



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒト化マウスモデルを用いた生体肝移植後レシピエントのアロ抗原反応における新規解析法の検討
Author(s)	深作, 慶友
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14268号
Issue Date	2020-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14268
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/79425
Type	doctoral thesis
File Information	Yasutomo_FUKASAKU.pdf



学 位 論 文

ヒト化マウスモデルを用いた生体肝移植後レシピエントの
アロ抗原反応における新規解析法の検討

(Novel immune assay of allo-reactivity for living donor liver
transplant recipients by using humanized mouse model)

2020 年 9 月

北 海 道 大 学

深 作 慶 友

学 位 論 文

ヒト化マウスモデルを用いた生体肝移植後レシピエントの
アロ抗原反応における新規解析法の検討

(Novel immune assay of allo-reactivity for living donor liver
transplant recipients by using humanized mouse model)

2020 年 9 月

北 海 道 大 学

深 作 慶 友

目 次

発表論文目録および学会発表目録	・ ・ ・ ・ ・	1 頁
要旨	・ ・ ・ ・ ・	2 頁
略語表	・ ・ ・ ・ ・	4 頁
緒言	・ ・ ・ ・ ・	6 頁
方法	・ ・ ・ ・ ・	11 頁
結果	・ ・ ・ ・ ・	18 頁
考察	・ ・ ・ ・ ・	43 頁
結論	・ ・ ・ ・ ・	50 頁
謝辞	・ ・ ・ ・ ・	52 頁
利益相反	・ ・ ・ ・ ・	53 頁
引用文献	・ ・ ・ ・ ・	54 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Yasutomo Fukasaku, Ryoichi Goto, Yoshikazu Ganchiku, Shin Emoto, Masaaki Zaitzu, Masaaki Watanabe, Norio Kawamura, Moto Fukai, Tsuyoshi Shimamura, Akinobu Taketomi
Novel immunological approach to asses donor reactivity of transplant tecipients using a humanized mouse model
Human Immunology, 81・342-353, (2020)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 深作慶友, 後藤了一, 巖築慶一, 財津雅昭, 渡辺正明, 川村典生, 腰塚靖之, 山下健一郎, 嶋村剛, 武富紹信
ヒト化マウスモデルを用いたヒト T 細胞のアロ抗原に対する反応性の検討
第 117 回 日本外科学会定期学術集会, 2017 年 4 月 27-29 日, 横浜
2. Yasutomo Fukasaku, Ryoichi Goto, Yoshikazu Ganchiku, Masaaki Zaitzu, Masaaki Watanabe, Norio Kawamura, Yasuyuki Koshizuka, Kenichiro Yamashita, Tsuyoshi Shimamura, Akinobu Taketomi.
Novel Personalized Immune-Monitoring Assay for Predicting Operational Tolerance by Using Humanized Mouse Model.
American Transplant Congress. 2017 年 4 月 29 日-5 月 3 日, Chicago (U.S.A.)
3. Yasutomo Fukasaku, Ryoichi Goto
Novel Immune Monitoring Assay by Minimizing the Influence of Immunosuppressants for Living Donor Liver Recipients by Using Humanized Mouse Model.
第 47 回 日本免疫学会学術集会, 2018 年 12 月 10-12 日, 福岡
4. 深作慶友, 後藤了一, 巖築慶一, 渡辺正明, 川村典生, 島村剛, 武富紹信
生体肝移植におけるヒト化マウス新規免疫モニタリング法の有用性の検討
第 55 回 日本移植学会総会, 2019 年 10 月 10-12 日, 広島

要旨

【背景と目的】

臓器移植における移植後レシピエントの免疫状態を観察し、適切な免疫抑制療法の調整をするための指標となる解析法は未だ確立されておらず、特に免疫抑制剤の減量、中止の可否を判断し得る Biomarker は分かってない。既報の移植後レシピエントに対する免疫状態モニタリングはレシピエント T 細胞のドナー抗原に対するアロ反応をリンパ球混合反応 (MLR) により評価し、一定の有用性が示されている。しかし、これらはモニタリング時点での免疫抑制剤の効果を判定する指標であり、免疫抑制剤を減量、中止した際のドナー抗原に対する反応を予測、評価できるものではない。ヒト化マウスモデルはヒト免疫細胞を免疫不全マウスに再構築することで、ヒト免疫を解析できるツールとして新規薬剤や臓器移植における拒絶反応のメカニズム解析に用いられている。我々は、肝移植後レシピエントの末梢血単核球 (hu-PBMC) を NSG マウスに再構築し、免疫抑制剤から一時的に離脱させたヒト化マウスを作成した。このヒト化マウスから hu-PBMC を分離し、アロ反応を評価することで、免疫抑制剤のない状態のレシピエント本来の免疫状態を観察する新たな解析法を確立することを目的とした。

