

図28. CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> (症例5)

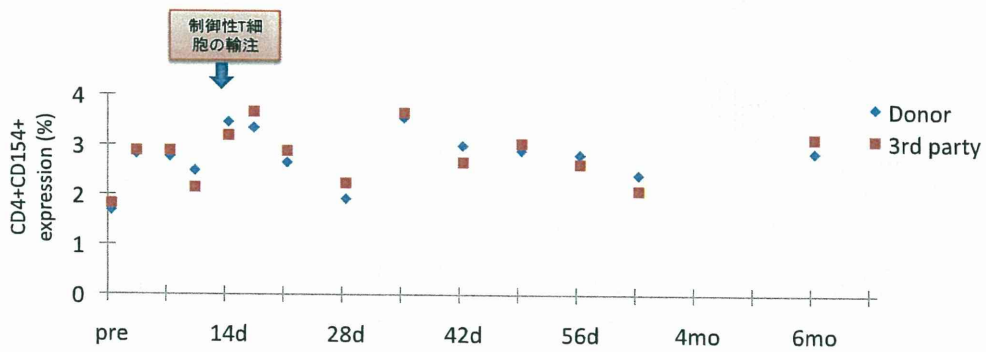


図29. 制御性T細胞 (症例5)

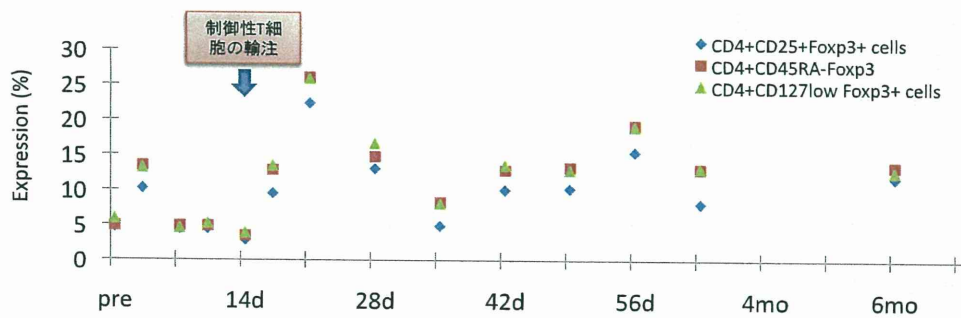
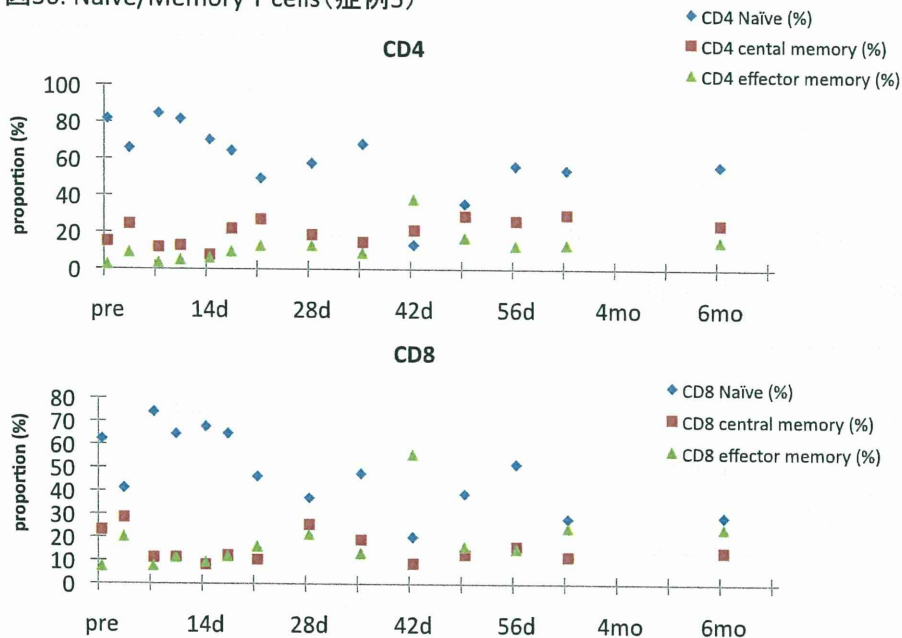


図30. Naïve/Memory T cells (症例5)



