

「制御性T細胞を用いた肝移植症例の免疫モニタリング」

研究分担者：山下 健一郎  
北海道大学 大学院医学研究科 移植外科・准教授  
研究分担者：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  
研究分担者：垣生 園子  
順天堂大学医学部 免疫学講座・教授

**研究要旨：**臓器移植後は適切な免疫抑制（薬剤の種類や投与量）を施すことが肝要であるが、臨床的に宿主の免疫状態や拒絶反応を予知しうる確立されたバイオアッセイやマーカーは存在しない。本研究では、平成24年度末までに制御性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10例において、種々のアッセイ法を用いて免疫モニタリングを試みた。Cylexは抗ドナー反応には非特異的だが、over immunosuppression、CMV感染やHCV再発など状態を判断する上で有用なアッセイと考えられた。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示唆された。培養制御性T細胞輸注後は全ての症例において末梢血液中のCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T細胞などの制御性T細胞の割合の増加が観察された。肝移植後、naïve T細胞は著減し、代わってmemory T細胞が増加する傾向がみられた。免疫モニタリングは個々の免疫状態を適切に判断し、安全な免疫抑制剤の減量、治療選択に有用であると考えられた。

## A. 目的

臓器移植後にはグラフト拒絶を予防するため免疫抑制剤の投与が必須である。しかし、今日臨床使用されている免疫抑制剤はすべて非特異的（汎）免疫抑制であり、これらはグラフトに対する拒絶反応を抑制する代わりに、さまざまな感染症や悪性腫瘍発生に対する免疫抵抗性を失わせることや、免疫抑制剤自体の副作用が問題となっている。免疫抑制中の免疫状態を把握し、適切な免疫抑制（薬剤の種類や投与量）を施すことが肝要であるが、現状では、臨床的に宿主の免疫状態や拒絶反応を予知しうるバイオアッセイやマーカー

は存在せず、免疫抑制剤の投与量は主に血中トラフ値や血液生化学検査でグラフト機能をみながら調整し、拒絶反応が疑われる場合には臓器生検を行い病理学的診断よらざるを得ない。また本研究のように免疫寛容の誘導を目指す際にも患者のドナー抗原に対する免疫反応を把握することは重要と考えられるが、未だにその手法は確立していない。

制御性T細胞を用いた肝移植症例において、末梢血液を用い、種々の免疫アッセイを行うことで免疫状態のモニタリングが可能であるか検討した。

## B. 方法

(1) 検討材料

- ① 生体肝移植後患者およびその生体ドナーから、診断あるいは治療目的で採取された末梢血 10-20 ml の提供を受ける（ドナーおよびレシピエント共に、手術直後で入院中の場合は 1-2 回/週程度、外来の場合は 2-4 回/年程度の頻度）。
- ② 上記より得られた血液中の全血および分離した白血球分画 PBMC を使用し、免疫生物学的解析を行う。採血管は EDTA およびヘパリン（Cylex 用）を使用。比重遠心液は Ficoll-Paque PLUS (GE healthcare)を用いた。培養液は RPMI-1640 (SIGMA) に 10%FBS、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、50 µM の 2-メルカプトエタノールに調整して使用した。ヒト末梢血を 840 xg、20 分、室温で比重遠心を行い、中間層を回収。HANK'S Balance Salt Solution (SIGMA)で 2 回洗浄後、培養液に再懸濁した。

(2) 評価項目

- ① Immuknow (Cylex)  
T細胞が活性化する際に細胞内で産生・蓄積されるATP量を測定することで活性能を評価する。レシピエント末梢血液(4倍希釈)100 µl に PHA (25 µl)を加え、37°C・5%CO<sub>2</sub>インキュベータ内で16時間培養を行う。CD4 Dynabeads で CD4<sup>+</sup> T細胞を抽出・溶解し、ルミノメーターでATP濃度を測定した。
- ② リンパ球混合培養試験 (MLR)  
Stimulator (ドナー および 3<sup>rd</sup> 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1x10<sup>5</sup>/wellで、これら細胞を7日間共培養した。培養終了

16時間前にチミジンを1 µCi/well 加えβ線シンチレーションカウンタでチミジンと取り込みを評価した。

③ IFN-γ ELISPOT

レシピエント末梢血リンパ球を Ficol比重分離で抽出し、IFN-γ補足抗体をコーティングしたBDTM ELISPOTプレートにヒトリンパ球を放射線照射したドナーリンパ球と共に混合培養する。24-48時間後にIFN-γスポットをビオチン標識抗マウスIFN-γ抗体にて反応させ HRP-streptavidin、3-amino-9-ethyl-carbasole substrate で視覚化し、ELISPOT リーダーにてspotを評価し定量化した。なお、本アッセイでは抗原にドナー末梢血リンパ球およびそのlysateもしくはMHC class IIの違いに応じたペプチドを使用することで、directおよびindirect pathwayの両反応を同時に検討した。Direct responseは24時間培養、Indirect responseは48時間培養後に評価した。

④ ドナー抗原特異的CD40L<sup>+</sup>リンパ球

レシピエント末梢血リンパ球を放射線照射したドナーリンパ球と混合培養し、抗 CD28 抗体にて刺激する。培養開始後 6 時間後に細胞を採取して Fixation Solution (BD Cytotfix/Cytoperm Buffer)および Permeabilization Buffer (BD Perm/Wash buffer)を用いて CD40L の細胞内染色を行う。抗体は BD Bioscience の PE-Cy<sup>TM</sup>5 Mouse Anti-Human CD4 (RPA-T4), PE Anti-Human CD154 (TRAP1)を用い、細胞内染色のプロトコールに従って染色を行い、Flow cytometry で CD40L の発現を解析・検討する。

⑤ 制御性 T 細胞の染色

抗体はBD Bioscience の PE-Cy<sup>TM</sup>5 Mouse Anti-Human CD4 (RPA-T4), PE-Cy<sup>TM</sup>5 Mouse Anti-Human CD8 (RPA-T4), FITC Mouse Anti-Human CD25 (M-A 251), FITC Mouse Anti-Human CD127 (hIL-7R-M21), FITC Mouse Anti-Human CD45RA (HI100), FITC Mouse Anti-Human CD28 (CD28.2), PE Mouse Anti-Human FoxP3 (259D/C7)を用いて FoxP3 染色推奨プロトコールに従って染色した。

⑥ Memory T cell

抗体はBD Bioscience の PE-Cy<sup>TM</sup>5 Mouse Anti-Human CD4 (RPA-T4), PE-Cy<sup>TM</sup>5 Mouse Anti-Human CD8 (RPA-T4), PE Mouse Anti-Human CD45RA (HI100), FITC Mouse Anti-Human CD62L (DREG-56)を用いて細胞表面染色を行った。

⑦ 臨床データとの統合

当該患者の臨床データとの統合解析を行い、免疫状態の把握や拒絶反応などの予測に有用な方法・因子について検討する。なお、臨床データは下記診療情報を利用する。

- ・患者基本情報：年齢、性別、ID 番号
- ・疾患情報：臨床診断名、病理診断名、血液生化学検査所見、生検病理組織学的所見 など

C. 結果

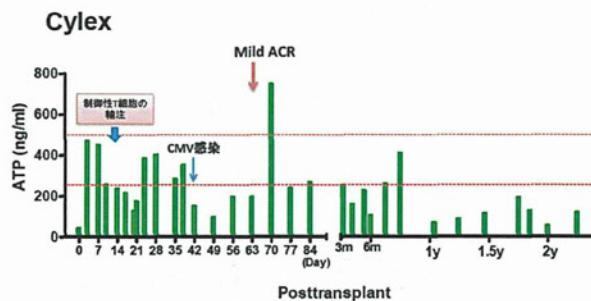
症例 1

・ Immuknow (cylex) : 図 1

術前値は43 ng/mlと低値であった。移植後早期は400台まで上昇するもその後漸減し、それに伴

いHCV-RNA値上昇が認められた。またCylexの値が100台と低下した際にはCMV罹患がみられた。CMV感染軽快後は約200-250 ng/mlで推移した。術後84日目以降Cylexは225 ng/ml以下で、12ヶ月目以降は100 ng/ml以下と低値を示し、HCV-RNAは6-7 logを推移している。

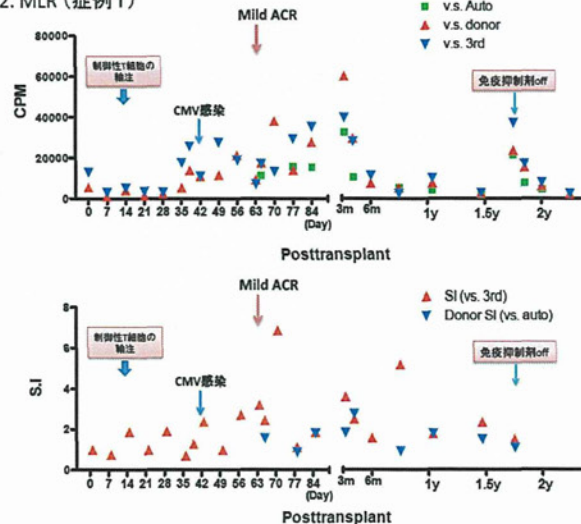
図1. Cylex (症例1)



・ MLR : 図2

移植後約5週間は術前値に比し低値であったが、6-10週目までドナー抗原に対する反応は漸増した。6週目に over immunosuppression からくるCMV感染症がみられたために免疫抑制剤は中止されており、臨床像と相関する結果であった。プログラブ再開後は反応が一過性に低下したが、術後65日目に軽度細胞性拒絶反応が生じた際にはドナー抗原に対する反応の上昇がみられ

