

## 学位論文題名

# 移植前樹状突起細胞投与と CD40/CD40L 経路阻害による移植片生着延長効果

## 学位論文内容の要旨

【緒言】移植医療において、レシピエントをドナー特異的な寛容状態に導き、既存の免疫抑制剤を使用せず移植片の長期生着を得ることが最終目的である。アロ抗原特異的 T 細胞が、抗原特異的に寛容状態になるためには、T 細胞がその抗原を認識し副刺激が効果的に阻害されることが必要である。最近、T 細胞上の CD40L から抗原提示細胞 (APC) 上の CD40 に伝達される副刺激経路が、APC/T 細胞相互作用の初期段階で重要であることが報告されている。そこで、移植前に強力な抗原提示細胞であるドナー由来の樹状突起細胞 (DC) でレシピエントを感作すると同時に CD40/CD40L 経路阻害により移植片生着延長が得られるかラット同種腎移植を用いて検討した。

【材料・方法】動物は、ACI ラット、LEW ラットを用いた。ドナーとして用いる ACI ラットの脾細胞から分離し得られた DC の発現している表面分子をフローサイトメトリーで確認し、FITC-Dextran を用いてその貪食能を検討した。組換えアデノウイルスベクターから得られた可溶性蛋白 CTLA4-Ig, CD40-Ig により、副刺激経路である CD28/CD80・CD86, CD40/CD40L 経路をそれぞれ阻害した。刺激細胞を ACI ラットの脾細胞または DC, 反応細胞を LEW ラットの脾細胞としたリンパ球混合反応 (MLR) により、刺激細胞の違いで使用される副刺激分子の重要度を検討した。ラット同種腎移植はドナーを ACI, レシピエントを LEW とし、移植後直ちにレシピエントの自己腎は摘出しているためレシピエントの死をもって移植片喪失とした。また、移植片生着期間は median survival time (MST) で表した。まず、移植後の CD40-Ig の効果を検討するために、コントロール群：無治療, CD40 群：CD40-Ig 1mg/body i.v. (day0, 2, 4), CTLA4 群：CTLA4-Ig 1mg/body i.v. (day0, 2, 4), を設定した。次に移植前 DC と CD40-Ig 併用投与の効果を検討した。DC はすべて移植 9 日前に  $2 \times 10^6$  個の細胞数でレシピエントに静注投与し、CD40-Ig の一回投与量は 1mg/body (low-dose) と 4mg/body (high-dose) の二つを設定した。1. DC・low-dose CD40-Ig 併用; DORO 群：DC 投与のみ, DIRO 群：DC 投与と CD40-Ig i.v. (day-7), DORI 群：DC 投与と CD40-Ig i.v. (day2), DIRI 群：DC 投与と CD40-Ig i.v. (day-7, 2)。2. DC・high-dose CD40-Ig 併用; D4RO 群：DC 投与と CD40-Ig i.v. (day-7), DORA 群：DC 投与と CD40-Ig (day2), DARA 群：DC 投与と CD40-Ig (day-7, 2), 以上の群で検討した。移植モデルの解析として D4R4 群について、移植後 7 日目、30 日目のレシピエントから脾細胞を回収し、コントロール群から得られた脾細胞のとアロ抗原に対する反応を MLR で比較した。また、DC と CD40-Ig 投与によりレシピエント脾細胞における調節性細胞とされる CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞及び NKT 細胞の比率を DC 投与後 5 日目・9 日目で無処置群, DC 単独投与群とフローサイトメトリーを用いて比較した。

【結果】本研究で用いた、脾細胞から得られる DC は ICAM-1, CD80, CD86, MHC class II を強く発現していたが、貪食能は保持され完全に成熟型の DC ではないと考えられた。この DC または脾細胞を刺激細胞とした MLR において CD40-Ig または CTLA4-Ig の抑制効果を検討した。すなわち、