では一貫して低値に抑えられた。

・ MLR : 図26

細胞治療後から6ヶ月の時点まで一貫して低値で推移した。

・ IFN- $\gamma$  ELISPOT : 図27

Cylexの上昇がみられた28日後以外

・ 末梢血中のドナー抗原特異的 CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T細胞 : 図28

術前値と大きな変化がなく、2-3%の値を推移した。

・末梢血中の制御性T細胞：図29  
 制御性T細胞は細胞治療後の23日目に急激な上昇を認めた。以後6ヶ月後の時点でも術前と比べて高値を維持している。

・末梢血中のNaïve/Memory T細胞：図30

CD4<sup>+</sup> およびCD8<sup>+</sup> naïve T細胞は術後21～28日前後に減少がみられたが、これまでの症例と異なりNaïve が優位なpopulationが6ヶ月目までみられた。CD4, CD8ともに同様な傾向であった。

### 症例 6

・Immuknow (cylex)：図31  
 本症例の術前値は343 ng/mlであり、

7日目に上昇を認めた。また28日目にも上昇を認めた。以後225 ng/ml以下の低値を続けている。

・MLR：図32  
 Cylexと同様に移植後28日目に上昇がみられ、ドナー抗原特異的な上昇が観察された。その後低値であったが、60日目、90日目にも高いCPM値であった。これらはドナー抗原特異的な反応では無かった。

・IFN- $\gamma$  ELISPOT：図33  
 21日目にドナー抗原に対する高いIFN $\gamma$ の産生がみられた。その際には3rd partyに対する反応も高値であった。Indirectの反応は28日目にドナー抗原

図31. Cylex (症例6)

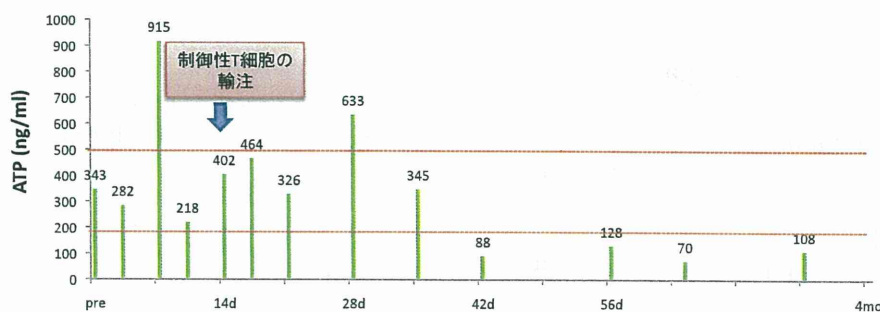


図32. MLR (症例6)

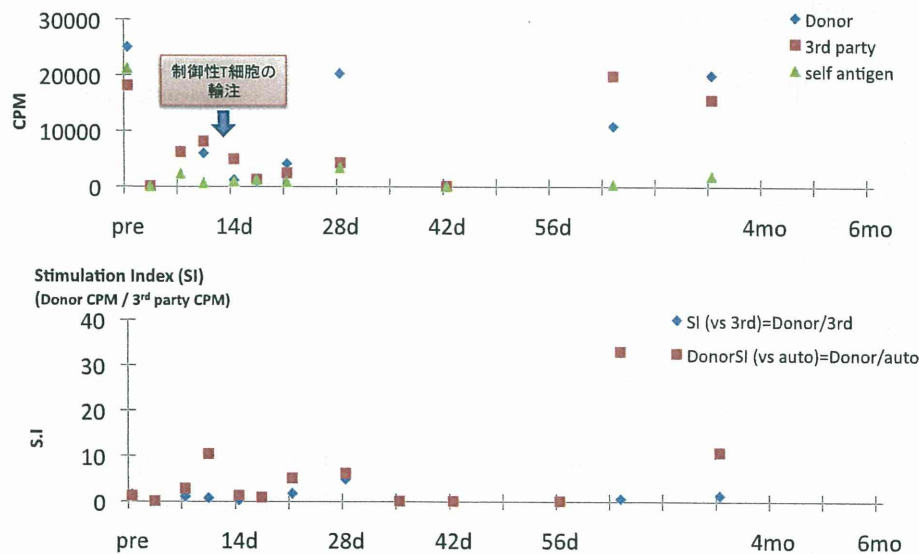


図33. IFN- $\gamma$  ELISPOT (症例6)

