



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ラット同種腎移植における術前ドナー樹状細胞およびCTLA4Ig投与による移植片生着延長効果
Author(s)	原田, 浩; Harada, Hiroshi
Description	running title: 樹状細胞, CTLA4Igによる移植片生着延長
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第4684号
Issue Date	1999-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3151367
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51585
Type	doctoral thesis
File Information	000000336556.pdf



【原著】

ラット同種腎移植における術前ドナー樹状細胞およびCTLA4Ig投与による移植片生着延長効果

running title: 樹状細胞,CTLA4Igによる移植片生着延長

原田 浩

北海道大学医学部 泌尿器科学講座

[主任: 小柳知彦教授]

Preoperative Inoculation of CTLA4Ig Combined with Allogeneic Dendritic Cells Prolongs Rat Renal Allografts in a Donor-Specific Fashion

Hiroshi HARADA

Department of Urology, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo 060-8638, Japan

①

【原著】

ラット同種腎移植における術前ドナー樹状細胞およびCTLA4Ig投与による移植片生着延長効果

running title: 樹状細胞,CTLA4Igによる移植片生着延長

原田 浩

北海道大学医学部 泌尿器科学講座

[主任: 小柳知彦教授]

Preoperative Inoculation of CTLA4Ig Combined with Allogeneic Dendritic Cells Prolongs Rat Renal Allografts in a Donor-Specific Fashion

Hiroshi HARADA

Department of Urology, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo 060-8638, Japan

Key words: Renal transplantation, Donor specific tolerance, Dendritic cell, Costimulatory signal, CTLA4Ig

Donor dendritic cells (DCs) within allografts initiate the induction of an allospecific T cell response, while an abortive alloantigen presentation by DCs may induce allospecific unresponsiveness. It thus seems important to determine if a preoperative transfusion of donor DCs in conjunction with CTLA4Ig would prolong graft survival, in a donor-specific manner. Rats treated with donor DCs (2×10^6 /rat i.v.) on the preoperative day 9 rejected allografts in an accelerated manner (5.0 ± 2.2 vs. 8.2 ± 1.6 days in the control group). Preoperative transfusion of DCs pulsed with CTLA4Ig, a procedure which suppresses an allogeneic mixed lymphocyte reaction (MLR), also provoked an accelerated rejection (5.6 ± 1.7 days). When DCs and CTLA4Ig (500 mg/rat i.p. on days -9, -7, and -5) were concomitantly inoculated, allograft survival was significantly prolonged ($>38.8 \pm 38.3$ days); a preoperative CTLA4Ig inoculation alone failed to do so (7.5 ± 1.2 days). Postoperative CTLA4Ig alone prolonged graft survival ($>68.1 \pm 39.0$ days). Long-term graft survivors tolerated skin grafts from the donor but not those from a third party. There were no cellular infiltrates within transplanted kidneys in the long-term survivors. The serum cytokine profiles were almost identical between the experimental groups with long-term survivors: the relative predominance of IL-4 and IL-10 in the early and late phases in the graft enhancement, respectively. The collective evidence suggests that as preoperative treatment of donor DCs in combination with CTLA4Ig prolongs graft survival, and the notion that an abortive alloantigen presentation by DCs conveys allospecific unresponsiveness is given support.

Key words: Renal transplantation, Donor specific tolerance, Dendritic cell, Costimulatory signal, CTLA4Ig

緒言

同種臓器移植の抗原認識機構として、移植臓器片中に発現した主要組織適合抗原複合体(major histocompatibility complex:MHC)断片をレシピエント抗原提示細胞(APC)がprocessingし自己MHC上に発現させ、これをT cellが認識するindirect pathway および、移植臓器中に存在するpassenger leukocyteであるドナーAPCを直接レシピエントT cellが認識するdirect pathwayが重要な役割を占めている¹⁾。

これまで臓器移植においてドナー特異的抗原の比較的大量の移入(donor-specific transfusion:DST)は臓器片の生着延長をもたらすことが判明しているが²⁾、一方この操作により前感作を引き起こし拒絶反応が促進されてしまう報告も相次いでいる^{3,4)}。近年T cellの抗原認識の際、APC上のMHCからの主刺激のみならず、CD80/86からT cell上のCD28への副刺激の共存がT cell活性化には必須で、これを欠いた場合、抗原特異的免疫学的寛容状態が誘導されることが判明してきている^{1,5,6)}。DSTによる生着延長/拒絶促進の機序は明らかでないが、移入した細胞中に比較的大量に存在するB cellなどのnon-professional APCが優位に働きdirect pathwayを不完全に発動させれば抗原特異的免疫学的不応答状態が誘導され、一方professional APCである樹状細胞(dendritic cell:DC)が優位に働けば強力にT cellを活性化し前感作される可能性が考えられる。

DCは成熟した状態でMHC class I/IIやICAM-1, CD40, CD80, CD86などの副刺激を伝達する表面抗原を多量に発現しているprofessional APCで、^{7,8)}passenger leukocyteの本体であるとされている。同種臓器移植では、これらが移植後の血流再開後にレシピエントリンパ系組織へ遊走し、direct pathwayを介して同種特異的T cell応答を惹起する(passenger cell theory)^{8,9)}。Passenger cellが除去された臓器を移植する実験的臓器移植において、ドナーT cell, B cell, adherent cellを移入した場合には移植片は受け入れられるが、DCを再投与した場合のみ強力な同種抗原特異的反応が誘導されることが確認されている¹⁰⁾。DCは腫瘍の免疫原性を増幅する手段として^{11,12)}、或いは自己免疫疾患モデル・臓器移植モデルでは逆にトレランスを誘導する手段として有効である¹³⁻¹⁶⁾。

CD80/86のcounter receptorであるCTLA4はCD28より20倍のaffinityを持っており、このCTLA4の細胞外domainとIgG1Fc portionの細胞工学的キメラ蛋白であるCTLA4Igは高率にCD28への副刺激をblockできることが示されている。実験的臓器移植の場合においても、CTLA4Igの投与にて臓器移植片の生着延長効果が確認されている¹⁷⁻¹⁹⁾。

本研究では、移植前のドナーDCおよびCTLA4Igの投与によって引き続き同種腎移植片の生着延長が図れるかをMHC完全不一致のラット腎移植モデルを用いて検討した。また得られた長期生着モデルに関して、そのメカニズムを検討したので報告する。

材料と方法

1. 実験動物

北海道大学医学部附属動物実験施設において繁殖、維持されている近交系ラット3系統LEW/Hkm(RT1^l)、WKAH/Hkm(RT1^k)およびACI/Hkm(RT1^a)を用いた。すべて雄を使用し、体重は200-300gのものを使用した。

2. 試薬

mCTLA4-hIgG(CTLA4Ig)はE1, E3領域欠失recombinant adenovirus vectorに同遺伝子を組み込んだAdex1CACTLA4IgGをCOS7細胞に遺伝子導入して得られた培養上清からprotein A-Sepharose 4B conjugate (Zymed社)にて精製した。ヒト精製IgG(hIgG) (O.E.M.社)をCTLA4Igのコントロール蛋白として用いた。CTLA4Ig, hIgGとも滅菌PBSにて至適濃度に希釈した。OX-6(抗ラットMHC class II), OX-62(抗ラットDC特異抗原), G4.18(抗ラットCD3)(以上PharMingen社), RLN-9D3(抗ラットpan B cell)(SEIKAGAKU社), 1A29(抗ラットICAM-1)(大阪大学 宮坂昌之教授より供与)²¹⁾をFACS解析における1次抗体として使用し、FITC結合ウサギ抗マウスIgG Fc, FITC結合抗ヒトIgG(以上Cappel社)を2次抗体として使用した。

3. ラット脾樹状細胞の調整

Knightら²²⁾, Havenith²³⁾らの方法に若干の改良を加え以下のように行った. すなわち, LEWラットから摘出した脾臓を細片化し, 150U/ml コラゲナーゼ (和光純薬), 10U/ml DNase (Promega社), 10%ウシ胎児血清 (FBS) (JRH Bioscience社) 添加RPMI-1640 (GIBCO社) にて90分間組織融解させた. 得られた脾細胞を 5×10^{-5} M 2-mercatroethanol (和光), 10%FBS含有RPMI-1640に浮遊させ 1×10^8 cells/dishの細胞濃度で直径100mm 細胞培養ディッシュにて1晩培養 (37°C、CO₂ incubator) した. 翌日脾付着細胞を回収し, 14.5%Nycodenz密度勾配上に重層後, 遠心し (600g、25分), 中間層を回収した. 得られた低密度細胞は70-80%のDC, 20-30%のマクロファージ, 数%のB cellの構成であった. さらに混在するマクロファージ, B cellを除去するため, Seversonら²⁴⁾の方法に準じ上記低密度細胞を3%ウシ血清アルブミン含有Hanks' balanced salt solution中に再浮遊させ直径100mm 細胞培養ディッシュにて1時間培養 (37°C、CO₂ incubator) し, 非付着細胞を回収し脾DCとして実験に用いた (population > 90%, viability > 95%).

