

臓器移植におけるリンパ球アポトーシス導入による
免疫寛容の誘導

(課題番号 10307029)

平成10年度～平成11年度科学研究費補助金基盤研究(A)
研究成果報告書



平成12年3月

研究代表者 阿 岸 鉄 三

(東京女子医科大学医学部教授)

**臓器移植におけるリンパ球アポトーシス導入による
免疫寛容の誘導**

(課題番号 10307029)

平成10年度～平成11年度科学研究費補助金基盤研究(A)
研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 阿 岸 鉄 三

(東京女子医科大学医学部教授)

も く じ

1. 目 次.....	P1
2. はしがき.....	P2
3. 研究課題名、研究課題番号、研究組織、研究経費.....	P3
3. 研究成果.....	P4
1) はじめに.....	P4
2) 研究の背景.....	P4
3) 研究の目的.....	P4
4) 本研究の学術的な特色・独創的な点.....	P5
5) 国内外の関連する研究での本研究の位置づけ.....	P5
6) 研究計画.....	P6
7) 検討項目.....	P6
8) 研究成果の概要.....	P7
①前期.....	P7
②後期.....	P8
4. 研究発表論文	
1) TOLERANCE IN A CONCORDANT NONHUMAN PRIMATE MODEL.....	P12
2) LONG-TERM OUTCOME AND ALLOANTIBODY PRODUCTION IN A NON-MYELOABLATIVE REGIMEN FOR INDUCTION OF RENAL ALLOGRAFT TOLERANCE.....	P21
3) A Mixed Chimerism Approach to Renal Transplantation Between Concordant Nonhuman Primate Species.....	P29
4) Prolongation of Cardiac Xenograft Survival by Double Filtration Plasmapheresis and Ex Vivo Xenoantibody Adsorption.....	P30
5) A Mixed Chimerism and Transplantation Tolerance Induced by a Nonlethal Preparative Regimen in Cynomolgus Monkeys.....	P31
6) A Study of Tolerance in a Concordant Xenograft Model.....	P32

はしがき

近年臓器移植の成績は新しい免疫抑制剤の開発等により飛躍的に向上しているが、それでも例えば腎移植における10年生着率は60%前後であり、また他の臓器移植でも決して満足できる成績が得られていないのが現状である。またその一方で、長期生着例が増加するのに伴って慢性拒絶反応や免疫抑制剤の長期投与による腎障害、肝障害、耐糖能異常といった様々な副作用が新たな問題となっている。これまで免疫抑制剤を投与することにより移植後の免疫反応すなわち拒絶反応を制御してきたが、それには限界があることがわかってきた現在、根本的に臓器移植における免疫抑制法を再検討する時期にきていると思われる。そこでこれらの問題を一挙に解決できる臓器移植の究極の方法として、免疫抑制剤の継続投与を必要としないドナー特異的免疫寛容の誘導が最近クローズアップされている。臨床では肝臓移植、腎臓移植患者の中に偶発的に免疫抑制剤の投与なしに臓器が長期間生着している症例もあり、ドナー特異的免疫寛容は十分実現可能な試みと考えられ、これまでも様々な動物実験により免疫寛容誘導の試みがなされてきた。しかし一部に成功例も散見されるが、確実に免疫寛容が誘導できるまでには至っておらず、また免疫寛容獲得についてのメカニズムについても現在までのところ全く解明されていない。

そこで我々はこのドナー特異的免疫寛容の誘導を臨床の場で実現可能とするため、人類に最も近い霊長類であるサルにおいて、人間とほぼ同様の条件の元で確実に免疫寛容を誘導できる方法について検討を加えた。本研究では臨床応用を前提にして、レシピエントに与える影響を最小限に抑えた低侵襲性の前処置により免疫寛容の誘導を図ることを目的とし、これまでの実験で行われていた放射線照射に代わる前処置として種々の薬剤を使用し、免疫反応の主要な役割を担うリンパ球のアポトーシスを起こすことによりMixed Chimerismの誘導、さらに免疫寛容の誘導を試み、評価すべき成果をあげることができた。