Direct response

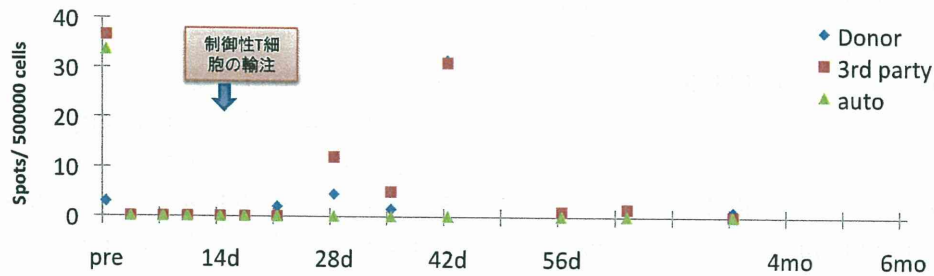
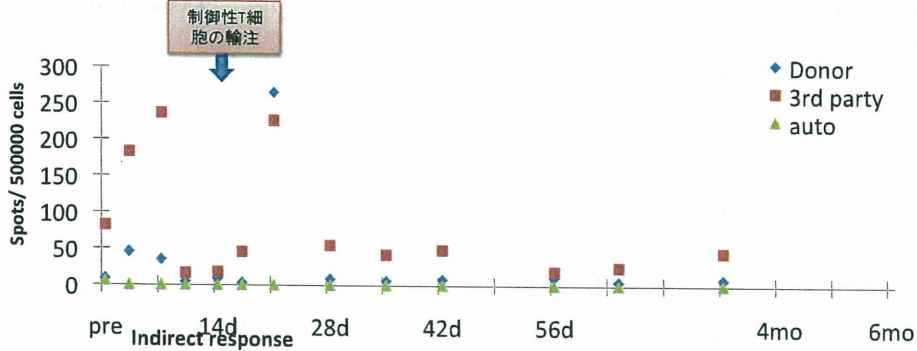


図34. CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> (症例6)

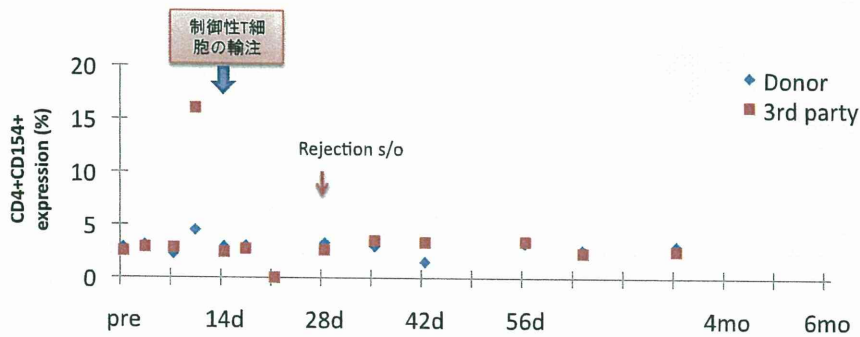
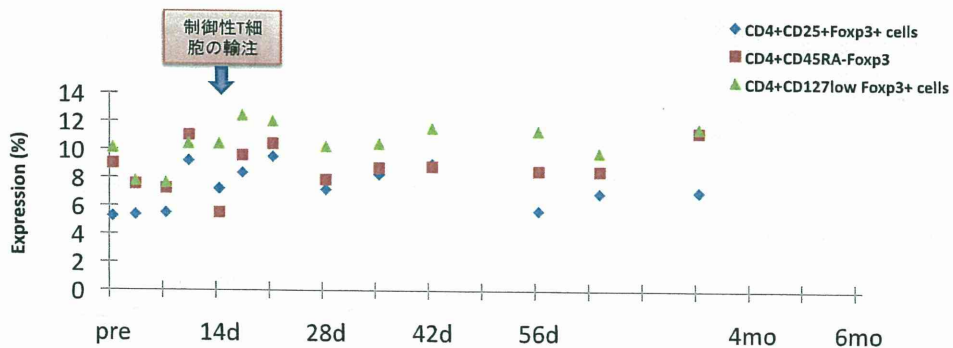


図35. 制御性T細胞 (症例6)