4. フローサイトメトリーによる細胞表面分子の解析

単離されたDCの表面抗原をFACSscan (Becton社) によるフローサイトメトリーで検索した. 上述のOX-6, CTLA4Ig, 1A29, OX-62, G4.18, RLN-9D3 OX-42を1次抗体として反応させたのち, FITC標識2次抗体で反応させた. なおpropidium iodide (Sigma社) を反応させ, 陽性細胞は死細胞としてgate outした. ソフトウェアはCELLQuest を用い 10000個の細胞を解析した.

5. CTLA4IgによるDCのCoating

得られたLEW DCにPBSにて各濃度に調整したCTLA4Igを氷温上で反応させ, 余剰のCTLA4IgをPBSにて十分洗浄 (4回以上) し除去したのち, 以下の実験に使用した. またコントロールとしてhIgG で同様に反応させたDCを用いた.

6. リンパ球混合培養 (Mixed lymphocyte reaction: MLR)

DC, 脾細胞 (spleen cell: SPC), 頸部リンパ節細胞 (lymphnode

cell:LNC) を刺激細胞 (stimulator), WKAH、LEWおよびACIのLNCを反応細胞 (responder) とした. また前述のように *ex vivo* でCTLA4IgをcoatingしたLEW DC もstimulator として用いた. Responderは 1×10^5 /wellで固定し, stimulatorを25mg/ml のmitomycin C処理後, SPC, LNCの場合 1.25×10^4 から 2×10^5 /well, DCの場合 1.25×10^3 から 2×10^4 /wellとし 96 well microtiter culture plate (Corning社) にて共培養を施行した. 細胞はすべて10% FBSおよび 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol 含有RPMI-1640 にて培養した (96 時間、37°C、5% CO₂ incubator). 実験によっては各濃度のCTLA4Ig を共培養開始時から添加した. Harvestの16時間前に0.5 mCi (Amersham LIFE SCIENCE社)[methyl-³H]thymidineを加えcell harvester にて細胞を回収し, 液体シンチレーションカウンターにて放射能を測定した. 全ての実験はtriplicateで行った.

7. アロ腎移植におけるCTLA4IgおよびDCの投与方法

MHC完全不一致の組み合わせであるLEWをドナーに, WKAHをレシピエントとする同種ラット腎移植においてドナーDCが急性拒絶反応を促進するか, またCTLA4Igがこの現象を回避させ, さらにドナー特異的免疫学的無反応状態が誘導されるか否かを確認するために以下の9群の実験群を設けた.

Group I: 無処置コントロール移植群

Group II: 移植0, 2, 4日後に 500mg/ratのCTLA4Igを腹腔内投与 (i.p.)

Group III: 移植0, 2, 4日後に 500mg/ratのhIgGをi.p.

Group IV: 移植9, 7, 5日前に 500mg/ratのCTLA4Igをi.p.

Group V: 移植9日前にドナー DC (2×10^6 /rat) を尾静脈から静脈内投与 (i.v.)

Group VI: 移植9日前に500mg/ml の濃度のCTLA4Igでcoatingされたドナー DC (2×10^6 /rat) をi.v.

Group VII: 移植9日前に500mg/ml の濃度のhIgGでcoatingされたドナー DC (2×10^6 /rat) をi.v.

Group VIII: 移植9日前にドナー DC (2×10^6 /rat) をi.v.し、かつ移植9, 7, 5日前に 500mg/ratのCTLA4Igをi.p.

Group IX: 移植9日前にドナー DC (2×10^6 /rat) をi.v.し、かつ移植9, 7, 5日

前に 500mg/ratのhIgGをi.p.

8. 腎移植手技

Lee²⁵⁾, Chikaraishiら²⁶⁾の方法を改良しラット同種腎移植を行った。すなわち、ペントバルビタール麻酔下に拡大鏡(16倍)を用いドナー左腎を腹腔内に移植した。自己腎は両腎とも摘出し、死亡をもって拒絶と判断した。なお1日以内の死亡は手術手技に起因するものと考え、データから排除した。経時的移植腎生検はGroup IIおよびVIIIの長期生着腎について施行した。

9. 皮膚移植手技

100日以上長期生着が得られたGroup IIおよびGroup VIIIのモデルにおいて、移植片生着がドナー特異的か否かを確認するために皮膚移植を行った。3種類の純系ラット(LEW, allogeneic donor; WKAH, syngeneic; ACI, allogeneic third party)の尾部から直径10mmの全層皮膚組織グラフトを切除し、上記2群の長期生着ラットの背部に同一ドナーから2片ずつ移植した。よって計6片の皮膚移植片が移植されたことになる。移植片は完全壊死をもって拒絶と判定した。

10. 血清サイトカイン測定

長期生着ラットのTh1/Th2バランスを精査する目的で血清中IL-2, IFN- γ , IL-4 および IL-10濃度を測定した。測定にはCytoscreenTM Immunoassay Kits (BIOSOURCE INTERNATIONAL社)を用い、付属のinstruction manualに従い行った。血清はGroup II, III, VIIIおよびIXから経時的に採取し、付属のStandard Diluent Bufferにて10倍に希釈してから測定に用いた。全ての測定はduplicateにて行った。

11. 統計学的解析

移植腎生着率, MLRおよび血清サイトカイン濃度測定のデータ解析にはStudent's *t* testを用い, $p < 0.05$ を統計学的有意とみなした。

結果

1. 分離したDCの表面マーカーおよび同種抗原提示能

FACS解析にてDCはMHC class II、CD80/86、ICAM-1およびrat DC マーカーであるOX-62抗原の細胞表面上発現が確認された (Fig.1)。また抽出した細胞中にはB cellの混在がみられたが少数であった。またMLRにおいてDCは添加細胞数がLNCやSPCの1/10としたのにもかかわらず、それらよりも強力な同種抗原提示能が確認された (Fig.2)。

なおDCは同種刺激能のみならず、LNCやSPCではみられなかった autologousなMLRにおいても活性を有していた。

2. CTLA4Igによる同種MLRの抑制効果

次に精製CTLA4Igの同種抗原提示抑制効果を同種MLRにて確認した。Mitomycin C処理したLEW DC (2×10^4 /well) をstimulatorに、またWKAH LNC (1×10^5 /well) をresponderとして共培養し、培養開始時にCTLA4IgおよびコントロールであるhIgGを最終濃度0から500 μ g/mlとなるよう添加したところ、濃度依存性にMLR活性の抑制が得られた (Fig.3A)。また予めCTLA4IgをcoatingしたDCを同様にstimulatorとしてMLRに添加したところ、coating時の濃度依存性にMLR活性を抑制する効果が確認された (Fig.3B)。

3. ドナーDC前投与による急性拒絶反応の促進, CTLA4Ig同時投与添加によるその回避, およびドナー特異的免疫学的寛容状態の誘導 (Table 1)