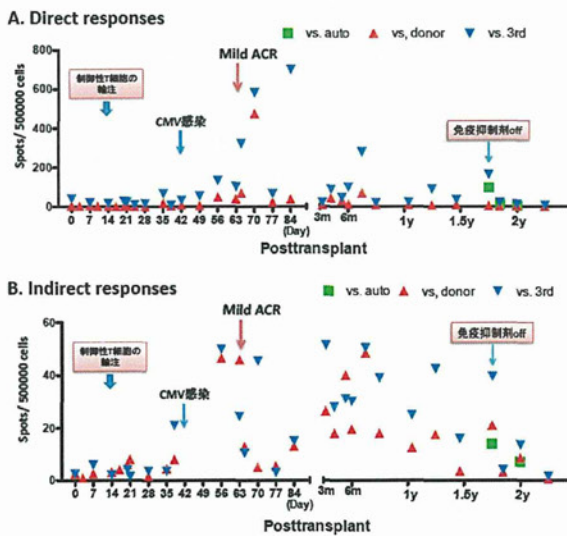
図2. MLR (症例1)



た。術後98日目にもドナー抗原に対する反応の上昇が見られたが、この時点で临床上拒絶反応は疑われなかった。以後免疫抑制剤は漸減し、約1年9ヶ月目に免疫抑制剤オフとしているが、以後、現在まで、ドナー抗原に対する反応性の上昇はみられず、临床上も拒絶反応を疑う所見はない。

・ IFN- $\gamma$  ELISPOT : 図3

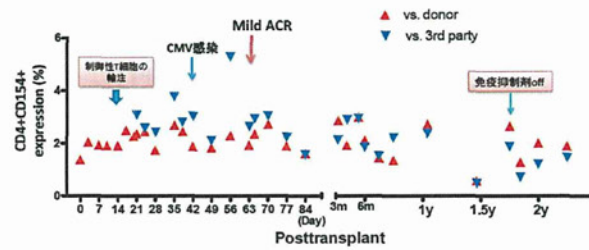
図3. IFN- $\gamma$  ELISPOT (症例1)



肝移植後は direct および indirect response とともに陰性であった。術後38日目にCMV感染が明らかになり、免疫抑制剤を減量し、56日目にはドナー抗原、3<sup>rd</sup> パーティーに対するIFN- $\gamma$ 産生上昇が見られた。65日目の肝生検でMildな急性細胞性拒絶反応と診断され、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ことが示唆された。MLRで一過性の上昇がみられた術後98日目にはドナー抗原に対する反応は観察されなかった。Indirect responseは術後3ヶ月以降やや高値であるが、3<sup>rd</sup> partyに対して有意である。

・ 末梢血中の抗原特異的CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>

図4. CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> (症例1)



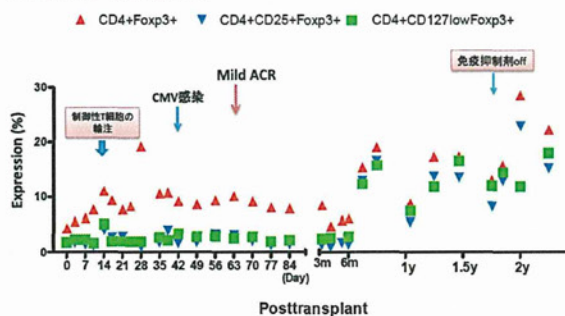
T細胞 : 図4

術前値は約1.5%であり、術後は2-3%で推移した。IFN- $\gamma$  ELISPOTと同様に術後56日目に特に3<sup>rd</sup> パーティーに対する反応が増加した。その後、拒絶反応が認められた。以後2%前後を推移し上昇は観察されない。

・ 末梢血中の制御性T細胞 : 図5

制御性T細胞のphenotypeとしてCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T細胞およびCD4<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup>Foxp3<sup>+</sup>T細胞の割合を検討した。これら細胞の術前値は約2%であったが、培養細胞輸注後は4-5%まで上昇し、その割合は次第に漸減したものの、約10週目まで術前値以上の割合が維持された。その後150日までの時点では、ほぼ前値に復している。術後6ヶ月以降は10%前後と高い割合で経過し、免疫抑制剤(タクロリムス)内服を中止した1年9ヶ月目以降はさらに高い割合を維持する傾向にある。

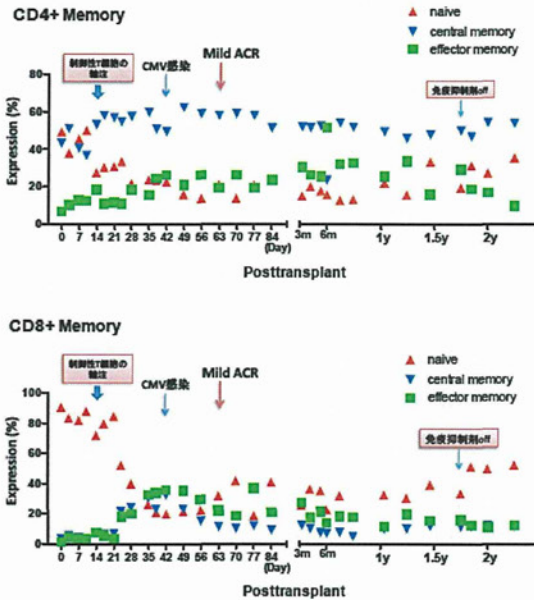
図5. 制御性T細胞 (症例1)





- ・末梢血中のNaïve/Memory T細胞：図6

図6. Naïve/Memory T cells (症例1)



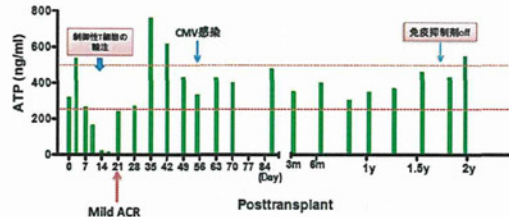
CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> Naïve T細胞は移植手術後10-21日目頃より漸減した。それとともにcentral memory CD4<sup>+</sup>T細胞、effector memory CD8<sup>+</sup>T細胞の増加がみられた。拒絶反応がみられた70日前後ではeffector memory CD4<sup>+</sup> T細胞の割合が一過性に増加した。術後2年4ヶ月現在でもcentral memory CD4<sup>+</sup> T細胞は優位な細胞集団のままであるが、effector memoryは術後6ヶ月前後で上昇傾向にあったものの、免疫抑制剤を中止した以降漸減し術前値に復しつつある。CD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup> naïve T細胞は術後1年後より徐々に上昇傾向にあり、免疫抑制剤中止後更に上昇傾向にある。

症例 2

- ・ Immuknow (cylex)：図7

術前値は318 ng/ml、術後3日目には531 ng/mlと高値を示したが、その後は急速に低値となり、術後17日目には

- 12 ng/mlまで低下した。この推移は図7. Cylex (症例2)

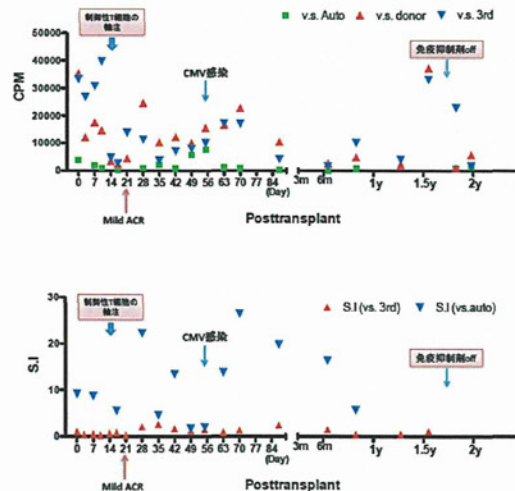


WBC数とほぼ並行していた。術後3週目にmild ACRを来したが、Immuknow値は200 ng/ml台であった。術後55日目にはCMV感染がみられ、その時は334 ng/mlと比較的低値であった。以後400 ng/ml前後を推移し、免疫抑制剤中止となってからはさらに上昇傾向にある。

- ・ MLR：図8

移植前MLRではドナーおよび3rdパーティー抗原に対する反応は約35000cpmと高値であったが、術後はこの値を超えることなく経過した。術後10日から21日目までは特に低値であった。20日目に臨床上mild rejectionが認められたが、それ以前にドナー抗原への反応の増加は認めず、むしろ、28日、35日目に上昇を認めた。自己抗原に対する反応をベースとしたSIで見ると術後4-5週目にSI値は約2まで

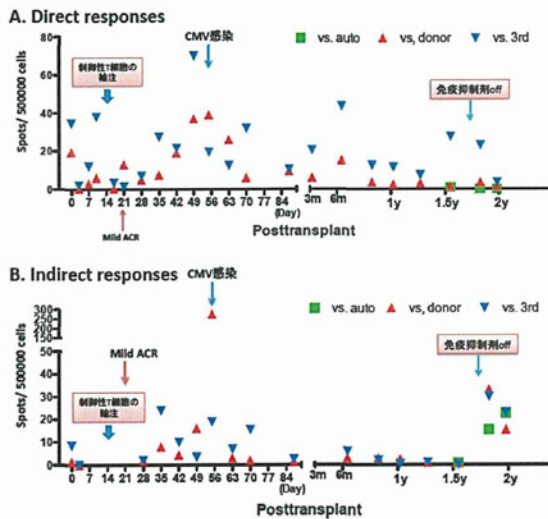
図8. MLR (症例2)



上昇したが、その後SI値はほぼ1で経過している。術後1年以降の経過はドナー抗原、3<sup>rd</sup> partyに対する反応の上昇が1年6ヶ月目にみられた以外、ドナー抗原に対する反応は低値を継続している。

・ IFN- $\gamma$  ELISPOT : 図9

図9. IFN- $\gamma$  ELISPOT (症例2)

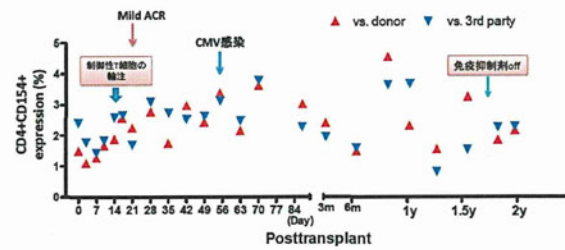


術後4週目まで direct・indirect responseともに陰性であった。Direct responseは7-8週目で軽度上昇した。この際、临床上、拒絶反応は認められず、CMV感染症がみられている。術後3ヶ月以降は3rd partyに対するdirect responseはみられるものの、ドナー抗原に対する反応は低値を継続しており、ドナー抗原特異的な免疫反応の抑制が得られていると考えられた。Indirect responseは5週目以降で上昇したが、direct responseと同様に8週目をピークに低下し、その後低値であった。免疫抑制剤中止後軽度反応の上昇がみられている。

・ 末梢血中の抗原特異的CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T細胞 : 図10

術前値は約1.5%であり、経過中のイベントによらず術後10週目まで末梢血中CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T細胞は2-3%で推移

図10. CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> (症例2)

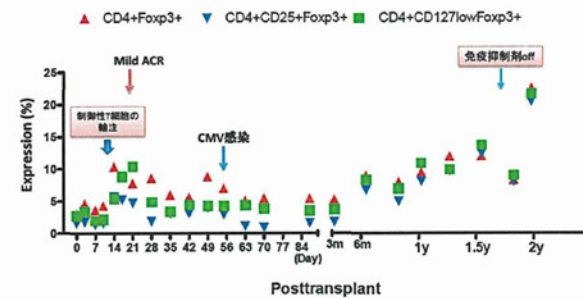


した。術後6ヶ月目までは約1%まで漸減したが、以降は再上昇し、2-3%で推移している。

・ 末梢血中の制御性T細胞 : 図11

(CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Foxp3<sup>+</sup>)はいずれも術後10日目までは術前値とほぼ同等の割合であったが、培養細胞輸注後はその割合は一過性の上昇がみられた。術後8-10週目まで術前値以上の割合が維持され、術後6ヶ月以降は更に上昇傾向がみられた。免疫抑制剤中止後はさらに割合の増加が観察されている。

図11. 制御性T細胞 (症例2)



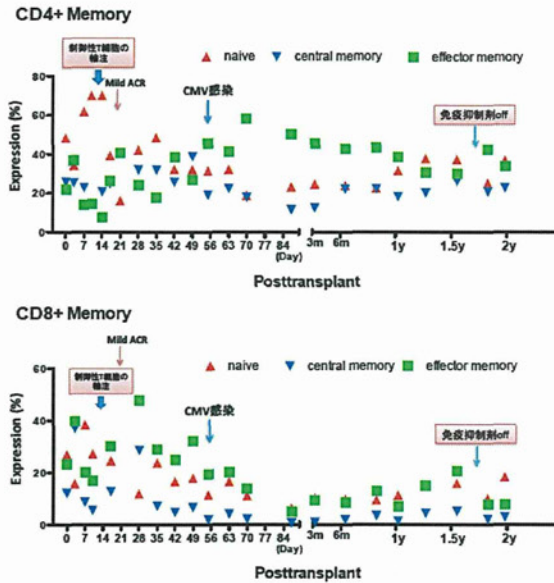
・ 末梢血中のNaïve/Memory T細胞 : 図12

CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> Naïve T細胞は移植手術後10-14日目頃より漸減し、代わりにCD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>ともにmemory T細胞の割合が漸増した。CD4<sup>+</sup> central memory T細胞の割合は術後3-7週目までは上昇した後に漸減したが、CD4<sup>+</sup> effector memory T細胞の割合は術後10週目まで増加し、以降は緩やかに減少した。CD8<sup>+</sup> centralおよびeffector memory T細胞の割合は術後4週目以降



低下し、現在これらは低値となっている。CD4、CD8 naïve T 細胞は免疫抑制剤中止後再び優位な細胞集団となりつつある。

図12. Naïve/Memory T cells (症例2)

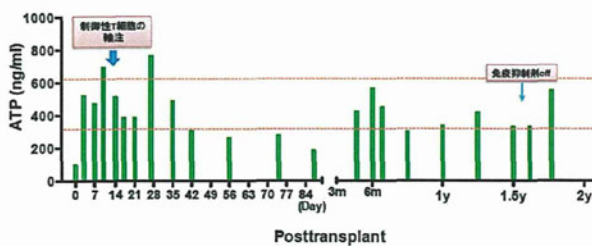


### 症例 3

・ Immuknow (cylex) : 図13

症例 1 と同様に本症例でも術前値は 98 ng/ml と低値であった。移植後 Immuknow 値は上昇し、10 日目には約 700 ng/ml となったが、WBC 低下と平行してその後は漸減し 3 週目には 300 ng/ml 台まで減少した。プログラムおよびセルセプトを中止していた術後 28 日目には一過性に Immuknow 値は 766 ng/ml まで上昇したが、した。免疫抑制剤中止後は上昇傾向にある。

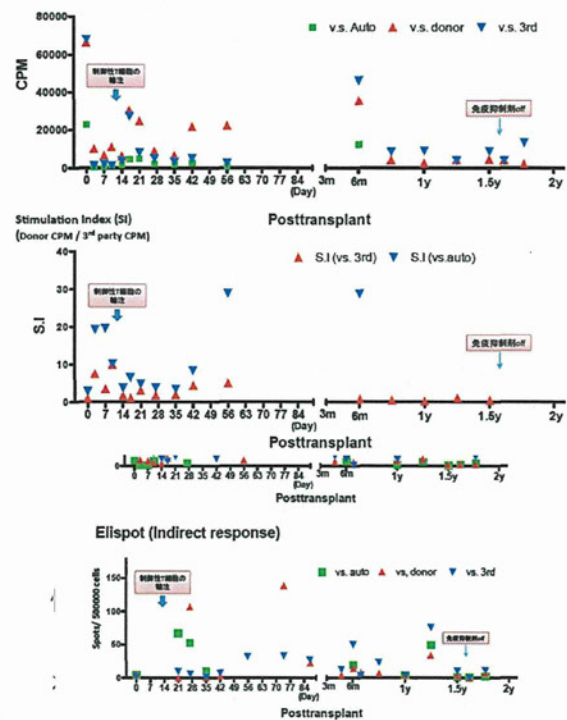
図13. Cylex (症例3)



・ MLR : 図14

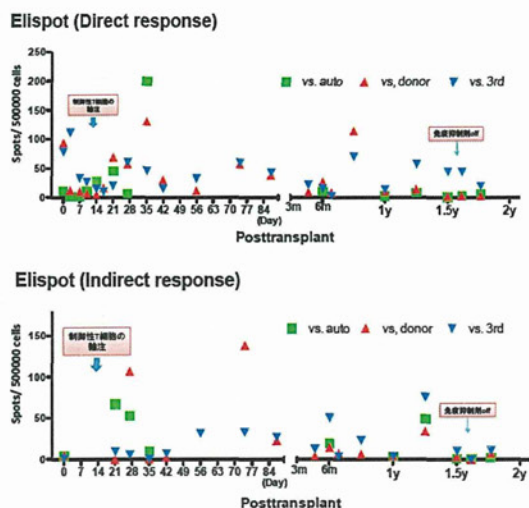
本症例も症例 2 と同様に、移植前 MLR では donor および 3rd party 抗原に対する反応は約 70000 cpm と非常に高値であったが、術後はこの値を超えることなく経過した。術後 17 日から 21 日目までは MLR は軽度上昇したが、28 日目以降は再び低値となった。donor および 3rd party 抗原に対する反応に差異を認めなかった。術後 6 ヶ月目には cylex と同様に cpm 値の上昇を認めしたが、SI 値では低値であり、グラフト生検 (protocol biopsy) の結果明らかな拒絶を認めなかったことから、MLR-SI 値がより臨床像を反映していると考えられた。なお、1 年経過時の donor 抗原に対する MLR-SI 値では低値で推移しており、その後も現在に至るまで低値のまま経過している。

図14. MLR (症例3)



原に対する反応はみられず、臨床像のモニタリングとして有用であった。術後 9 ヶ月目に IFN- $\gamma$  産生細胞数がほぼ術前値まで復したが、グラフト生検では

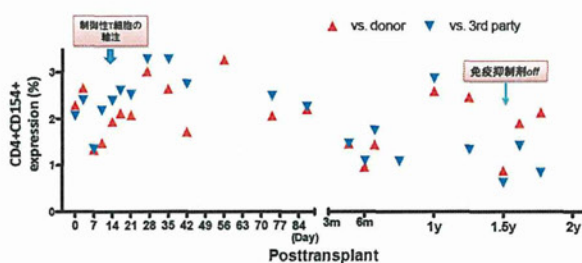
図15. IFN- $\gamma$  ELISPOT (症例3)



明らかな拒絶像を認めなかった。その後はドナー抗原が3rd Party抗原に比べて優位に抑制され、ドナー抗原特異的な抑制効果が得られている可能性が示唆された。Indirect responseは術後4週目および8週目には上昇していたが、術後12ヶ月目以降、IFN- $\gamma$ 産生細胞は末梢血中にほとんど認められていない。

- ・末梢血中の抗原特異的CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T細胞：図16

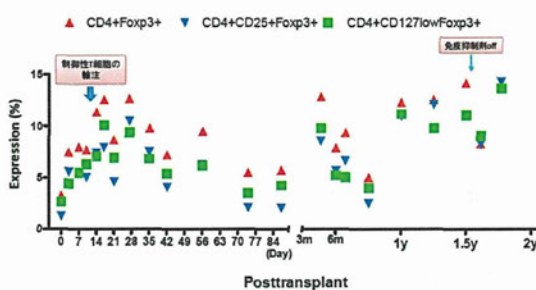
図16. CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> (症例3)



術前値は約2%であり、術後は2-3%で推移した。術後56日目を超えて末梢血中のCD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T細胞の割合は減少傾向となった。術後12ヶ月以降はドナー抗原に対する反応の方が3rd partyに対する反応より強く出ている傾向がある。

- ・末梢血中の制御性T細胞：図17

図17. 制御性T細胞 (症例3)

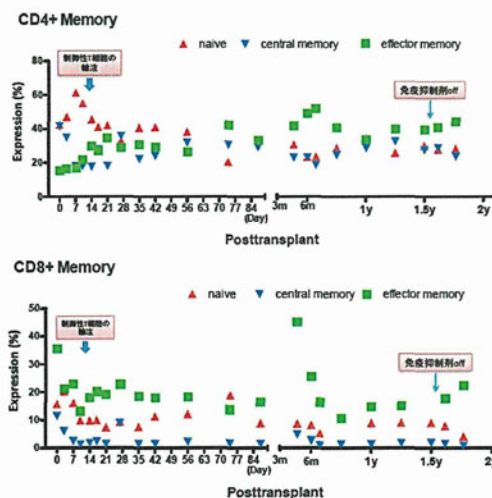


CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T細胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T細胞、CD4<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup>Foxp3<sup>+</sup> T細胞の割合は移植直後から上昇し、培養細胞輸注後は更に5-7倍まで増加した。術後8週目でも、これら細胞の割合は高く、6ヶ月、12ヶ月後の時点でも術前値の約3-5倍の割合が維持され、その後も高値を維持している。

末梢血中のNaïve/Memory T細胞：図18

CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> Naïve T細胞は移植手術後7日目頃より漸減し、代わりにCD4<sup>+</sup>ではeffector memory T細胞の割合が漸増した。CD4<sup>+</sup> central memory T細胞の割合は術後7日目までは減少したが、その後緩やかに術前値に復した。Effector memory 優位な状況は術後2年前の段階でも継続されている。(CD8は術前からeffector memory 優位であった)。

図18. Naïve/Memory T cells (症例3)

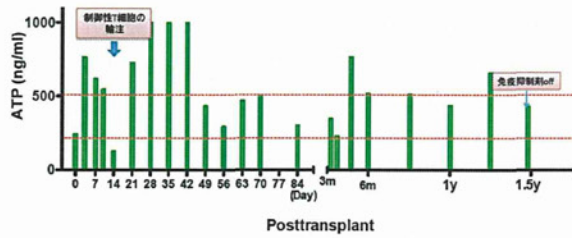




#### 症例4

・ Immuknow (cylex) : 図19

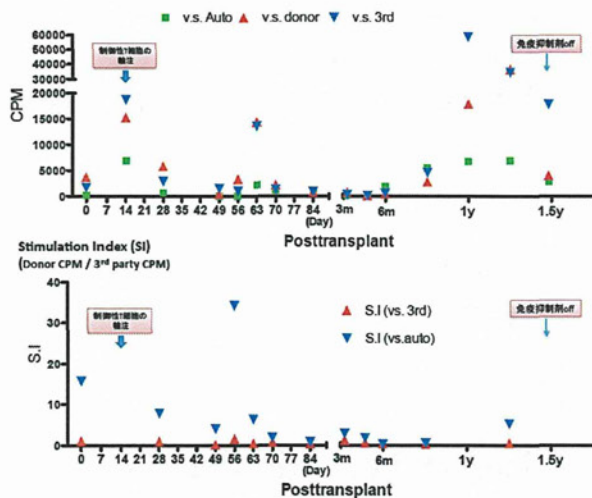
図19. Cylex (症例4)



本症例の術前値は245 ng/mlであり、移植後他症例と同様に一過性の上昇を認めた。その後WBC数低下に伴い128 ng/mlまで漸減した。術後21日からは急上昇し>700 ng/mlとなったが、臨床的に拒絶反応は認められなかった。術後7週以降は低下傾向となり、12-16週には200-350 ng/mlへ減少したが、その後は500-800 ng/mlとやや高めで推移している。

・ MLR : 図20

図20. MLR (症例4)

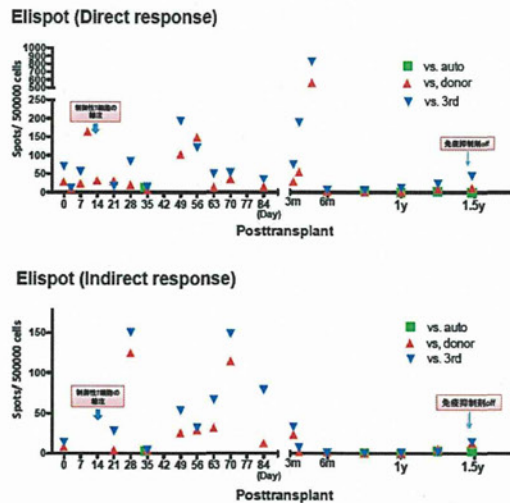


移植14日目にドナー抗原に対するMLR cpm値の上昇がみられたが、SIでは上昇とはとらえられず、拒絶反応を疑う所見も認めなかった。一方、術後56日目にドナー抗原に対するMLR SI値に一過性の上昇を認めたが、この時点でプログラフ血中濃度は低値であっ

たものの、拒絶反応を疑う臨床所見は認められなかった。術後1年目を以降ドナー抗原と特に3rd party抗原に対する反応の上昇がみられたが、拒絶反応を疑う臨床、またはプロトコール肝生検での病理学的所見は無かった。術後1年6ヶ月目にはドナー抗原に対する特異的な免疫抑制状態と考えられるMLRの値となっている。

・ IFN- $\gamma$  ELISPOT : 図21

図21. IFN- $\gamma$  ELISPOT (症例4)

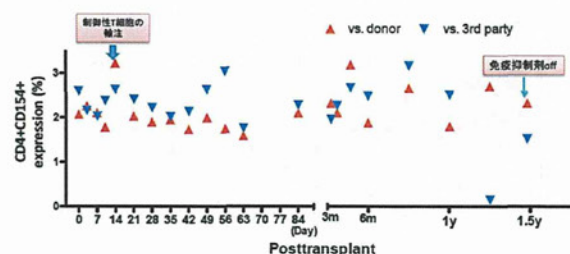


Cylexと同様に術後43日目に上昇が認められ、この際、Directとindirectの反応で同様の傾向がみられた。術後3ヶ月近傍で特に3rd party抗原に対する反応の上昇がみられた。以後はいずれも低値で推移している。

・ 末梢血中のドナー抗原特異的CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T細胞 : 図22

術前と変わらない2-3%の値を推移

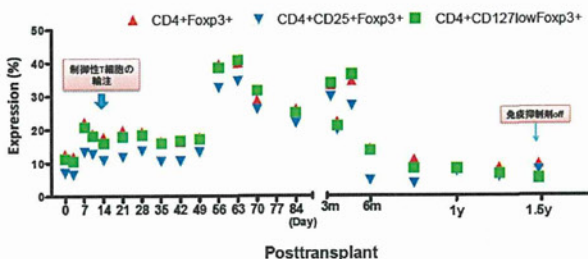
図22. CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> (症例4)



した。術後1年後は他のassayと異なり3rd party抗原よりもドナー抗原刺激後の方が高いCD154の発現がみられた。

・末梢血中の制御性T細胞：図23

図23. 制御性T細胞(症例4)

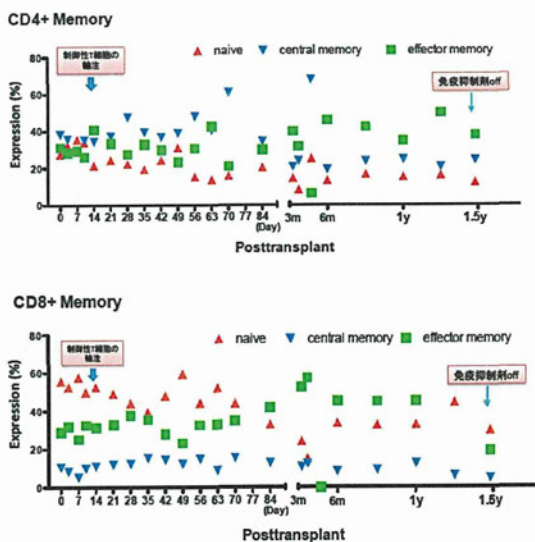


制御性T細胞の割合は移植後7日目から上昇し、以後高めで推移した。特にラパマイシンを投与し、その後プログラフに切り替える前後の56日目、63日目に高値を認めた。10ヶ月目の時点ではほぼ術前値に復し、以後はこれまでの症例と比べて低値で推移している。

・末梢血中のNaïve/Memory T細胞：図24、

CD4<sup>+</sup> およびCD8<sup>+</sup> naïve T細胞は術後14日目、84日目以降にそれぞれ緩やかに漸減した。一方CD4<sup>+</sup> central memory T細胞は術後70日目あたりから徐々に減少した。その後CD4<sup>+</sup> naïve T細胞は術前値と同様低い割合を持続したが、

図24. Naïve/Memory T cells(症例4)



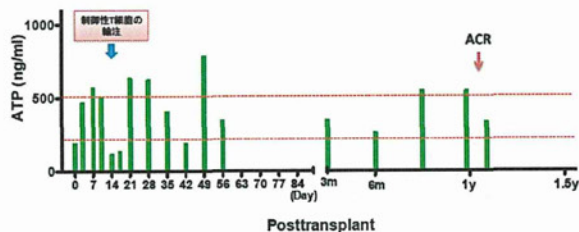
CD8<sup>+</sup> naïve T細胞は術後1年目以降より上昇傾向を認め1.5年目以降には術前値同様最も優位な細胞集団となった。一方CD4<sup>+</sup> central memory T細胞は術後70日目あたりから徐々に減少し、逆にCD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> effector memory T細胞は術後80日前後で優位なpopulationとなった。CD8<sup>+</sup> では1年後より漸減傾向にある。

### 症例5

・Immuknow (cylex)：図25

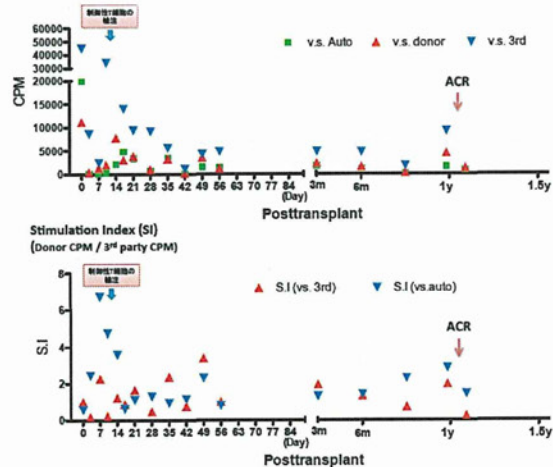
本症例の術前値は193 ng/mlとやや低値であったものの、これまでの症例と同様に一過性の上昇とWBC数に比例した減少がみられた。セルセプト中止後(21, 28日後)と49日目に上昇がみられたが、以後は200-500 ng/mlで推移している。

図25. Cylex (症例5)



・MLR：図26

図26. MLR (症例5)

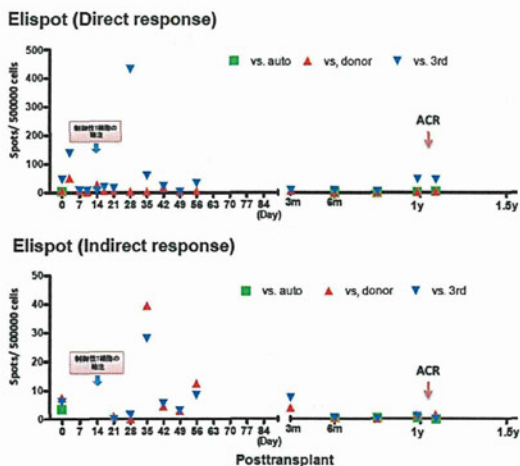


細胞治療後は一貫して低値で推移したが、術後1年付近で細胞性拒絶反応が疑われた。この際3rd party抗原に対する反応性の上昇はみられたが、ドナー抗原に対する反応の上昇は軽度であった。

・ IFN- $\gamma$  ELISPOT : 図27

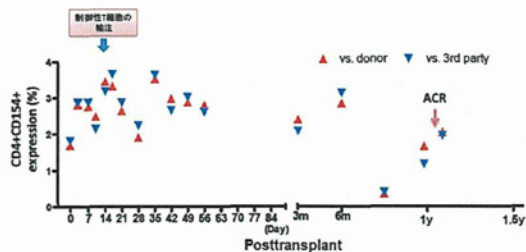
Cylexの上昇がみられた28日以降低値を持続した。ACRがみられた1年目付近でもMLRと同様軽度3rd partyに対する反応が上昇した程度であった。

図27. IFN- $\gamma$  ELISPOT (症例5)



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

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

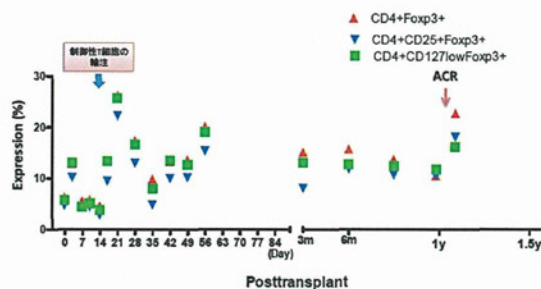


術前値と大きな変化がなく、2-3%の値を推移した。ACRを認めた術後1年目でも特に上昇は無かった。

・ 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。以後術前値と比較して高値を持続している。ACRが

みられた1年目付近で軽度上昇がみられた。

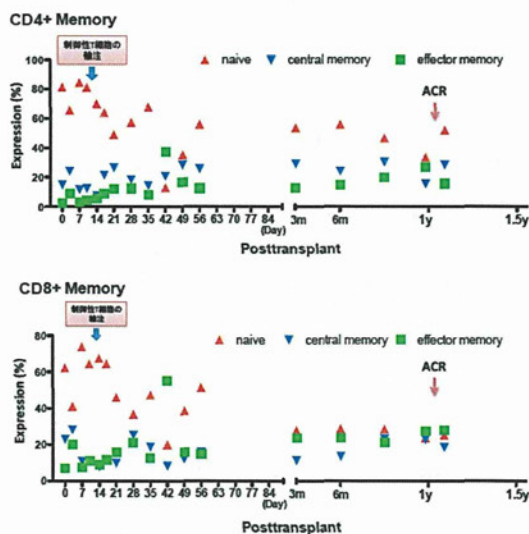
図29. 制御性T細胞 (症例5)



・ 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が継続している。CD8は1年目付近でやや減少傾向である。

図30. Naïve/Memory T cells (症例5)



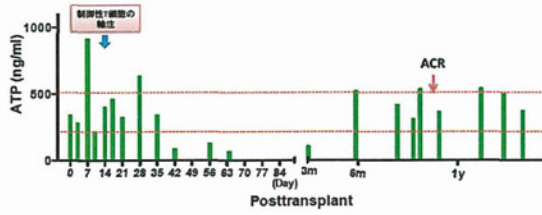
### 症例 6

・ 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以下の低値が術後6ヶ月目まで続いたが、その後は225-500 ng/mlの間を推移している。



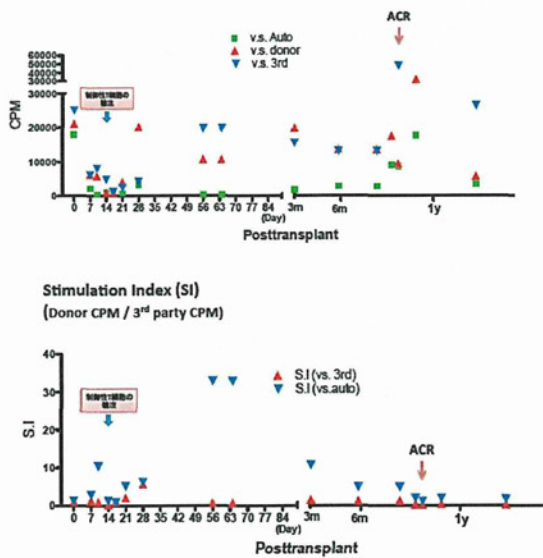
図31. Cylex (症例6)



・ 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値であったが、ドナー抗原特異的な反応では無かった。また10ヶ月目付近でみられたACRの際には3rd party抗原とdonor抗原に対する反応の上昇がみられた。最近ではドナー抗原に対する反応は低値で3rd party抗原に対する反応が上昇したドナー特異的な免疫抑制状態がMLRでは得られている。

図32. MLR (症例6)



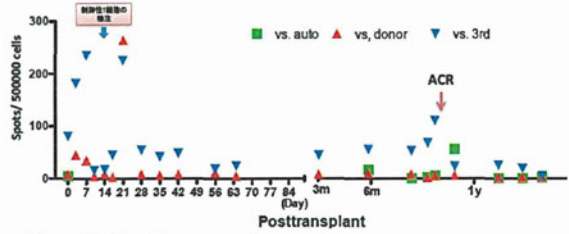
・ IFN- $\gamma$  ELISPOT : 図33

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、

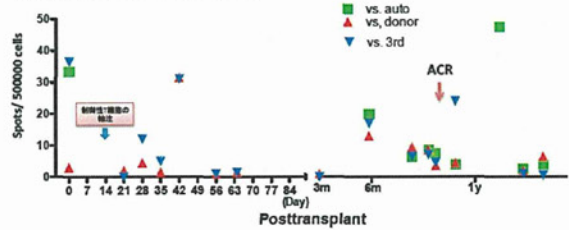
3<sup>rd</sup> party に対しては28日、42日で高値であった。術後10ヶ月目に認められたACRの際には、3rd party抗原に対するdirect responseの上昇がみられたが、ドナー抗原に対する反応は低値であった。

図33. IFN- $\gamma$  ELISPOT (症例6)

Elispot (Direct response)



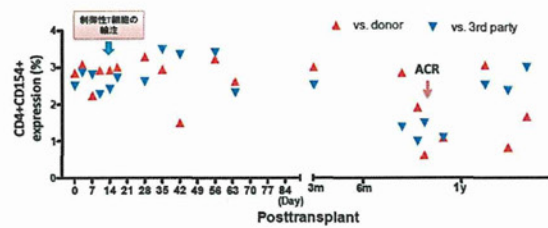
Elispot (Indirect response)



・ 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。ACRの際にも3rd party、donor抗原に対するCD154の発現上昇はみられなかった。

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

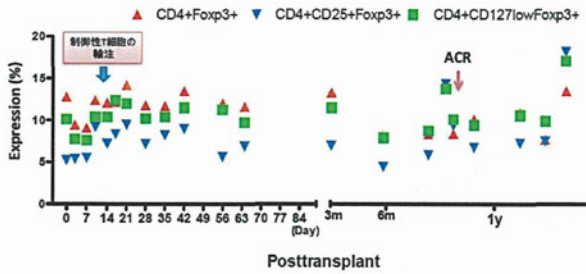


・ 末梢血中の制御性T細胞 : 図35

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。以後10%前後を推移している。ACRがみられた直前には軽度上昇が観察され

た。

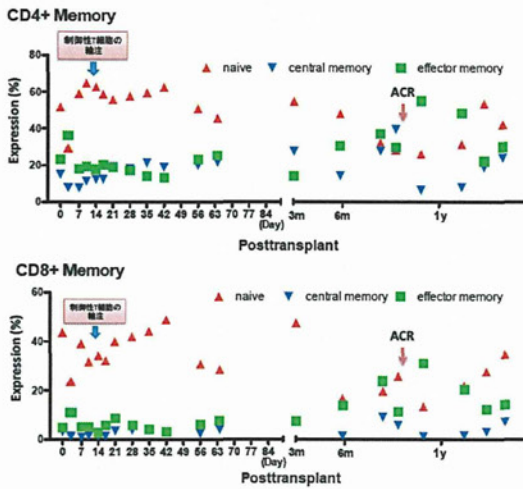
図35. 制御性T細胞(症例6)



・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

図36. Naïve/Memory T cells(症例6)



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6ヶ月目までみられなかった。ACRの前後で一過性のeffector memoryの上昇がみられたが、その後漸減した。

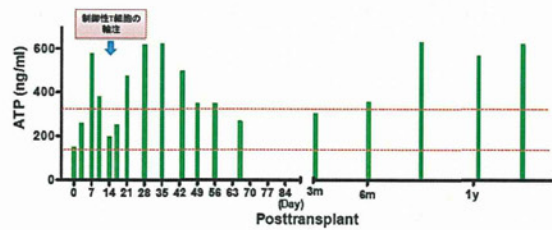
**症例7**

・ 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。その後は術後28日

目にImmuknow値再上昇を認めたが、以後は漸減傾向となった。術後6ヶ月以降からは600 ng/ml前後の高値を持続している。

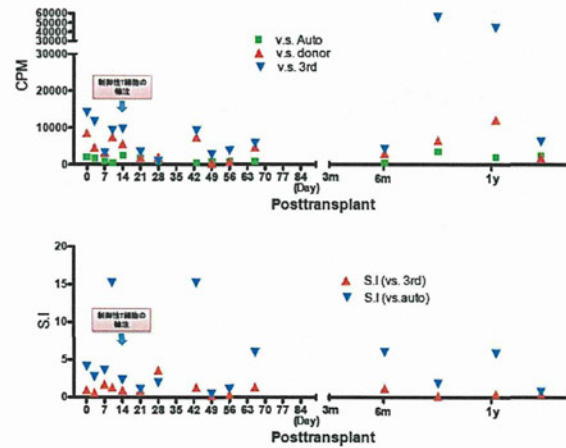
図37. Cylex(症例7)



・ 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。術後9ヶ月目以降は3<sup>rd</sup> party抗原に対する反応の増加がみられたが、ドナー抗原に対する反応は低値を持続した。

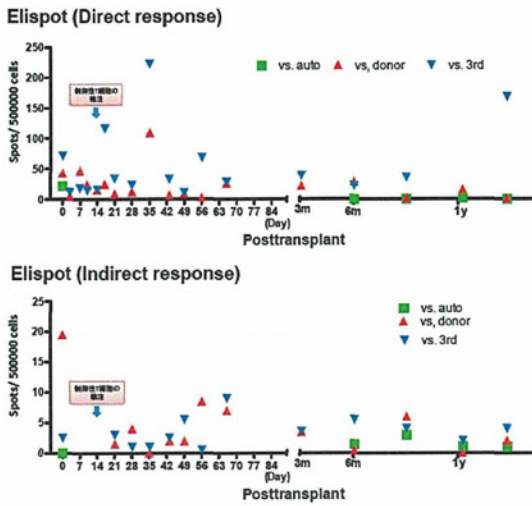
図38. MLR(症例7)



・ IFN-γ ELISPOT：図39

10日目と35日目にMLRと同様に3<sup>rd</sup> 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。術後1年3ヶ月目に3<sup>rd</sup> party 抗原に対する反応が観察され、ドナー

図39. IFN- $\gamma$  ELISPOT (症例7)

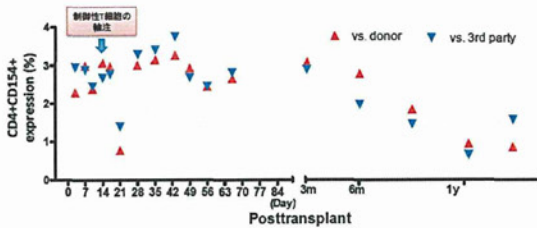


抗原特異的な抑制状態にあることが示唆された。

・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。

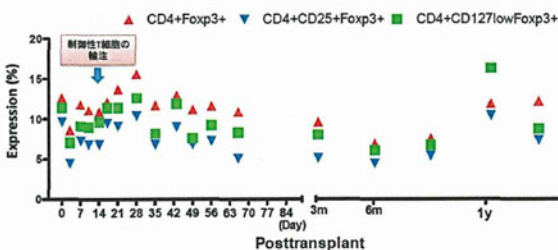
図40. CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> (症例7)



・末梢血中の制御性T細胞：図41

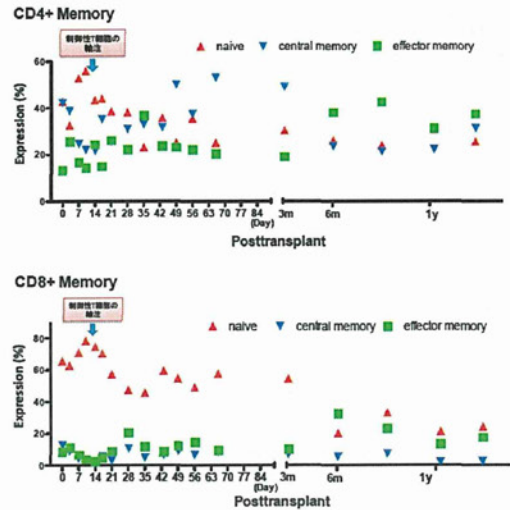
術前の値も比較的高い割合を示した。術後早期に一旦減少がみられたが、術後28日目あたりまで微増した。以後現在に至るまで、術前と同程度かやや低値の割合で推移している。

図41. 制御性T細胞 (症例7)



・末梢血中のNaïve/Memory T細胞：図42

図42. Naïve/Memory T cells (症例7)

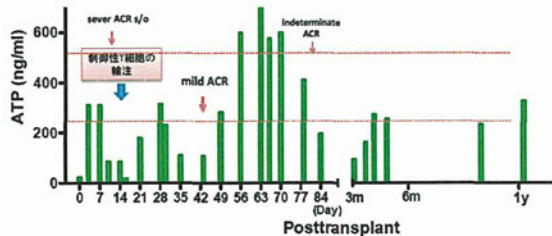


術後7日目付近で一旦上昇がみられたNaïve CD4<sup>+</sup> T細胞も35日目まで漸減し、以後低値であった。対してcentral memory CD4<sup>+</sup> T細胞の割合の増加がみられ、49日目以降優位な細胞集団となり、3ヶ月の時点まで続いた。術後6ヶ月以降からはeffector memory の集団が優位となり持続している。一方naïve CD8<sup>+</sup> T細胞は術後一過性の上昇を見た後、6ヶ月以降減少傾向を示した。

### 症例 8

・ Immuknow (cylex)：図43

図43. Cylex (症例8)



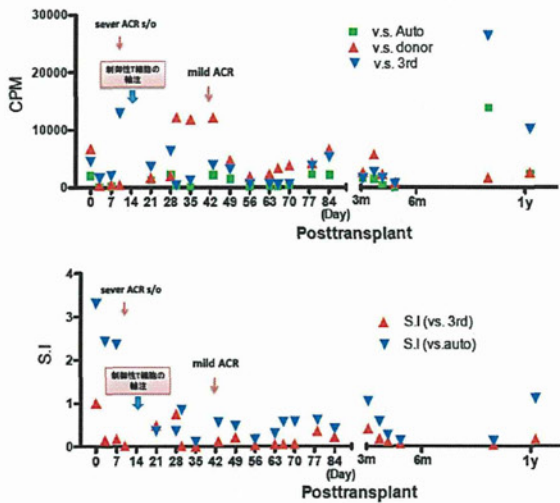
本症例の術前値は25 ng/mlと非常に低値であった。術後一過性に術前値と比べ上昇がみられたものの、14日目を



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と高値が見られた。3ヶ月目頃からは比較的 low 値が続いたが、1年目には225 ng/ml以上と軽度上昇がみられている。

・ MLR : 図44

図44. MLR (症例8)



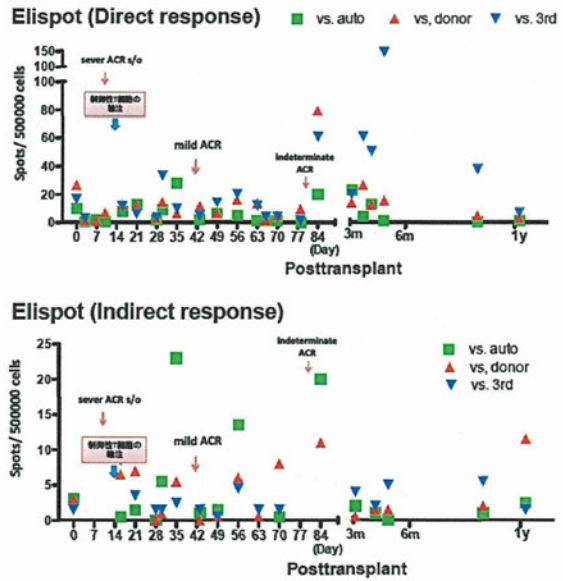
移植後7日目まで値の漸減が見られていたが、9日に急激な3rd partyに対する反応の上昇がみられ、同時期に臨床的にはsever ACRが疑われた。術後30日目付近にドナー抗原に対する上昇が観察され、肝生検でもmild ACRと確認された。6ヶ月以降は3rd partyに対し、ドナー抗原に対する反応の低下みられている。

・ IFN- $\gamma$  ELISPOT : 図45

ドナー抗原に対するIFN- $\gamma$ 産生は、術後84日目以外は低値であった。上昇がみられたこの時点には臨床的にも肝生検にてindeterminate ACRと診断された。その後は3rd partyに対する反応の上昇に対しドナー抗原は低値を持続した。Indirect responseは、術後77日目のindeterminate ACRと診断される直前のIFN- $\gamma$  ELISPOTにてドナー抗原特異的

な上昇として観察された。

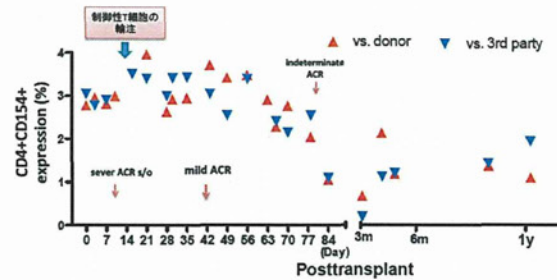
図45. IFN- $\gamma$  ELISPOT (症例8)



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

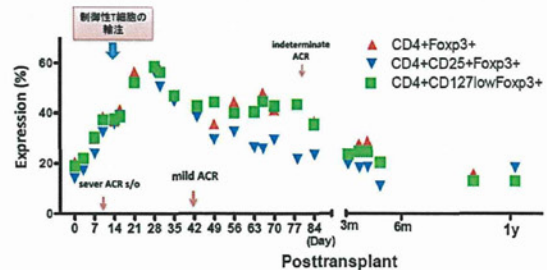
ドナー抗原に対する反応、3<sup>rd</sup> partyに対する反応いずれも約3%を推移した。拒絶反応の前後での上昇は観察されなかった。

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



・ 末梢血中の制御性T細胞 : 図47

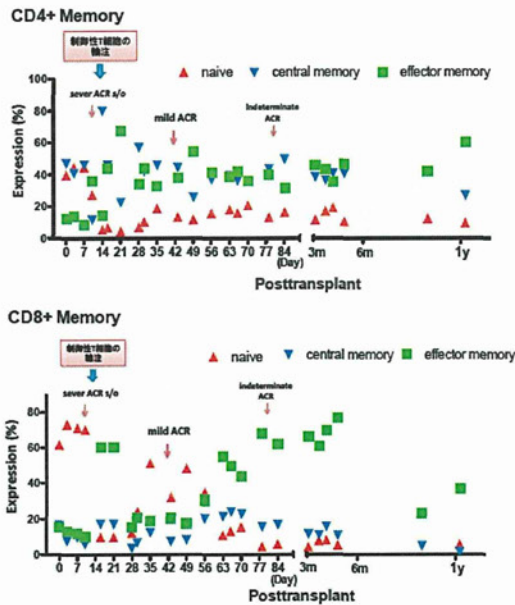
図47. 制御性T細胞 (症例8)



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が、以後は漸減傾向となり、術後1年目の現在において術前値と同レベルまで復した。

・末梢血中のNaïve/Memory T細胞：図48

図48. Naïve/Memory T cells (症例8)



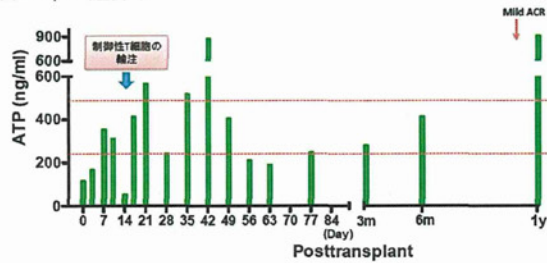
CD4<sup>+</sup> central memoryは術前から比較的高い値であった。Severe rejectionがみられた術後13日付近ではCD4<sup>+</sup> Central memory T細胞の上昇がみられた。23日目にはCD4<sup>+</sup> effector memory T細胞の一過性の増加もみられた。その後Naïve CD4<sup>+</sup>T細胞に比し、effector、central memory CD4<sup>+</sup> T細胞の割合が優位な状態で推移している。CD8<sup>+</sup> T細胞は当初naïve T細胞が主な集団であったが、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。

### 症例9

・Immuknow (cylex)：図49

本症例の術前値は117 ng/mlと比較的低値であった。術後10日目頃まで軽度上昇したが、WBCの低下とともに14日目をピークに減少がみられた。術後42日目と1年目に600 ng/ml以上の上昇が観察され、1年目の値は既にsteroid pulseの治療後であるが、臨床的にACRがみられた。

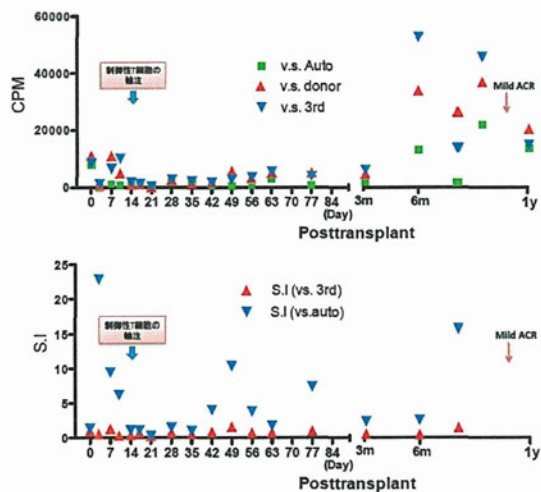
図49. Cylex (症例9)



・MLR：図50

術後低値を持続したが、6ヶ月目以降3rd party抗原、ドナー抗原に対する反応の上昇がみられていた。その後臨床的にはmild rejectionが観察された。

図50. MLR (症例9)

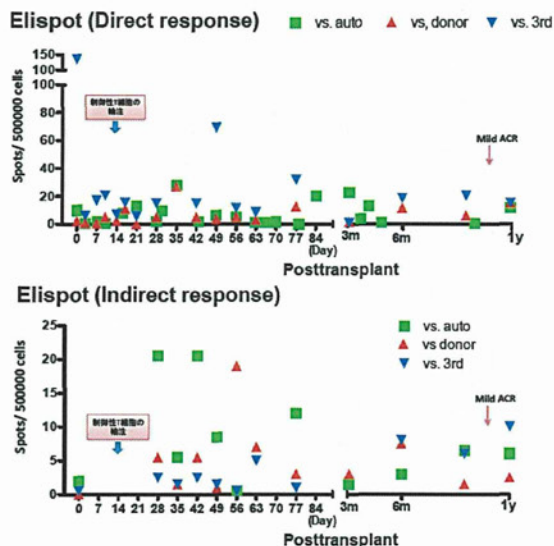


・IFN- $\gamma$  ELISPOT：図51

ドナー抗原に対するIFN- $\gamma$ 産生は35日目に軽度上昇がみられただけで低値を持続した。Indirect responseは56日目

に上昇がみられたが、臨床的には拒絶反応は観察されなかった。

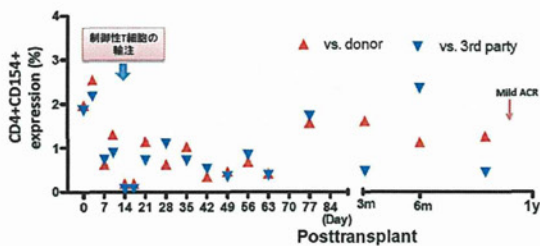
図51. IFN- $\gamma$  ELISPOT (症例9)



・末梢血中のドナー抗原特異的 CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T細胞：図52

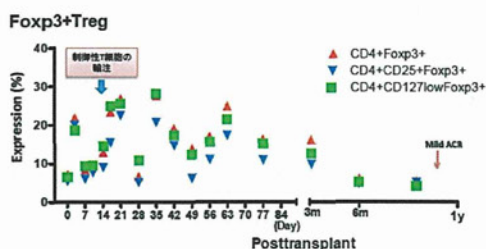
術後よりドナー抗原に対するCD154の発現は低値を持続した。mild rejectionがみられた直近のCD154の発現はドナー抗原に対してより上昇がみられた。

図52. CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> (症例9)



・末梢血中の制御性T細胞：図53

図53. 制御性T細胞 (症例9)

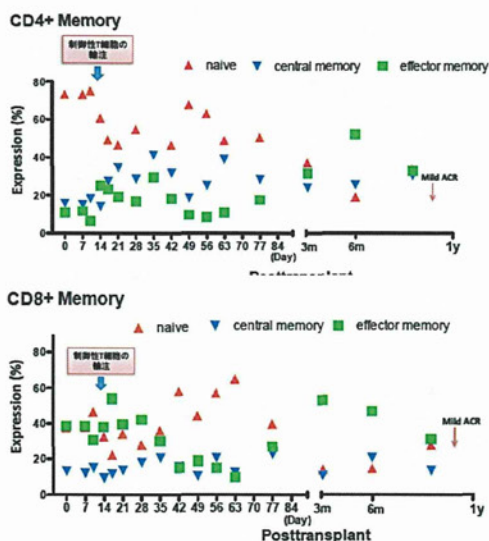


制御性T細胞輸注後一過性の上昇がみられたが、術後28日目には一時減少がみられた。その後再度上昇したが、6ヶ月までに徐々に漸減し、mild ACRの前までには術前と同レベルまで低下した。

・末梢血中のNaïve/Memory T細胞：図54

術前はCD4<sup>+</sup> naïve T細胞が有意な細胞集団であったが、3ヶ月目まで徐々に低下した。それに対しCD4<sup>+</sup> effector memory T細胞の割合は徐々に増加し、術後6ヶ月目には最も優位な細胞集団となった。CD8<sup>+</sup> naïve T細胞は術後63日目をpeakに上昇がみられたが、その後漸減し、術後1年目直前には術前値と同レベルに復した。CD8<sup>+</sup> Effector memory T細胞はnaïveと逆の経過を辿ったが、最終的に術前と同レベルになった。

図54. Naïve/Memory T cells (症例9)



### 症例10

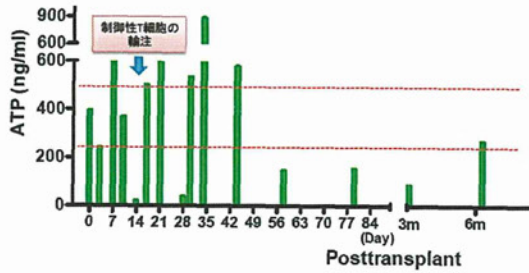
・Immuknow (cylex)：図55

他の症例と同様にWBCの低下とともに14日目をピークに減少がみられた。その後42日目まで500 ng/ml 以上の高



値が持続したが、56日目以降は100前後と低値持続が観察された。

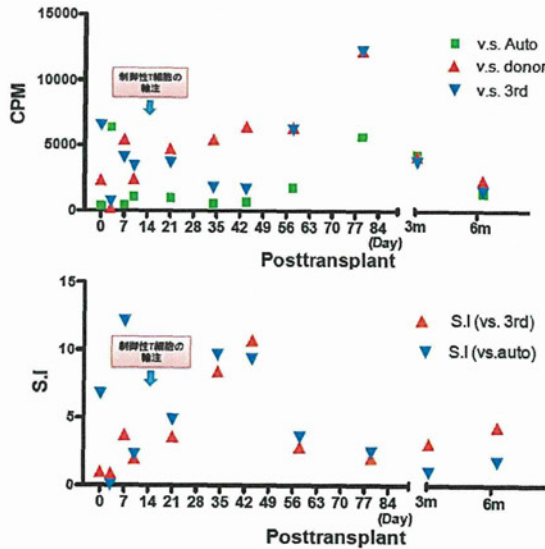
図55. Cylex (症例10)



・ MLR : 図56

術後より77日目までドナー抗原に対する反応の上昇がみられていたが、臨床拒絶反応を疑う所見は無かった。6ヶ月経過した時点でドナー抗原に対する反応の低下が観察されている。

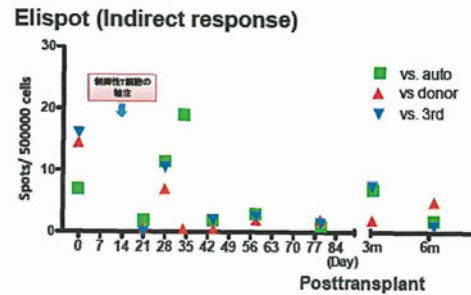
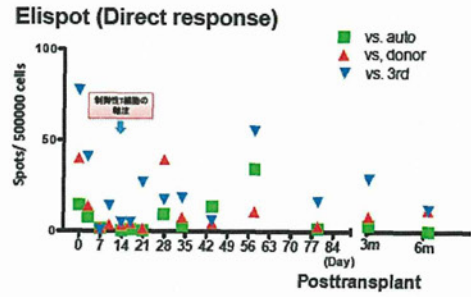
図56. MLR (症例10)



・ IFN- $\gamma$  ELISPOT : 図57

MLRで観察されたドナー抗原に対するIFN- $\gamma$ 産生28日目にみられた以外は観察されず、経過中低値を持続した。3<sup>rd</sup> partyに対する反応はみられていることからドナー抗原特異的な免疫抑制状態と考えられた。

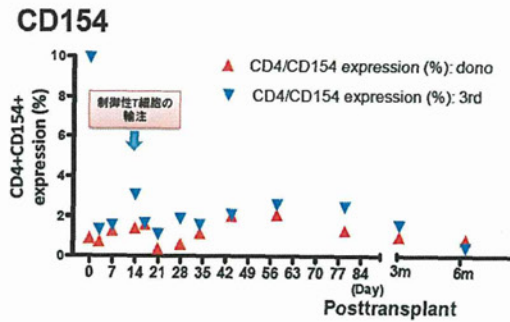
図57. IFN- $\gamma$  ELISPOT (症例10)



・ 末梢血中のドナー抗原特異的CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>T細胞 : 図58

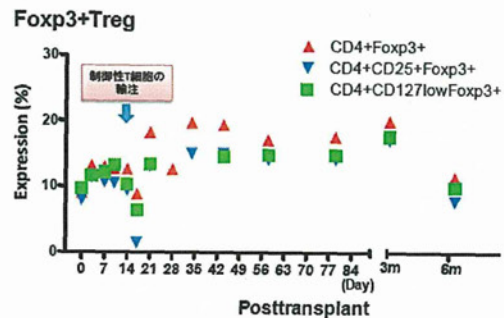
術前にみられた3rd partyに対する反応の上昇も術後は一貫して低値を持続している。

図58. CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>(症例10)



・ 末梢血中の制御性T細胞 : 図59

図59. 制御性T細胞(症例10)

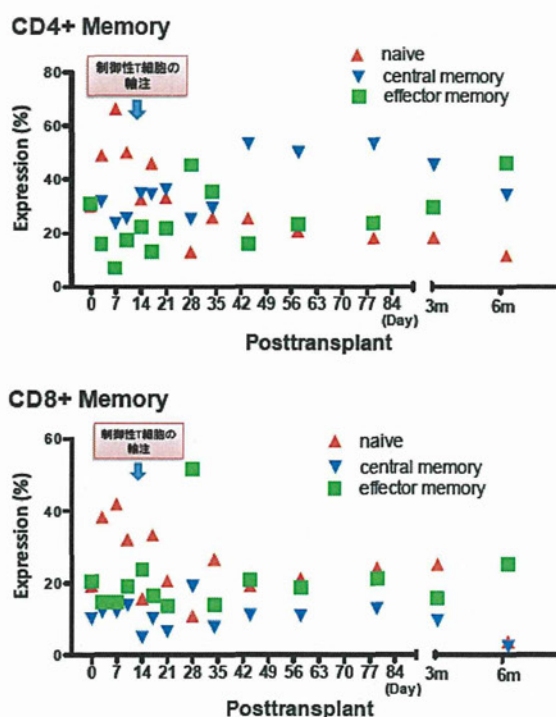


術後21日より3ヶ月目まで比較的高値を持続した。術後6ヶ月目には術前と同レベルに復した。

・末梢血中のNaive/Memory T細胞：図60

術後一過性にCD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> naive T細胞の上昇がみられたが、術後28日目よりCD4<sup>+</sup> naive T細胞は低値を持続した。術後42日目よりcentral memory CD4<sup>+</sup> T細胞の上昇が持続した。

図60. Naive/Memory T cells (症例10)



#### 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10症例において、Cylex、MLR、IFN- $\gamma$  ELISPOT、FACSによる抗原特異的CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T細胞、制御性T細胞、ナイーブ、記憶T細胞の観察による免疫モニタリングを行った。本研究ではドナーが生体であることから、ドナーリンパ球を必要に応じて採取し、ドナー

抗原に対する反応を観察し得た。今回、経過中に急性細胞性拒絶反応（ACR）を来した症例は10例中6例であった。このうち4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た。また、ACR直前には非特異的免疫反応であるCylexの上昇も6例中4例に観察し得た。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。前述したように拒絶反応に際して治療前のCylex高値が観察になる症例がみられたが(症例5、6、8、9)、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単独では拒絶反応をモニターするのは難しい可能性が示唆された。CMV感染に関しては症例1のようにCylex値が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性が示唆された。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(症例1)。Cylexによる免疫モニタリング



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indirect responseによるIFN- $\gamma$ 産生上昇が見られ、65日目にMild ACRと診断された。一方direct responseはACRと診断された後に観察されたことからindirect responseを観察するIFN- $\gamma$  ELISPOT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。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、拒絶反応と相関しており、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。一方、症例5においては、術後約1年経過時に細胞性拒絶反応が認められたが、その際のドナー抗原に対する反応性の上昇は軽度であった。この症例は兄弟間の生体肝移植でmajor HLAは適合していた。急性拒絶反応時のMLRにおいては3<sup>rd</sup> party抗原に対する反応の軽度上昇がみられていることから、HLA-mismatchが結果に影響している可能性がある。さらに症例6 (図32)にみられたように、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で拒絶反応が観察されたが、反応が3<sup>rd</sup> party抗原に対してのみ反応の場合には臨床的に拒絶反応を疑う所見は認められず、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。また、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。今後3<sup>rd</sup> パーティーの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策が必要であると考えられた。

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だけでなく、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。移植後1.5年目、1年目以降はほとんどの症例で、MLRまたはELISPOTアッセイ上、ドナー抗原特異的な免疫抑制(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)が観察された。しかしながら、症例5では臨床経過をこれらアッセイによるドナー抗原特異的な抑制が必ずしも反映しておらず、総合的な判断が必要と考えられた。

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く観察された。

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、レシピエント末梢血中のCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T細胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>