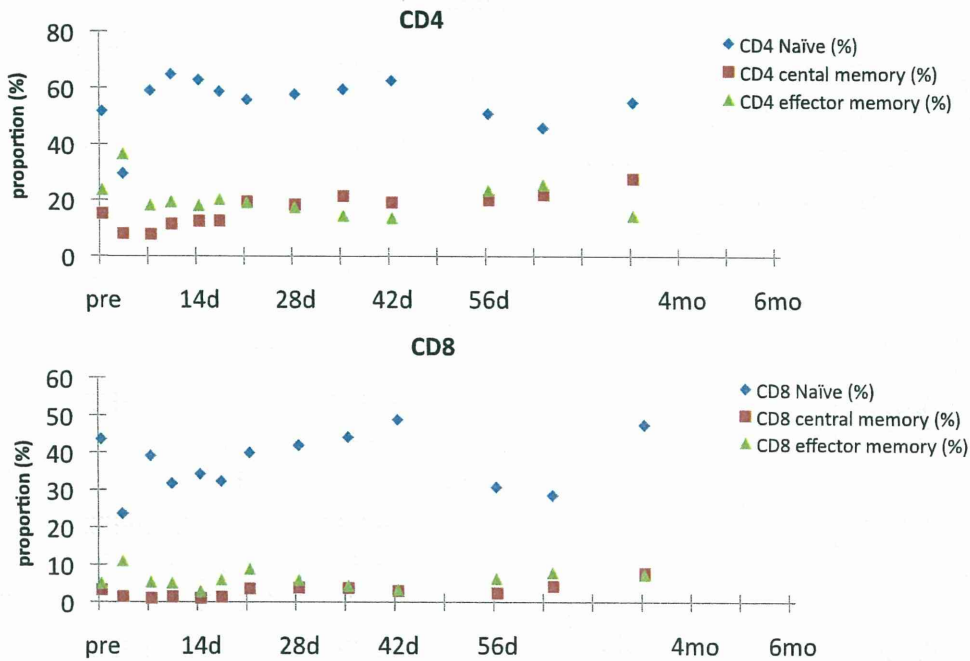


に対する比較的高い反応がみられたが、3<sup>rd</sup> party に対しては28日、42日で高値であった。

・末梢血中のドナー抗原特異的 CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T細胞：図34

移植後3ヶ月の時点まで術前値と比べて大きな変化はみられなかった。

図36. Naïve/Memory T cells (症例6)



・末梢血中の制御性T細胞：図35

これまでの症例と比べて制御性T細胞の明らかな上昇はみられなかったが、細胞治療後の23日目にはCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>の上昇がみられた。

・末梢血中のNaïve/Memory T細胞：図36

移植直後にはCD4<sup>+</sup> およびCD8<sup>+</sup> naïve T細胞の減少がみられたもののその後、これまでの症例と異なり、naïve T細胞の減少を伴う細胞集団の変化は見られなかった。

### 症例7

・Immuknow (cylex)：図37

本症例の術前値は149 ng/mlと低値であったが、これまでの症例と同様に術後7日目までに上昇を認め、WBCの低下に伴い、14日目を最低値とする減少が観察された。その後同様に28日目にも上昇を認め多後の漸減傾向がみられた。

図37. Cylex (症例7)

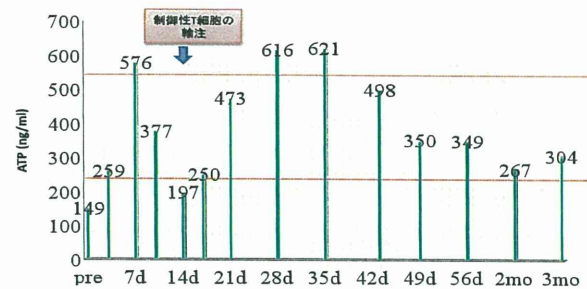
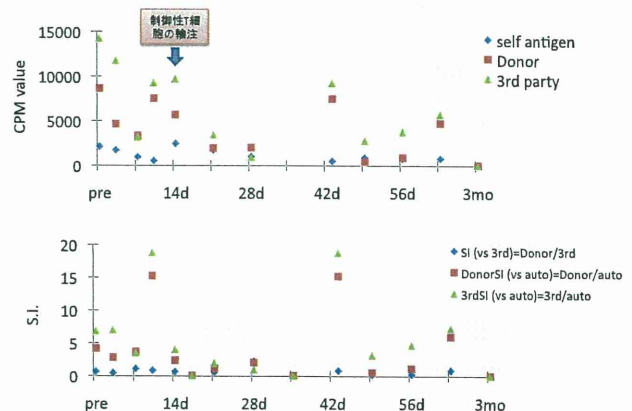