各実験群における移植腎生着日数をTable 1に示す。無処置コントロール Group Iでは移植片は平均 8.2 ± 1.6 日で拒絶されたが、Group IIすなわち術後CTLA4Ig投与群では生着期間が有意に延長した。Group IIのコントロール群であるhIgGを用いたGroup IIIでは移植片はGroup I同様日数で拒絶され、このことからGroup IIにおける生着延長は外因性蛋白の非特異的enhancing効果ではないと考えられた。Group IVはGroup VIIIのコントロール群であり、CTLA4Igを術前投与し移植を行った群であるが、移植片の生着延長効果はなかった。次に強力な同種抗原提示活性をもつDCを前投与した群Group Vでは

移植片の生着日数は無処置コントロール群と比べ有意に短縮した。次に *in vitro* では有効であった DC に *ex vivo* で CTLA4Ig を coating し術前投与した群でも、コントロール群である Group VI 同様拒絶の促進は回避できなかった。十分な量の CTLA4Ig を DC の投与と同時に術前投与した Group VIII では、有意に移植片の生着延長が得られた。この生着延長効果は DC および hIgG の組み合わせでは生じなかった。

4. 長期生着モデルにおける皮膚移植 (Table 2)

長期生着が得られた Group II および Group VIII において長期生着個体への皮膚移植を行った。各々から3匹を選び皮膚移植レシピエントとし、syngeneic ドナーとして WKAH、腎移植片と同一 allogeneic strain である LEW、および third party コントロールドナーとして ACI からの皮膚を各々2片ずつ移植した。すべてのレシピエントで移植腎と同系の LEW の皮膚移植片は50日以上が生着が得られた。また対照同種の ACI の皮膚移植片は15日以内に拒絶された。ナイーブな WKAH ラットでは LEW の皮膚移植片は早期に拒絶された。これらから、Group II, VIII においてドナー特異的免疫不応答が誘導されていると思われた。

5. 長期生着モデルにおける血清サイトカインの測定

Group II および Group VIII において長期生着が得られたモデルに関し Th1/Th2 バランスの状態を検討するために、血清中サイトカインを各々の対照群である Group III, Group IX とあわせて測定した。Th1 サイトカインとして IL-2, IFN- γ , Th2 サイトカインとして IL-4, IL-10 を測定した。Figure 4 には Group II および Group III における経時的血清サイトカインの値を示す。IL-2 は有意な変化を示さなかったが移植後早期の IFN- γ は Group II は Group III に比べ有意に低値であった (4日目で $p=0.025$)。また IL-4, IL-10 の推移は特徴的であり、移植後早期には IL-4 は Group II が有意に高値で (4日目 $p=0.006$) 移植後30日まで高値で徐々に下降した。一方 IL-10 では30日目までは2群間に差を認めなかったが、Group II で徐々に上昇し100日を越えると有意に高値を示すという対称的な結果が得られた。また同様の測定を Group VIII および Group IX において行った (Fig. 5)。概して、長期生着ラットの Th1/Th2 サ

イトカイン濃度はGroup II, IIIでみられたのと同様の傾向を示した。Th1サイトカインについては有意な変化はなく, Th2サイトカインについてはGroup VIIIにおいて早期にはIL-4が上昇しやがて下降し, 逆に長期的にはIL-10の上昇が1頭においてみられたが統計学的有意差はなかった。

6. 長期生着モデルにおける病理組織学的検討

Group IIおよびGroup VIIIの長期生着モデルの移植腎生検を施行し, HE染色標本にて検討した。両群とも糸球体, 尿細管の構造は良く保たれ, 動脈, 細動脈とも正常であった。リンパ球主体の炎症性細胞浸潤は間質に軽微にみられたのみであった (Fig.6)。

考察

本研究で用いられたDCは表面にMHC class IIのみならず副刺激伝達分子であるCD80/86が強力に発現し, allogeneicのみならず, autologous MLRさえも強力に起こしうるprofessional APCである。本研究でも示されたが, DCの同種抗原提示能は移植前に1回投与された場合でも促進型急性拒絶反応を惹起させることができることから, 非常に強力であることがわかる。しかしCTLA4IgはこのDCをstimulatorとする同種MLRを培養開始時に添加することで抑制することが可能であった。また予めCTLA4IgをDCに結合させておいても, 余剰のCTLA4Igなしで濃度依存性にMLRを抑制できることが示された。このようなCTLA4Igの投与法は余剰のCTLA4Igによる非特異的免疫抑制が起きない点から, 移植後の感染症や, 腫瘍の発生という臓器移植にまつわる免疫抑制状態の問題点を解決できる可能性を秘めている。しかしながら, このようなCTLA4Igを結合させたドナーDCを移植前に投与しても前感作は免れず, 移植片は早期に拒絶された (Group VI)。すなわちこの群では, 依然 *in vivo*でのDCの強力な同種抗原提示能が保持されることを示している。これは結合させたCTLA4Igの脱落, あるいは細胞内への取り込み, さらには新規に発現するCD80/86分子からの副刺激が伝達される可能性が推測される。Steurerら²⁷⁾は筆者同様 *ex vivo*でCTLA4/Fcでcoatingした同種膵島細胞を移植し長期生着を保っているが, これは根本的に2つの細胞すなわちDCと膵島細胞ではT cell刺

激能が異なる点によるものであり、おそらくは副刺激伝達分子やturn overの発現の差にもよっているのであろう。

本研究ではさらに移植前のDCの静脈内投与に加えCTLA4Igを腹腔内投与しているが、この場合はDCの強力な同種抗原提示能が抑制され移植片は長期に生着することが観察された。この現象はDCとCTLA4Igを共に投与した場合（Group VIII）のみにみられ、DCの単独投与群やコントロール蛋白であるhIgGを投与した場合にはみられず（Group V, VII, IX）、またCTLA4Igのみを移植前に投与した群（Group IV）でもみられなかった。これらの長期生着ラットに皮膚移植をおこなったが、移植腎と同一strainであるLEWの皮膚移植片のみ長期に生着し、third partyであるACIは拒絶された。このことから生着延長のメカニズムとしてドナー特異的免疫学的無反応状態が誘導されており、これはDCからT cellへの不完全な抗原提示の結果であると思われた。すなわちCD80/86からCD28への副刺激のブロックにより同種抗原特異的T cell不応答が誘導された可能性が高い。

同種臓器移植の結果によりもたらされる同種特異的免疫学的無反応状態はclonal deletion, suppressorの誘導、あるいはT cellトレランスにより維持されているとされるが、完全には解明されていない。近年、Th1/Th2 バランスが同種抗原を含む様々な抗原に対する免疫応答を制御する際に重要な鍵を握っているとされている。このTh1/Th2 バランスはThサブタイプ特異的サイトカインを同定することで評価が可能である。本研究の長期生着モデルは特徴的なサイトカインの推移を示す傾向がみられた。すなわち移植後早期にはIL-4は上昇し、長期的にはIL-10の上昇がみられる点である。これらTh2タイプのサイトカインが優位であることから、Th2細胞が免疫応答を負に制御している可能性がある。今回検討に用いた検体数は少ないため結論を出すのは性急であるが、おそらく同種特異的免疫不応答においてIL-4は導入期に関与し、IL-10は維持期に関与しているのであろう。Group II, VIIIにおいて何頭かは長期生着が得られず、早期に拒絶されているが、これらはTh2優位のバランス導入がなされなかった結果とも考えられる。

Group IIはすでに諸家の報告²⁸⁻³²⁾にあるように術後CTLA4Igを投与し生着延長が得られた群であるが、Sayeghら³¹⁾はワンショットのCTLA4Igにて長期