【対象と方法】

健常者 (n=5) と、生体肝移植後レシピエント (n=14) のうち免疫抑制療法中の症例 (On IS 群: n=10) と免疫抑制剤中止できている症例 (Off IS 群: n=4) のそれぞれよりヒト末梢血リンパ球 (hu-PBMC) を採取し、 2.5×10^6 個を 2.0Gy 放射線照射した NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm/Wjl}/Sz (NOD/SCID/IL2r γ ^{null}; NSG) マウスの腹腔内に投与した (hu-PBMC-NSG モデルの作成)。hu-PBMC 投与 21 日後に NSG マウス末梢血/脾/骨髓より hCD45⁺リンパ球を分離し、hCD45⁺リンパ球分画を Flow cytometry で評価した。また hCD3⁺T 細胞のドナー、3rd party 抗原に対するアロ反応を MLR で評価し、それぞれ NSG マウスに再構築する前の hu-PBMC (Fresh PBMC) と再構築した後の hu-PBMC (hu-PBMC-NSG) で比較した。

【結果】

健常者、On IS 群、Off IS 群間の Fresh PBMC の hCD45⁺リンパ球分画に有意差は無かった。また、全ての症例で hu-PBMC-NSG の作成に成功し、再構築後の hCD45⁺リンパ球分画は全群で hCD3⁺T 細胞が $86.3 \pm 1.8\%$ (n=19) と優位に再構築され、hCD3⁺リンパ球の再構築は数%であった。hu-PBMC-NSG における hCD3⁺T 細胞では、特に CD45RA⁻CD62L^{lo} effector memory T 細胞 (T_{EM})、CCR6⁺CXCR3⁺ Th1 細胞が優位な分画となった。また、hu-PBMC-NSG における再構築後の hCD3⁺T 細胞は

CD3/CD28 刺激には Fresh PBMC と同等に強い反応を示す一方で、アロ抗原に対するリンパ球増殖反応は全群で Fresh PBMC より有意に増幅された ($p < 0.05$)。更に移植後レシピエントにおいては、On IS 群で 10 例中 2 例の hu-PBMC-NSG のドナー抗原に対するリンパ球増殖反応が、3rd party 抗原に対する反応と比較して強く観察された。この 2 例は臨床経過で拒絶反応を繰り返す高リスク症例であった。一方、Off IS 群では、全例で Fresh PBMC と hu-PBMC-NSG においてドナー抗原に対する反応が 3rd party 抗原に比べて特異的に抑制されている donor-specific hyporesponsiveness が観察され、hu-PBMC-NSG でもドナー特異的反応抑制が維持されていた。この Off IS 群と同等の donor-specific hyporesponsiveness は On IS 群においても 10 例中 4 例で観察された。この 4 例の臨床経過は拒絶反応のエピソードが Off IS 群と同様に少なく、免疫抑制剤が減量できる可能性が示唆された。

【考察】

hu-PBMC を NSG マウスに投与、再構築することで、hCD45⁺リンパ球は抗原非依存性に hCD3⁺T 細胞、特に CD45RA⁺CD62L^{lo} T_{EM}、CCR6⁺CXCR3⁺ Th1 という拒絶反応に重要な役割を担う細胞に置き換わり、同時にアロ抗原への反応性の増幅を獲得することを明らかにした。これらの変化は、免疫不全マウスに hu-PBMC を投与する際に起こる homeostatic proliferation により引き起こされると考えられる。また、Fresh PBMC、hu-PBMC-NSG を用いた MLR より、各レシピエントのドナー抗原への反応性と臨床経過との比較検討から、On IS 群における急性拒絶反応の高リスク症例、免疫抑制剤が減量できる可能性のある症例が示唆され、Off IS 群では donor-specific hyporesponsiveness が hu-PBMC-NSG でも維持されることを明らかにした。このことから本研究で採用したヒト化マウスモデルは、hu-PBMC 再構築後もドナー特異的反応が維持され、免疫抑制療法中の生体肝移植後レシピエントにおいては免疫抑制剤を減量、もしくは中止した後アロ反応性を T_{EM}、Th1 という急性拒絶反応に関与する細胞に焦点を当てて観察し得るモデルである可能性がある。しかし、免疫寛容に関わるとされる T_{REG} は本研究では関連を示唆することはできなかった。今後、さらなる症例の積み重ねと詳細な解析により免疫抑制剤調整の指標の一つとして、実臨床応用が期待できる。

【結論】

NSG マウスを用いたヒト化マウスモデルによる新規免疫状態解析法は生体肝移植後レシピエントのアロ反応性を増強させ、免疫抑制剤のない状態のドナー特異的なアロ反応を拒絶反応により関与する T_{EM}、Th1 に焦点を当てて詳細に観察し得る。本研究結果と臨床経過の詳細な検討が、各レシピエントの免疫抑制剤調整の指標の一つとして有用である可能性がある。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである

AR;	acute rejection
ATP;	adenosine tri-phosphate
Ag;	antigen
CFSE;	carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
DC;	dendritic cell
DSA;	donor specific antibody
DTH;	delayed type hypersensitivity
FCS;	fetal calf serum
Foxp3;	Forkhead boxprotein P3
GVHD;	graft-versus-host disease
HLA;	human leukocyte antigen
hu-;	human
IFN γ ;	interferon-gamma
IL;	interleukin
IRB;	institutional review board
IS;	immunosuppressant
LDLT;	living donor liver transplant
MFI;	mean fluorescence intensity
MLR;	mixed lymphocyte reaction
MMF;	mycophenolate mofetil
mPSL;	methylprednisolone
NASH;	non-alcoholic steatohepatitis
NK;	natural killer
NSG;	NOD.Cg-Prkdc ^{scid} IL-2rg ^{tm/Wjl} /Sz
OVA;	ovalbumin
PBMC;	peripheral blood mononuclear cell
SIRO;	sirolimus
SPF;	specific pathogen free
TAC;	tacrolimus
T _{CM} ;	central memory T cell

