

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461964

研究課題名(和文) 調節性細胞輸注による腎移植免疫寛容誘導

研究課題名(英文) Immunotolerance induction in kidney transplantation by infusion of regulatory cells

## 研究代表者

小山 一郎 (Koyama, Ichiro)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：10266760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腎移植患者に対して自己の調節性T細胞を体外で誘導、増幅し、それを体内にもどすことで移植片拒絶反応を回避するという免疫寛容導入法の開発を試みた。16例に対して施行し免疫抑制剤の減量を図った。通常の内服量の半量程度まで減量可能であり、検査上はドナー特異的な低反応性は獲得できたが、臨床的には7例で急性拒絶反応の発症を認めた。効果をより確実なものとするためには、プロトコルの改良が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study was performed in kidney transplant (KTx) recipients from living donors. Lymphocytes were harvested 2 days before KTx. Recipient's PBMCs were co-cultured with irradiated (30Gy) donor cells in the presence of anti CD80/CD86 mAb for 2 weeks. As preconditioning, splenectomy or rituximab + cyclophosphamide (CP) were employed. Twelve days after KTx, the cultured cells were intravenously infused, after that immunosuppressants were gradually tapered. In the cultured cells, CD4, CD25, and FoxP3 expressions were upregulated. The recipients showed excellent graft survival rate and function. Final doses of CsA and MMF were almost half of conventional KTx, however high incidence of BPAR: 3 subclinical, 4 anti-rejection treatments, obliged us to discontinue further reducing immunosuppressants. These results showed that adoptive transfer of anergic cells could be one of promising approaches as tolerance-inducing strategy.

研究分野：移植外科学

キーワード：腎臓移植 免疫寛容

### 1. 研究開始当初の背景

臓器移植の分野では、免疫抑制法の進歩により急性拒絶反応の頻度は劇的に低下し、短期的には良好な成績を示すようになった。しかし長期的な視点からは、慢性拒絶は未だ克服し得ず、薬剤の長期内服による副作用や合併症、経済的負担といった問題点が存在している。

その解決へ向け国内外多くの施設から免疫抑制剤を使用せずに拒絶反応を回避できる治療法、すなわち免疫寛容導入療法についての研究、報告がなされている。免疫寛容成立の機序としては、大きく分けて、免疫担当細胞(Tリンパ球)の分化途上に関わる、すなわち中枢性の寛容と、すでに分化済みの細胞に関与する末梢性の寛容との二つがある。

実際の臨床の腎臓移植で有効性が報告されているのは米国の3施設で行なわれている治療法で、主として中枢性の機序によるものである。骨髓細胞などのドナー細胞を実質臓器とともにレシピエントに移植することでレシピエントに混合キメラ状態を成立させる方法である。この方法は成功率が高い反面、患者に対する前処置の負担が大きく合併症の発症も無視できないものである。そこで患者に対する負担の少ない末梢性の免疫寛容導入療法の確立が現在望まれている。

### 2. 研究の目的

第一に、移植患者(レシピエント)本人由来の免疫調整細胞を体外で誘導し、その免疫抑制メカニズムを解明すること。第二に、より有効な免疫抑制能力を有する細胞を誘導する培養法を見出すこと。第三に、培養で得られた細胞を臓器移植後の体内にもどし免疫寛容の成立を目指すこと。第四に、ドナー特異的な免疫抑制能力を正確に評価する方法を見出すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

生体腎移植を行なう患者ペアの双方から予めリンパ球を採取し2週間共培養する。これによりドナー特異的な免疫抑制性を有する調節性T細胞が誘導される。この処置と並行して通常の手技に基づいて生体腎移植術を施行し同時に免疫抑制療法を開始する。術後12日目、すなわち培養開始から2週間目に培養細胞をレシピエントに点滴静注する。その後はレシピエントの移植腎機能、免疫抑制状態を確認しながら、免疫抑制剤の減量を行なっていく。移植後1年で抑制剤をすべて中止できることが最終目標である。以下に具体的な手順を示す。

