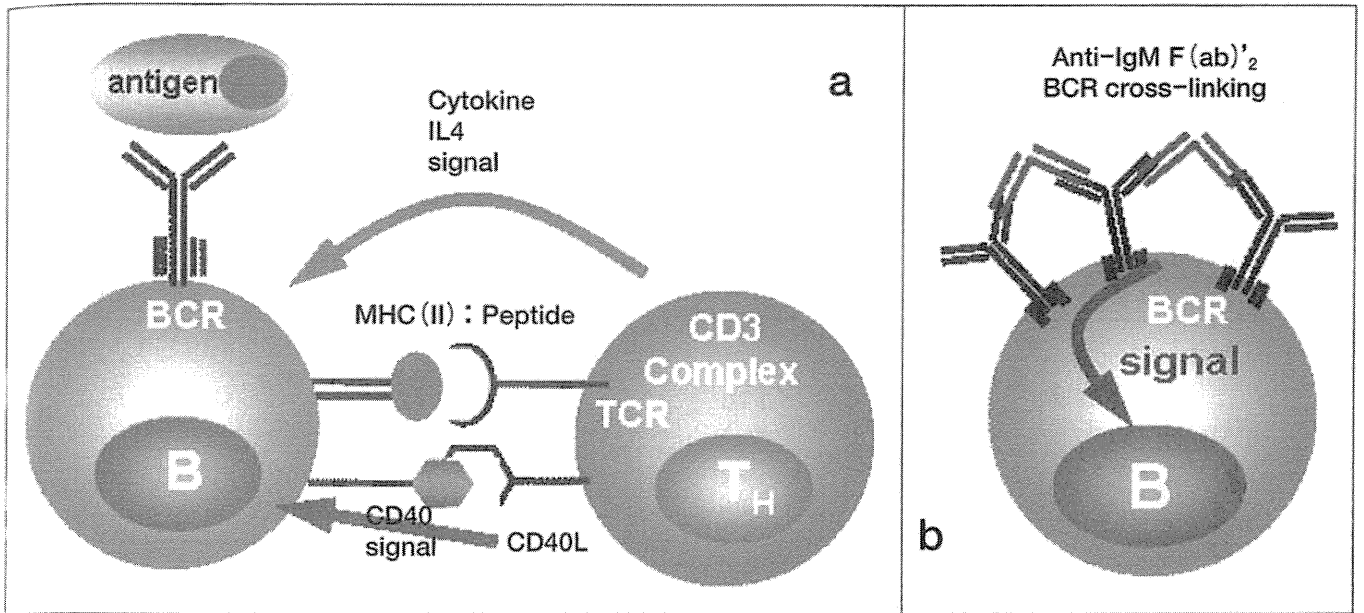


図4 T細胞依存性/非依存性B細胞活性化 *in vitro* モデル

a : B cells activation by T<sub>H</sub> dependent peptide Ag. b : B cell activation by T<sub>i</sub> Ags  
 マウス脾リンパ球を、CD40LとIL-4あるいは抗IgM抗体F(ab)<sup>2</sup>の存在下で培養すると、B細胞の分化増殖をCFSE-ラベル法によってフローサイトメーターで解析できる。  
 (Irei T et al. : Blood 110 : 4567-4575, 2007<sup>1)</sup>より)