図38. MLR (症例7)



・MLR：図38

移植前の値と比べて、いずれも低いCPMであった。3<sup>rd</sup> partyに対するドナー抗原のSIは一貫して低値であったが、autoに対するSI、3<sup>rd</sup> partyの反応は10日

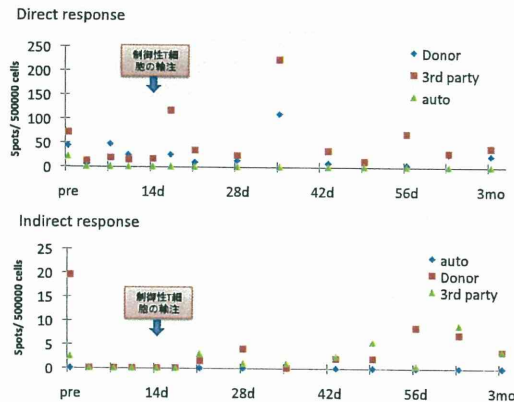


目、42日目に高値を認めた。

・ IFN- $\gamma$  ELISPOT : 図39

10日目と35日目にMLRと同様に3rd party 抗原に対する反応が観察された。ドナー抗原に対する反応は35日目に認められたがそれ以外では一貫して低値であった。

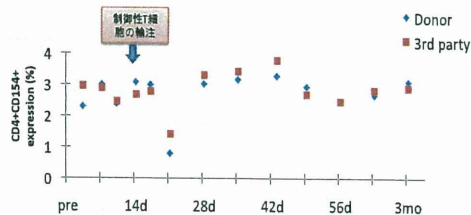
図39. IFN- $\gamma$  ELISPOT (症例7)



・ 末梢血中のドナー抗原特異的 CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T細胞 : 図40

移植後3ヶ月の時点まで術前値と同程度か低値であり、拒絶反応を疑うドナー抗原特異的な反応は見られなかった。

図40. CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> (症例7)

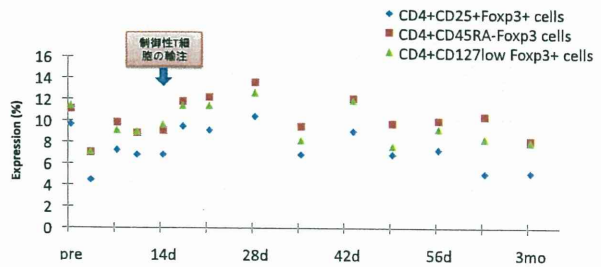


・ 末梢血中の制御性T細胞 : 図41

術前の値も比較的高い割合を示した。術後早期に一旦減少がみられたが、術後28日目あたりまで微増した。以後術前と同程度かやや低値の割合で推移している。

・ 末梢血中のNaïve/Memory T細胞 : 図

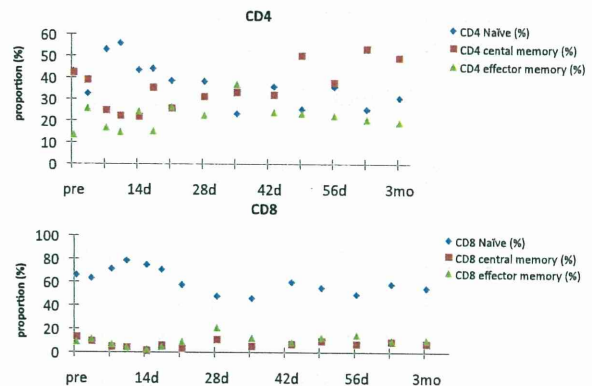
図41. 制御性T細胞 (症例7)



42

術後7日目付近で一旦上昇がみられたNaïve CD4<sup>+</sup> T細胞も35日目まで漸減し、以後低値であった。対してcentral memory CD4<sup>+</sup> T細胞の割合の増加がみられ、49日目以降優位な細胞集団となり、3ヶ月の時点まで続いた。一方Naïve CD8<sup>+</sup> T細胞は術後一過性の上昇を見た以外に大きな変化なく、ほぼ術前の状態と同じ割合で推移した。