TCR ;	T cell receptor
T _{EM} ;	effector memory T cell
T _{EM} RA;	effector memory re-expresses CD45RA
T _N ;	naïve T cell
T _{REG} ;	regulatory T cells
Th;	helper T cell
VPD;	violet proliferation dye
WT;	wild type

緒言

臓器移植の臨床成績は免疫抑制剤（immunosuppressant; IS）の発展により、著しく改善した（Starzl and Fung, 2010 ; Calne et al., 1979）。2018 年時点の本邦における臓器移植の 5 年生存率/グラフト生着率は、心臓；92.5%/92.5%、肺；73.4%/72.2%、肝臓；82.0%/81.3%、腎臓；91.1%/78.1%と良好な成績が報告されている（日本臓器移植ネットワーク 2019）。しかし、臓器移植後の拒絶反応を抑えるためには終生にわたる IS の服用が必要であり（Lucey et al., 2013）、長期免疫抑制に伴う発癌・感染症・腎機能障害・代謝障害などの様々な副作用が問題とされている。（Benlloch et al., 2004 ; Kim, 2014 ; Del Pilar Hernandez et al., 2015 ; Magee and Pascual, 2003 ; Fernandez-Miranda et al., 1998）。IS には T 細胞機能を抑制するカルシニューリン阻害剤や核酸代謝障害による免疫担当細胞の抑制効果を示すミコフェノール酸モフェチル（MMF）、広範な遺伝子転写制御により抗炎症効果を発揮するステロイドがあり、個人の免疫状態に応じて単剤または併用による投与量が決定される。実臨床では、拒絶反応の発症を抑え、副作用のリスクが軽減できる最小量での IS 投与量が設定される。しかし、免疫状態や免疫反応には個人差が大きく、特にカルシニューリン阻害薬は治療血中濃度域が狭く治療薬物濃度モニタリングが必要であること、IS 併用に伴う副作用の発現率の上昇等から、臓器移植後レシピエントの IS 至適量の決定は容易でなく、安易な減量は拒絶反応のリスクを伴う。

臓器移植後の拒絶反応は発生機序により、T リンパ球の活性化により起こる細胞性拒絶反応と抗ドナー抗体のグラフト血管内皮への結合により惹起される抗体関連型拒絶反応がある。また移植からの時間経過により、既存抗体とそれによる補体活性化を原因とした移植直後の超急性拒絶反応、移植後比較的早期に生じる抗体・単球・NK 細胞を中心とした促進型急性拒絶反応、T 細胞を中心とした急性拒絶反応、移植後長期経過後に生じる慢性拒絶反応（原因として上記の抗体および細胞性拒絶反応の関与が示唆されている）が知られている（Moreau et al., 2013）。他方、拒絶反応は移植臓器によって頻度、重症度が異なる。心移植後の移植心冠動脈病変は、移植後慢性期の心グラフト冠動脈に生じるびまん性の内膜肥厚病変であり、5 年で 32%の発生率が報告されており（Taylor et al., 2007）、重大な予後規定因子である（Costello et al., 2002）。また、肺移植後に生じる慢性拒絶反応による慢性移植肺機能不全に対する治療法は確立されておらず、移植後 5 年で 50%以上の症例に影響を与えると報告され（Robertson et al., 2009）、長期成績不良の原因である（Verleden et al., 2015）。腎移植における *de novo* ドナー特異的抗体は慢性糸球体障害の重要な予測因子とされ、5 年グラフト生着率は 60%程度と長期成績は不良となる（Wiebe et al., 2015）。一方で

IS の副作用による腎機能障害からグラフト喪失となる症例も少なくない。肝移植においても、拒絶反応は 10-20%程度に生じるされ、長期的な経過で慢性拒絶反応から肝線維化をきたし、3-4%の頻度でのグラフト機能不全が報告されている (Neil et al., 2002)。