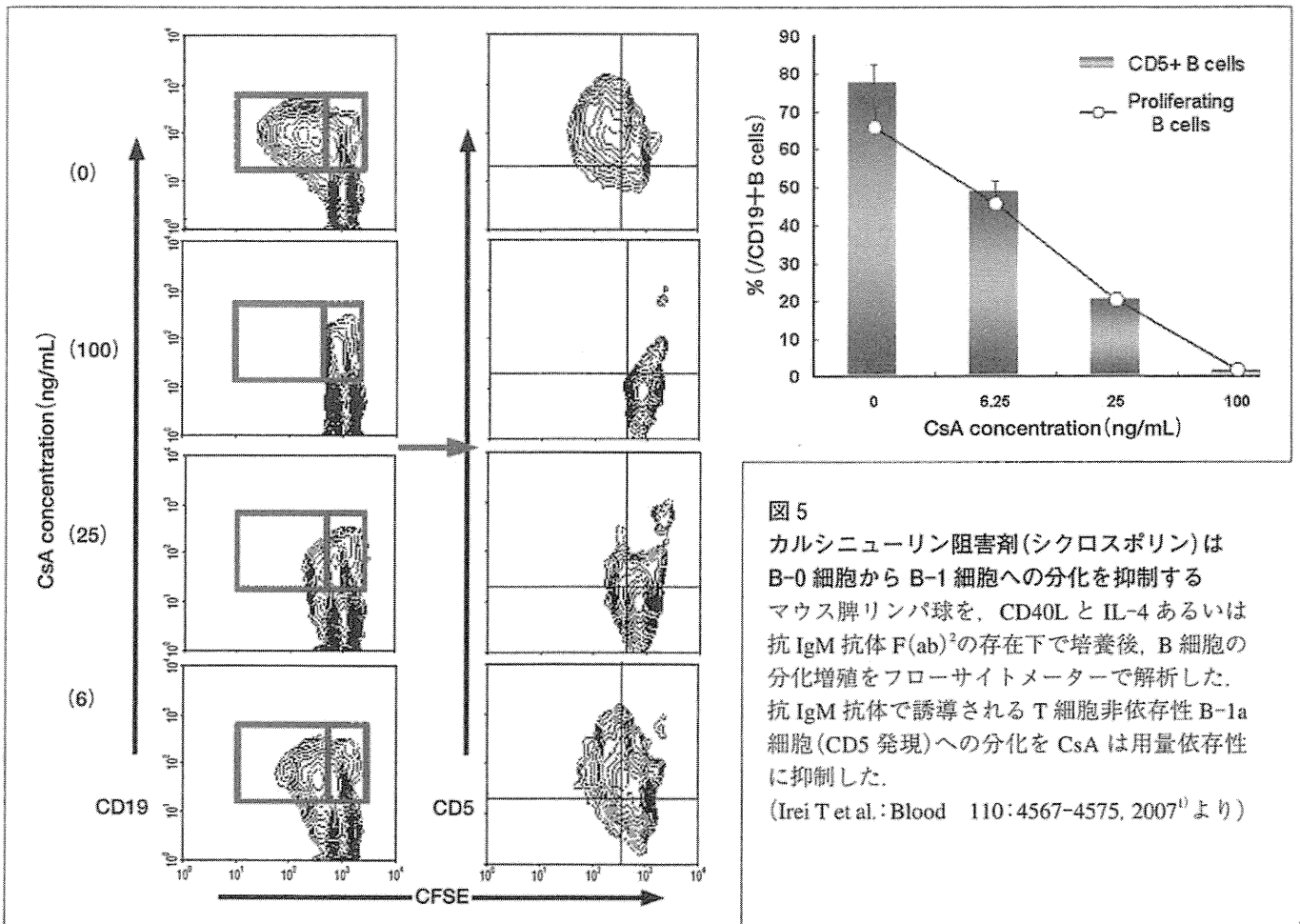


図5  
 カルシニューリン阻害剤(シクロスポリン)はB-0細胞からB-1細胞への分化を抑制する  
 マウス脾リンパ球を、CD40LとIL-4あるいは抗IgM抗体F(ab)<sup>2</sup>の存在下で培養後、B細胞の分化増殖をフローサイトメーターで解析した。  
 抗IgM抗体で誘導されるT細胞非依存性B-1a細胞(CD5発現)への分化をCsAは用量依存性に抑制した。  
 (Irei T et al. : Blood 110 : 4567-4575, 2007<sup>1)</sup>より)

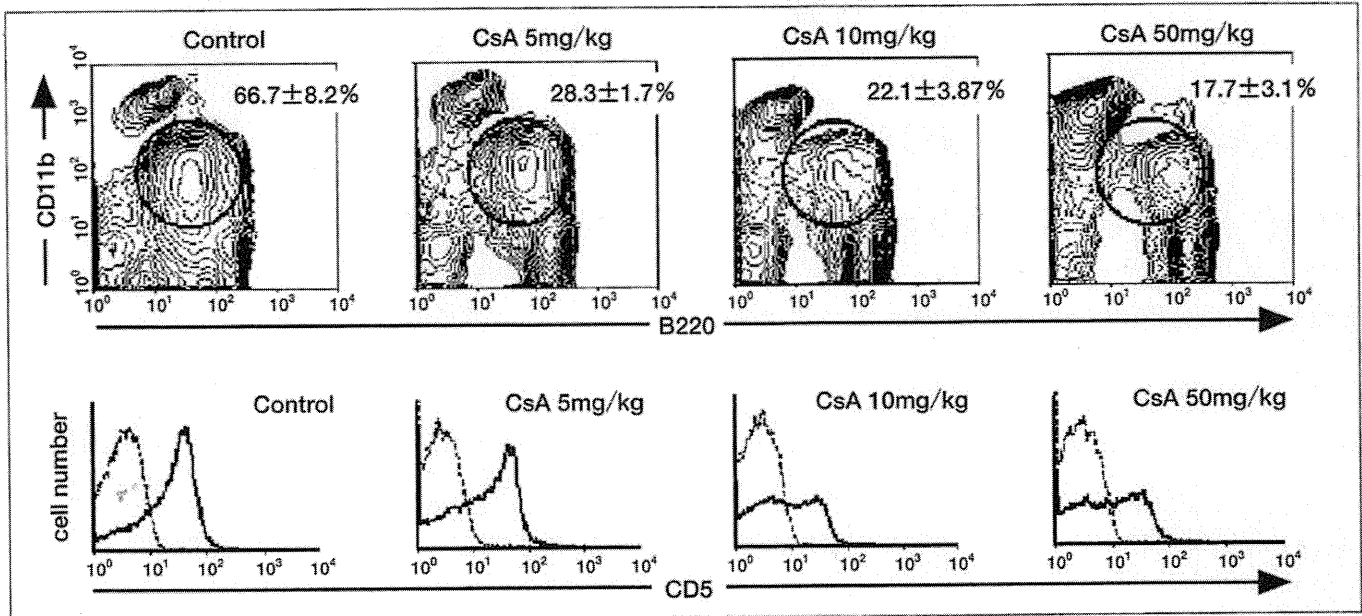


図6 カルシニューリン阻害剤(シクロスポリン)投与後(2週間)のB細胞フェノタイプ解析  
 腹腔内リンパ球中の B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>B-1a 細胞が有意に減少した。  
 (Irei T et al. : Blood 110 : 4567-4575, 2007<sup>1)</sup>より)

