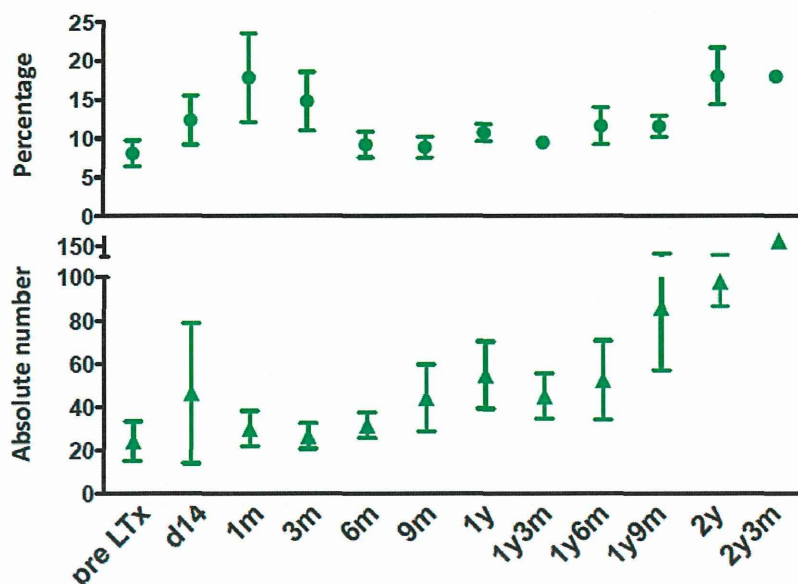


図9. 末梢血液中 CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺ 制御性T細胞の術後推移



成果が報告されている。しかし、これらは第三者由来の抗原非特異的な所謂 naturally occurring regulatory T細胞を用いた治療である。本研究の如く、ドナー抗原に対し特異性の高い制御性T細胞を誘導し細胞治療を行う臨床試験は未だ行われておらず、本研究の成果は学術的のみならず国際的にも意義は大きい。研究の直接成果としては、第1に移植患者の免疫抑制剤服用量を軽減もしくは中止できることであり、世界に先駆けて、「患者にやさしい移植医療」の提供を実現することができる。第2に医療経済的見地から、高額医療の多くを占める免疫抑制療法と合併症治療にかかる医療経費を軽減できることにある。更に、間接的な成果としては制御性T細胞と自己免疫疾患や持続性肝炎ウイルス感染症との関連が明らかにされつつある今日、これら疾患に対する制御性T細胞による細胞治療の応用や新たな治療法が開発され、国民の保健・医療・福祉の向上等に資するものと期待される。

肝移植において本研究の細胞治療の結果が普遍的か否かを判断するには症例数を更に増やして検討することが肝

要である。従って、今後は i) 国内における多施設共同試験の実施、ii) 脳死肝移植への応用とその効果判定を目的とした海外肝移植施設における多施設共同試験の実施が急務である。また、iii) 本細胞治療が既に肝移植術を実施した患者における有効性の検討(pilot study)も必要である。更に、肝移植において本細胞治療の有効性が広く示されたならば、iv) I型糖尿病などの自己免疫疾患治療への応用も期待される。

E. 結論

- ・ 生体肝移植症例計10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。
- ・ 生体肝移植10症例中、8症例で免疫抑制剤の減量に成功した。残り2症例は薬剤減量中に拒絶反応を来したが、その反応は軽微であり、免疫抑

制剤増量により肝機能は正常化した。免疫抑制剤の減量に成功した症例のうち4症例は免疫抑制剤から完全に離脱し、現時点において既に4～8ヶ月間、免疫抑制剤フリーで経過しており、免疫寛容誘導が期待される。

- 今後もこれら臨床試験症例の経過をフォローすることが重要であり、症例数を増やすべく多施設との共同試験を実施する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 国内

口頭発表 0件

原著論文による発表 0件

それ以外（レビュー等）の発表 0件

2) 海外

口頭発表 3件

原著論文による発表 0件

それ以外（レビュー等）の発表 0件

学会発表

Yamashita K, Goto R, Zaitzu M, Nagatsu A, Igarashi R, Oura T, Wakayama K, Tsunetoshi Y, Watanabe M, Aoyagi T, Ohta M, Taniguchi M, Furukawa H, Suzuki T, Shimamura T, Todo S. A REAL-TIME IMMUNOLOGICAL MONITORING IN LIVING LIVER TRANSPLANT RECIPIENTS. ESOT and AST Joint Meeting - Transformational Therapies and Diagnostics in Transplantation, Oct 12-14, 2012 Nice, France

Yamashita K, Zaitzu M, Nagatsu A, Goto R, Oura T, Watanabe M, Aoyagi T, Suzuki T, Shimamura T, Sato N, Sugita J, Hatanaka K, Taniguchi M, Furukawa H, Bashuda H, Okumura K and Todo S. SUCCESSFUL

REDUCTION AND CESSATION OF IMMUNOSUPPRESSANTS BY A REGULATORY T CELL-BASED CELL THERAPY IN LIVING DONOR LIVER TRANSPLANTATION: A PILOT STUDY FOR TOLERANCE INDUCTION. The 13th Joint Annual Congress of the American Society of Transplant Surgeons and The American Society of Transplantation, May 18-22, 2013. Seattle, U.S.A

Nagatsu A, Yamashita K, Zaitzu M, Emoto S, Asahi Y, Ogura M, Ono H, Tsunetoshi Y, Goto R, Bashuda H, Taketomi A, Okumura K and Todo S. Ex-vivo Generation of Immunosuppressive Human Cells by Co-culture of Recipient and Irradiated Donor PBMCs under CD80/CD86 Costimulation Blockade. The 13th Joint Annual Congress of the American Society of Transplant Surgeons and The American Society of Transplantation, May 18-22, 2013. Seattle, U.S.A