これらの制御困難な慢性拒絶反応、また IS の副作用に対する対策として、免疫寛容の誘導が提唱されている。免疫寛容とは免疫抑制を行うことなく、特定のアロ抗原に対する免疫反応が惹起されず、それ以外の抗原（感染症など）に対する免疫反応が保たれている状態と定義される。免疫寛容の誘導は基礎研究、動物実験モデル、臨床により様々な方法が試みされてきた。Tryphonopoulos らは肝移植後レシピエントに対し、ドナー骨髄細胞を投与することでの免疫寛容導入を試みたが、投与群と非投与群において IS 中止可能な症例数に有意差はなく、ドナー骨髄細胞の投与と免疫寛容導入に関連がないと報告した (Tryphonopoulos et al., 2005)。一方、Kawai らは腎移植に先立ってドナー骨髄をレシピエントに移植することで、Mixed chimerism を作り出し、10 例中 7 例で IS 中止に成功した (Kawai et al., 2014)。当科でも抗 CD80/86 抗体を用いた副刺激経路の遮断によりドナー特異的アロ反応を抑えた T 細胞を ex vivo で作成し、肝移植後レシピエントに投与することで 10 例中 7 例で移植後の IS 中止に成功した (Todo et al., 2016)。このような積極的な治療介入による免疫寛容の誘導に対し、自然に免疫抑制剤を中止できる症例がある。特に肝臓は外来抗原に対して寛容な臓器であることが知られており、移植領域でも免疫寛容の誘導に優位であるとされる。実際、肝移植後レシピエントは他の臓器移植に比べ免疫寛容が得られやすく、20~40%のレシピエントに IS 中止が可能であると報告されている (Ramos et al., 1995 ; Tisone et al., 2006 ; Orlando et al., 2009)。またカルシニューリン阻害薬単剤の免疫抑制で臨床的に安定している肝移植後レシピエントに対して、数ヶ月ごとに IS を減量していくという IS 減量プロトコルも報告されており、最終的な IS 中止の成功率は 6~40%と報告されている (Mazariegos et al., 1997 ; Feng et al., 2012 ; Benitez et al., 2013)。さらに 2012 年には Banff Working Group によるクライテリアも発表され (Demetris, 2012)、HCV・自己免疫性疾患を除く、肝移植後 3 年以上臨床的に安定したレシピエントにおけるベースライン肝生検による移植肝の炎症と線維化の状態を基にした IS 減量プロトコルが示された。

免疫寛容の誘導可能な症例選択のバイオマーカーとして、移植グラフト内または末梢血中に増加する制御性 T 細胞 (T_{REG}) や $\gamma\delta T$ 細胞の有用性が報告されている (Yoshizawa et al., 2005 ; Martinez-Llordella et al., 2007 ; Taubert et al., 2016)。Yoshizawa らは T_{REG} が移植肝の免疫寛容維持に寄与している可能性を示し、Martinez らは免疫寛容症例で末梢血中の $\gamma\delta T$ 細胞と T_{REG} が増加していることを、

Taubert らは免疫寛容症例で移植グラフト内の T_{REG} の増加を報告した。さらに免疫抑制性 B 細胞 (Newell et al., 2010) や、樹状細胞サブセット比 (Tokita et al., 2008)、網羅的遺伝子解析による免疫寛容レシピエントの予測 (Martinez-Llordella et al., 2008) などの報告があるが、免疫寛容バイオマーカーの臨床応用としては確立されていない。

移植後レシピエントの免疫状態を観察する免疫モニタリングには、レシピエント T 細胞のドナー抗原特異的な反応をリンパ球混合反応 (Mixed lymphocyte reaction; MLR) による増殖細胞の割合、 $IFN\gamma$ や ATP の産生を測定する方法が報告されている (Tanaka et al., 2012 ; Millan et al., 2013 ; Ravaioli et al., 2015)。しかし、IS 投与中のレシピエントでは、抗原に対するアロ反応が抑制されていることから (図 1)、全体の反応が低く評価が難しい。さらに、IS 投与中のレシピエントのアロ反応は、現行の IS の効果を反映する指標であり、IS を減量もしくは中止した際のアロ反応を予見するものではない可能性がある。また拒絶反応は必ずしも単一の細胞種が原因でなく、生体内の獲得免疫 (細胞性、液性)、自然免疫の相互作用によって生じる反応の総和であることが多いと理解されている (Wood et al., 2012)。T 細胞の反応をターゲットにした *in vitro* assay では、必ずしも生体内 (*in vivo*) で生じる多様な免疫反応が反映されない可能性もある。これらの理由により、テラーメイドの IS 投与量決定に免疫モニタリングは必須と考えられているが、信頼しうる方法論は確立されていない現状がある。