た。すなわち、成熟 B-1a 細胞と抗体産生細胞を一時的に排除できれば、以後はカルシニューリン阻害剤の投与によって血液型不適合移植における抗体関連拒絶反応を制御しうると考えられる。

B-1a 細胞も B-2 細胞もともに CD20 分子を発現する。一方、IgG 抗体を産生するプラズマ細胞は CD20 分子の表出を欠く。したがって、抗 CD20 抗体(リツキシマブ)は、成熟 B-1a 細胞を一時的に除去するが、抗体産生細胞には無効であると考えられる。さらに、抗体産生はミコフェノール酸モフェチル(MMF)の投与で抑制されることが知られている。

新たな B-1a 細胞への分化をカルシニューリン阻害剤が抑制することと合わせて考えると、リツキシマブ、MMF、カルシニューリン阻害剤の併用によって好成績をあげている ABO 血液型不適合腎移植の臨床病態を説明しうる。

文献

1) Irei T, Ohdan H, Zhou W, Ishiyama K, Tanaka Y, Ide K et al. : The persistent elimination of B cells responding to blood group A carbohydrates by synthetic group A carbohydrates and B-1 cell differentiation blockade : novel

concept in preventing antibody-mediated rejection in ABO-incompatible transplantation. Blood 110 (13) : 4567-4575, 2007.  
 2) Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K : New perspectives in B-1 B cell development and function. Trends Immunol 27(9) : 428-433, 2006.  
 3) Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E : Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. Nat Rev Immunol 7(3) : 213-219, 2007.  
 4) Kantor AB, Merrill CE, Herzenberg LA, Himeno K : An unbiased analysis of VH-D-JH sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. J Immunol 158(3) : 1175-1186, 1997.  
 5) Ohdan H, Sykes M : B cell tolerance to xenoantigens. Xenotransplantation 10(2) : 98-106, 2003.  
 6) 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.  
 7) Ohdan H, Swenson KG, Kruger Gray HS, Yang YG, Xu Y, Thall AD et al. : Mac-1-negative B-1b phenotype of natural antibody-producing cells, including those responding to Gal alpha 1,3Gal epitopes in alpha 1,3-galactosyl-transferase-deficient mice. J Immunol 165 (10) : 5518-5529, 2000.  
 8) Arnold LW, McCray SK, Tatu C, Clarke SH : Identification of a precursor to phosphatidyl choline-specific B-1 cells suggesting that B-1 cells differentiate from splenic conventional B cells *in vivo* : cyclosporin A blocks differentiation to B-1. J Immunol 164 (6) : 2924-2930, 2000.  
 9) Berland R, Wortis HH : Normal B-1a cell development

requires B cell-intrinsic NFATc1 activity. Proc Natl Acad Sci USA 100(23):13459-13464, 2003.

10) Zhou W, Ohdan H, Asahara T: Calcineurin inhibitors block

B-1 cell differentiation: the relevance to immunosuppressive treatment in ABO-incompatible transplantation. Transplant Proc 37(4):1808-1811, 2005.

## 討 論

**高橋** 大段先生のご講演に対して質問はございませんか。

**杉谷** B-1a細胞への分化を抑制するCsAのマウス実験では、2週間という観察期間をとっていましたが、やはり効果を見るには2週間という期間が必要だとお考えでしょうか。

**大段** 成熟B細胞のライフスパンは約1カ月前後ですので、その半分の2週間は薬剤効果の観察期間として設定しました。しかし、B細胞受容体がリアレンジされたB-1細胞のほうがB-2細胞よりも長寿命を獲得している可能性も指摘されていますので、もう少し長い期間で実験するほうがよいのかもしれない。

**杉谷** ABO血液型不適合移植での術前脱感作療法は各施設ばらばらで、使用する薬剤の種類も違いますし、大段先生の施設や私たちの施設ではカルシニューリン阻害剤を術前14日から投与しますが、術前2日からの施設もあります。

これはカルシニューリン阻害剤を脱感作と称してABO不適合移植に使用する場合は術前14日から投与しておいたほうがよいということの基礎的な理由としてよいのでしょうか。

**大段** CsAはB-1細胞の分化を抑制しますが、成熟B-1細胞には抑制効果を持たないものと思われれます。したがって、成熟B細胞をリツキシマブで除去後にB-1細胞の再出現を防止するには、CsAの投薬が必要です。14日間という期間は、むしろMMFの前投与期間として重要です。既存抗体を産生する抗体産生形質細胞のライフスパンは

1カ月ぐらいですので、少なくともハーフライフスパンの14日間の投与期間が要されると考えます。

**杉谷** もし最初に成熟したB細胞を殺してしまおうと考えるのであれば、数日前にリツキシマブを投与するよりも、肝移植で行われているように術前2週間あるいは3週間に一度リツキシマブを投与しておいたほうがいいのではないかという理論的な根拠に基づいていますか。

**大段** リツキシマブの投与後に、B細胞除去が確実にできるかどうかを観察する期間として2週間が適切かどうかは、私たち自身はデータを持ち合わせていません。しかし、B-1細胞分化抑制という観点では、カルシニューリン阻害剤はリツキシマブの投与とあまり離れない時期に投薬を開始すべきだと考えます。