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

II. 分担研究報告

「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すると共に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。肝移植症例、計10例において、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、制御性T細胞の誘導を試み、その抗原特異的免疫抑制能を検討した。本培養法により10例中8例においてCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺やCD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺制御性T細胞が高率に誘導され、*in vitro*では培養細胞を添加することで細胞数依存性かつ比較的抗原特異的にMLRが抑制された。しかし、HLA適合ドナー・レシピエント間での制御性T細胞の誘導効率は不良であり、MLRを用いた培養細胞の抑制能試験でもドナー抗原に対する抑制効果の判定は困難であった。培養細胞輸注による明らかな副作用は認められず、本制御性T細胞を用いる細胞治療の安全性が確認された。

A. 目的

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にあたり、H22年度は1) 細胞の培養方法と至適培養条件、2) 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を確認した。その後、H23年度より現在に至るまで、生体肝移植患者およびそのドナーからなる計10例の肝移植症例を対象に、抗CD80抗体および抗CD86抗体を用いた制御性T細胞を*ex vivo*において誘導を試み、以下の検討

を行った。

- 1) 制御性 T 細胞誘導効率
- 2) 培養細胞の細胞分画（細胞種）の変化
- 3) 培養細胞の MLR 抑制能

B. 方法

1) 細胞培養

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-Paque™ 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 1%(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 1%(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それぞれの解析を行った。

2) 制御性 T 細胞誘導効率の検討

培養前および抗 CD80 抗体および抗 CD86 抗体存在下に誘導した培養リンパ球中の制御性 T 細胞誘導効率は、以下の制御性 T 細胞マーカーを染色し、BD FACS Calibar を用いて検討を行った。抗体は BD Bioscience の PE-Cy™5 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。

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-Cy™5 Mouse Anti-Human CD4 (RPA-T4), PE-Cy™5 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。

4) 培養細胞の MLR 抑制能についての検討

Stimulator (ドナー および 3rd パーティ)は 30 Gy で放射線照射をした細胞を使用した。Responder (レシピエント)および Stimulator の細胞濃度は 1×10^5 /well で共培養し、リンパ球混合培養 (MLC) を行った。この培養系に抗 CD80 抗体および抗 CD86 抗体存在下に誘導した培養リンパ球を加え、1 週間共培養した。培養終了 16 時間前にチミジンを $1 \mu\text{Ci}/\text{well}$ 加えβ線シンチレーションカウンターでチミジンと取り込みを評価し、MLR 抑制能を検討した。

C. 結果

臨床試験症例#1

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。一方、制御性 T 細胞である

表1. 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

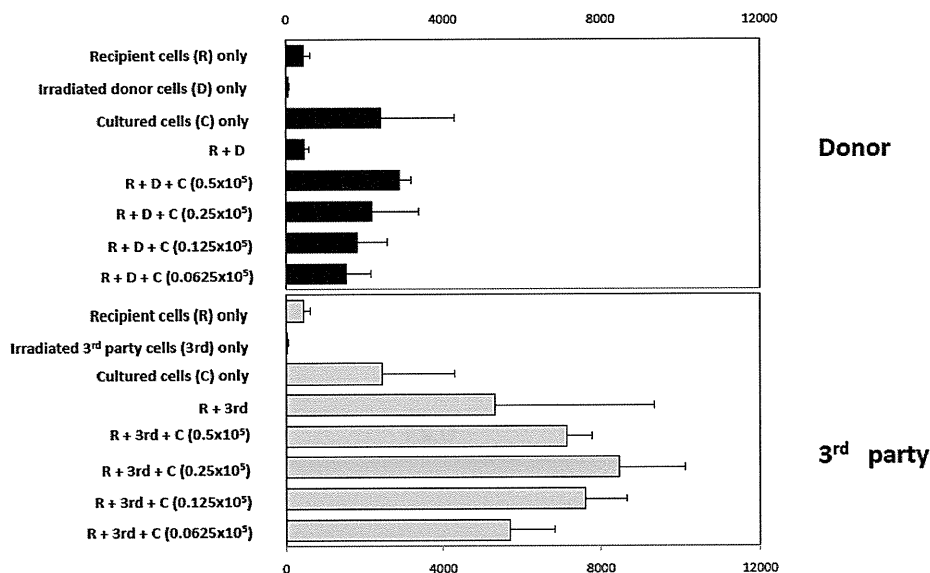
表2. 臨床試験1例目の培養細胞のデータ(細胞phenotypeのTable)

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 ⁺ SCC ^{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

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞は、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1)。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(表2)。

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を用いて検討した(図1)。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

図1. 臨床試験1例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



(2910±288)であった。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。

臨床試験症例#2

総リンパ球数は培養前の 6.9×10^9 から 2 週間培養後に 2.54×10^9 となった。

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^{low}Foxp3⁺細胞は

表3. 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

0.4%から 23.4%へとそれぞれ上昇した(表3)。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4)。

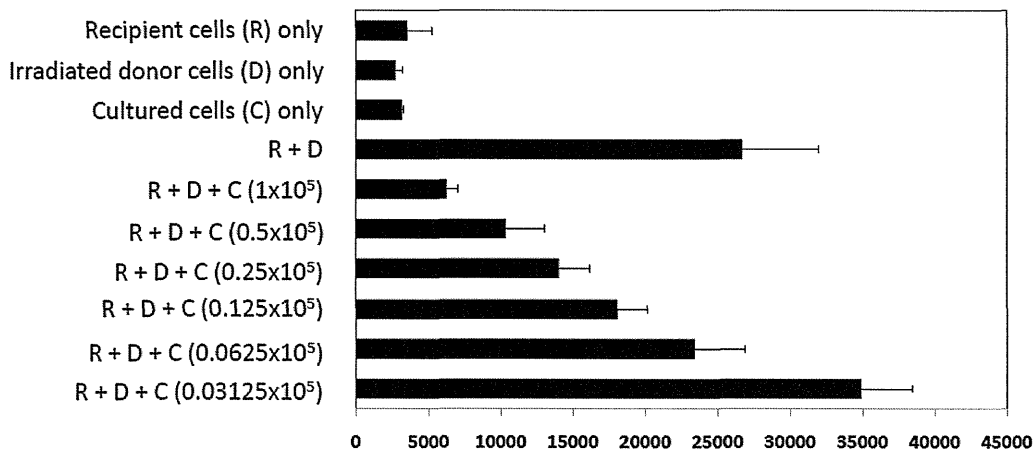
誘導された制御性 T細胞を含む細胞が免疫抑制効果を示すか、MLR法を用いて検討した(図2)。1x10⁵/well