アロ抗原に対するT細胞反応性

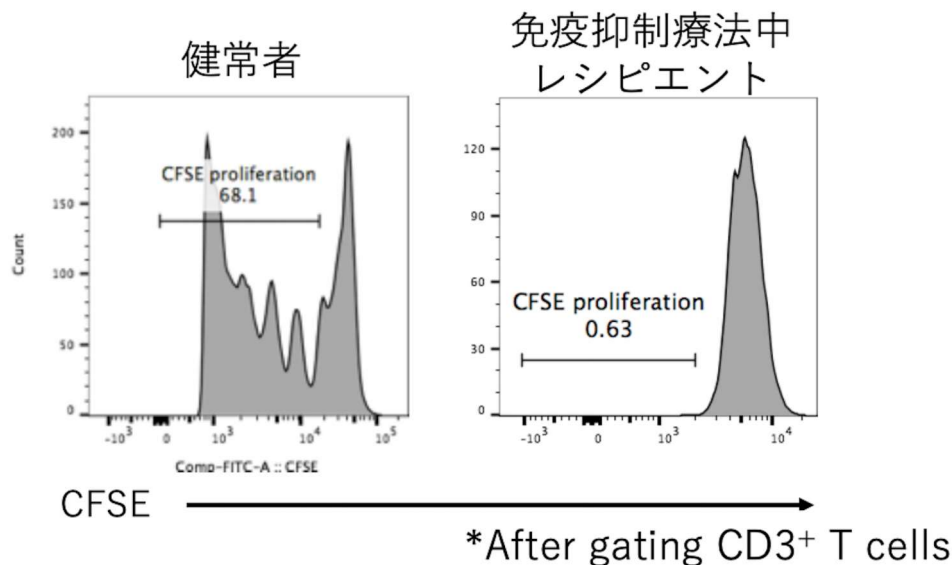


図1 MLRにおける健常者と免疫抑制療法中レシピエントのアロ反応性
免疫抑制療法中レシピエントにおいて、アロ抗原に対する反応性の抑制が見られる。

ヒト化マウスモデル (Humanized mouse model) は、ヒト組織やヒト免疫細胞を免疫不全マウスに移入・構築し、*in vivo* においてヒト免疫反応を評価できる手法として有用性が報告されている (Shultz et al., 2007)。近年、免疫不全マウスの発展に伴い、ヒト組織や免疫細胞 (造血幹細胞や末梢血単核球) の生着・再構築は良好となり、実際の患者をリスクにさらさず、ヒト免疫システムを解析できる重要な preclinical model system として、新規薬剤や臓器移植における拒絶反応のメカニズム解析がおこなわれている (Kenney et al., 2016)。既報ではヒト免疫細胞を再構築した免疫不全マウスにヒト皮膚・臍島・血管を移植するモデルを用いた研究が報告されている (de Oliveira et al., 2012 ; Xiao et al., 2014 ; Wang et al., 2004)。

以上より、IS 投与量の設定、減量、中止症例の選別に、既報と異なる新しい免疫モニタリング法の確立が待たれている。そこで我々は肝移植後レシピエントの免疫状態の評価に、IS 影響下で抑制されたアロ反応でなく、IS の影響から離脱したアロ反応を観察する方法論として、肝移植後レシピエントより採取したヒト末梢血単核球 (human peripheral mononuclear cell; hu-PBMC) を免疫不全マウスに再構成しヒト化マウスモデルを作成することを想起した。このヒト化マウスモデルにおいて、IS の影響下から離脱した状態の免疫反応が観察可能となり、IS 中止もしくは減量した状態のレシピエントのアロ免疫反応を模倣できると仮定した。この仮説を証明するた

めに、まず健常者におけるヒト化マウスの作成とアロ抗原に対するアロ免疫反応を定量的に観察出来るモデルの作成を試みた。続いて生体肝移植（Living donor liver transplantation; LDLT）レシピエントの hu-PBMC を用いたヒト化マウス作成の可否、およびアロ反応の評価について検討した。さらに LDLT レシピエントの hu-PBMC を用いたヒト化マウスにおいて、IS 影響下から離脱できていると仮定した場合、ドナーまたは 3rd party 抗原に対する免疫の変化を既存のモニタリング法と比較検討した。

方法

マウス

米国ジャクソン研究所 (Bar Harbor, ME, USA) から日本チャールズリバー (Yokohama, Japan) を介して購入した NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm/Wjl}/Sz (NOD/SCID/IL2r γ ^{null}; NSG) マウスを北海道大学附属動物実験施設で繁殖・飼育した。繁殖・飼育は特定病原体より隔離された状態 (SPF コンディション) でマイクロアイソレーターを用いて行った。全ての動物実験は当学医歯学研究棟 8 階において実施し、各実験には 8~16 週齢の雌雄のマウスを用いた。また、本研究におけるマウスを用いたすべての動物実験は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に則して行われた。

実験集団

本研究は北海道大学病院の定める自主臨床研究事務局 (Institutional review board; IRB) の承認 (承認番号 008-0129) に基づいて行われ、健常人、生体肝移植後レシピエント・ドナーから研究参加の同意を得た上で血液試料と臨床情報の提供を得た。本研究に登録された健常人は 5 例、すべて成人男性で年齢の中央値は 36 歳 (23-40) であった (表 1)。

表1: 健常者背景

#	年齢	性別	HLA mismatch vs. allo-Ag A-B-DR
i	33	男	1-2-2
ii	37	男	1-1-2
iii	36	男	1-2-2
iv	23	男	0-2-2
v	40	男	1-1-1-

また、北海道大学病院で定期外来診察を行っている生体肝移植後 1 年以上を経過したレシピエント 14 例とそのドナー 14 例が登録された。うち 10 例 (男性 3 例) はタクロリムス (TAC)、ミコフェノール酸モフェチル (MMF)、メチルプレドニゾロン (mPSL)、シロリムス (SIRO) を含めた免疫抑制療法中で、肝移植時のレシピエント年齢は中央値 44.0 歳 (0.5-70.0 歳)、移植後年数は中央値 5.6 年 (1.9-24.0