**岩崎** 今回の発表においてB-1細胞に分化するために必要なサイトカインのようなものはあるのでしょうか。それはNFATc1のターゲット分子などでしょうか。

**大段** *In vitro*では、抗IgM抗体FabフラグメントだけでB-1a細胞の分化を誘導することができます。IL-2が存在すると分化誘導は助長されますが、特徴的なサイトカインの存在が必須ではありません。B細胞受容体が架橋されればB-1細胞への分化は誘導できますが、抗体産生細胞へのさらなる分化にはいくつかのサイトカインカクテルが必要になります。したがって、B-1a細胞への初期分化の抑制には、サイトカインをターゲットとするよりもCsAのほうが有効であるかもしれません。

**岩崎** そうであるならば、細胞の増殖と成長と分化においてNFATc1の役割は主にどこにあると思われますか。

**大段** 一番の役割はB細胞受容体のリアレンジメントではないでしょうか。特異性の低いB細胞

### 発言者

- 高橋 公太 (新潟大学大学院医歯学総合研究科腎泌尿器病態学分野)(司会)  
 杉谷 篤 (藤田保健衛生大学臓器移植再生医学)  
 大段 秀樹 (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科学)  
 岩崎 研太 (名古屋大学医学部免疫機能制御学)  
 中川 健 (慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室)  
 加藤 真梨奈 (名古屋第二赤十字病院薬剤部)



胞受容体が、糖鎖を認識してより高い特異性を獲得するためリアレンジメントが誘導され、B-1a細胞へと分化する際、NFATc1の活性化を要するのだと思います。

**中川** CsAは臨床的濃度でB細胞の分化・誘導を抑えられるという発表でしたが、これはT細胞と同濃度で同じように効くと考えていいのでしょうか。

**大段** 前のセッションで発表された加藤さん

は、T細胞の存在している実験系を用いて私たちと類似の*in vitro* B細胞活性化実験をされていました。そのデータを拝見する限り、CsAはT細胞を抑制するよりもむしろ低い濃度でB細胞を抑制していたと思います。加藤さん、そうですね。

**加藤** はい、そうです。

**大段** T細胞を抑制するよりも低い臨床的濃度でCsAはB細胞を抑制できるのかもしれませんが。

**高橋** それでは、ありがとうございました。

## 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<sup>1)</sup>。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。

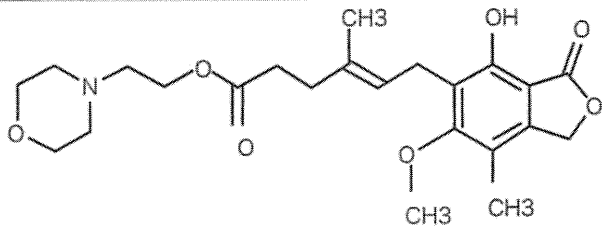
## 2 肝移植後の免疫抑制療法

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)

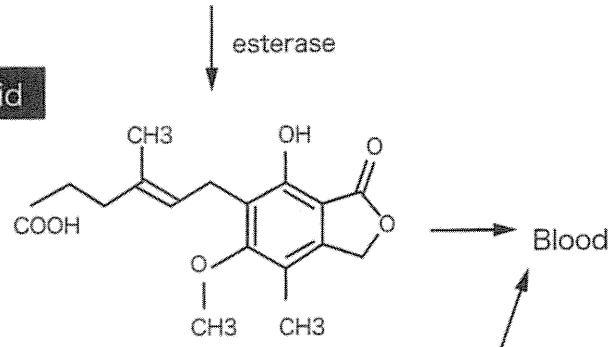
Hideki OHDAN: The role of mycophenolate mofetil in immunosuppressive regimen after liver transplantation

\*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]

**Mycophenolate mofetil**



**Mycophenolic acid**



**Mycophenolic acid glucuronide**

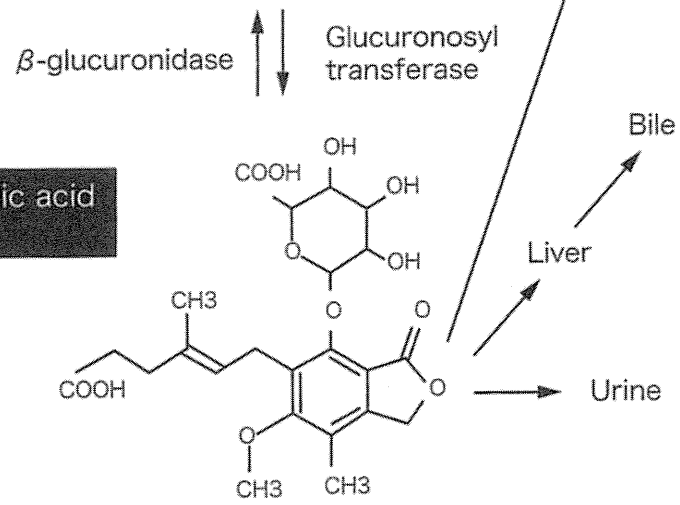


図1 ミコフェノール酸モフェテル(Mycophenolate mofetil)の構造と代謝  
MMFの2-モルフォリノエチルエステルは体内で加水分解され、MPAへと変じ作用をあらわす。

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)やプレドノゾロン(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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。

### 4 C型肝炎ウイルス(HCV)感染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<sup>4~6)</sup>。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<sup>7)</sup>。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<sup>8)</sup>。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<sup>9)</sup>。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