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

表4. 臨床試験2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	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

図2. 臨床試験2例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



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。

臨床試験症例#3

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。更に CD4⁺細胞中の比率を見ると、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞は 2.35 % から 18.0 %、CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺細胞は 1.96 % から 33.1%、CD4⁺CD127^{low}Foxp3⁺細胞は 2.5 % から 13.2 % へとそれぞれ上昇した(表 5)。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%

表5. 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6. 臨床試験3例目の培養細胞のデータ(細胞phenotypeのTable)

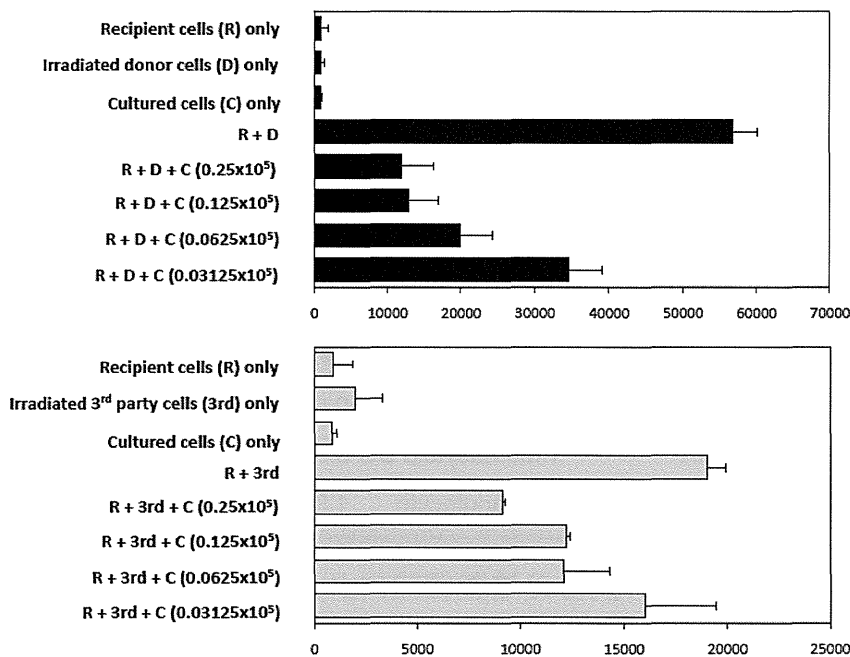
Phenotype	細胞種	培養前 (%)	2週間培養後 (%)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4 ⁺ T cell	30.6	66.6
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	14.9	16.4
CD3 ⁻ CD19 ⁺	B cell	7.41	4.8
CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	3.92	5.87
CD14 ⁺ SCC ^{mid}	Monocyte	27.4	18.2
Lin1 ⁻ CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	0.76	0.068
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	0.29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

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(表 6)。

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 3)。 $1 \times 10^5/\text{well}$ のレシピエント細胞、照射したドナー細胞に、培養細胞($0.03125 \times 10^5/\text{well}$,

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 $0.03125 \times 10^5/\text{well}$ 加えた群(16008 ± 3434)、培養細胞を $0.0625 \times 10^5/\text{well}$ 加えた群(12088 ± 2214)、培養細胞を $0.125 \times 10^5/\text{well}$ 加えた群(12222 ± 175)、培養細胞を $0.25 \times 10^5/\text{well}$ 加えた群(9142 ± 129)であった。

図3. 臨床試験3例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



$0.0625 \times 10^5/\text{well}$, $0.125 \times 10^5/\text{well}$, $0.25 \times 10^5/\text{well}$)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 SD)は、培養細胞を加えない(control)群(56821 ± 3355)、培養細胞を $0.03125 \times 10^5/\text{well}$ 加えた群(34581 ± 4484)、培養細胞を $0.0625 \times 10^5/\text{well}$ 加えた群(19904 ± 4462)、培養細胞を $0.125 \times 10^5/\text{well}$ 加えた群(12781 ± 4069)、培養細胞を $0.25 \times 10^5/\text{well}$ 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

臨床試験症例#4

総リンパ球数は培養前の末梢血単核球 4.541×10^9 、脾細胞 1.254×10^9 から 2 週間培養後に 2.45×10^9 となった。

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、末梢血単核球 26.8%、脾細胞 11.2%から 64.5%へと上昇を認めた。一方、制御性 T 細胞である $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 細胞は、末梢血単核球 3.21%、脾細胞 1.51%から 14.9%へと上昇した。更に $CD4^+$ 細胞中の比率を見ると、