刺激細胞の種類により移植抗原認識に係わる副刺激分子の重要性が異なるかを検討した。刺激細胞が脾細胞のとき、高濃度を添加すると CTLA4-Ig, CD40-Ig 両者ともに増殖反応を抑制することができたが、低濃度では CTLA4-Ig がより抑制効果は強かった。しかし、刺激細胞を DC としたとき、CD40-Ig は 50 $\mu$ g/ml の濃度で完全に抑制することができたが、CTLA4-Ig は同濃度でも約 50% の抑制効果に留まった。以上より、DC/T 細胞相互作用において CD28/CD80, CD86 経路より CD40/CD40L 経路による副刺激が重要な役割を担っていることが示された。よって、レシピエントが移植抗原を認識するとき、APC がドナー由来の DC に限定されると、CD40-Ig の投与で効果的に移植片生着延長が得られる可能性があると考えられた。まず、DC と CD40-Ig の移植前投与の効果を検討する前に CD40-Ig の単独投与の効果と CTLA4-Ig と比較した。CTLA4 群は容易に移植片長期生着が得られたが (MST>100 日)、CD40 群 (MST=8 日) は同量投与してもコントロール群 (MST=8 日) と差はなかった。これは投与量を合計 18mg まで増加しても同様であった。従って、CD40-Ig を可溶性蛋白として移植後レシピエントに投与しても効果は示さないと考えられた。次に、移植前のドナー由来 DC と CD40-Ig 併用投与で移植片生着延長が得られるかを試みた。投与された DC が二次リンパ節組織に移動し T 細胞と相互作用するのは 2-4 時間以降と考え CD40-Ig の投与は DC 投与後 2 日目にした。移植前 DC のみ投与した D0R0 群は、移植抗原に感作されるため超急性拒絶反応により、コントロール群と比べ 2 日早く移植片喪失となった (MST=6 日)。DC 投与後 CD40-Ig (1mg/body) を追加した D1R0 群は、超急性拒絶反応を回避でき軽度の移植片生着延長を認めた (MST=9 日)。更に、移植後 CD40-Ig を追加した D1R1 群は 40% に 90 日以上長期生着延長が得られた (MST=13 日)。low-dose CD40-Ig では CD40/CD40L 経路を阻害するには不十分と考え、一回投与量を 4mg/body にし生着期間を観察した。D4R0 群は 40% に 10 日以上生着が認められるのみであり (MST=9 日)、また D0R4 群はコントロール群と明らかな差はなかった (MST=7 日)。しかしながら、day-9, day2 に CD40-Ig を投与した D4R4 群は全ての移植片に長期生着延長を認めた (MST>100 日)。よって、移植後の CD40-Ig 単独投与は効果が認められなかったことから、移植前 DC と CD40-Ig 投与により移植後の CD40-Ig の効果を著明に増幅させることができたと考えられた。D4R4 群がドナー抗原に対し寛容状態になっているか、MLR にて検討した。移植後 7 日目では D4R4 群の脾細胞はドナー脾細胞に対して増殖反応は抑制されていたが、30 日目では増殖反応は回復していた。よって、胸腺から新たにドナー抗原反応性 T 細胞が産出され、末梢で抑制されていないことが示唆された。また、DC と CD40-Ig 投与による処置でレシピエントの二次リンパ節組織で調節性細胞である CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞と NKT 細胞の変化を解析した。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞は DC 投与後 5 日目、9 日目で無処置群、DC 単独投与群、DC・CD40-Ig 併用群で差は認められなかった。しかし、NKT 細胞は DC 単独投与で軽度増加を認めたが、DC・CD40-Ig 併用群では更に増加していた。よって NKT 細胞が、移植前 DC・CD40-Ig 投与による移植後 CD40-Ig 効果増幅に関与していることが示唆された。

【考察】移植抗原反応性 T 細胞が抗原を認識するとき、APC が様々な細胞集団で構成されていると、各々の APC/T 細胞相互作用において使用される副刺激分子も異なってくる可能性が考えられる。事実、脾細胞を刺激細胞とした MLR では CD40/CD40L 経路を阻害するより CD28/CD80・CD86 経路を阻害したほうが効果的に増殖反応を抑制できた。これに対して、APC を DC に均一化したとき、CD40/CD40L 経路の阻害により抗原提示能力が高いにもかかわらず完全に抑制することができた。よって、DC/T 細胞相互作用において CD40/CD40L 経路が非常に重要であることが示された。一般的にドナー由来の APC によりレシピエントを寛容状態へ誘導するには、B 細胞、未熟型 DC などの抗原提示能の低い APC を用いた方が有利と考えられている。しかし我々は、副刺激分子を効果的に阻害できるのであれば、MHC 分子を強く発現している DC の方が、容易に数多くの T 細胞を低反応状態に誘導できると考え、DC と CD40-Ig 併用による移植片生着延長を試みた。移植前 DC と CD40-Ig の投与のみでは生着延長に効果は認められなかったが、移植後 CD40-Ig を追加することで全てのレシピエントに長期生着延長を得ることができた。合計 3 回の処置だけで長期生着を

誘導することができ、この処置は有効な方法と考えられた。長期生着が得られた群に対し移植後のドナー抗原に対する反応性を検討したところ、胸腺から新たに産出したドナー抗原反応性のT細胞は消失せず末梢に存在していることが示された。これはレシピエント内では何らかの抑制機序が働きT細胞が活性化せずに存在しているが、in vitro で培養するとその抑制機序が働かないためT細胞は増殖反応を示すと考えられた。また、DCとCD40-Igの投与でレシピエントの脾細胞にNKT細胞の増加を認め関与が示唆されたが、この細胞群の消失または移入により移植片生着に影響を与えるか検討する必要がある。

**【結語】** 本研究において、DC/T細胞相互作用においてCD40/CD40L経路が重要な役割を持ち、DCとCD40-Ig併用により移植片生着延長が得られることを示した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 柳 知 彦  
副 査 教 授 上 出 利 光  
副 査 教 授 小 野 江 和 則