この冊子は科学研究補助金による研究の成果ばかりではなく、本研究に至るまでの経緯がわかるようにそれ以前からの研究成果をも含めたものとなっている。

研究代表者 阿岸 鉄三

【研究課題名】

臓器移植におけるリンパ球アポトーシス導入による免疫寛容の誘導

【研究課題番号】

10307029

【研究組織】

研究代表者：阿岸 鉄三 （東京女子医科大学第三外科教授）

研究分担者：寺岡 慧 （東京女子医科大学第三外科教授）

君川 正昭 （東京女子医科大学第三外科助手）

廣谷 紗千子 （東京女子医科大学第三外科助手）

佐藤 雄一 （東京女子医科大学第三外科助手）

石井 保夫 （東京女子医科大学第三外科助手）

【研究経費】

平成10年度 21,100 千円

平成11年度 15,200 千円

計 36,300 千円

研究成果

はじめに

ここでは本研究の全貌の理解を容易にするため、この研究を開始するに当たっての背景および目的、他の関連する研究での本研究の位置づけや学術的な特色について概説した後、研究の成果について研究計画、研究前期、研究後期と分けて概説した。

(研究の背景)

新たな免疫抑制剤の開発などにより臓器移植の成績は近年飛躍的に向上しているが、それでも例えば腎移植における10年生着率は60%前後であり、また他の臓器移植でも決して満足できる成績が得られていないのが現状である。その一方で長期生着例の増加に伴い、慢性拒絶反応や免疫抑制剤の長期投与による腎障害、肝障害、耐糖能異常といった様々な副作用が新たな問題となってきた。これまで免疫抑制剤の投与により臓器移植後の拒絶反応を制御してきたが、それには限界があり、なおかつ重大な合併症を新たに生ずる危険性が大であることが明白となった現在、根本的に臓器移植における免疫抑制法を再検討する時期にきている。

免疫抑制剤の長期投与を必要としないドナー特異的免疫寛容の誘導は、これらの問題を一挙に解決できる臓器移植の究極の方法として最近クローズアップされてきている。臨床では肝移植、腎移植患者の中に偶発的に免疫抑制剤の投与なしに臓器が長期間生着しているものもあり、ドナー特異的免疫寛容は十分実現可能な試みと思われる。

(研究の目的)

研究分担者の君川は以前より Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital において A.B.Cosimi, D.H.Sachs 教授らとカニクイザルを用いて免疫寛容誘導に関する共同研究を行ってきた。前処置として全身照射、胸腺照射、ATG(anti-thymocyte globulin)の投与を行った後に、骨髄移植を併用した腎移植を行う実験モデルで免疫寛容を誘導する研究であった。その結果免疫寛容が誘導され、最長3年以上免疫抑制剤の投与なしに、しかも1回の拒絶反応もなく移植腎を生着させることに成功した (Kimikawa M, Sachs D, et al : Transplantation 64 : 709-716, 1997)。しかし、この前処置は非常に強

力で、大多数のレシピエントは前処置のためと思われる全身状態への影響（汎血球減少症、食欲低下、全身衰弱、感染症等）が移植後2～3週間認められた。前処置の中でも特に放射線照射は臨床でもしばしば問題となる様々な重篤な合併症を併発する危険性が大であり、サルで成功したこのプロトコルをそのまま臨床に応用することは難しいと思われた。そこで本研究の目的は放射線照射に代わり、薬剤の投与だけによる前処置で免疫寛容を誘導することである。

（本研究の学術的な特色・独創的な点）

本研究では臨床応用を前提として、レシピエントに与える影響を最小限に抑えた低侵襲性の前処置により免疫寛容の誘導を図ることを目的としている。そのため、これまでの実験で使われてきた放射線照射に代わる前処置として種々の薬剤を使用し、免疫反応の主要な役割を担うリンパ球のアポトーシスを起こすことにより Mixed Chimerism の誘導、さらに免疫寛容の誘導を試みることを特色としている。また骨髄移植を併用するため、臨床応用を念頭に置いた場合 GVHD の発症が重要な課題となるが、これについても過去の研究成果を参考にしながら、検討を加える。