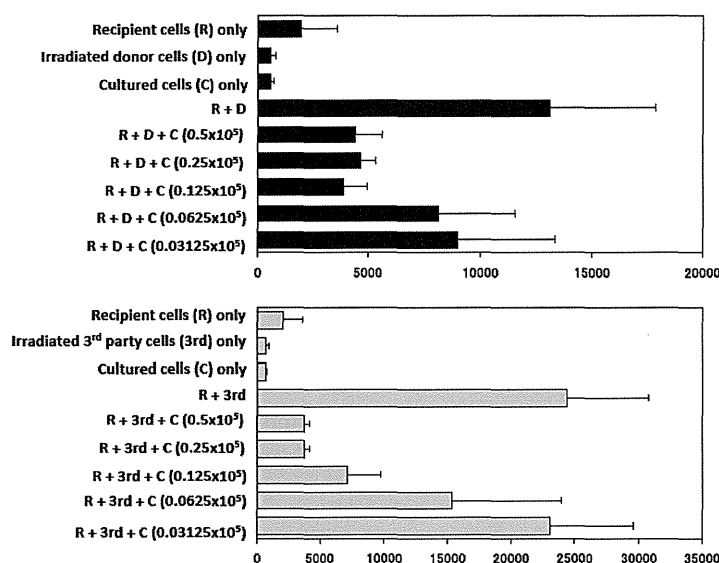
表7. 臨床試験4例目の培養細胞のデータ(細胞数・Treg phenotype)

	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:%)	4.541 + 1.254 (98.1) (95.8)	3.62 (89.0)	2.45 (71.8)
Donorリンパ球数 (x10 ⁹)	約3.0	約3.0	-
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	26.8 + 11.2	-	64.5
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)	3.21 + 1.51	-	14.9
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	7.45 + 5.67	-	27.9
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	3.63 + 6.53	-	27.7
CD4 ⁺ CD127 ^{low} Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	13.9 + 12.4	-	26.5

表8. 臨床試験4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	26.8 (11.2)	64.5
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	8.59 (5.0)	17.6
CD3 ⁻ CD19 ⁺	B cell	12.9 (17.0)	4.43
CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	13.3 (8.1)	5.75
CD14 ⁺ SCC ^{mid}	Monocyte	10.2 (2.1)	1.92
Lin1 ⁻ CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	0.81 (1.76)	1.11
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	0.39 (0.12)	0.27
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	Granulocyte	1.33 (0.12)	0.73

図4. 臨床試験4例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞は末梢血単核球

7.45%、脾細胞 5.67%から 27.9%、 $CD4^+CD25^+CTLA4^+$ 細胞は末梢血単核球 3.63%、脾細胞 6.53%から 27.7%、 $CD4^+CD127^{lo}Foxp3^+$ 細胞は末梢血単核球 13.9%、脾細胞 12.4%から 26.5%へとそれぞれ上昇した(表7)。表面抗原を解析の結果、 $CD4^+$ T細胞が 64.5%、 $CD8^+$ T細胞が 17.6%と T細胞が 82%以上を占めた。これに対し、B細胞、NK細胞はそれぞれ 4.43%、5.75%であった。また、単球は 1.92%であった。さらに、樹状細胞が 1.38%、顆粒球が 0.73%程度認められた(表8)。

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4)。 1×10^5 /well のレシピエント細胞、照射したドナー細胞に、培養細胞 (0.03125×10^5 /well, 0.0625×10^5 /well, 0.125×10^5 /well, 0.25×10^5 /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±SD)は、培養細胞を加えない(control)群(13172 ± 4728)、培養細胞を 0.03125×10^5 /well 加えた群(9025 ± 4372)、培養細胞を 0.0625×10^5 /well 加えた群(8207 ± 3400)、培養細胞を 0.125×10^5 /well 加えた群(3894 ± 1068)、

培養細胞を 0.25×10^5 /well 加えた群(4488 ± 1139)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(24315 ± 6426)、培養細胞を 0.03125×10^5 /well 加えた群(23116 ± 6495)、培養細胞を 0.0625×10^5 /well 加えた群(15324 ± 8565)、培養細胞を 0.125×10^5 /well 加えた群(7128 ± 2665)、培養細胞を 0.25×10^5 /well 加えた群(3739 ± 420)であった。

臨床試験症例#5

総リンパ球数は培養前の末梢血単核球 4.35×10^9 、脾細胞 0.56×10^9 から 2週間培養後に 0.63×10^9 となった。

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、末梢血単核球 19.0%、脾細胞 15.3%から 78%へと上昇を認めた。一方、制御性 T細胞である $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 細胞は、末梢血単核球 1.02%、脾細胞 1.07%から 2.22%へと上昇した。更に $CD4^+$ 細胞中の比率を見ると、 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 細胞は末梢血単核球 6.51%、脾細胞 5.84%から 3.40%、

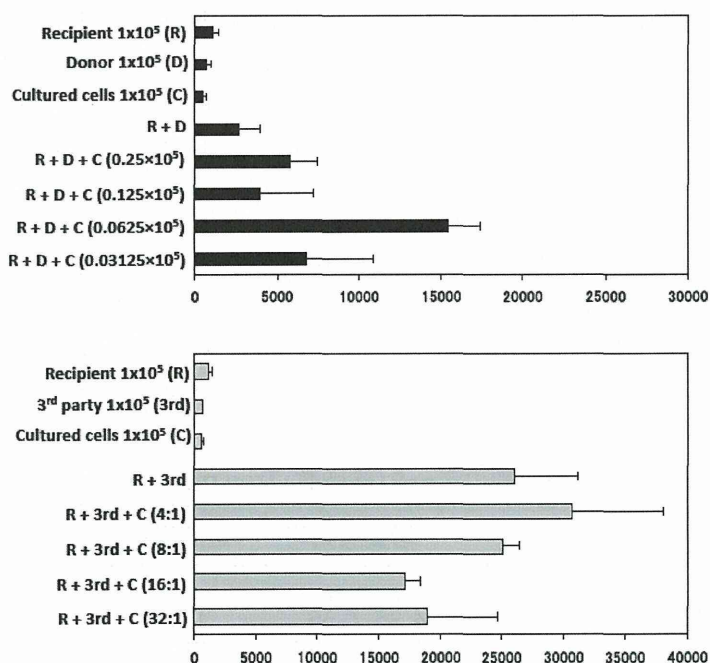
表9. 臨床試験5例目の培養細胞のデータ(細胞数・Treg phenotype)