学 位 論 文 題 名

## 移植前樹状突起細胞投与と CD40/CD40L 経路阻害による移植片生着延長効果

T細胞が抗原認識するとき、副刺激経路を阻害するとT細胞は寛容状態へ誘導することが可能である。また、免疫応答において樹状細胞(DC)は中心的な役割をもち、DCの機能を修復することで宿主の免疫応答を調整し、疾患を治療する試みがなされている。よって、DCと副刺激阻害を用いることが移植片生着誘導に有効な手段と考えられる。当教でドナー由来DCとCTLA4-Igの移植前投与により、移植片生着延長を試みたが不十分な結果であった。今回、DCとT細胞との相互作用においてCD28/CD80・86経路よりもCD40/CD40L経路が重要と考え、ドナー由来DCでレシピエントを感作する際、CD40-IgによるCD40/CD40L経路阻害で移植片生着延長が誘導できるかを検討した。今回の実験で用いたドナー脾細胞から分離したDCは、T細胞を活性化するための表面分子はすでに発現し、未熟型のDCではないが、dextranを取り込む能力は保持されていた。次にCD40-Igの効果もMLRで確認する際、刺激細胞の違いで重要となる副刺激分子も異なるかをCTLA4-Igと比較した検討した。刺激細胞をACIの脾細胞、DCとし、反応細胞をLEWの脾細胞としMLRを行った。刺激細胞を脾細胞としたときCD40-Ig・CTLA4-Igが高濃度であるとき両者は増殖反応を抑制するが、低濃度ではCTLA4-Igのほうが抑制効果は強かった。それに対し、刺激細胞をDCとしたときCTLA4-Igは高濃度添加しても約50%程度の抑制であったが、CD40-Igは10 $\mu$ g/mlの濃度でも完全に抑制できた。よって、DC・T細胞相互作用においてCD28/CD80・86経路よりCD40/CD40L経路が重要と考えられた。次にドナーをACI、レシピエントをLEWとしたラット同種腎移植を行った。CTLA4-Igは1mg/body 3回投与で容易に長期生着延長が得られるのに対して、CD40-Igは同投与量でもコントロール群と比べ差はなかった。よって移植後CD40-Ig単独投与では生着延長効果を得るのは困難と考えた。続いて、DC・CD40-Ig併用による生着延長効果を検討した。DCは全ての群で移植9日前に2 $\times$ 10<sup>6</sup>個の細胞数で静脈投与した。CD40Igの一回投与量が1mgであるlow-doseと4mgであるhigh-doseを設定し、移植7日前、2日後、または両日投与した。DCのみ投与されたDORO群はコントロール群と比べて2日早い移植片喪失を認めた。DC投与後2日目にCD40-Igを追加したDIRO群に早期移

植片喪失は認められず、5匹中2匹に10日以上の上着を認めた。更に移植後 CD40-Ig を投与した D1R1 群は 40%の移植片に長期上着を認めた。さらに CD40-Ig の投与量を増加し移植実験を行った。D4R0 群, D0R4 群に早期の移植片喪失を認めないが軽度の上着延長を示すだけであった。しかし, day-7 と day2 に CD40-Ig を投与した D4R4 群は 100%長期上着延長を得ることができた。この群において寛容状態が誘導されているか、まず移植片の病理組織像を確認したところ、移植後 130 日目では組織は強く荒廃し寛容は誘導されていなかった。移植後 D4R4 群レシピエントのドナー抗原に対する反応をコントロール群と MLR で比較検討した。移植後 7 日目ではレシピエントのドナー抗原に対する反応は抑制されていたが 30 日目までに回復していた。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞と NKT 細胞の regulatory cell について、DC・CD40-Ig 投与後脾細胞中での比率の変化をフローサイトメトリーで解析した。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞は DC・CD40-Ig を投与でも変化は認められなかった。NKT 細胞は DC 投与後 5 日目に DC 投与だけでも NKT 細胞は増加したが CD40-Ig を追加すると更に増加していた。更に、その増加は 9 日後まで持続していた。以上から、DC/T 細胞相互作用において、CD40/CD40L 経路は重要な副刺激経路と考えら、DC と CD40-Ig の投与で移植片に長期上着延長が得られた。また DC・CD40-Ig 処置により NKT 細胞の増加を認め、移植片上着延長への関与が示唆された。質疑応答では、まず小野江教授から移植後ラットの MLR が抑制されているのは投与した CD40-Ig が関与しているのではとの質問があった。その質問に対し、培養するまで洗浄しているため、投与した CD40-Ig の関与は否定的であると解答した。上出教授から移植前に DC を投与する意義について質問があった。その質問に対し、移植前に DC により感作することでレシピエントに移植抗原に対し低反応状態を誘導することができ移植片への傷害が回避できると答えた。小柳教授から、CD40-Ig をアデノウィルスベクターにより投与したときの、血中濃度の違いについての質問があった。可溶性蛋白のときはウィルスベクターと比べ約 5 分の 1 程度の血中濃度までしか上昇しないが、DC と併用することでウィルスベクターを用いたときと同等の効果を示し、かつ安全性が高いと解答した。

この論文は、アデノウィルスベクターを用いず可溶性蛋白として CD40-Ig を用いて上着延長を誘導した点で高く評価され、今後 DC と CD40-Ig 併用の臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。