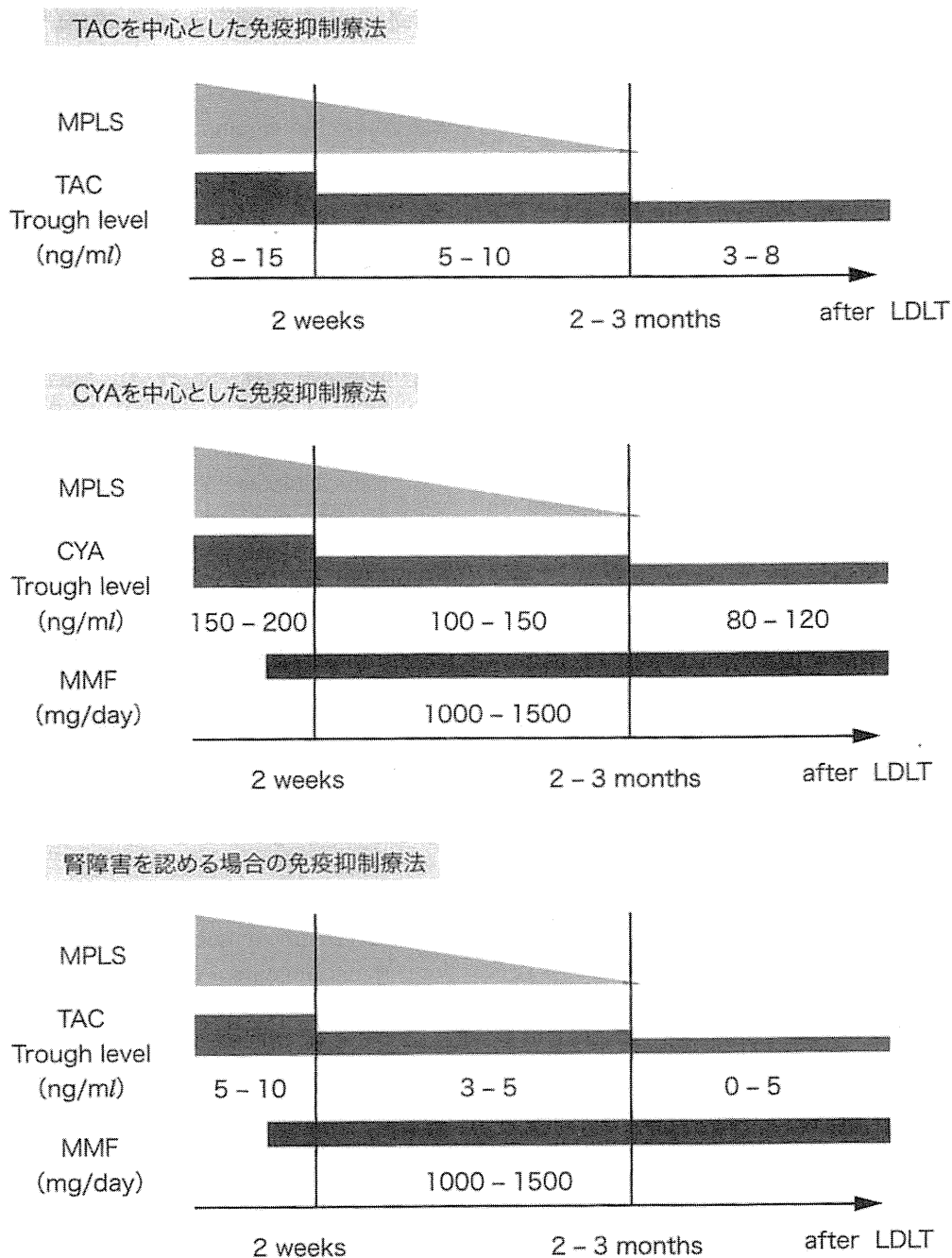


図2 広島大学病院における生体肝移植後免疫抑制プロトコール

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<sup>10)</sup>。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からラパマイシンあるいは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<sup>11~15)</sup>。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<sup>16)</sup>。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<sup>17)</sup>。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<sup>18)</sup>。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

\* \* \*

## 特集「抗体関連型拒絶反応の病理と臨床」

B 細胞 lineage と  
抗体性拒絶反応の制御

大段秀樹

広島大学大学院先進医療開発科学講座外科学

## ■ ■ ■ はじめに

B 細胞の分化や成熟、活性化機構の解明に基づき、臓器移植における B 細胞性免疫応答が理解されその制御法が開発されてきた。臓器移植における B 細胞性免疫応答には T 細胞依存性と非依存性に分類される。アロペプチド抗原（組織適合性抗原）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、増殖を繰り返しリンパ節に濾胞を形成し、イムノ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（図 1A, B）。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。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く、難治性となる。

一方、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（図 1C）。ペプチド抗原の応答する B 細胞（B-2 細胞）とは異なる起源、特異性、組織局在をも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。本稿では、臓器移植における B-2 細胞および B-1 細胞 lineage の応答機構とその制御法について概説する。