	培養開始時	1週間培養後	2週間培養後
	PBMCs Splenocytes		
リンパ球数 ($\times 10^9$) (生細胞率%)	4.35, 0.56 (100) (94)	1.83 (80.4)	0.63 (78)
Donorリンパ球数 ($\times 10^9$)	3.0	3.0	-
$CD3^+CD4^+$ (%)	19.0, 15.3	-	78
$CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (%)	1.02, 1.07	-	2.22
$CD4^+CD25^+Foxp3^+/CD4^+$ (%)	6.51, 5.84	-	3.40
$CD4^+CD25^+CTLA4^+/CD4^+$ (%)	4.64, 5.21	-	3.34
$CD4^+CD127^{low}Foxp3^+/CD4^+$ (%)	1.25, 1.13	-	3.62

表10. 臨床試験5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 (%)
		PBMCs	Splenocytes	
CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4 ⁺ T cell	19.0,	15.3	78.4
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	1.60,	5.3	5.93
CD3 ⁻ CD19 ⁺	B cell	0.5,	3.7	1.7
CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	2.8,	7.9	1.3
CD14 ⁺ SCC ^{mid}	Monocyte	31.3,	2.7	6.0
Lin1 ⁻ CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	1.2,	0.3	0.1
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	0.4,	0.3	0
Lin1 ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	Granulocyte	0.4,	0.2	0.1

図5. 臨床試験5例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺細胞は末梢血単核球 4.64%、脾細胞 5.21%から 3.34%、CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺細胞は末梢血単核球 1.25%、脾細胞 1.13%から 3.62%へと変化したが、過去の症例とは異なる結果であった(表9)。表面抗原を解析の結果、CD4⁺T細胞が 78.4%、CD8⁺T細胞が 5.93%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 1.7%、1.3%であった。また、単球は 6.0%であった。さらに、樹状細胞が 0.1%、顆粒球が 0.1%程度認められた(表10)。

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)。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 ($0.03125 \times 10^5/\text{well}$, $0.0625 \times 10^5/\text{well}$, $0.125 \times 10^5/\text{well}$, $0.25 \times 10^5/\text{well}$) 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(2721 ± 1239)、培養細胞を $0.03125 \times 10^5/\text{well}$ 加えた群(6883 ± 4006)、培養細胞を $0.0625 \times 10^5/\text{well}$ 加えた群(15519 ± 1917)、培養細胞を $0.125 \times 10^5/\text{well}$ 加えた群(4065 ± 3242)、培養細胞を $0.25 \times 10^5/\text{well}$ 加えた群(5843 ± 1639)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 (26054 ± 5215)、培養細胞を $0.03125 \times 10^5/\text{well}$ 加えた群(19036 ± 5693)、培養細胞を $0.0625 \times 10^5/\text{well}$ 加えた群 (17178 ± 1190)、培養細胞を $0.125 \times 10^5/\text{well}$ 加えた群(25095 ± 1429)、培養細胞を $0.25 \times 10^5/\text{well}$ 加えた群 (30686 ± 7331)であった。この結果は小規模試験と乖離した結果であり、制御性 T 細胞の割合が少ない事によるものの可能性があると考えられた。

臨床試験症例#6

総リンパ球数は培養前の末梢血単核球 3.55×10^9 、脾細胞 0.825×10^9 から 2 週間培養後に 1.18×10^9 となった。

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、末梢血単核球 43.8%、脾細胞 10.7% から 64.1%へと上昇を認めた。一方、制御性 T 細胞である $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 細胞は、末梢血単核球 1.02%、脾細胞 1.07%から 13.7%へと上昇した。更に $CD4^+$ 細胞中の比率を見ると、 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 細胞は末梢血単核球 5.66%、脾細胞 4.20%から 35.9%、 $CD4^+CD25^+CTLA4^+$ 細胞は末梢血単核球 2.44%、脾細胞 6.02%から 27.7%、 $CD4^+CD127^{low}Foxp3^+$ 細胞は末梢血単核球 6.28%、脾細胞 7.24%から 30.2%へとそれぞれ上昇した (表 11)。表面抗原を解析の結果、 $CD4^+$ T 細胞が 64.1%、 $CD8^+$ T 細胞が 16.4%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 5.02%、6.98%であった。また、単球は 2.55%であった。さらに、樹状細胞が 0.32%、顆粒球が 0.18%程度認められた (表 1

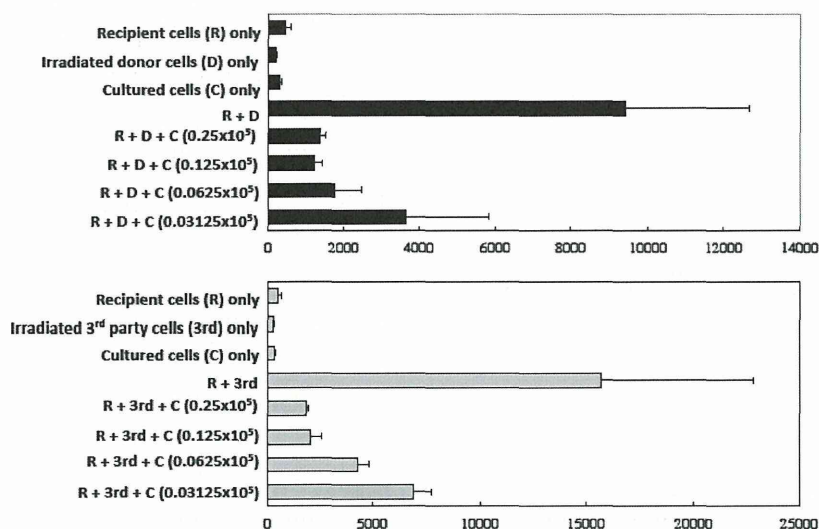
表 11. 臨床試験6例目の培養細胞のデータ(細胞数・Treg phenotype)