図42. Naïve/Memory T cells (症例7)

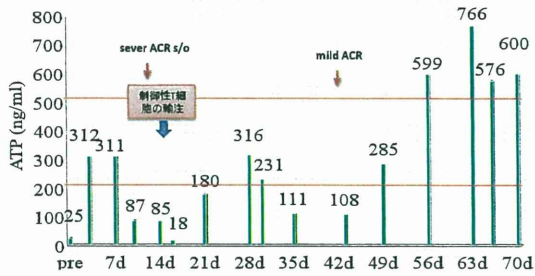


症例 8

・ Immuknow (cylex) : 図43

本症例の術前値は25 ng/mlと非常に低値であった。術後一過性に術前値と比べ上昇がみられたものの、14日目をピークに減少がみられた。12日目にセルセプトを中止した後もこれまでの症例のような上昇はみられず推移したが、術後56日目、63日目には599、766と高値が見られ、以後400以上が77日の時点で続いている。

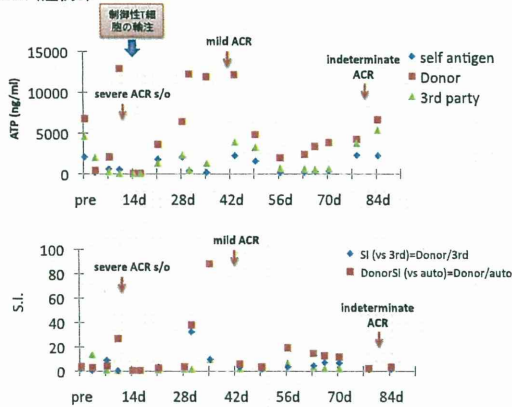
図43. Cylex (症例8)



・ MLR : 図44

移植後7日目まで値の漸減が見られていたが、9日に急激な上昇がみられた。30日目付近と70日目前後にドナー抗原に対する上昇が観察された。

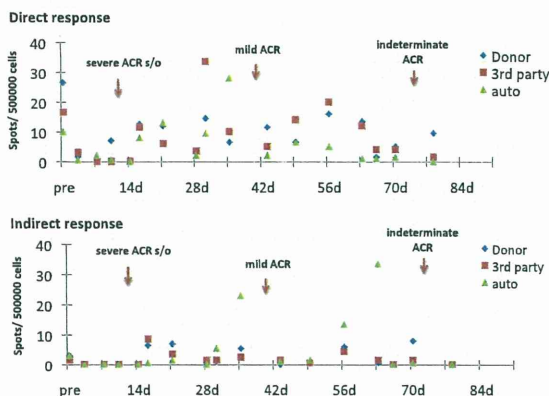
図44. MLR (症例8)



・ IFN- $\gamma$  ELISPOT : 図45

ドナー抗原に対するIFN- $\gamma$ 産生は一貫して低値であった。拒絶反応の前後でも上昇がみられず、ドナー抗原に対しては術前の値が最も高かった。

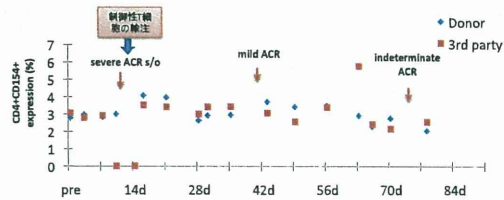
図45. IFN- $\gamma$  ELISPOT (症例8)



・ 末梢血中のドナー抗原特異的 CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T細胞 : 図46

ドナー抗原に対する反応、3<sup>rd</sup> party に対する反応いずれも約3%を推移した。拒絶反応の前後での上昇も観察されなかった。

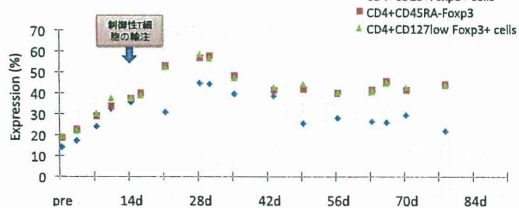
図46. CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> (症例8)



・ 末梢血中の 制御性T細胞 : 図47

術後より28日目まで漸増がみられた。その後も84日目まで術前値と比べて高い割合を維持した。

図47. 制御性T細胞 (症例8)