## ■ ■ ■ B-1 細胞と B-2 細胞 lineage

抗体性免疫応答を担う B 細胞は、B-1 細胞と B-2 細胞の

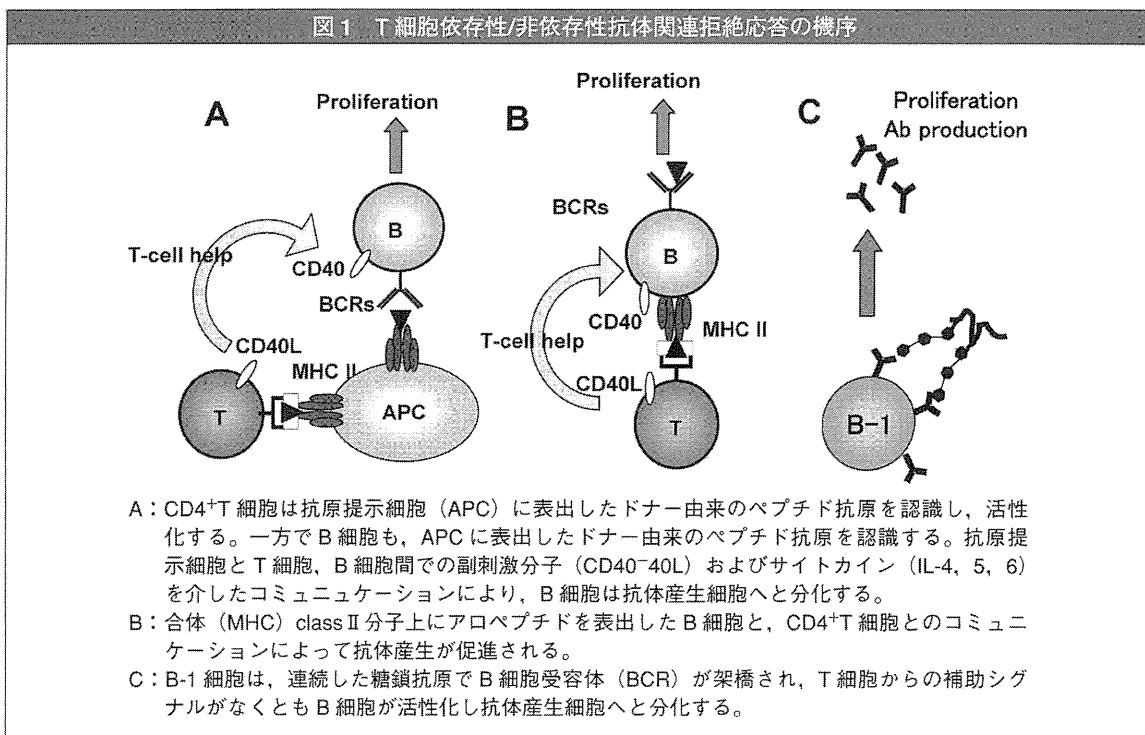
2 亜群が存在し、それぞれの分化も機能も異なる。一般に、B-1 細胞は自然免疫応答の一部としての抗体産生を、B-2 細胞は獲得免疫応答としての抗体産生を司ると考えられている。

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 細胞免疫応答である。

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、2つのモデルが提唱されている（図 2）<sup>12)</sup>。1つは lineage モデルでは、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続けるというものがある。もう1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<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>）と B-1b 細胞（IgM<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>）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<sup>3)</sup>。



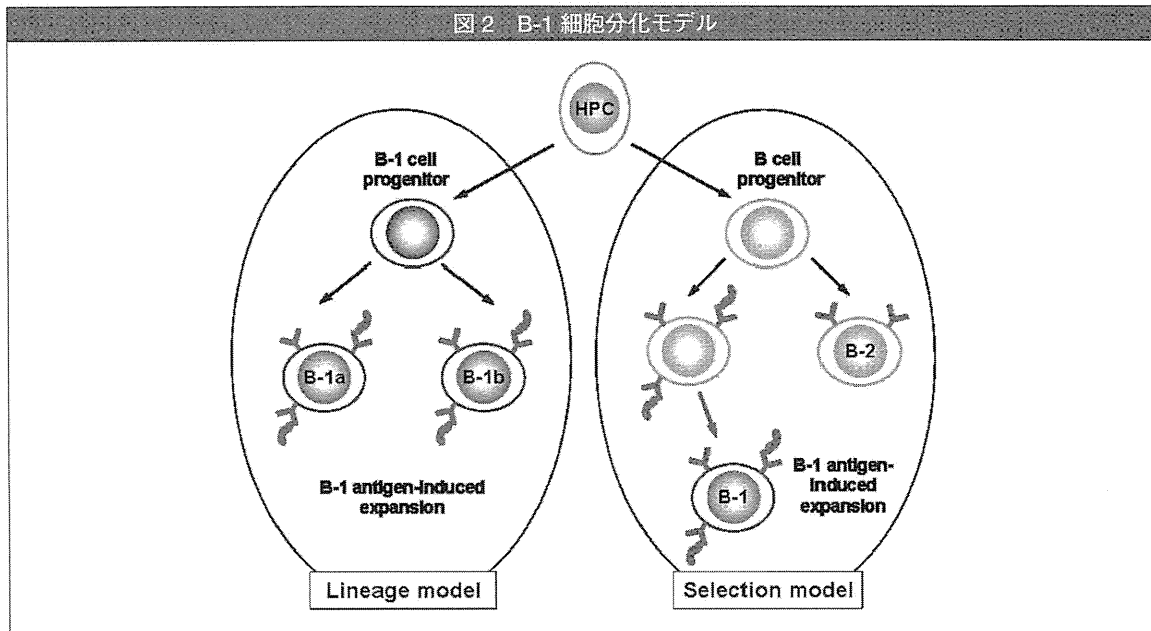
図1 T細胞依存性/非依存性抗体関連拒絶応答の機序



### ■ アロ抗原に対する B-2 細胞応答

ドナーの組織適合性抗原に由来するペプチドが標的となる抗体関連拒絶反応は、T細胞依存性抗体産生による。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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>T細胞もCD8<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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リン