生着が得られたラット同種腎移植片の免疫組織学検討では長期的にもIL-10ではなくIL-4の発現がみられるとしている点が筆者の検討とは異なる。またCTLA4Igのワンショットは、ラット慢性拒絶モデルにおいても慢性拒絶が回避されるとする報告もある^{33,34)}。いずれも作用機序は同種抗原認識の抑制に寄与しているためとされている。今回の研究では、Group VIIIでも長期生着が得られた。Onoderaら³⁵⁾は前感作モデルでさえ、DST (donor specific transfusion) とCTLA4Igを併用することで、同種心移植片の長期生着が可能であったと報告しており、ドナー抗原、特にDCの投与とCTLA4Igの併用は投与量、投与方法の詳細な吟味が今後の検討課題である。なお今回長期生着がえられたII群およびVIII群におけるtoleranceの同種抗原特異性やサイトカインの動態は類似していた。このことはVIII群と同様にII群においても同種抗原の認識における制御が重要であることを示唆するものと考えられる。しかしII群においては、これに加えeffector cellの分化誘導をも抑制していた可能性が考えられる。いずれにせよVIII群に示した方法は術前にドナー特異的免疫学的寛容状態を作り出せる可能性を秘めており、今回は検討できなかったが、移植前にドナー特異的免疫学的寛容状態の成立の有無を確認することができれば、引き続き移植後の免疫抑制剤の投与量の減量、あるいは中止を図れる可能性がある。その結果移植後合併症である感染症、悪性腫瘍の発症率を減ずることができるとは思われる。今回長期生着が得られたCTLA4Igの投与方法は全身投与であり術前、術後を問わず非特異的免疫抑制状態を誘導する可能性は否めず、CTLA4Igの投与方法に関してはさらなる検討が必要であると思われた。

結語

- ドナー脾樹状細胞およびCTLA4Igを用いラット同種異型腎移植を行った。
- i) ドナー樹状細胞の腎移植前投与は促進型急性拒絶反応(AAR)を惹起した。
 - ii) CTLA4Igの術後単独投与は移植片の生着を有意に延長させた。
 - iii) *in vitro* で有効であった樹状細胞にCTLA4Igを結合させ前投与する方法では、AARは回避できなかった。
 - iv) 樹状細胞とCTLA4Ig術前投与により、術後免疫学的操作なしに移植片の生着の延長が可能であった。

v) 100日以上長期生着が得られたgraftの病理組織学的所見では、2群とも間質の細胞浸潤は極めて軽度であった。

vi) 上記長期生着群では、2群とも皮膚移植にてドナー特異的免疫学的不応答の誘導がもたらされていると考えられた。

vii) 長期生着群2群の血清Th1/Th2サイトカインを測定したところ、CTLA4Ig単独群 (Group II) では早期ではIL-4、長期的にはIL-10の増加が関与していた。一方CTLA4Ig、ドナー樹状細胞術前投与群 (Group VIII) では、同様の傾向がみられたが統計学的有意差は得られなかった。

viii) 以上の結果からドナー樹状細胞からの副刺激を抑制することにより術前操作による移植片生着延長の可能性が示された。

謝辞

稿を終えるにあたりご校閲、ご指導を賜りました北海道大学医学部泌尿器科学講座 小柳知彦教授ならびに同病理学第一講座 吉木 敬教授、北海道大学免疫研究所免疫病態部門 上出利光教授に深甚なる謝意を表します。あわせて終始直接のご指導をいただきました病理学第一講座 石倉 浩助教授、免疫研究所免疫病態部門 村上正晃助手をはじめ第一病理学講座、免疫研究所免疫病態部門の諸氏に深謝いたします。また貴重な抗体をご供与していただいた大阪大学バイオメディカル教育センター宮坂昌之教授に心から感謝いたします。

文献

1. Sayegh MH, Turka LA (1998): The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* **338**:1813-1821.
2. Salvatierra O, Vincenti F, Amend W, Potter D, Iwaki I, Opelz G, Terasaki P, Duca R, Cochrum K, Hanes D, Stoney RJ, Feduska NJ (1980): Deliberate donor-specific transfusions prior to living related renal transplantation: a new approach. *Ann Surg* **192**: 543-552.
3. Burlingham WJ, Grailer A, Sparks-Mackety EMF, Sondel PM, Sollinger HW (1987): Improved renal allograft survival following donor-specific transfusions: II. in vitro correlates of early (DST-type) rejection episodes. *Transplantation* **43**: 41-46.
4. Burlingham WJ, Grailer A, Sondel PM, Sollinger HW (1988): Improved renal allograft survival following donor-specific transfusions. *Transplantation* **45**: 127-132.
5. Jenkins MK, Taylor PS, Norton SD, Urdahl KB (1991): CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* **147**: 2461-2466.
6. Schwartz RH (1992): Costimulation of T lymphocytes: the role of CD 28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* **71**: 1065-1068.
7. Steinman R, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA (1979): Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: V. purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med* **149**: 1-16.
8. Klinkert WEF (1990): Lymphoid dendritic accessory cells of the rat. *Immunol Rev* **117**: 103-120.
9. Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM (1990): Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens: a novel

- pathway for initiation of rejection. *J Exp Med* **171**: 307-314.
10. Lechler R, Batchelor JR (1982): Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med* **155**: 31-34.
 11. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R (1996): Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Med* **2**: 52-58.
 12. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Yuansheng, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D (1998): Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nature Med* **4**: 328-332.
 13. Steinbrink K, Wolfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH (1997): Induction of tolerance by IL-10 treated dendritic cells. *J Immunol* **159**: 4772-4780.
 14. Rastellini C, Lu L, Ricordi C, Starzl TE, Rao AS, Thomson AW (1995): Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor stimulated hepatic dendritic cell progenitors prolong pancreatic islet allograft survival. *Transplantation* **60**: 1366-1370.
 15. Lu L, McCaslin D, Starzl TE, Thomson AW (1995): Bone marrow-derived dendritic cell progenitors (NLDC 145⁺, MHC class II⁺, B7-1^{dim}, B7-2⁻) induce alloantigen-specific hyporesponsiveness in murine T lymphocytes. *Transplantation* **60**: 1539-1545.
 16. Fu F, Li Y, Qian S, Lu L, Chambers F, Starzl TE, Fung JJ, Thomson AW (1996): Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC Class II⁺, CD80^{dim}, CD86⁻) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. *Transplantation* **62**: 695-665.
 17. Pearson TC, Alexander DZ, Hendrix R, Elwood ET, Linsley PS, Winn KJ, Larsen CP (1996): CTLA4-Ig plus bone marrow induces

- long-term allograft survival and donor-specific unresponsiveness in the murine model: evidence for hematopoietic chimerism. *Transplantation* **61**: 997-1004.
18. Stadlbauer THW, Schaub M, Korom S, Onodera K, Sayegh MH, Kupiec-Weglinski JW (1997): CD28 T-cell co-stimulatory blockade potentiates the effects of intrathymic immunomodulation in sensitized graft recipients. *Transplantation* **64**: 1816.
 19. Linsley PS, Wallace PM, Johnson J, Gibson MG, Greene JL, Ledbetter JA, Singh C, Tepper MA (1992): Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* **257**: 792-795.
 20. Nakagawa I, Murakami M, Ijima K, Chikuma S, Saito I, Kanegae Y, Ishikura H, Yoshiki T, Okamoto H, Kitabatake A, Uede T (1998): Persistent and secondary adenovirus-mediated hepatic gene expression using adenovirus vector containing CTLA4IgG. *Hum Gene Ther* **9**: 1739-1745.
 21. Tamatani T, Miyasaka M (1990): Identification of monoclonal antibodies reactive with the rat homolog of ICAM-1, and evidence for a differential involvement of ICAM-1 in the adherence of resting versus activated lymphocytes to high endothelial cells. *Int Immunol* **2**: 165-171.
 22. Knight SC, Farrant J, Bryant A, Edwards AJ, Lever BA, Clarke J, Webster ADB (1986): Non-adherent, low density cells from human peripheral blood contain dendritic cells and monocytes, both with veiled morphology. *Immunology* **57**: 595-603.
 23. Havenith CEG, Breedijk AJ, Verdaasdonk MAM, Kamperdijk EWA, Beelen RHJ (1992): An improved and rapid method for the isolation of rat lymph node or spleen T lymphocytes for T cell proliferation assays. *J Immunol Methods* **153**: 73-79.
 24. Severson CD, Burg DL, Lafrenz DE, Feldbush TL (1987): An