年)であった(表2)。

表2: 肝移植後レシピエント背景① 免疫抑制療法中レシピエント

#	移植時 年齢 (歳)	性別	原疾患	移植後 経過年数 (年)	ドナー	HLA mismatch A-B-DR		免疫抑制剤詳細				拒絶反応 エピソード
						vs. Donor	vs. 3 rd party	TAC (mg/day) [trough (ng/ml)]	MMF (mg/day) [trough (μg/ml)]	mPSL (mg/day)	SIRO (mg/day) [trough (ng/ml)]	
1	5.5	男	劇症肝炎	17.3	祖母	2-1-1	2-2-2	2.5 [5.0]	2000 [15.5]	5.0	-	6 回
2	58.3	女	PBC	4.0	息子	1-1-1	1-1-1	4.0 [7.2]	-	-	-	3 回
3	43.2	男	PBC	1.9	兄弟	1-1-1	1-1-1	1.4 [4.4]	500 [1.6]	-	-	なし
4	48.1	女	特発性肝炎	4.0	夫	2-2-2	2-2-2	1.0 [6.5]	1500 [3.1]	5.0	1.0 [10.0]	4 回
5	44.7	男	アルコール性肝硬変	7.9	夫	2-2-2	1-2-2	4.0 [4.8]	-	-	-	1 回
6	3.9	女	Byler 病	10.7	母	0-1-0	0-1-2	1.0 [1.5]	-	-	-	2 回
7	42.7	男	FAP	6.1	妻	1-2-1	2-2-0	4.0 [8.6]	1000 [3.0]	-	-	1 回
8	70.0	女	PBC	3.1	息子	0-1-1	1-1-1	6.0 [3.9]	1000 [1.9]	-	-	なし
9	55.5	女	PSC	5.0	娘	1-1-1	1-2-1	-	1000 [1.7]	7.5	-	1 回
10	0.5	女	胆道閉鎖症	24.0	母	1-1-1	2-2-2	1.0 [2.9]	-	-	-	なし

PBC, 原発性胆汁性肝硬変; FAP, 家族性アミロイドポリニューロパチー; PSC, 原発性硬化性胆管炎; TAC, tacrolimus; MMF, mycophenolate mofetil; mPSL, methylprednisolone; SIRO, sirolimus

また、4 例（男性 2 例）は肝移植後免疫抑制剤を中止できた症例で、移植時のレシピエントの年齢は中央値 53.8 歳（0.5-59.3 歳）、移植後年数は中央値 8.0 年（4.0-19.0 年）、免疫抑制剤中止期間は中央値 2.8 年（2.5-13.5 年）であった（表 3）。

表3: 肝移植後レシピエント背景② 免疫抑制療法中止レシピエント

#	移植時 年齢 (歳)	性別	原疾患	移植後 経過年数 (年)	ドナー	HLA mismatch A-B-DR		免疫抑制剤 中止期間 (年)	拒絶反応 エピソード
						vs.	vs.		
						Donor	3 rd party		
I	59.3	女	NASH	4.5	娘	0-0-1	1-1-2	3.0	なし
II	52.2	男	アルコール性肝硬変	4.5	息子	1-1-0	0-1-2	2.6	1 回
III	55.4	男	NASH	4.0	息子	0-1-1	1-1-1	2.5	なし
IV	0.5	女	胆道閉鎖症	19.0	母	1-1-1	1-2-2	13.5	1 回

NASH, 非アルコール性脂肪肝炎; BA, 胆道閉鎖症

免疫抑制療法中の 1 例（症例#2）、また免疫抑制剤中止できた 4 例中 3 例（症例 # I、# II、#III）は、北海道大学の IRB により承認された臨床研究（承認番号 010-0070）に登録されている症例である。ドナーは血縁者が 11 例、非血縁者（配偶者）が 3 例であった。本実験集団に再移植症例はなく、実験中の血液感染リスクを考慮して原病がウイルス性肝炎のレシピエントは除外した。