パ節に濾胞を形成してイムノ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、移植腎6カ月以降の抗HLA抗体の陽性率が20%で、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、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<sup>4)</sup>。また、抗HLA class I抗体は女性、出産、輸血に関連し、class II抗体が移植腎機能の悪化に関連し、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<sup>5)</sup>。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薬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、ひとたび抗HLA抗体の産生応答が進行すれば、もはやカルシニューリン阻害薬やステロイドを用いた治療に対して抵抗性を示すことが少なくない。この場合、抗体除去目的の血漿交換やガンマグロブリン大量療法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レセプターのブロックによる抗体依存性細胞障害の抑制、②補体介在性障害の減



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抗イデオタイプ作用や B 細胞の Fcγ R B を介した抗体産生抑制作用など挙げられる。

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/クロスマッチ陽性症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症例に対し、リツキシマブとガンマグロブリン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<sup>6)</sup>。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 レセプター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。一定の成果が得られているが、特異性の問題と効果が期待できる期間の問題が残る。

■ ■ ABO 血液型抗原に対する  
■ ■ B-1a 細胞応答

臓器移植ドナー不足の究極的解決策としてブタを用いた異種移植に期待がかかる。一方で、ドナー不足の可及的緩和のために ABO 血液型不適合生体ドナーからの移植によるドナーソースの拡大が試みられている。これらの試みに共通する最大の障壁が T 細胞非依存性抗体性拒絶である。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 Galα1, 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る<sup>7)</sup>。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。

われわれは 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 B-1a 細胞に (図 3)<sup>8)</sup>、Gal 反応性 B 細胞は B-1b 細胞にそれぞれ分類された (ともに、主に腹腔や胸腔内に存在し、脾臓に移行して抗体産生細胞となる)<sup>9)</sup> (表 1)。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。

■ ■ カルシニューリン阻害薬による  
■ ■ B-1a 細胞への分化抑制

Selection モデルでは、B-1a 細胞は、未成熟 B 細胞が<sup>5)</sup> 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と考えられている。このような未成熟 B 細胞から B-1a 細胞への分化を、カルシニューリン阻害薬 (cyclosporin : CsA) が<sup>5)</sup>抑制する可能性が報告されている。マウスでは、phosphatidyl choline (PtC) に<sup>5)</sup>応答する B

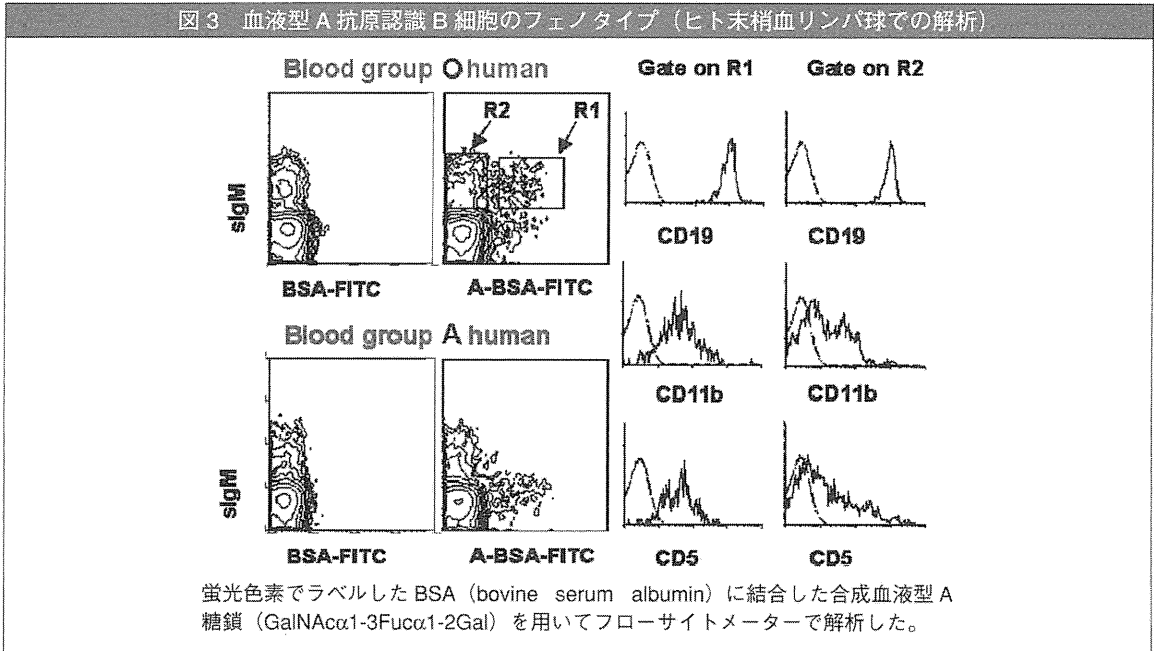


表1 抗血液型A抗原応答B細胞と抗Gal抗原応答B細胞のフェノタイプ

	Cell size	sigM	CD21	CD23	CD5	CD11b
B-2 cells	small	+	+/-	+	-	-
B-1a cells	large	++	-	-	+	+
B-1b cells	large	++	-	-	-	+
anti-Gal B cells	large	++	-	-	-	+
anti-A B cells	large	++	-	-	+	+

