



Title	新規化合物 “NK026680” とDonor specific transfusionの併用による免疫抑制効果 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	江本, 慎
Description	配架番号 : 2363
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12984号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70389
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Shin_Emoto_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 江本 慎

学 位 論 文 題 名

新規化合物 “NK026680” と Donor specific transfusion の併用による免疫抑制効果
(The Immunosuppressive effect of ”NK026680” in combination with Donor specific transfusion)

【背景と目的】

臓器移植は臓器不全に対する究極の治療法である。一卵性双生児間の同種同型臓器移植であれば拒絶反応は起こらず臓器はレシピエントに受け入れられるが、同種異型臓器移植の場合には拒絶反応により移植臓器が拒絶される。免疫抑制剤の開発により、固形臓器移植の成績は各段に向上したが、免疫抑制剤の終生投与による二次発癌、感染症、代謝異常などの副作用の問題が未解決である。そのため、ドナー抗原特異的な免疫寛容の誘導法の開発が期待される。

臨床腎移植において、1960 年代から術前輸血による成績の向上効果が報告されており、実験的にはドナー血液が用いられることから、donor-specific transfusion (DST) と呼ばれた。DST は、さまざまな免疫抑制剤や免疫抑制作用のある生物製剤と併用され、その効果が立証されてきた。DST の作用は、レシピエントの樹状細胞によるドナー抗原取り込みと T 細胞への提示により発揮される。さまざまな機序が報告されているが、そのひとつにドナー抗原特異的制御性 T 細胞の誘導がある。

新規化合物 NK026680 は、樹状細胞の修飾作用を有する薬物として開発された。樹状細胞の成熟や活性化を抑制することで、さまざまな動物モデルで免疫抑制効果を示した。

本研究の目的は、新規化合物 NK026680 と DST の併用による免疫抑制作用を調べ、その機序を明らかにすることである。

【材料と方法】

レシピエントに C57BL/6 (H2^b)、ドナーに BALB/c (H2^d)、3rd-party に C3H (H2^k) を使用した。移植予定日の 7 日前 (day -7) にドナーもしくは 3rd-party の脾細胞 20×10^6 個を静脈投与し、DST とした。NK026680 は 40 mg/kg/日で day -7～day 6 に経口投与した。グラフトはドナーもしくは 3rd-party の心臓を用い、レシピエントの腹腔内に移植した。心拍動の触診により拒絶を評価し、拍動の停止は開腹して確認した。治療を施さない群を無治療群、DST 単独治療を DST 群、NK026680 単剤投与群を NK 群、DST と NK026680 を併用した群を NK+DST 群とし、4 群の移植心生着期間を評価した。また、移植直前 (day 0)、ドナー抗原再投与 24 時間後および心移植後 (day 4, day 7, day 14) のレシピエントの脾細胞およびグラフト浸潤細胞を回収して免疫学的評価を行った。また、抗 CD25 抗体 (PC61) の、DST と NK026680 の併用治療に及ぼす効果につき検討した。

【結果】

無治療群ではドナー移植心は 7 日以内に全例拒絶された。DST 群、NK 群では中央値 24.5 日、25.5 日とグラフト生着期間が有意に延長したが、NK+DST 群では、中央値 75.5 日とグラフト生着期間が著明に延長した。NK026680 とドナー血液による DST の併用治療を行ったレシピエントマウスへ 3rd-party グラフトを移植した場合の生着期間は中央値 22.0 日で、3rd-party の血液による DST と NK026680 の併用治療したレシピエントマウスのドナーグラフトの生着期間は 30.5 日であり、いずれも DST とグラフトをドナーで行った場合よりも生着期間が有意に短かった。

day 0 の脾細胞中の CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞の割合は各群で有意差を認めなかったが、day 0 にドナーの脾細胞で再度刺激して翌日回収した脾細胞では、NK+DST 群で他群に比べて有意に CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞の割合が増加した。3rd-party で再刺激した場合にはこの増加は認めなかった。また、day 0 の脾細胞を CFSE で染色して *in vitro* でドナー抗原と培養し、細胞の分裂を調べたところ、NK+DST 群で分裂する T 細胞の CD4/CD8 比が有意に高く、ドナー抗原に対して分裂する CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞が有意に増加した。3rd-party の脾細胞と培養した場合には CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞の分裂は有意に少なかった。移植前の脾細胞中の活性化 T 細胞 (CD44⁺、CD62L⁺) の割合を検討したところ、CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞および CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞の CD44 の発現は DST 群、NK+DST 群で有意に高かった。また、CD8⁺ T 細胞の CD44 の発現および CD62L の陰転化は、DST 群が他群に比べて有意に高かった。