- (1) 腎移植手術の2日前に、患者ペア(ドナー、レシピエント)の末梢血からリンフォサイタフェレーシスによりリンパ球を分離採取する。ドナーからはこの1週間後にも追加刺激の目的でリンパ球を採取する。
- (2) ドナーリンパ球には30Gyの放射線を照射し不活性化する。Tリンパ球を活性化する際の副刺激経路(CD80/CD86-CD28)を遮断する抗体(抗CD80/CD86抗体)を加え、院

内の cell processing center で2週間共培養する。

- (3) 通常の手技に基づき生体腎移植を実施する。ドナーからは腹腔鏡下手術により腎臓を摘出する。レシピエントに対しては、腹腔鏡で脾臓を摘出したのち、開腹で右腸骨窩に腎臓を移植する。
- (4) リンパ球採取後より免疫抑制療法を開始する。免疫抑制剤はシクロスポリン、ミコフェノール酸モフェティル、ステロイドの3剤を用いる。通常腎移植で用いる抗CD25抗体は調節性Tリンパ球の機能を阻害する可能性があるため使用しない。10例目以降は脾摘を行わず、リツキシマブを投与した。培養細胞輸注の前処置として、シクロフォスファミドを移植後5日目より2-3日間血管内投与する。
- (5) 培養開始から2週間後にレシピエントのTリンパ球はアナジーと呼ばれる免疫不応性の状態となるが、これは同時に調節性Tリンパ球(Treg: regulatory T cell)として免疫反応調整機能を有する。Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)を行なうことでドナー特異的な免疫抑制作用であることを確認する。
- (6) 輸注前に培養液中のエンドトキシンをチェック、細菌、真菌感染のないことを確認する。繰り返し洗浄を行うことで死細胞を除去する。ドナーリンパ球は放射線照射によりリンパ球としての機能を失うため、レシピエントの体内に入ってもGVHDを発症する危険性はないものと考えられる。
- (7) 前処置により、レシピエントの末梢血中の白血球数は移植後12日目には通常は500/mm<sup>3</sup>以下に減少する。ニューモシスチスやサイトメガロウイルスの感染予防のため、バクタ、バルガンシクロピルの内服を行なう。過度に白血球が減少、あるいは減少が遷延した場合にはG-CSFの皮下注で対応する。
- (8) 培養で得られた調節性T細胞をレシピエントに点滴静注する。輸注時のアレルギー反応予防のため、直前にステロイド、抗ヒスタミン薬を投与しておく。
- (9) 移植腎機能を定期的に調べる。MLR、リンパ球フェノタイプも定期的にチェックし、腎ドナーに対する免疫応答性を確認する。免疫抑制剤は慎重に漸減する。血清クレアチニン値が上昇したり尿量が急激に低下したりした場合には、拒絶反応を疑い移植腎生検を実施する。おおよそ1年を目途として免疫抑制剤の減量、中止を試みる。

対象: 2009年から計16名の患者に対して本プロトコールによる腎移植を施行した。患者本人の自発意思に基づき、十分なinformed consentを繰り返し実施したうえで理解、諒承が得られた者を対象とした。本治療は東京女子医科大学倫理委員会、日本移植学会倫理委員会の了承を得ている。

除外条件: ABO血液型不適合移植、PRA

(panel reactive antibody) 陽性、重篤な合併症を有する者は除外する。

一般的検査項目：血算、生化学、尿検査、免疫抑制剤血中濃度、胸部 X 線、移植腎ドプラエコー。

特殊検査項目：リンパ球サブセット、パネル反応性抗体 (Panel Reactive Antibody: PRA) 法による抗 HLA 抗体、CSFE MLR によるドナー特異的免疫応答の評価。