さらにより効果的なドナー骨髄細胞の採取法として、末梢血幹細胞移植と同様ドナーに対して G-CSF の投与およびアフエレーシスを行い幹細胞を採取する方法を試みる。この方法は全身麻酔を必要としないため、ドナーに対する負担がより軽減される骨髄細胞採取法であり、成功すればより一層臨床応用が実現可能と思われる。臨床の骨髄移植においては末梢血幹細胞移植はすでに日常行われているが、体重 4-5kg のサルでは技術的に困難で、これまでアメリカの 1 施設でしか骨髄採取のためのアフエレーシスが行われていないが、我々の施設では新生児、小児の血液浄化の経験が豊富であり十分対応可能である。人類に最も近い霊長類を用いることにより、確実に免疫寛容が誘導された場合は臨床応用の実現性が高まると考えられる。

（国内外の関連する研究での本研究の位置づけ）

日本国内では最近小動物を用いた免疫寛容の誘導実験が行われるようになり、また数施設で大動物でも研究がされ始めたところである。

海外においては、前処置として放射線照射にドナーの骨髄細胞移植を併用したサルやブタなどの大動物の実験や、種々の抗体投与による前処置を施した

小・大動物の実験がなされており成功例も散見されるが、まだ確実に免疫寛容が誘導されるには至っていない。

臨床では、研究分担者の君川が共同研究を行っていた Massachusetts General Hospital の A.B.Cosimi らが、悪性リンパ腫の腎不全患者に骨髄移植と腎移植を同時に行い免疫寛容を誘導できたと最近症例報告している (Spitzer T, Delmonico F, Cosimi AB et al : Transplantation 68 : 480-484, 1999)。しかしこの症例は HLA identical と組織適合性は最良であり、また悪性リンパ腫の治療のためドナー細胞の輸注を術後追加しており、これに用いられたプロトコールをそのまますべての臨床の移植に応用できるわけではない。しかし本研究でも免疫寛容誘導を実現できる可能性が十分あることを示唆するものである。

(研究計画)

使用動物：カニクイザル、アカゲザル

ドナーとレシピエントの決定：

ヒトの HLA typing に準じてサルの type を分別し、full mismatch となるような組み合わせを選別した。

MLA-class I : HLA-class I モノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーにより、ドナー陽性・レシピエント陰性となるような組み合わせを選別。

MLA-class II : リンパ球混合培養試験で強陽性となるような組み合わせを選別。

検討項目：

- 1) 生存日数—免疫抑制剤非使用での長期生存を追求する。
- 2) 術前・術後の末梢血液像の経時的変化の観察—前処置による骨髄抑制効果および術後の骨髄機能回復程度について検索する。
- 3) 末梢血中の Mixed Chimerism、リンパ球サブセットの観察—フローサイトメトリーによりドナー骨髄生着の確認、GVHD 発症の危険性について検討する。
- 4) 腎生検—術後 30 日目、60 日目、100 日目前後に施行し、急性拒絶反応発症の有無、免疫寛容獲得のための移植臓器内のリンパ球動態を検討する。
- 5) リンパ球混合培養試験—移植前、移植後定期的に行い、ドナー特異的

な無反応すなわち免疫寛容獲得の有無を確認する。

- 6) 皮膚移植—術後 100 日以上経過した時点でドナーおよび第 3 者の皮膚をレシピエントに移植し、ドナー特異的な免疫寛容となっていることを確認する。
- 7) 骨髄幹細胞の検討—輸注したドナー骨髄細胞中の幹細胞数をフローサイトメトリー、培養により算出し、Mixed Chimerism、免疫寛容誘導に必要な骨髄幹細胞数を検討する。
- 8) GVHD が発症した場合は輸注した骨髄細胞数や前処置による骨髄抑制の程度等を他のレシピエントと比較検討する。

(研究成果の概要)