	培養開始時	1週間培養後	2週間培養後
リンパ球数 ($\times 10^9$) (生細胞率%)	PBMCs 3.55, (99.8)	Splenocytes 0.825 (92.2)	1.896 (91.6)
Donorリンパ球数 ($\times 10^9$)	3.43	3.43	-
$CD3^+CD4^+$ (%)	43.8, 10.7	-	64.1
$CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (%)	1.02, 1.07	-	13.7
$CD4^+CD25^+Foxp3^+/CD4^+$ (%)	5.66, 4.20	-	35.9
$CD4^+CD25^+CTLA4^+/CD4^+$ (%)	2.44, 6.02	-	27.7
$CD4^+CD127^{low}Foxp3^+/CD4^+$ (%)	6.28, 7.24	-	30.2

表 12. 臨床試験6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 (%)
		PBMCs	Splenocytes	
CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4 ⁺ T cell	43.8,	10.7	64.1
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	15.9,	5.0	16.4
CD3 ⁻ CD19 ⁺	B cell	3.76,	5.46	5.02
CD3 ⁻ CD16+56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	4.43,	6.06	6.98
CD14 ⁺ SCC ^{mid}	Monocyte	9.12,	1.21	2.55
Lin1-CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	0.51,	0.04	0.30
Lin1-CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	0.10,	0.04	0.02
Lin1-CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	Granulocyte	0.66,	0.10	0.18

図6. 臨床試験6例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



2)。

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)。 1×10^5 /well のレシピエント細胞、照射したドナー細胞に、培養細胞 (0.03125×10^5 /well, 0.0625×10^5 /well, 0.125×10^5 /well, 0.25×10^5 /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±SD)は、培養細胞を加えない(control)群(9410 ± 3276)、培養細胞を 0.03125×10^5 /well 加えた群(3648 ± 2179)、培養細胞を 0.0625×10^5 /well 加えた群

(1744 ± 721)、培養細胞を 0.125×10^5 /well 加えた群 (1241 ± 196)、培養細胞を 0.25×10^5 /well 加えた群 (1377 ± 144) 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 (15724 ± 7129)、培養細胞を 0.03125×10^5 /well 加えた群 (6863 ± 871)、培養細胞を 0.0625×10^5 /well 加えた群 (4246 ± 561)、培養細胞を 0.125×10^5 /well 加えた群 (2006 ± 578)、培養細胞を 0.25×10^5 /well 加えた群 (1779 ± 145) であった。

表13. 臨床試験7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
	PBMCs Splenocytes		
リンパ球数 (x10 ⁹) (生細胞率%)	7.27, 0.48 (99.2), (100)	4.56 (93.6)	2.59 (94.3)
Donorリンパ球数 (x10 ⁹)	3.79	3.79	-
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	41.3, 34.7	-	64.0
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)	3.39, 3.48	-	10.3
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	6.99, 8.04	-	19.2
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	4.80, 6.46	-	15.1
CD4 ⁺ CD127 ^{low} Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	8.38, 8.37	-	18.0

表14. 臨床試験7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 (%)
		PBMCs	Splenocytes	
CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4 ⁺ T cell	41.3,	34.7	64.0
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	11.7,	10.5	17.0
CD3 ⁻ CD19 ⁺	B cell	5.96,	15.9	7.94
CD3 ⁻ CD16 ⁺ 56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	15.3,	11.1	8.21
CD14 ⁺ SCC ^{mid}	Monocyte	5.01,	1.52	1.43
Lin1-CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	0.62,	1.02	0.44
Lin1-CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	0.78,	0.29	0.02
Lin1-CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	Granulocyte	0.80,	0.48	0.06

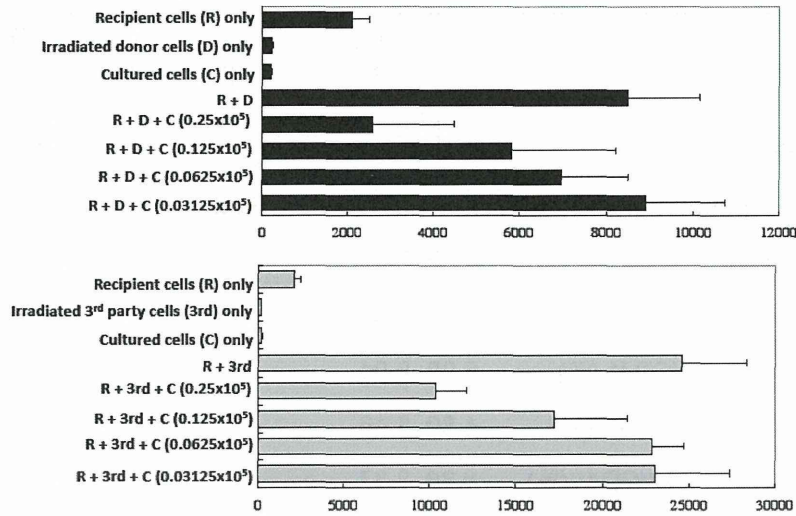
臨床試験症例#7

総リンパ球数は培養前の末梢血単核球 7.27×10⁹、脾細胞 0.48×10⁹から2週間培養後に2.59×10⁹となった。

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、末梢血単核球 41.3%、脾細胞 34.7%から64.0%へと上昇を認めた。一方、制御性T細胞であるCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞は、末梢血単核球 3.39%、脾細胞 3.48%から10.3%へと上昇した。更にCD4⁺細胞中の比率を見ると、