レシピエント 14 例における肝移植後の拒絶反応の有無を含めた経過を図 2 に示す。

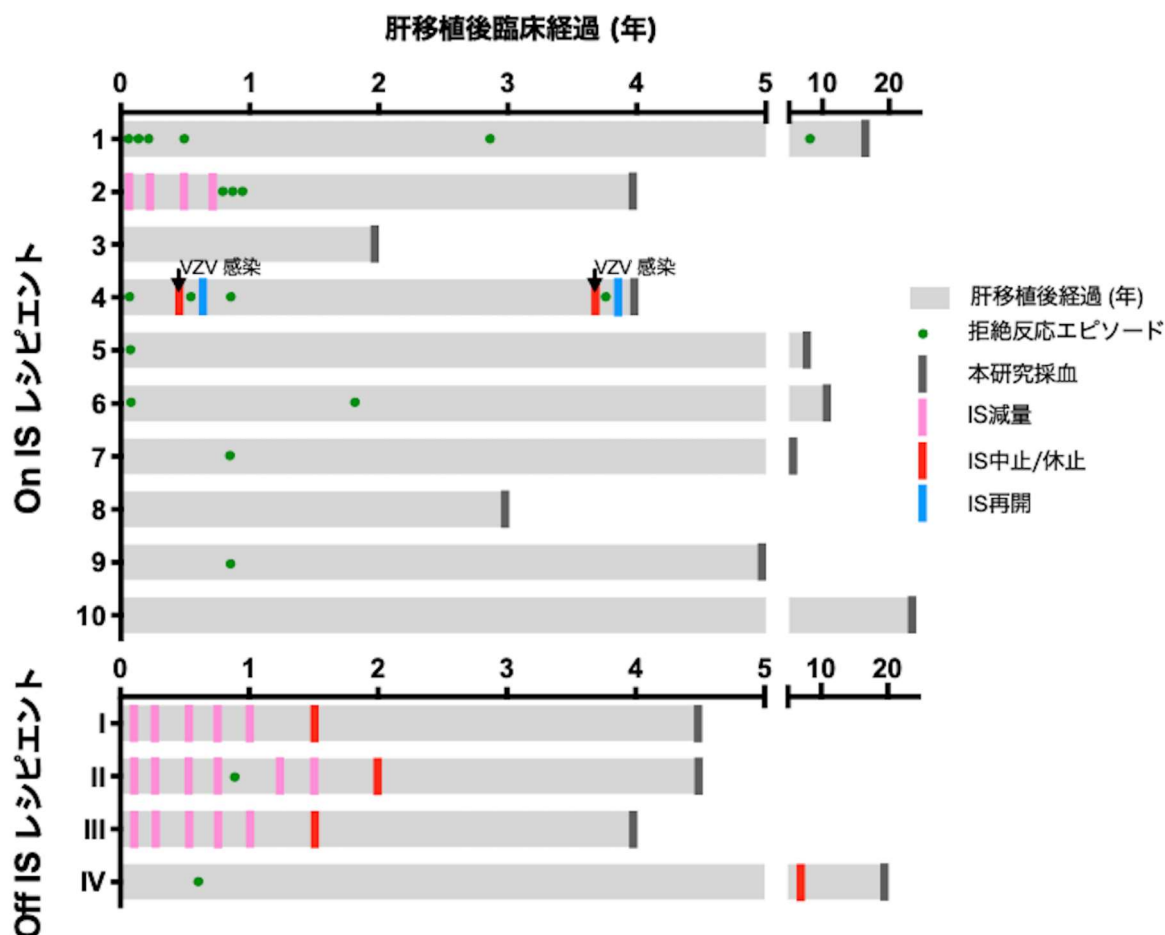


図2 肝移植レシピエントの術後臨床経過

本研究に登録された14例の肝移植後レシピエントの術後経過を示す。横軸は各レシピエントの術後年数を示す。各レシピエントの右端の灰色の線は本研究での血液サンプリングの時期を示す。免疫抑制剤の減量（ピンク）、中止（赤）、再開（水色）をそれぞれ線で、拒絶反応エピソードは緑の点で示す。#4では免疫抑制剤中止の原因となったVZV感染のタイミングも示している。

さらに肝移植後レシピエントのうち、表 4 に IS 内服継続症例の、表 5 に IS 内服中止症例の移植前抗原暴露歴とドナー特異的抗体（Donor specific antibody; DSA）の詳細を記した。

表4: 肝移植後レシピエントにおける移植前抗原暴露とドナー特異的抗体① 免疫抑制療法中レシピエント

#	移植前		Preformed DSA			De novo DSA					肝生検所見	C4d
	輸血	妊娠	有無	Ag	DSA-MFI	移植後 DSA 検出までの期間 (年)	有無	Ag	DSA-MFI			
									max	Sum		
1	あり		なし	—	—	あり	17.0	DQ4, DQ7	16666	92241	A2F3	+
2	なし	あり	あり	DR1	6583	あり	1.0	DQ5	1058	2089	A1F0	(-)
3	なし		なし	—	—	不明	不明	不明	不明	不明	不明	
4	あり	あり	なし	—	—	なし	—	—	—	—	A2F2	(-)
5	あり	あり	なし	—	—	なし	—	—	—	—	不明	
6	あり	なし	なし	—	—	あり	14.6	DQ7	23124	106062	A1F0	(-)
7	なし		なし	—	—	あり	5.0	DQ2, DR53	11694	661169	A1F1	(-)
8	なし	あり	なし	—	—	不明	不明	不明	不明	不明	不明	
9	なし	あり	あり	Cw6	7099	あり	1.9	A1	1292	1292	A0F0	(-)
10	不明	なし	不明	不明	不明	あり	20.1	DQ8, DR4	2819	4355	A0F1	(-)

Ag, antigen; DSA, donor specific HLA antibodies; MFI, mean fluorescence intensity

表5: 肝移植後レシピエントにおける移植前抗原暴露とドナー特異的抗体② 免疫抑制療剤中止レシピエント

#	移植前		Preformed DSA			De novo DSA					肝生検所見	C4d
	輸血	妊娠	有無	Ag	DSA-MFI	有無	移植後 DSA 検出までの期間 (年)	Ag	DSA-MFI			
									max	Sum		
I	なし	あり	なし	—	—	なし	—	—	—	—	A1F0	(-)
II	なし		あり	A2	6670	なし	—	—	—	—	A0F0	(-)
III	なし		なし	—	—	あり	2.0	DQ4	6020	15142	A0F0	(-)
IV	不明	なし	不明	—	—	なし	—	—	—	—	A0F1/2	(-)

Ag, antigen; DSA, donor specific HLA antibodies; MFI, mean fluorescence intensity

全てのレシピエントは、ドナーリンパ球と血清を使用したリンパ球クロスマッチテストによって評価され、陽性であった場合、ドナー特異的抗 HLA-A、-B、-Cw、-DR、および-DQ 抗体を LABScreen® single antigen test (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA) により測定し、ドナーHLA に一致した平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity; MFI) 1000 以上を DSA 陽性と判定した。移植後抗 HLA 抗体は原則毎年測定している。

NSG マウスへのヒトリンパ球の再構築 (ヒト化マウスリンパ球移植モデル (hu-PBMC-NSG) の作成)