- alternative method of panning for rat B lymphocytes. *Immunol Lett* **15**: 291-295.
25. Lee S (1967): An improved technique of renal transplantation in the rat. *Surgery* **61**: 771-773.
 26. Chikaraishi T, Ishikura H, Seki T, Koyanagi T, Yoshiki T (1995): Effect of 15-deoxyspergualin (DSG) on rat kidney allograft; immunological mechanisms implicated in prolonged survival. *J Urol* **154**: 2197-2202.
 27. Steurer W, Nickerson PW, Steele AW, Steiger J, Zheng XX, Strom TB (1995): Ex vivo coating of islet cell allografts with murine CTLA4/Fc promotes graft tolerance. *J Immunol* **155**: 1165-1174.
 28. Pearson TC, Alexander DZ, Winn KJ, Linsley PS, Lowry RP, Larsen CP (1994): Transplantation tolerance induced by CTLA4-Ig. *Transplantation* **57**:1701-1706.
 29. Bolling SF, Lin H, Wei RQ, Linsley P, Turka LA (1994): The effect of combination cyclosporine and CTLA4-Ig therapy on cardiac allograft survival. *J Surg Res* **57**: 60-64.
 30. Lin H, Bolling ST, Linsley PS, Wei RQ, Gordon D, Thompson CB, Turka LA (1993): Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion. *J Exp Med* **178**: 1801-1806.
 31. Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, Russell ME, Carpenter CB, Linsley PS, Turka LA (1995): CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med* **181**: 1869-1874.
 32. Perico N, Amuchastegui S, Bontempelli M, Remuzzi G (1996): CTLA4Ig alone or in combination with low-dose cyclosporine fails to reverse acute rejection of renal allograft in the rat. *Transplantation* **61**: 1320-1322.
 33. Russell ME, Hancock WW, Akalin E, Wallace AF, Glysing-Jensen T,

Willett TA, Sayegh MH (1996): Chronic cardiac rejection in the LEW to F344 rat model. *J Clin Invest* **97**: 833-838.

34. Azuma H, Chandraker A, Nadeau K, Hancock WW, Carpenter CB, Tilney NL, Sayegh MH(1996): Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12439-12444.
35. Onodera K, Chandraker A, Schaub M, Stadlbauer THW, Korom S, Peach R, Linsley PS, Sayegh MH, Kupiec-Wesglinski JW (1997): CD28-B7 T cell costimulatory blockade by CTLA4Ig in sensitized rat recipients: induction of transplantation tolerance in association with depressed cell-mediated and humoral immune responses. *J Immunol* **159**: 1711-1717.

Table 1. Renal allograft survival with preoperative administration of donor dendritic cells in combination with CTLA4Ig^a

Group	Treatment	Graft survival (days)	Mean survival time (days)
I	None	6, 7, 8, 8, 10, 10	8.2±1.6
II	Post-transplant CTLA4Ig	14, 21, 28, 50, >100, >100, >100, >100	>68.1±39.0 ^b
III	Post-transplant hIgG	6, 6, 7, 7, 8, 8	7.0±0.9
IV	Pre-transplant CTLA4Ig	6, 6, 8, 8, 8, 9	7.5±1.2
V	DCs	3, 3, 3, 4, 5, 5, 6, 6	5.0±2.2 ^c
VI	DCs coated with CTLA4Ig	3, 3, 5, 5, 5, 6, 7, 7, 8	5.6±1.7
VII	DCs coated with hIgG	3, 3, 4, 4, 4, 6	4.0±1.1
VIII	DCs and pre-transplant CTLA4Ig	4, 4, 4, 10, 15, 16, 21, 30, 41, >60, >100, >100, >100	>38.8±38.3 ^d
IX	DCs and pre-transplant hIgG	3, 3, 3, 4, 5, 5, 5, 5	5.3±4.1

^aCTLA4Ig 500 µg/ml was given intraperitoneally on days 0 (day of renal transplantation), 2, and 4 in Group II, and on days -9 (nine days before renal transplantation), -7, and -5 in Groups IV and VIII. Human IgG (hIgG) at 500 µg/ml was given intraperitoneally on days 0, 2, and 4 in Group III, and on days -9, -7, and -5 in Group IX. Dendritic cells (DCs) of the donor strain were intravenously injected on days -9 in Groups V, VI, VII, VIII, and IX.

In addition, DCs inoculated in Groups VI and VII were coated with either CTLA4Ig or hIgG. ^bp<0.01 vs. Group I,

^cp<0.01 vs. Group I, ^dp=0.085 vs Group I, p<0.02 vs. Group V.

Table 2. Skin graft survival in long-term renal allograft survivors^a

Recipients of skin graft	Graft survival (days)		
	Skin graft from WKAH	Skin graft from LEW	Skin graft from ACI
Rat #1 in Group II	>50, >50	>50, >50	10, 11
Rat #2 in Group II	>50, >50	>50, >50	13, 15
Rat #3 in Group II	>50, >50	>50, >50	14, 15
Rat #1 in Group VIII	>50, >50	>50, >50	12, 13
Rat #2 in Group VIII	>50, >50	>50, >50	14, 14
Rat #3 in Group VIII	>50, >50	>50, >50	13, 14
Naïve WKAH rat	>50, >50	12, 16	13, 13

^aSkin tissues from WKAH (syngeneic), LEW (allogeneic, experimental), and ACI (allogeneic, third-party) were transplanted to long-term survivors in Groups II and VIII (each, n=3). Two pieces of skin tissues were transplanted from respective donor strains, resulting in six skin patches on the dorsum. Complete necrosis of graft was defined as rejection. Observation of the grafts stopped on day 50.

Figure Legends

FIGURE 1. Surface antigen profile of purified dendritic cells (DCs) from the spleen of the rat. This is representative of three independent experiments.

FIGURE 2. Stimulatory activity of DCs to autologous and allogeneic T cells detected by the mixed lymphocyte reaction (MLR). Mitomycin C-treated DCs (▲), lymphnode cells (LNC, ●), and spleen cells (SPC, ■) of LEW origin are stimulatory cells, while responder cells are LNCs from LEW (syngeneic, A), WKAH (allogeneic, B), and ACI (allogeneic, third-party, C).

FIGURE 3. Effect of CTLA4Ig on LEW-to-WKAH mixed lymphocyte reaction (MLR). Purified CTLA4Ig at various concentrations is added to the medium at the beginning of MLR, remaining mixed throughout the reaction (A). Purified CTLA4Ig at various concentrations is added to DC suspension for 60 min, and they are washed four times with phosphate buffered saline, followed by MLR (B).

FIGURE 4. Cytokine profile in the serum of long-surviving recipients in Groups II (○) and III (●).

FIGURE 5. Cytokine profile in the serum of long-surviving recipients in Groups VIII (◇) and IX (◆).

FIGURE 6. Histology of renal grafts from long-surviving recipients in Groups II (a) and VIII (b).



FIGURE 1

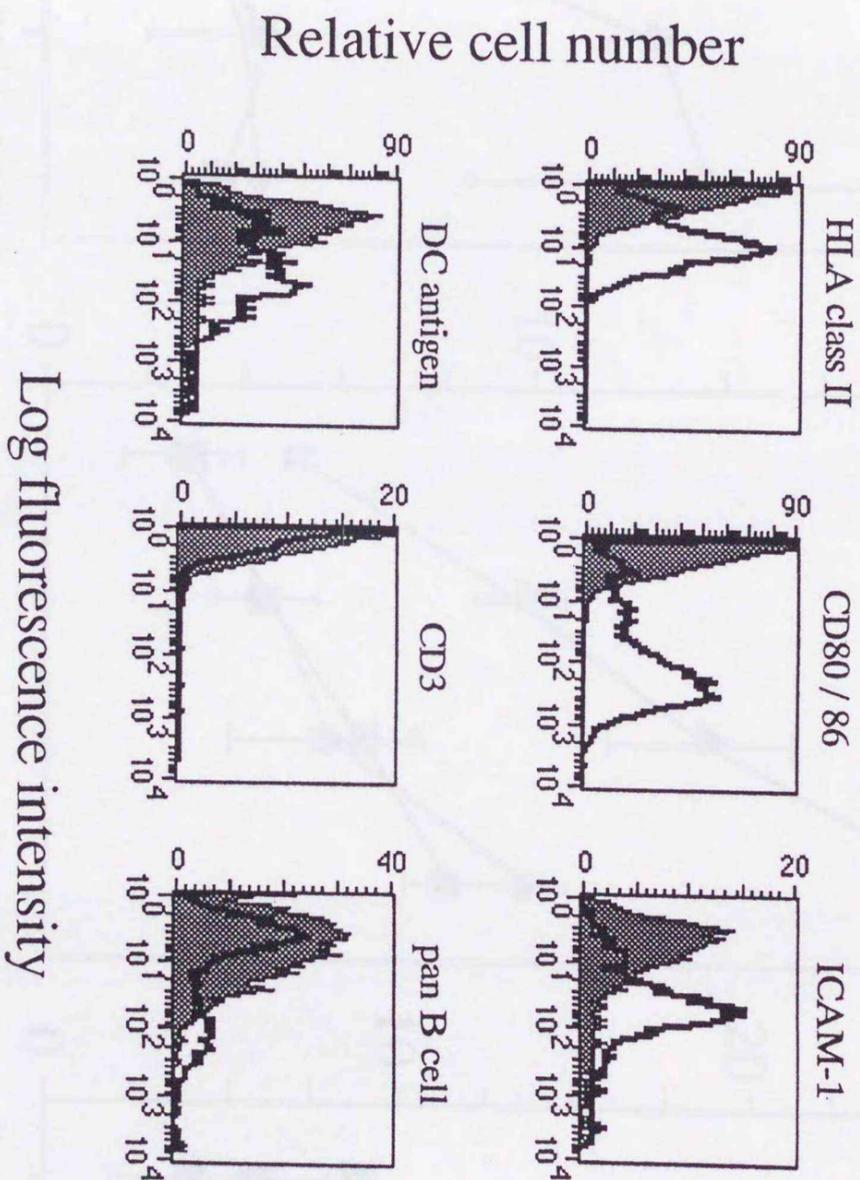
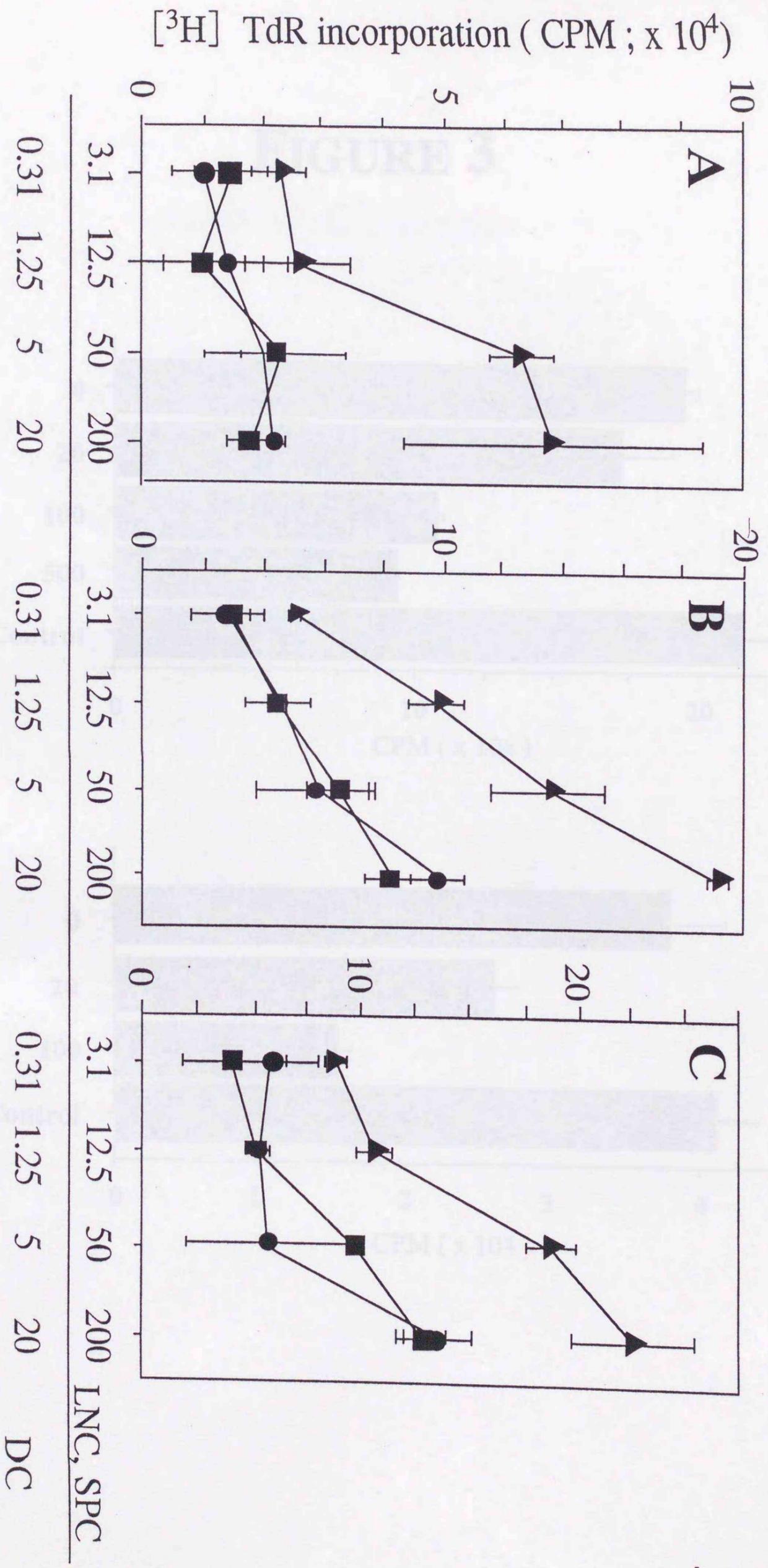


FIGURE 2

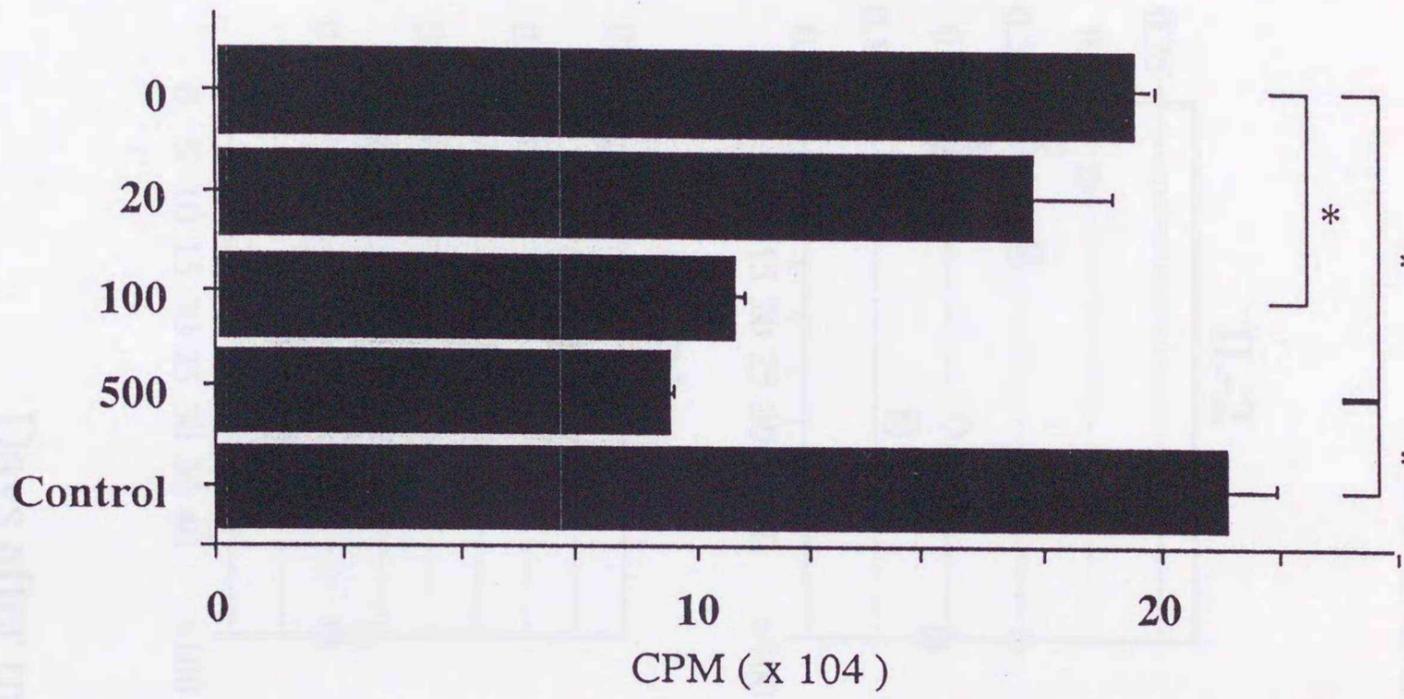


Number of stimulator cells ($\times 10^3$)

FIGURE 3

A

Concentration of CTLA4Ig ($\mu\text{g/ml}$)



B

Concentration of CTLA4Ig ($\mu\text{g/ml}$)
in Coating of DC

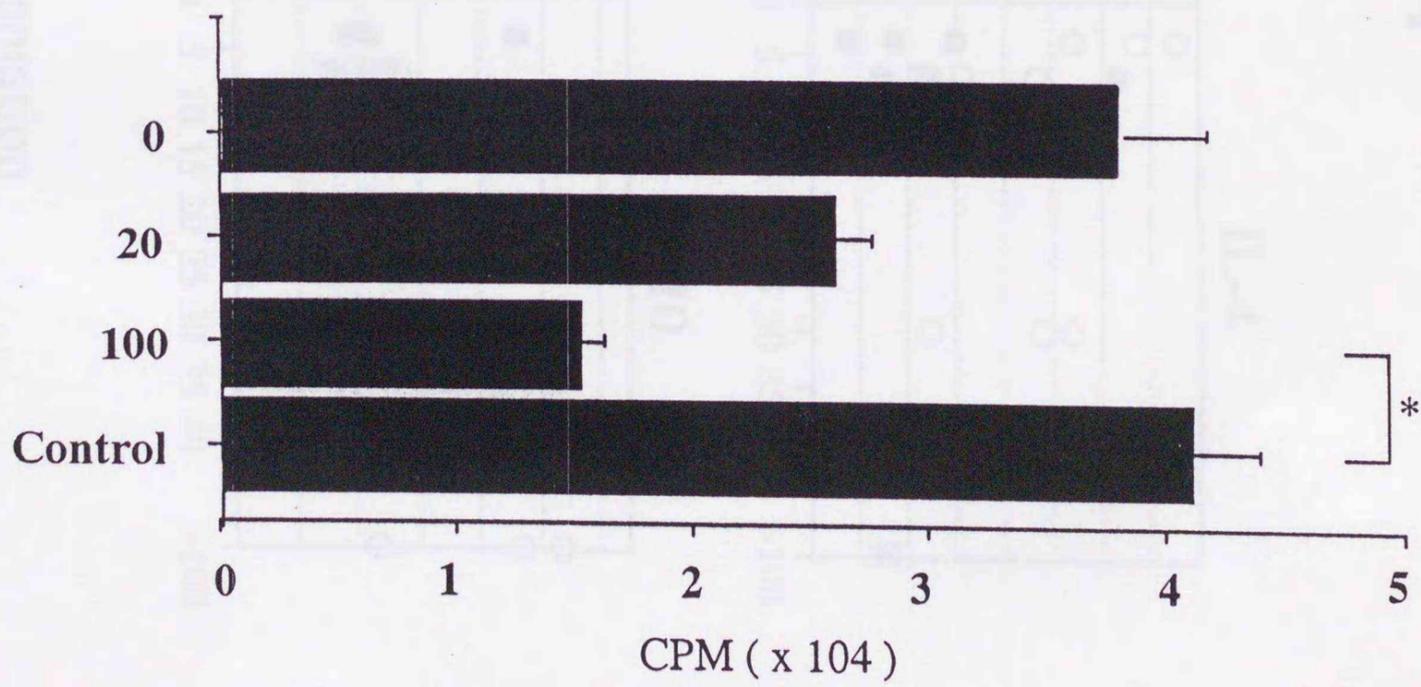


FIGURE 4

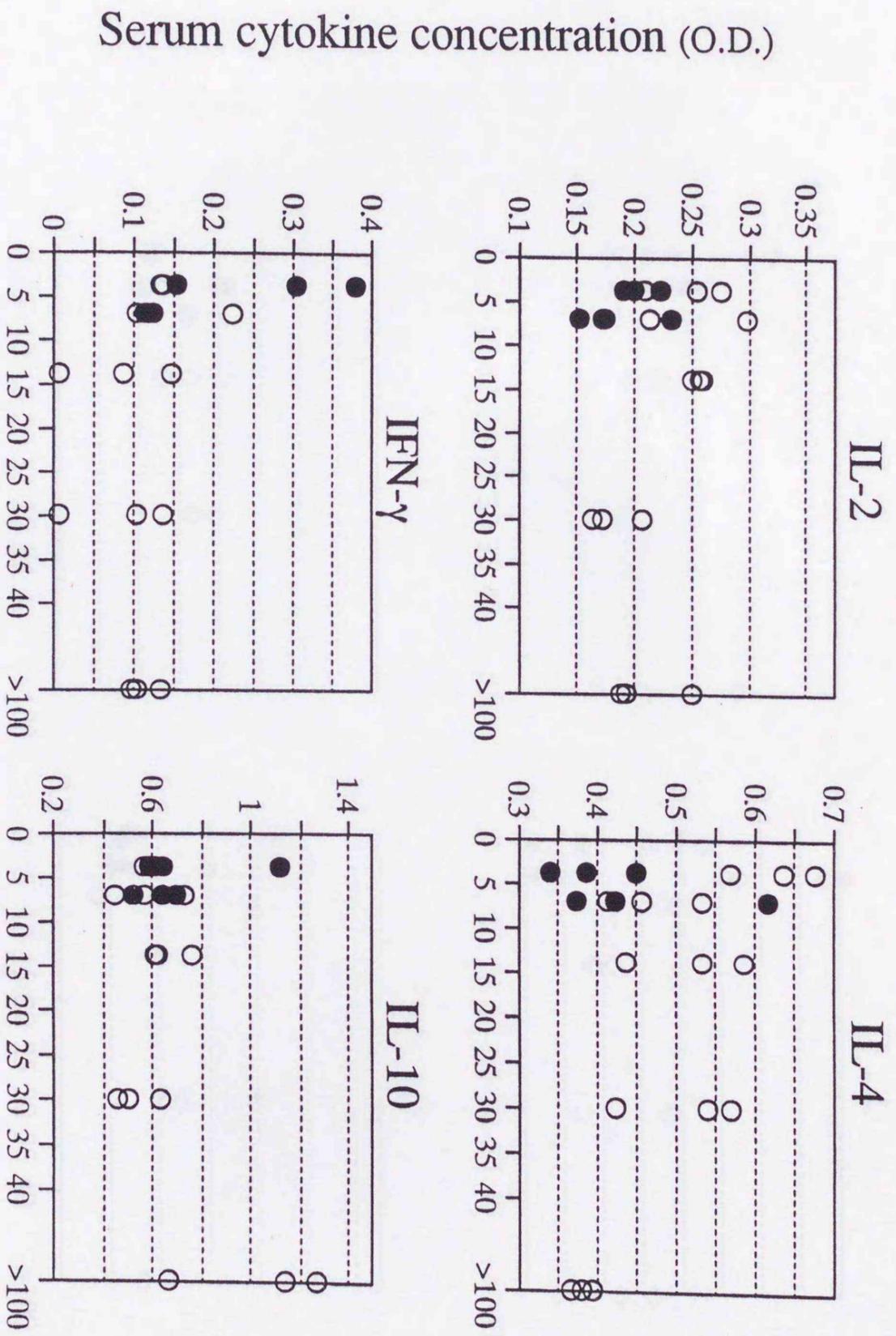
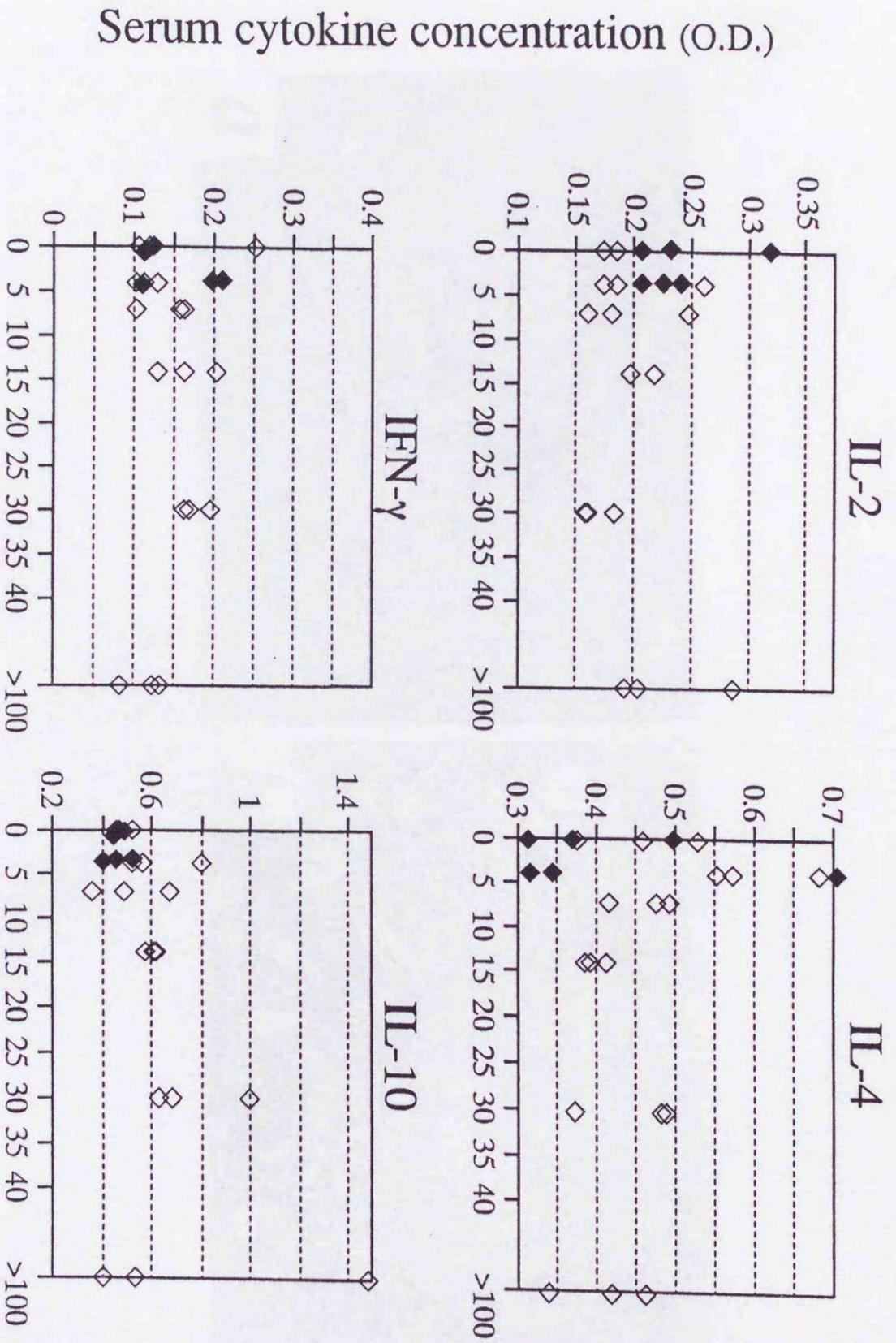


FIGURE 5



Days after transplantation

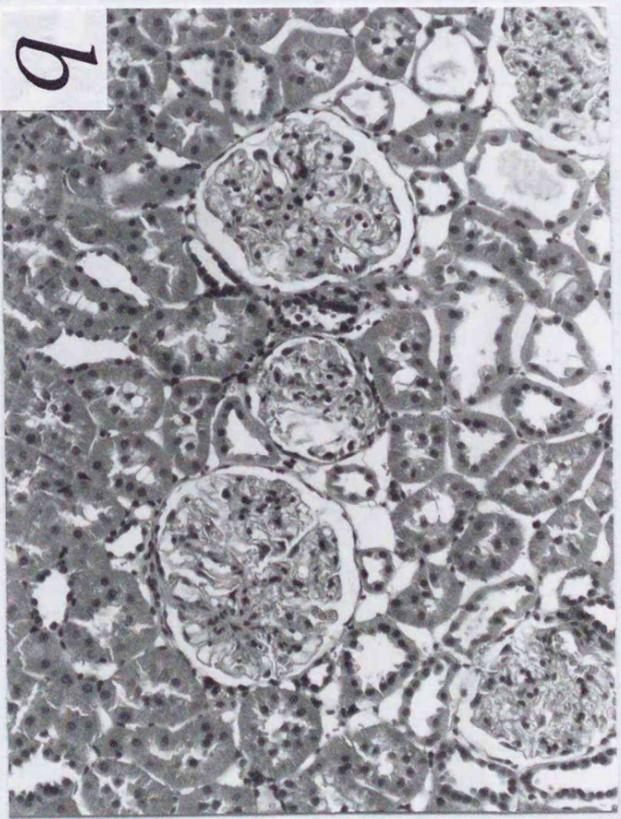
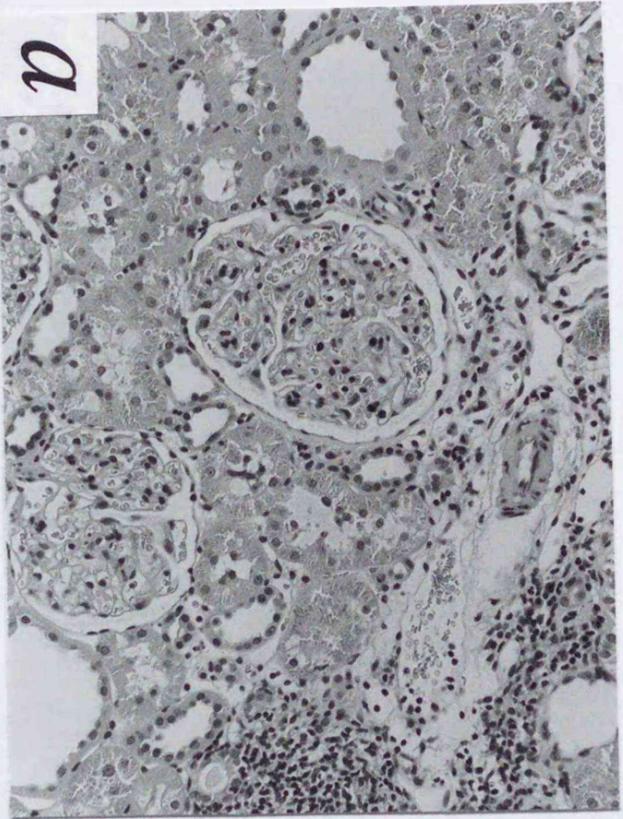


FIGURE 6



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Blue

Cyan

Green

Yellow

Red

Magenta

White

3/Color

Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A

1

2

3

4

5

6

M

8

9

10

11

12

13

14

15

B

17

18

19