臨床的検討項目：腎生検病理標本による拒絶反応の診断、拒絶反応発症率、移植腎生着率、移植腎機能、免疫抑制剤の減量の程度。

#### 4. 研究成果

対象：レシピエントは男性 9 名、女性 7 名の計 16 名。移植時平均年齢 38.7 歳。ドナーとの関係は、親子間 11 例、同胞間 3 例、配偶者間 2 例であった。

培養細胞：レシピエントからは  $5 \times 10^9$  個、ドナーからは  $2.5 \times 10^9$  個の細胞が採取された。培養開始から 14 日目には細胞数は平均  $1.1 \times 10^9$  個まで減少した。術後合併症により培養期間を延長 (21、23、35 日間) せざるを得なかった例では  $0.075-0.8 \times 10^9$  個に減少した。培養細胞中の調節性 T 細胞分画 (CD4+CD25+FoxP3+) の割合は培養開始時の 4% から 14% に増加した。免疫抑制効果を確認するために MLR を実施したところ、ドナー特異的に濃度、および用量依存性に抑制作用があることが確認された。

細胞輸注：全例において細胞輸注までのプロトコールは完遂可能であり重大な有害事象は認めなかった。

臨床経過：慎重に免疫抑制剤の減量を試みた。経過観察期間中に 9 名 (56%) の患者において移植腎生検病理標本で軽度ではあるものの拒絶反応の所見を認めた。これらの拒絶反応に対しては免疫抑制剤の減量の中止により進行防止が可能であり移植腎機能は回復したが、安全性、倫理性を考慮して拒絶を発症していない症例でもそれ以上の抑制剤の減量は控えた。16 例のうち 1 例が慢性拒絶により移植腎機能を術後 6 年 5 か月後に喪失した。機能の保たれている他の症例では血清クレアチニン値は平均 1.56 mg/dl と良好である。同時期に当科において標準的免疫抑制療法で行なわれた生体腎移植 28 例との比較では免疫抑制剤は約半分の内服量まで減量可能であった。しかし

抗ドナー抗体：PRA 法により検索したところ、7 名 (44%) に抗 HLA 抗体が術後新たに発現した。しかし、これらはドナー非特異的であった。

CSFE MLR：3rd party に対する反応に比較するとドナーに対する反応性は 1/2-1/4 と低反応性を示した。

以上の結果より、本プロトコールではドナー特異的な免疫低反応性は得られたものの、移植免疫寛容の完全な導入には至っていないと言える。今後各症例に対する評価を継続することと、プロトコール改変の必要があると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Todo S, Yamashita K, Goto R, Zaito M, Nagatsu A, Oura T, Watanabe M, Aoyagi T, Suzuki T, Shimamura T, Kamiyama T, Sato N, Sugita J, Hatanaka K, Bashuda H, Habu S, Demetris AJ, Okumura K, A pilot study of operational tolerance with a regulatory T cell-based cell therapy in living donor liver transplantation. Hepatology, 査読有, 2016 Jan. 16
- ② Uchiyama M, Jin X, Matsuda H, Bashuda H, Imazuru T, Shimokawa T, Yagita H, Niimi M An agonistic anti-BTLA mAb (3C10) induced generation of IL-10-dependent regulatory CD4+ T cells and prolongation of murine cardiac allograft. Transplantation. 査読有 2014 Feb 15;97(3):301-9.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 一郎 (KOYAMA, Ichiro)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10266760

(2) 研究分担者

湧之上 昌平 (FUCHINOUE, Shohei)  
東京女子医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10147382

寺岡 慧 (TERAOKA, Satoshi)  
国際医療福祉大学・大学病院・教授  
研究者番号：20147383

場集田 寿 (BASHUDA, Hisashi)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号：40439295

奥村 康 (OKUMURA, Ko)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号：50009700

村上 徹 (MURAKAMI, Toru)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 50287356

中島 一郎 (NAKAJIMA, Ichiro)  
東京女子医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 80198077