1. 前期：平成 10 年度および平成 11 年度前半

まず最初に MLA type が full mismatch となるようなドナーとレシピエントの組み合わせを選択するためのスクリーニング検査を行った。

1) MLA-class I : HLA-class I モノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーにより、使用するすべてのサルにおける抗体の有無を検索した。そこで抗体陽性のサルをドナー候補とし、抗体陰性のサルをレシピエント候補とした。

2) MLA-class II —使用するすべてのサルを用いたリンパ球混合培養試験を施行し、強い反応を示した組み合わせを選別した。

以上の 2 つの検査により、MLA-class I ,class II がともに異なる組み合わせをを決定した。

今回の実験で使用する薬剤 (Busulfan, FTY720) は、これまでサルの実験で使用した経験がないため、サルにおける各薬剤の効果、影響について検討する必要があり、実験の第一段階としてまず腎移植をせずに薬剤だけを投与し、サルにおける至適投与量、投与法を検討した。2 頭のサルに Busulfan 4mg/kg/day を 4 日間連続 (Day -7, -6, -5, -4)、FTY720 5mg/kg/day を 3 日間連続 (Day -2, -1, 0) で投与し、投与前、投与中、投与後と連続的に採血し、骨髄抑制の程度、肝障害、腎障害の有無を検索した。その結果、以前に君川らが米国で行っていた全身照射を用いたプロトコールと同程度の骨髄抑

制が得られたため、この投与量、投与方法で腎移植、骨髄移植を実施することにした。

プロトコール

移植 7 日前～ 4 日前	Busulfan 4mg/kg/day
2 日前～移植当日	FTY720 5mg/kg/day
移植日	腎移植+ドナー骨髄移植
術後第 1 病日～ 1 4 病日	CsA 8mg/kg/day

上記プロトコールで本実験を開始した。1 例目は予想以上に骨髄抑制の程度が強く術後 1 6 日目に敗血症により死亡した。移植腎機能、肝機能は正常であった。3 例目は術後 1 日目に術後出血を起こした後乏尿となり、その後の輸液で肺水腫を併発し術後 5 日目に死亡した。2 例目と 4 例目、5 例目は術後それぞれ 3 7 日目と 5 7 日目および 7 1 日目に拒絶反応により死亡した。

骨髄抑制効果

1 例目は術後 9 日目には白血球数が $300/\text{mm}^3$ まで減少し、リンパ球数は 0 となっていた。またヘマトクリットも 23%、血小板数も $2\text{万}/\text{mm}^3$ まで低下しており、強度の汎血球減少症を呈することになり、最終的には術後 1 7 日目に敗血症により死亡した。また 2 例目も 1 例目ほど強くはなかったがやはり強度の汎血球症を呈した。この症例は最終的には術後 3 7 日目に拒絶反応により死亡した。

上記 2 例では骨髄抑制が強すぎたため、3 例目からは FTY720 の投与量は変更せず、Busulfan のみ $3\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ に減量して投与した。しかし今度は骨髄抑制が不十分で、期待した白血球数減少、リンパ球数減少が得られなかった。術後 5 7 日目、7 1 日目に拒絶反応により死亡した。

またいずれの症例でも mixed chimerism は長期間観察されなかった。

そこで Busulfan に代えて Cyclophosphamide を $20\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ で 3 日間術前投与したが、しかしそれでも骨髄抑制は不十分で、mixed chimerism も誘導されず拒絶された。

2. 後期

後期はプロトコールをさらに変更して実験を行った。

プロトコール

移植 7 日前～5 日前	Cyclophosphamide 20mg/kg/day
4 日前～2 日前	FTY720 5mg/kg/day
移植日	腎移植＋ドナー骨髄移植
術後第 1 病日～1 4 病日	CsA 8mg/kg/day

さらにドナーの骨髄細胞採取法を、腸骨窩直接穿刺法から連続血球成分分離装置を用いて末梢血中から造血幹細胞を採取する方法に変更して、腎移植 2 日前に施行した。このためドナーには腎移植 7 日前から 3 日前まで 5 日間連続で造血因子である granulocyte colony stimulation factor (G-CSF)を投与した。