移植後、day 14 の脾細胞中の CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞は NK 群、NK+DST 群で有意に高かった。day 7 のグラフト中の CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞の割合は各群で有意差がなかったが、細胞数は NK 群、NK+DST 群で有意に多かった。脾細胞中の CD8⁺ T 細胞の活性化マーカーを調べたところ、day 4 で NK 群、NK+DST 群で CD44 の発現が有意に抑制され、day 7 では DST 群、NK 群、NK+DST 群で、無治療に対して CD44 の発現および CD62L の陰転化が有意に抑制された。IFN- γ 産生 CD8⁺ T 細胞は NK 群、NK+DST 群で無治療群、DST 群に対して有意に抑制された。NK+DST 群でグラフト内の CD4⁺ T 細胞の割合、細胞数とも有意に増加し、DST 群でグラフト内の CD8⁺ T 細胞の割合、細胞数とも有意に増加した。グラフト浸潤細胞の CD4/CD8 T 細胞比を検討すると、NK+DST 群で無治療群、DST 群に比べて有意に高かった。

抗 CD25 抗体を day -7 に投与することで、DST と NK026680 の併用治療を行っても生着期間が中央値で 11.0 日に有意に短縮した。また、抗 CD25 抗体の投与により、グラフト内の CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞は有意に減少した。

【考察】

DST と NK026680 を併用した場合、無治療群や DST・NK026680 の単独治療群と比べて有意に生着期間が延長し、併用による免疫抑制効果の増幅が示された。また、3rd-party を使用したグラフト生着期間の検討により、DST と NK026680 の併用による免疫修飾効果にはドナー特異性があると考えられた。移植前 (day 0) の脾細胞を用いた検討では、*in vivo*、*in vitro* のいずれにおいても、DST と NK026680 の併用治療によってドナー抗原刺激に対する CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞の増加を認め、移植後にはグラフト内の CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞の増加を認めた。さらに、抗 CD25 抗体の投与により DST と NK026680 の併用治療のグラフト生着延長効果が阻害され、グラフト内の CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞が有意に減少した。これらの結果は、DST と NK026680 の併用治療により、ドナー特異的な CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞が誘導され、グラフト生着延長効果を発揮したことを強く示唆する。

また、DST 単独治療では、CD8⁺ T 細胞の活性化およびグラフト浸潤を認めたが、DST に NK026680 を併用することにより、CD8⁺ T 細胞の活性化、サイトカイン産生およびグラフト浸潤を抑制することができた。ドナー特異的 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞の誘導に加え、アロ反応性 CD8⁺ T 細胞を抑制することが、グラフト生着期間の延長に寄与した可能性が考えられた。

DST が免疫抑制作用を発揮するには MHC-class II 分子が必要であることが報告されており、樹状細胞によるドナー抗原の提示が重要である可能性がある。当教室では、NK026680 により *ex vivo* で調整された樹状細胞に CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞誘導効果と免疫抑制作用があることを報告しており、本研究においても、DST によって供給されたドナー抗原が、NK026680 によって *in vivo* で誘導された抑制性樹状細胞によって提示されることでドナー特異的な免疫抑制作用を発揮した可能性が考えられた。

【結語】

DST と NK026680 の併用治療はドナー特異的な免疫抑制作用を有し、*in vivo* でドナー抗原特異的 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 制御性 T 細胞を誘導することでアロ移植心生着延長効果を示した。NK026680 は制御性 T 細胞を阻害しない可能性があり、既存の免疫抑制剤に加えて新たな免疫抑制療法の選択肢となりうる可能性が示唆された。