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞は末梢血単核球 6.99%、脾細胞 8.04%から19.2%、CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺細胞は末梢血単核球 4.80%、脾細胞 6.46%から15.1%、CD4⁺CD127^{low}Foxp3⁺細胞は末梢血単核球 8.38%、脾細胞 8.37%から18.0%へとそれぞれ上昇した(表13)。表面抗原を解析の結果、CD4⁺T細胞が64.0%、CD8⁺T細胞が17.0%とT細胞が81%以上を占めた。これに対し、B細胞、NK細胞はそれぞれ7.94%、8.21%であった。また、単球は1.43%であった。さらに、樹状細胞が0.46%、顆粒球が0.06%程度認められた(表1

図7. 臨床試験7例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



4)。

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)。 1×10^5 /well のレシピエント細胞、照射したドナー細胞に、培養細胞 (0.03125×10^5 /well, 0.0625×10^5 /well, 0.125×10^5 /well, 0.25×10^5 /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 SD) は、培養細胞を加えない (control) 群 (8499 ± 1684)、培養細胞を 0.03125×10^5 /well 加えた群 (8911 ± 1863)、培養細胞を 0.0625×10^5 /well 加えた群 (6971 ± 1521)、

0.125×10^5 /well 加えた群 (5810 ± 2416)、培養細胞を 0.25×10^5 /well 加えた群 (2585 ± 1890) 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 (24604 ± 3476)、培養細胞を 0.03125×10^5 /well 加えた群 (23011 ± 4411)、培養細胞を 0.0625×10^5 /well 加えた群 (22858 ± 1823)、培養細胞を 0.125×10^5 /well 加えた群 (17267 ± 4158)、培養細胞を 0.25×10^5 /well 加えた群 (10324 ± 1899) であった。

表15. 臨床試験8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 ($\times 10^9$) (生細胞率%)	PBMCs 4.58, Splenocytes 0.564 (98), (100)	3.74 (86.6)	0.695 (89.5)
Donorリンパ球数 ($\times 10^9$)	3.13	3.13	-
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	32.3, 28.0	-	67.6
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)	5.46, 2.73	-	43.8
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	16.9, 9.75	-	64.8
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	14.8, 12.5	-	65.0
CD4 ⁺ CD127 ^{low} Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	19.5, 15.0	-	66.0

臨床試験 #8

総リンパ球数は培養前の末梢血単核球 4.58×10^9 、脾細胞 0.564×10^9 から 2 週間培養後に 0.695×10^9 となった。

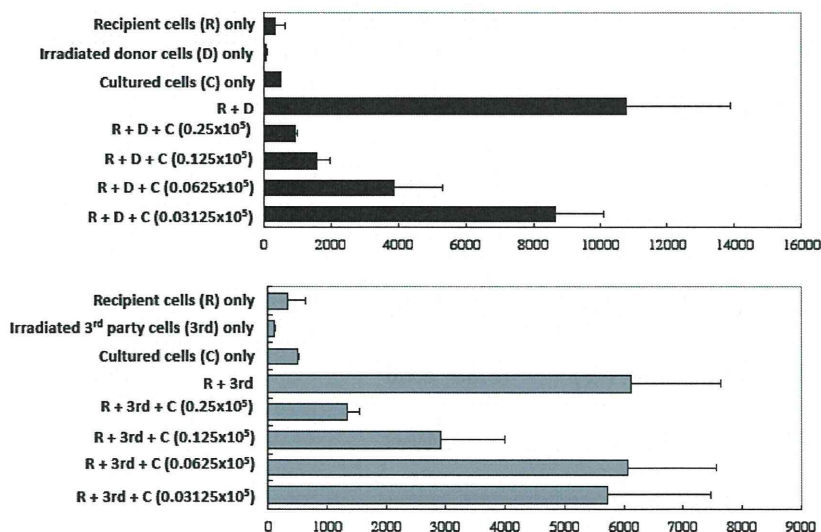
表面抗原の解析により、これらのリンパ球の表現型解析を行うと、 $CD3^+CD4^+$ 細胞は 2 週間培養により、末梢血単核球 32.3%、脾細胞 28.0% から 67.6%へと上昇を認めた。一方、制御性 T 細胞である $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 細胞は、末梢血単核球 5.46%、脾細胞 2.73%から 43.8%へと上昇した。更に $CD4^+$ 細胞中の比率を見ると、

$CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 細胞は末梢血単核球 16.9%、脾細胞 9.75%から 64.8%、 $CD4^+CD25^+CTLA4^+$ 細胞は末梢血単核球 14.8%、脾細胞 12.5%から 65.0%、 $CD4^+CD127^{lo}Foxp3^+$ 細胞は末梢血単核球 19.5%、脾細胞 15.0%から 66.0%へとそれぞれ上昇した(表 15)。表面抗原を解析の結果、 $CD4^+$ T細胞が 67.6%、 $CD8^+$ T細胞が 9.97%と T細胞が 76%以上を占めた。これに対し、B細胞、NK細胞はそれぞれ 6.58%、4.51%であった。また、単球は 4%であった。さらに、樹状細胞が 0.494%、

表 16. 臨床試験8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 (%)
		PBMCs	Splenocytes	
$CD3^+CD4^+$	$CD4^+$ T cell	32.3,	28.0	67.6
$CD3^+CD8^+$	$CD8^+$ T cell	5.44,	12.0	9.97
$CD3^-CD19^+$	B cell	10.7,	32.1	6.58
$CD3^-CD16^+56^+CD45^+$	NK cell	10.25,	12.5	4.51
$CD14^+SCC^{mid}$	Monocyte	26.2,	8.4	4
$Lin1^-CD11c^+HLA-DR^+$	Myeloid DC	0.803,	1.41	0.434
$Lin1^-CD123^+HLA-DR^+$	Plasmacytoid DC	0.978,	2.28	0.06
$Lin1^-CD123^+HLA-DR^-$	Granulocyte	3.54,	0.471	0.01

図8. 臨床試験8例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



顆粒球が 0.01%程度認められた (表 16)。

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 8)。 1×10^5 /well のレシピエント細胞、照射したドナー細胞に、培養細胞 (0.03125×10^5 /well, 0.0625×10^5 /well, 0.125×10^5 /well, 0.25×10^5 /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±SD)は、培養細胞を加えない(control)群(10780 ± 3125)、培養細胞を 0.03125×10^5 /well 加えた群(8670 ± 1457)、培養細胞を 0.0625×10^5 /well 加えた群(3879 ± 1442)、培養細胞を 0.125×10^5 /well 加えた群(1563 ± 417)、培養細胞を 0.25×10^5 /well 加えた群(956 ± 62)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(6117 ± 1509)、培養細胞を 0.03125×10^5 /well 加えた群(5734 ± 1738)、培養細胞を 0.0625×10^5 /well 加えた群(6056 ± 1508)、培養細胞を

0.125×10^5 /well 加えた群(2918 ± 1076)、培養細胞を 0.25×10^5 /well 加えた群(1333 ± 225)であった。

臨床試験 #9

総リンパ球数は培養前の末梢血単核球 3.22×10^9 、脾細胞 0.663×10^9 から 2 週間培養後に 1.10×10^9 となった。

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、末梢血単核球中 19.0%および脾細胞中 24.6%から総培養細胞中 34.3%へと上昇を認めた。一方、制御性 T 細胞である $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 細胞は、末梢血 1.30%、脾細胞 1.39%から培養後 5.63%へと上昇した。更に $CD4^+$ 細胞中の比率を見ると、 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 細胞は末梢血 6.78%、脾細胞 5.66%から培養後 16.4%、 $CD4^+CD25^+CTLA4^+$ 細胞は末梢血 7.53%、脾細胞 3.08%から培養後 24.2%、 $CD4^+CD127^{low}Foxp3^+$ 細胞は末梢血 11.3%、脾細胞 10.0%から培養後 19.6%へとそれぞれ上昇した (表 17)。表面抗原を解析の結果、

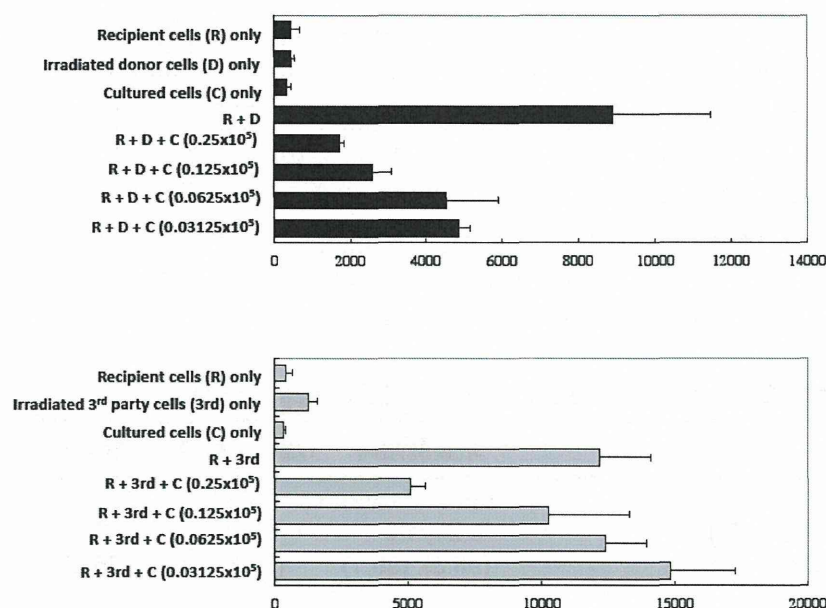
表 17. 臨床試験 9 例目の培養細胞のデータ (細胞数・Treg phenotype)

	培養開始時	1週間培養後	2週間培養後
	PBMCs Splenocytes		
リンパ球数 ($\times 10^9$) (生細胞率%)	3.22, 0.6625 (94.5), (71.42)	2.215 (99.21)	1.1:0.585 (99.0:99.4)
Donorリンパ球数 ($\times 10^9$)	2.95	2.95	-
$CD3^+CD4^+$ (%)	19.0, 24.6	-	34.3
$CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (%)	1.30, 1.39	-	5.63
$CD4^+CD25^+Foxp3^+/CD4^+$ (%)	6.78, 5.66	-	16.4
$CD4^+CD25^+CTLA4^+/CD4^+$ (%)	7.53, 3.08	-	24.2
$CD4^+CD127^{low}Foxp3^+/CD4^+$ (%)	11.3, 10.0	-	19.6

表18. 臨床試験9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 (%)
		PBMCs	Splenocytes	
CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD4 ⁺ T cell	19.0,	24.6	34.3
CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ T cell	4.2,	16.0	6.25
CD3 ⁻ CD19 ⁺	B cell	5.7,	14.0	4.61
CD3 ⁻ CD16+56 ⁺ CD45 ⁺	NK cell	3.6,	10.9	3.23
CD14 ⁺ SCC ^{mid}	Monocyte	44.7,	1.19	0.602
Lin1-CD11c ⁺ HLA-DR ⁺	Myeloid DC	1.6,	0.771	0.832
Lin1-CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Plasmacytoid DC	0.2,	0.498	0.024
Lin1-CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	Granulocyte	4.6,	0.59	0.569

図9. 臨床試験9例目の培養細胞による免疫抑制効果 (MLR)



CD4⁺ T細胞が 34.3%、CD8⁺ T細胞が 6.25%と T細胞は 41%であった。これに対し、B細胞、NK細胞はそれぞれ 4.61%、3.23%であった。また、単球は 0.6%であった。さらに、樹状細胞が 0.9%、顆粒球が 0.6%程度認められた(表18)。

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9)。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(8887±2579)、培養細胞を0.03125x10⁵/well加えた群(4867±274)、