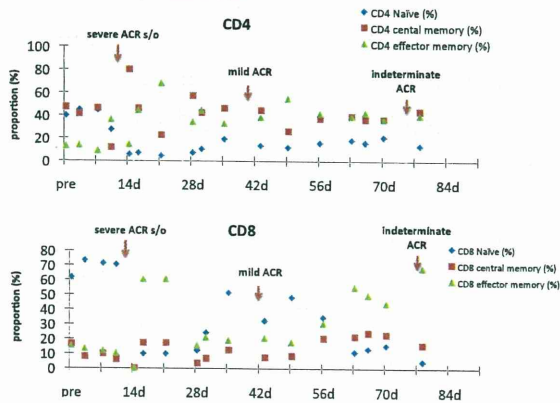


・ 末梢血中のNaïve/Memory T細胞 : 図48

CD4<sup>+</sup> central memoryは術前から比較的高い値であった。Severe rejectionがみられた術後13日付近ではCD4<sup>+</sup> Central memory T細胞の上昇がみられた。23日目にはCD4<sup>+</sup> effector memory T細胞の一過性の増加もみられた。その後Naïve CD4<sup>+</sup> T細胞に比し、effector, central memory CD4<sup>+</sup> T細胞の割合が増加した。CD8<sup>+</sup> T細胞は当初naïve T細胞が主な集団であったが、14日目を境にeffector memory CD8<sup>+</sup> T細胞の増加が見られた。35~56日目までnaïve CD8<sup>+</sup> T細胞が優位な集団であったが、63日目以降、effector memoryが優位な

細胞集団へと変化した。

図48. Naïve/Memory T cells (症例8)



## D. 考察

制御性T細胞を用いた新しい免疫抑制療法を施行した生体肝移植症例において、主に Cylex、MLR、IFN- $\gamma$  ELISPOT、抗原特異的CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T細胞を用いた免疫モニタリングを行った。本研究では生体間での肝移植を対象にしたが、生体ドナーであるため、ドナーリンパ球を必要時に採取できるという利点がある。今回、経過中に急性細胞性拒絶反応（ACR）を来した症例は4例みられたが、少なくとも3例において拒絶反応を来す直前にドナー抗原に対するMLR、IFN- $\gamma$  ELISPOT、CD154の発現のいずれかの上昇が観察され、また全症例では無いが、非特異的免疫反応であるCylexの上昇を観察できた。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ることで、拒絶反応に対する早期治療、適切な免疫抑制剤の調節に有用であると考えられた。

Cylexは非特異的な免疫反応を測定しているが、過剰な免疫抑制（over immunosuppression）、CMV感染やHCV再発などの状態を判断する上で有用なアッセイと考えられた。特にエンドキサン投与などで極度にWBCが低下するような場合には、Cylex値の低値が

全症例で観察された。拒絶反応に際して治療前のCylex高値が観察になる症例もあったが(症例6, 図31)、WBC低下時に拒絶反応生じた場合には必ずしも高値として観察されなかった(症例8, 図43)。一般的に拒絶反応はWBC全体のうちわずか数パーセントのドナー抗原反応性T細胞の存在で引き起こされると考えられていることから、WBCの低下をきたすような病態や治療時(ある種のinduction therapyなど)には、Cylexでは拒絶反応をモニターするのは難しいかもしれないと考えられた。CMV感染に関しては症例1のようにCylex値が100台と低下した際に罹患がみられ、over immunosuppressionのモニタリングとしての有用であると考えられた。またHCVにおいても術後長期にわたりCylexの低値を認めた場合には、HCV-RNAはやや高値を持続した。Cylexによる免疫状態の観察は、適切な免疫抑制剤やウイルス治療薬の使用を可能とし、免疫モニタリングとして大変有用であると考えられた。

ドナー抗原に対する反応はMLR、IFN- $\gamma$  ELISPOT、CD154の発現の3種の異なる測定方法で観察した。興味深いことに拒絶反応に対するモニタリングとして症例毎にそれぞれの測定方法で異なるSensitivityが観察された。症例1では56日目にドナー抗原、3<sup>rd</sup>パーティーに対するIFN- $\gamma$ 産生上昇が見られ、65日目にMildな急性細胞性拒絶反応と診断されたことから、IFN- $\gamma$  ELISPOTの発現が拒絶反応のモニタリングとして有用であったと考えられた。一方、MLRでも拒絶反応前の反応増加が観察されたが、ELISPOTのような急峻な反応上昇はみられなかった。また症例1では3<sup>rd</sup> partyに対するIFN- $\gamma$  ELISPOTのspot増加とCD154の発現の増加が、拒絶反応と関連しており、3<sup>rd</sup> partyへのCross reactについて検討する