末梢血幹細胞移植の目的

従来骨髄移植では頻回の骨髄穿刺により造血幹細胞源としての骨髄液を採取してきたが、最近急速に末梢血幹細胞移植が広まっている。その理由として

- 1) アフェレーシスにより骨髄細胞を採取するため、全身麻酔を必要とせずドナーへの負担が軽い。
- 2) アフェレーシス後の末梢血中に含まれる単核細胞当たりの CD34 陽性細胞数は、通常の骨髄採取により得られる骨髄単核細胞中より多く含まれる。
- 3) より多くの造血幹細胞および前駆細胞 (CD34 陽性細胞) が移植可能なことは、移植後の速やかな造血回復が期待できる。

などが挙げられている。

我々のこれまでの研究でも、腎移植後 2～3 週間前後の骨髄抑制が強い時期にレシピエントの状態が悪化することがしばしば見られた。食欲不振、全身衰弱等が認められ、さらに感染症から敗血症となって死亡するサルも少なからず見られ、この時期の対策が重要であった。骨髄抑制が弱ければ mixed chimerism が早期に消失し免疫寛容は誘導されず、逆に骨髄抑制が強すぎればレシピエントの全身状態が極度に悪化するという相反する問題があったが、これらを解決できる可能性があり、今回の研究に取り入れることにした。

アフエレーシスの方法

ドナーに連続5日間 G-CSF を投与した後連続血球成分分離装置を用いて末梢血幹細胞を採取した。

G-CSF 効果—ドナー白血球数の変動

G-CSF を5日間連日 50~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与した結果、白血球数は投与前に比較して6~12倍に増加していた。手術後1~2週間で G-CSF 投与前の白血球数に復帰しており、G-CSF 投与による影響はそれほど大きいものではなく副作用も心配ないと思われた。

Product

アフエレーシスにより採取された骨髓細胞数は $3\sim 4 \times 10^8/\text{ml}$ と、直接穿刺法に比較して高値を示してした。

前処置効果

Cyclophosphamide による前処置を行い骨髓抑制を意図的に惹起させたが、腎移植当日の白血球数は前処置開始前に比べて10~30%に減少しており、リンパ球数も15~20%に減少していた。Cyclophosphamide の投与量を20mg/kg/day、30mg/kg/day、40g/kg/day と変更したが、用量依存的に骨髓抑制が認められた。

リンパ球サブセットの変動

FTY を投与することにより腎移植直前にリンパ球を減少させたが、その間のリンパ球サブセットの変動をフローサイトメトリーを用いて検討した。

CD4 および CD8 を two color analysis で解析した。その結果 FTY 投与前40~60% あった CD4 は腎移植当日には1~15%に減少していた。

一方 CD8 はほとんど減少しておらずむしろ上昇する症例も約半数で認められた。

絶対数で見ると CD4 はほとんど末梢血中から消失している症例もみられた。

Mixed Chimerism

3症例でフローサイトメトリーを使用した mixed chimerism の検討を行

ったが、2例では術後5日目以降 mixed chimerism が観察されることはなかった。他の1例は現在なお追跡調査中であるが、術後16日目現在 CD4 においても CD8 においても mixed chimerism が観察されている。すなわちドナーのリンパ球がレシピエントの末梢血中に存在していることになる。

腎移植成績

本プロトコルを用いてこれまで5組の腎移植を行った。残念ながら2例は外科的合併症によりそれぞれ術後25日目、28日目に失っているが、残りの3例は拒絶反応を生じることもなく生存中であり、第1例は140日、第2例目は100日を越えて生存しており、免疫抑制剤を完全に中止してからそれぞれ125日、85日経過している。また第3例目も術後20日経過し、免疫抑制剤を中止し経過観察中である。今後3例とも移植腎生検、リンパ球混合培養試験、皮膚移植等を適宜施行し、ドナー特異的免疫寛容誘導の確認をする予定である。