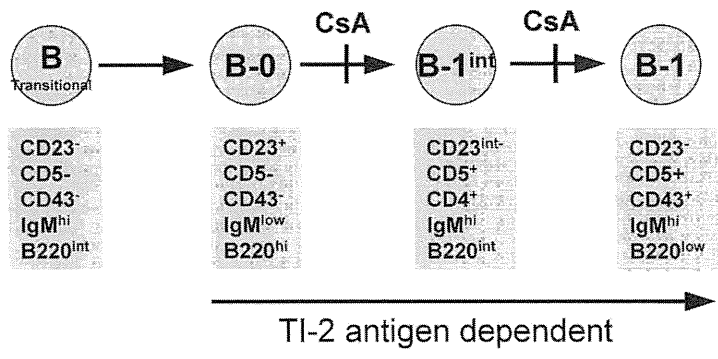
(マウス腹腔内B細胞の解析結果)

細胞はB-1a細胞に分化することが知られている。抗PtC-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PtC-B細胞は、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4)<sup>10)</sup>。

われわれの*in vitro*の検討でも、CsAはT細胞非依存性B-1a細胞への分化を用量依存性に抑制したが、T細胞依存性B-2細胞の分裂を抑制しなかった<sup>11)</sup>(図5, 6)。したがって、CsAは血液型抗原反応性B細胞への分化を抑制する可能性があるが、tacrolimus (Tac)にも同様な効果を認めた<sup>12)</sup>。しかし、既に成熟した血液型抗原反応性B細胞と抗体産生細胞はCsAやTacに抵抗性を示した。すなわち、成熟B-1a細胞と抗体

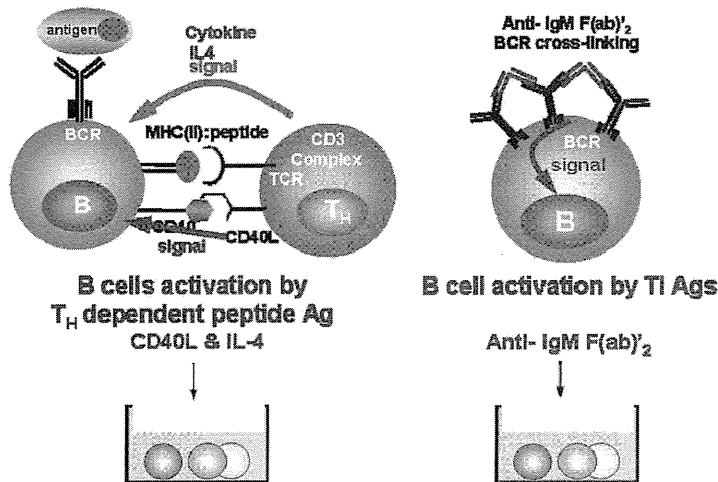
産生細胞を一時的に排除できれば、以後はカルシニューリン阻害薬の投与によって血液型不適合移植における抗体性拒絶反応を制御しうると考えられる。B-1a細胞もB-2細胞とともにCD20分子を発現する。一方、IgG抗体を産生するプラズマ細胞はCD20分子の表出を欠く。したがって、抗CD20抗体(rituximab)は、成熟B-1a細胞を一時的に除去するが、抗体産生細胞には無効であると考えられる。さらに、抗体産生はmycophenolate mofetil (MMF)の投与で抑制されることが知られている。新たなB-1a細胞への分化をカルシニューリン阻害薬が抑制することと合わせて考えると、rituximab, MMF, カルシニューリン阻害薬の併用によって好成績を上げているABO血液型不適合腎移植の臨床病態を説明しうる。

図4 未成熟B細胞からB-1a細胞への分化をカルシニューリン阻害薬 (cyclosporin: CsA) が抑制する



イムノグロブリントランスジェニックマウスにおいて、Phosphatidyl choline に応答する B 細胞は、CsA の投与によって 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。

図5 T細胞依存性/非依存性B細胞活性化 *in vitro* モデル



マウス脾リンパ球を、CD40L と IL-4 あるいは抗 IgM 抗体 F(ab)<sup>2</sup> の存在下で培養すると、B 細胞に分化増殖を CFSE-ラベル法によってフローサイトメーターで解析できる。

文 献

- 1) Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. New perspectives in B-1 B cell development and function. Trends Immunol 2006; 27: 428-433.
- 2) Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E. Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. Nat Rev Immunol 2007; 7: 213-219.
- 3) Kantor AB, Merrill CE, Herzenberg LA, et al. An unbiased analysis of V(H)-D-J(H) sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. J Immunol 1997; 158: 1175-1186.
- 4) Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. Am J Transplant 2004; 4: 438-443.
- 5) Campos EF, Tedesco-Silva H, Machado PG, et al. Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. Am J Transplant 2006; 6: 2316-2320.
- 6) Vo AA, Lukovsky M, Toyoda M, et al. Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization