

1.) 免疫寛容獲得患者の長期予後と免疫学的機序の解明：

- a. 免疫寛容獲得患者の臨床的経過観察：先行研究で10例中7例に免疫寛容が得られた。免疫抑制剤中止以後4例が3年以上、3例が2年以上経過するも、全員正常なグラフと機能と病理組織学的所見を維持している。しかし長期的には拒絶反応や、腎不全やがんなどの合併症の発生の可能性は無視できないために、より長い綿密な臨床的観察が必要である。したがって、定期的に血液生化学検査、生検肝組織検査と画像検査を行った。
- b. 免疫寛容獲得患者の免疫機序の解明：免疫寛容状態は、細胞学的にもまた液性抗体学的にもドナー抗原に対して免疫反応を生じないと考えられ、実験的にはドナーと同じ strain の組織・臓器移植を行っても拒絶を受けないことで証明されてきた。しかし、ヒトではこのような操作は不可能で、レシピエントの免疫担当細胞のドナーと第三者抗原に対する *in vitro* での反応性で検証せざるを得ず、また同方法による免疫寛容のバイオマーカーの探索がこれまで試みられてきた。したがって、MLR や ELISPOT 法を用いてドナー抗原特異性を検討するとともに、制御性 T 細胞の血中動態や同細胞を除去もしくは添加した場合の免疫反応を検討した。

a. 免疫寛容獲得患者の臨床的観察

i. 目的:

制御性 T 細胞を用いた細胞治療により免疫寛容を獲得した生体肝移植 7 症例 (表 1 . 症例 1 , 2 , 3 , 4 , 7 , 8 , 10) の臨床経過を追跡して、肝機能や生検肝組織の異常、感染症や癌の合併の有無を確認し、本治療法の長期的効果と安全性を検討する。

Patients

Case	Age (y.o.)	Gender	Disease	Child	MELD	Date of LDLT	Donor	HLA M M	Graft Volume/SV
#1	39	M	LC (HCV)	C	16	2010.11.30	Brother	0	30.7%
#2	63	M	LC (alcoholic)	C	14	2011.2.15	Son	3	28.6%
#3	56	M	LC (NASH)	C	18	2011.3.15	Son	4	34.4%
#4	59	M	LC (HBV), HCC	C	15	2011.6.28	Son-in-law	7	32.6%
#5	52	M	PBC	C	15	2011.9.20	Brother	0	27.7%
#6	55	F	PSC	C	18	2011.11.2	Daughter	4	30.7%
#7	59	F	LC (NASH), HCC	B	12	2011.11.22	Daughter	4	29.8%
#8	56	M	LC (alcoholic)	C	21	2012.2.7	Son	3	42.7%
#9	58	F	PBC	C	25	2012.4.10	Son	5	39.0%
#10	55	M	LC (NASH), HCC	B	12	2012.7.24	Son	4	32.7%

BSM 2013, Paris, France

ii. 方法：

免疫抑制剤中止後、6か月毎に血液像（RBC, WBC, Ht, Hg, 電解質など）、肝機能（AST, ALT, γ -GTP など）を検査
1年ごとに生検肝組織（HE, Masson-trichrome 染色）や ECHO/CT 検査を行った。

iii. 結果：

1) 臨床経過：血液、肝機能検査で何ら異常を認めず、感染症や癌の合併は現在まで生じていない。免疫抑制剤を中止できなかった3症例は通常より少ない投与量で正常な肝機能を維持している。

症例2は small-for-size グラフトのために門脈 下大静脈シャントを必要とし、術後早期にシャント閉鎖を行ったが不完全閉鎖であった。その後胆管炎や脱水などの折に軽い肝機能異常を時々しめしていたが、抗生剤や輸液で

直ちに正常化していた。しかし定期健診で、門脈血流の下大静脈流入が次第に顕著となり、術後2年目に interventional にシャントを完全閉鎖することができた。

臨床経過

Case	CP ¹ (mg/kg)	Cells Infused (x 10 ⁶)/body Total (Tregs ²)	Time after LDLT ³	IS at present ³	LFTs ³ : AST/ALT/γGTP (IU/L)	Time free of IS ³	De novo DSA (MFI)	Remarks
#1	50	6.1 (0.3)	5y 1m	off	20/11/14	3y 5m	Negative	CMV Hepatitis (POD 35) HCV-RNA negative
#2	50	25.4 (4.7)	4y 11m	off	32/41/24	3y 4m	Class III (+) DQ7 (3040)	Graft MHV thrombus (POD 608)
#3	30	7.9 (0.9)	4y 10m	off	20/17/48	3y 4m	Class III (+) DQ7 (10117)	FK neurotoxicity (POD 14) FK→CsA conversion
#4	40	24.5 (4.4)	4y 7m	off	2/3/10	3y 1m	Negative	Intra-graft bleeding after LBx
#5	40	6.3 (0.4)	4y 4m	FK 5 mg/d	20/11/15	-	Negative	Mild ACR @ IS weaning (POD 394) Late onset ACR (POD 1091)
#6	40	11.8 (2.7)	4y 2m	MMF 500 mg/d + PSL 7.5 mg/d	21/15/29	-	Class I (+) A1 (4497)	Brachial plexus neuritis (POD 206) Mild ACR @ IS weaning (POD 311)
#7	40	25.9 (3.2)	4y 1m	off	30/28/24	2y 7m	Negative	-
#8	40	7.0 (3.0)	3y 11m	off	25/20/32	2y 5m	Negative	-
#9	40	5.9 (0.3)	3y 9m	FK 4 mg/d	17/8/28	-	Class II (+) DQ5 (1058)	Mild ACR @ IS weaning (POD 365)
#10	40	12.0 (2.9)	3y 6m	off	16/10/16	2y	Class III (+) DQ4 (10302)	-

¹CP: Cyclophosphamide, ²Tregs: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cell, ³Data collected on Jan. 7, 2016

2) 病理所見：生検肝組織の病理学的検査では、4例に門脈領域に軽度な非活動性のリンパ球浸潤を認め、症例1と症例2に同領域に軽い fibrosis があるほかは、比較的安定した組織像を維持していた。C4D染色は、全例、全経過を通じて陰性だった。

iv. 考察:

免疫寛容 (Operational Tolerance) の誘導は長年様々な方法を用いて試みられてきた。理論的には胸腺での hematological mixed chimerism による Central tolerance と、末梢での制御性細胞による Peripheral tolerance とに分かれる。また、患者が自分で免疫抑制剤をやめたり、医学的な理由や種々の条件を満足した選択された患者で抑制剤投与量を漸減して中止する spontaneous tolerance と、simultaneous bone marrow transplantation, 抗体を用いた induction therapy や、tolerance facilitating cell や、本研究のように制御性免疫細胞を投与して得られる intentional, or induced, tolerance がある。しかし、その成果は Northwestern University や Massachusetts General Hospital で試行されている生体腎移植での少数の成功例を除いて 極めて散発的で限られている。特に制御性 T 細胞を用いた移植後の免疫寛容を目的とした細胞治療は、骨髄移植で Graft versus Host Disease の予防や軽減のために用いられているのみで、本研究での成果は、臓器移植において世界で初めての成功である。しかも、腎移植で試みられた方法は、術前に強固な補助療法を必要とするために生体臓器移植にしか適応できないのに対して、本法は術前治療を必要とせず脳死臓器移植にも用いる点でも、おおいなる advantage を有するものである。

b. 免疫寛容獲得患者の免疫機序の解明

1) 制御性 T 細胞の機能分析

i. 目的:

免疫寛容獲得患者末梢血細胞を用いて、ドナーと第三者抗原に対する免疫学的反応性を検討し、ドナー抗原特異的免疫抑制を明らかにするとともに、ドナー特異的抗体や、制御性 T 細胞の量的、質的变化を検討して寛容状態のバイオマーカーとしての可能性を明らかにする。

ii. 方法:

SI (stimulation index) ; responder に患者リンパ球を、また、stimulator に放射線照射したレシピエント (R) ドナー (D) 及び第三者リンパ球 (T P) を用いて、mixed lymphocyte reaction (MLR)を行う。R/R=1 とし、

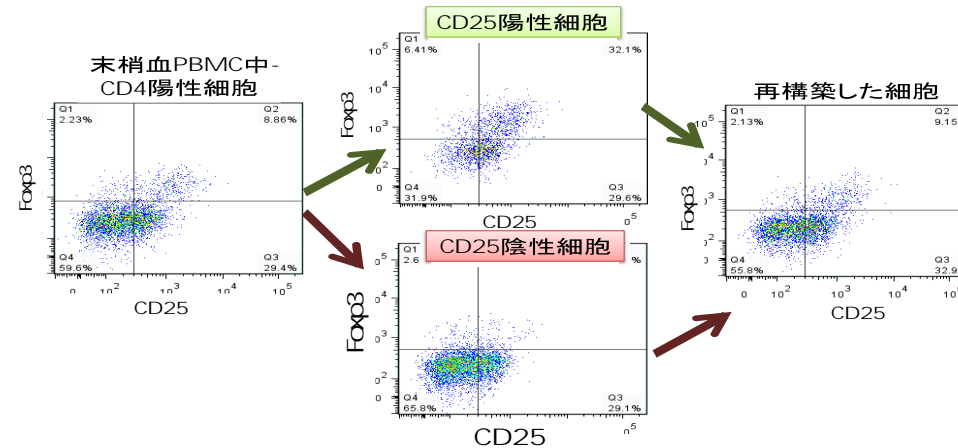
D/R が R/R と有意差がなければ non-responsive, R/R =, or <, >D/R >>>TP/R の場合は hyporesponsive とする。

DSA (donor specific antibody) : Luminex 法を用いて、患者血清中の DSA を検討する。

制御し T 細胞の動的変化：移植後から制御性 T 細胞の集団である CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T 細胞の割合を経時的に（移植前、移植後 14、28 日目、3、6、9 ヶ月後、1 年後、1 年 3、6、9 ヶ月後、2 年後、2 年 3、6、9 ヶ月後、3 年後、3 年 6 ヶ月後、4 年後）観察した。染色抗体は BD Bioscience の PE -cy7 mouse anti-human CD3, V500 mouse anti-human CD4, APC-H7 mouse anti-human CD8, BV421 mouse anti-human CD25, Alexa Fluor 647 mouse anti-human CD127, Alexa Fluor 488 mouse anti-human Foxp3, 7-AAD を用いて FoxP3 染色推奨プロトコールに従って染色した。BD FACS Canto -II™ フローサイトメーターにて解析を施行した。細胞治療後、免疫寛容が誘導できた 7 例と免疫抑制剤を中止できなかった 3 例を比較検討した。

CD25 陽性細胞の除去 (Fig. 1); 細胞治療により免疫抑制剤中止が可能であった肝移植後レシピエント 7 例において免疫寛容が誘導された機序について末梢血リンパ球を用いて解析した。末梢血リンパ球を免疫寛容誘導症例から採取し、CD4 陽性 T 細胞中の CD25 陽性細胞（つまり CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞）を除去した時のリンパ球混合培養でのドナー抗原に対する細胞増殖の程度を ³H thymidine uptake にて観察した（Fig. 1）。細胞除去には抗 CD25 抗体 beads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) を用い、auto MACS (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) による depletion program にて細胞を分離した。Auto MACS を使用することでの細胞の viability の低下の可能性を否定するため、細胞分離施行後再構築したリンパ球集団でのアロ抗原に反応するリンパ球増殖の程度も観察した(Fig.1)。

Fig. 1 末梢血PBMC中-CD4陽性細胞中のCD25陽性制御性T細胞の除去



iii. 結果：

SI：術前のドナーに対する反応性は、検討した6例中5例でレシピエントより有意に高値であった。最も最近のSIは、肝機能に異常がないにも関わらず、症例4と症例8にドナー抗原に対する反応性がみとめられた。

DSA：術前のDSAは全例陰性であった。症例2と3に術後1年よりDSAが検出され、2年目には各々減少と経度増加を認めたが、肝機能の上でもまた組織学的にも異常はなかった。s

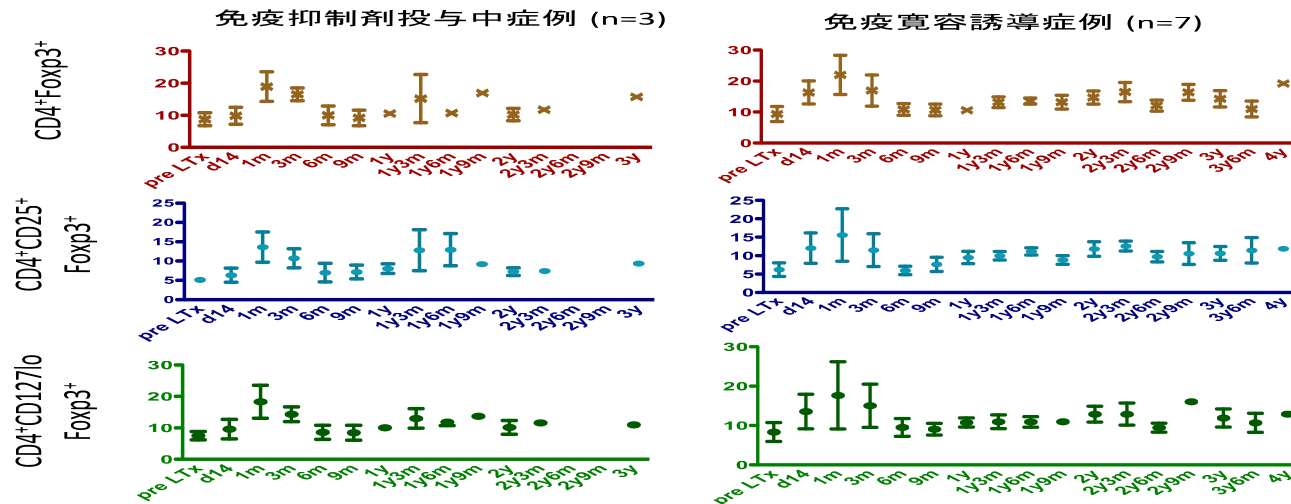
Case	DSA(MFI)			SI	
	LDLT Pre	Drug-free		(Anti-donor/anti-third)	
		1 Year	2 Year	Before	Latest
1	negative	negative	Negative	ND/ND	1.6/5.7*
2	negative	C-II:DQ7(10117)	C-II:DQ7(3040)	9.2*/8.6*	1.7/5.1*
3	negative	C-II:DQ7(5655)	C-II:DQ7(7042)	2.9/2.9	1.7/78.5*
4	negative	negative	Negative	15.7*/7.3*	1.5*/2.3*
7	negative	negative	negative	4.0*/6.9*	3.3/12.4*

8	negative	negative	negative	3.5*/2.6*	1.2*/11.1*
10	negative	negative	ND	5.0*/16.8*	1.7/2.2*

POD: postoperative days, AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase,
 r-GTP: gamma-glutamyl transpeptidase, LDLT: living donor liver transplantation, DSA: donor specific antibody,
 MFI: a mean fluorescence intensity, SI: stimulation index

細胞治療による制御性 T 細胞の末梢血における割合の変化 :

Fig. 2 細胞治療後CD4+FOXP3+ 制御性T細胞の変化

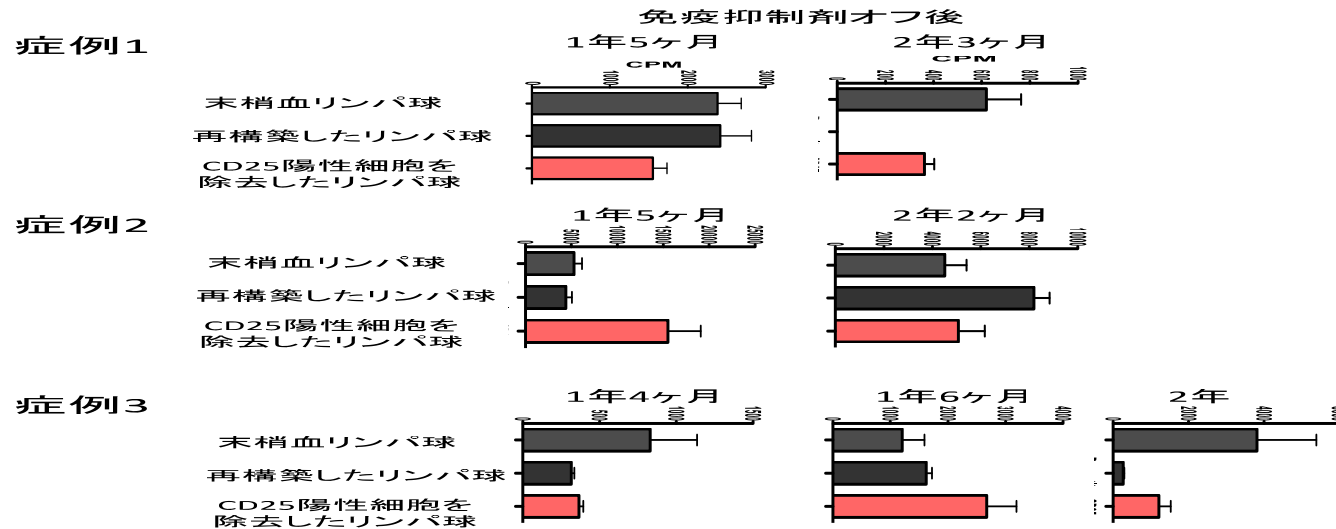


細胞治療後免疫寛容が誘導された症例 (n=7)と細胞治療後免疫寛容が誘導されなかった免疫抑制剤内服中の症例 (n=3) の CD4+CD25+Foxp3+ T 細胞の末梢血中 PBMC における割合を移植前、移植後、細胞治療後の経過を観察した。移植前の CD4+CD25+Foxp3+の割合は 5-10%であり、いずれの症例においても特に差は無かった。移植後 2 週間の時点でドナー抗原特異的抑制作用を持つ培養細胞を輸注したところ、移植後 1 ヶ月を peak に制御性 T 細胞の増加が観察された。これは免疫

寛容誘導症例、免疫抑制剤中止できなかった症例のいずれにも観察され、両群間に有意差は無かった。移植 6-9 ヶ月頃から制御性 T 細胞の割合は減少傾向を認め、その後やや漸増または不変の割合で経過した。いずれの変化も免疫抑制剤投与中症例(n=3)、免疫寛容誘導症例(n=7)の間に有意な差を認めなかった。

末梢血リンパ球のドナー抗原特異的抑制効果の維持における CD4+CD25+Foxp3+制御性 T 細胞の役割

Fig. 3 CD25陽性制御性T細胞の除去



細胞治療により免疫寛容が誘導された肝移植レシピエント7症例はいずれも3rd party 抗原に対する反応に比べて著明なドナー抗原に対する細胞増殖反応が抑制されており、ドナー抗原特異的な抑制効果が観察された。このドナー抗原特異的抑制効果を末梢血リンパ球の CD4+CD25+Foxp3+制御性 T 細胞を除去した場合に抑制効果がキャンセルされるかどうかについて検討した。Fig.2 は末梢血リンパ球（灰色の棒グラフ）、細胞集団毎に分離した後再構築したリンパ球（再構築したリンパ球; 黒色の棒グラフ）、CD25 陽性細胞を除去したリンパ球（赤色の棒グラフ）それぞれのドナー抗原に対する細胞増殖反応を ³H thymidine uptake で示した。症例 1 においては CD25 陽性細胞を除去した細胞集団の方がむしろドナー抗原に対する細胞増殖は減少し、CD25 陽性細胞の免疫抑制効果は無いように思われた。症例 2 においては免疫抑制剤中止後 1

年 5 ヶ月の時点のリンパ球での検討では、CD25 陽性細胞除去によりドナー抗原に対する反応が観察されたため、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞がドナーに対する反応抑制に関与している可能性が示唆されたが、免疫抑制剤中止後 2 年 2 ヶ月の時点では同様の結果が得られなかった。症例 3 においては免疫抑制剤中止 1 年 4 ヶ月、2 年の時点では制御性 T 細胞除去によるドナー抗原抑制効果のキャンセルは得られなかったが、1 年 6 ヶ月の時点では抑制効果のキャンセルが軽度観察された。症例 4、7、8 でも CD25 陽性細胞の抑制効果のキャンセルは観察されなかった。症例 10 においては末梢血リンパ球の反応に比べると CD25 陽性細胞の除去によりドナー抗原に対するリンパ球増殖反応が増加したようにも見えるが、再構築した細胞集団と比べるとその増殖の程度は軽微であった。

iv. 考察:

多施設共同試験で計画しているドナー抗原特異的な制御性 T 細胞を含めた細胞治療の機序解明に関し、以前の non-human primates での研究成果 (Bashuda H, et al., JCI 2005) で示された CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 細胞が関与している可能性について検討した。細胞治療により一過性に CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 細胞の割合の増加が観察されたが、その後末梢血中制御性 T 細胞の割合は減少し、10%程度に落ち着いた。この変化は細胞治療後免疫寛容が誘導された群と誘導されなかった群との間に有意な違いは観察されなかった。最近 Bluestone らは 1 型糖尿病の患者を対象に制御性 T 細胞を用いた細胞治療の臨床試験の結果について報告 (Bluestone JA, et al., Sci Trans Med 2015) し、その中で輸注した制御性 T 細胞が約 1 年後にも生存維持されていることを報告した。本研究においては細胞のトラッキングを行っていないため、輸注した細胞の行き先、細胞の維持、細胞の寿命については不明である。マウスなどによる基礎研究において制御性 T 細胞などの輸注後、輸注細胞は炎症組織に集積する可能性が示唆されており、移植後の炎症部位がグラフトサイトであることを考えると、輸注細胞はグラフトに生着するのかもしれない。そう考えると、細胞治療後一過性に末梢血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 細胞の割合の増加した後、高値を持続せずに減少が観察された今回の研究結果も理解できる。今後グラフト組織の観察を含め、更なる検討が必要であると考えている。

また末梢血リンパ球がドナー抗原特異的な細胞増殖抑制を生じている機序として、末梢血リンパ球における制御性 T 細胞が抑制している可能性について、CD25 陽性細胞の除去効果を検討した。MACS beads を用いて細胞集団を分離し、混合リンパ球反応を観察した結果、症例 2,3 の一部の測定において CD25 陽性細胞による細胞増殖反応抑制効果を示唆する結果が得られた。しか

し、同一症例内でも時期により普遍的な結果は得られず、また他の症例においては CD25 陽性細胞の抑制効果は観察されなかった。このことから末梢血リンパ球における CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 細胞が必ずしもドナー抗原特異的な抑制に関与する結果は導かれなかったと考えられる。制御性 T 細胞の関与も個々の症例、背景疾患の違い、時期により異なる可能性もあるが、前述したように末梢血を用いた検討では本研究で誘導された免疫寛容の機序を明らかにすることは難多施設共同臨床試験においてその有効性を検討する制御性 T 細胞を用いた細胞治療を北海道大学病院で 10 例に先行して施行しており、7 例に免疫寛容が誘導された。また 3 例は免疫抑制剤の減量は可能であったが、免疫抑制剤の中止はできなかった。これら 10 例について細胞治療後の免疫状態を観察した。観察項目として、ドナー抗原特異的な免疫抑制の有無について末梢血リンパ球を用いてドナー抗原に対する IFN- γ 産生細胞を IFN γ -Elispot アッセイにて観察した。結果、免疫抑制剤を中止し得た 7 症例において 3rd party 抗原に比較してドナー抗原に対する反応が低下するドナー抗原特異的な反応抑制が観察された。特に症例 1,2,3,4,7 においては 72 時間培養後においてもドナー抗原に対する反応は自己抗原と同程度の反応であり、ドナー抗原に対する抑制効果の持続が得られた。一方症例 8,10 においては、72 時間の培養によりドナー抗原の反応が軽度観察されたが、移植肝グラフトの組織において拒絶反応は観察されず、この長期培養後のドナー抗原に対する反応の解釈については不明である。近年、制御性 T 細胞も IFN- γ を産生することが知られており、必ずしもドナー抗原に対して反応性に産生される IFN- γ が悪影響を及ぼすとは限らないのかもしれない。

免疫抑制剤内服中の症例 5,9 については 3rd party に対する反応も少なく、アロ抗原全体に対する反応が抑制されていた。免疫抑制剤内服により、汎免疫抑制状態であると考えられた。これら免疫抑制剤内服中症例と比較することで、免疫寛容症例ではドナー抗原特異的な抑制が得られていることが明らかとなり、感染、悪性腫瘍に対する免疫力も保持されている状態と推察することができる。

制御性 T 細胞の細胞集団である CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 細胞は免疫寛容が誘導された症例のうち症例 1-3 において移植前より増加傾向がみられたものの、免疫寛容が誘導されなかった症例 5,6,9 においても増加傾向であった。末梢血リンパ球中の CD4 陽性制御性 T 細胞の割合の増減については、免疫寛容誘導との関連や、細胞治療に使用した細胞のトラッキングを含め要検討課題である。

一方 naive/memory T 細胞の集団については、症例 6, 10 と症例 9 の CD8 を除いて naive から memory へのシフトが観察された。通常の免疫抑制剤のプロトコールにおいても naive から memory へのシフトが観察されるかについては明らかでなく、本治療で

の細胞治療により特徴的な変化であるのか、通常の免疫抑制剤プロトコールでも同様の検討が必要であると考えている。