必要があると考えられた。しかし、症例6 (図66) のように、ドナー抗原、3<sup>rd</sup> party抗原のいずれに対しても反応がみられる場合は拒絶反応がモニターされるが、反応が3<sup>rd</sup> party抗原に対してのみの場合には臨床的に拒絶反応を疑う所見は無かったケースなどドナー抗原に対して特異的なモニタリングが可能な症例もあった。さらに症例4のようにMLRの高値は拒絶反応に特異的ではなく、免疫応答可能な状態を観察していると考えられるケース、症例2のように拒絶反応が観察された移植後21日目の時点でMLR、ELISPOTともに軽度上昇を認めるのみであったケースもある。また症例5ではMLRは移植後14日目以降高値が観察されず、臨床像と合致したが、IFN $\gamma$  ELISPOTでは28日目に一過性の増加が観察され、擬陽性と考えられるケースもあった。今後3<sup>rd</sup> パーティのHLAタイピングや、術前値との比較などについても追加検討することで、個々の症例に対応し得る特異的なモニタリングとしての改善を考えている。

またドナー抗原特異的な免疫反応の観察は拒絶反応のモニタリングに留まらず、長期経過後においては安全な免疫抑制剤の減量の指標として使用することができる。症例によっては (症例1-2) 100日以降の免疫反応を観察するとドナー抗原特異的な免疫抑制 (つまり3<sup>rd</sup> party抗原には反応するが、ドナー抗原に対する反応は抑えられている) が得られており、免疫寛容の誘導が示唆された (図3, 9)。

肝移植後にはmemory T細胞が増加し、naïve T細胞が低下する傾向がみられた。しかし症例によってはnaïve T細胞の割合が増加した状態が続く場合もあり、個人差も観察された (図36、症例6)。また拒絶反応の前後でmemory T細胞の増加が観察される場

合もあり (図12 : 症例2、図48 : 症例8)、新しい拒絶反応に対するマーカーとしての有用性も示唆された。症例4ではセルセプトを中止にした70日前後からeffector memory T細胞が優位な集団へと変化した (症例4 : 図24)。原疾患や免疫抑制剤による影響、memory T細胞のドナー抗原特異性などについても興味深い。

本研究では抗CD80および抗CD86抗体により誘導した制御性T細胞の輸注を行う免疫寛容誘導の治療プロトコルを用いたが、細胞治療に伴い、レシピエント末梢血中のCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T細胞、CD4<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup>Foxp3<sup>+</sup> T細胞およびCD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T細胞といった制御性T細胞のphenotypeの割合が6割以上の症例で増加することが確認された。(図5, 11, 17, 29, 47) (症例1-3, 5, 8) 術後長期を経た症例でも制御性T細胞の増加が観察され、さらにこれらの症例では免疫抑制剤の減量にもかかわらず拒絶反応は抑制され、免疫寛容誘導効果が推察された (症例3, 図17)。これら制御性T細胞のドナー抗原特異性、機能 (免疫寛容誘導への寄与) また、グラフト内の制御性T細胞について今後の検討課題と考えられる。

## E. 結論

- 制御性T細胞を用いた新しい免疫抑制療法を施行した生体肝移植症例8例において、免疫モニタリングを行った。
- Cylex値の測定は感染症罹患時やover immunosuppressionの状態を把握する上で有用な可能性がある。
- MLR、IFN- $\gamma$  ELISPOT、抗原特異的CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T細胞を用いたドナー抗原に対する反応を総合的に判断することで、免疫抑制の適正化を図れる可能性がある。



- 培養制御性T細胞輸注により末梢血液中の制御性T細胞の割合が増加する可能性が示唆された。
- 肝移植後はnaïve T細胞の割合は減少し、代わってmemory T細胞が増加する傾向が認められた。
- 症例の追加と長期経過後の免疫抑制剤の減量、免疫寛容誘導におけるモニタリングの有用性について今後検討が必要である。

## 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