- ① ヒト末梢血単核球 (hu-PBMC) の採取：それぞれの実験集団より約 30ml の末梢血を採取した後、速やかにフィコール液 (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) を用いて hu-PBMCs を分離した。
- ② マウスへの放射線照射：ヒト化マウスモデル作成にあたり、マウスへの前処置として少量の放射線照射を施行することで、マウス内へのヒト免疫細胞の構築率が上昇することが報告されている (King et al., 2009)。本研究では NSG マウスに 2.0Gy の放射線照射を施行した。

- ③ hu-PBMC-NSG の作成：採取した hu-PBMC を速やかに RPMI-1640 溶液 500 μ l で $5.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^7$ 個に調整し、マウス腹腔内に投与した。ヒトリンパ球のマウス内への再構築を確認するため、hu-PBMC 腹腔内投与 14 日後にマウス尾静脈より毛細管を用いて末梢血を採取し、マウス末梢血中ヒト CD45 陽性 (hCD45⁺) リンパ球の割合を Flow cytometry を用いて測定した。マウス末梢血中の hCD45⁺ リンパ球の割合が、1%を超えた場合、ヒトリンパ球がマウス内に再構築されたと定義した (Issa et al., 2010)。

Flow cytometry

ヒト末梢血より採取した hu-PBMC、ヒトリンパ球を再構築した NSG マウスより採取した hCD45⁺リンパ球を以下のフローサイトメトリー抗体を用いて染色した。FITC; 抗ヒト-CD3, -CD14, -CD62L, PE; 抗ヒト-CD19, -CD16, -CD56, -CD45RA, -CCR4, -CCR6, PerCP-Cy5.5; 抗ヒト-HLA-DR, PE-Cy7; 抗ヒト-CD3, -Ki67, APC; 抗ヒト-CD3, -CD45, -CCR6, Alexa Fluor 647; 抗ヒト-CD127, APC-H7; 抗ヒト-CD8, -CD45RO, BV421; 抗ヒト-CD25, -CXCR3, V500; 抗ヒト-CD4, Alexa Fluor 488; 抗ヒト-Foxp3 (全て BD Pharmingen, San Diego, USA)。死細胞除去は 7AAD 染色を用いた。細胞内染色には、Fixation/Permeabilization solution (eBioscience, San Diego, USA)を用いて、eBioscience の推奨プロトコールに従い細胞を処理した。測定は FACS Canto II (BD Bioscience, New Jersey, USA)を使用して、多重染色法により行った。マルチカラー解析は FlowJo software (FLOWJO LLC)を使用した。

In vivo cell proliferation assay

アロ抗原に対するヒト T 細胞の反応を NSG マウス生体内で観察する目的で以下のモデルを作成し評価した。

- ① アロ抗原 マウス静脈内投与モデル：hu-PBMC 腹腔内投与 21 日後、RPMI-1640 溶液 500 μ l で 3.0×10^6 個に調整した他の健常人より採取したアロ PBMC (アロ抗原；Allo-Ag) を 30Gy の放射線照射を行い増殖を停止させた上で、hCD45⁺リンパ球の再構築が確認された NSG マウス尾静脈より投与した。アロ PBMC 投与前 (Day0)、投与後 1, 3, 5, 7 日目にそれぞれマウス尾静脈より末梢血を採取し、末梢血中のヒト CD4, CD8 陽性 (hCD4⁺/hCD8⁺) T 細胞を測定しその中の Ki67 陽性細胞率を測定、Ki67 陽性細胞の推移を評価した。
- ② アロ抗原 マウス腹腔内投与モデル： hu-PBMC 腹腔内投与 21 日後、RPMI-1640 溶液 500 μ l で 3.0×10^6 個に調整したアロ PBMC を 30Gy の放射線照射を行い増殖を停止させた上で、hCD45⁺リンパ球の再構築が確認された NSG マウス腹腔内

より投与した。アロ PBMC 投与前 (Day0)、投与後 3 日目で腹腔内洗浄液 (マウス腹腔内に生理食塩水 5ml を投与し、その後回収したもの) 中の hCD4⁺/hCD8⁺T 細胞を測定しその中の Ki67 陽性細胞率を測定、Ki67 陽性細胞の推移を評価した。

hu-PBMC を再構築した NSG マウスに RPMI-1640 溶液 500 μ l のみを投与したものの negative control として用いた。

hu-PBMC-NSG からの hCD45⁺リンパ球の採取

NSG マウスに再構築した hCD45⁺リンパ球分画の測定、また、以下の *Ex vivo* cell proliferation assay に用いる細胞を採取する目的で hu-PBMC 腹腔内投与 21 日後に NSG マウスを犠牲死 (全身麻酔+頸椎脱臼) させ、末梢血、脾、骨髓を採取した。採取した脾、骨髓は 70 μ m セルストレイナー上ですりつぶして単細胞とし、末梢血とあわせ RBC lysis buffer (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) で溶血後、洗浄し精製した。

Ex vivo cell proliferation assay

- ① Ki67 陽性細胞による評価：アロ抗原に対する反応を観察するため MLR を用いて Ki67 染色により Flow cytometry で評価した。健常人より採取した hu-PBMC、もしくは hu-PBMC 再構築後に NSG マウスより採取した hCD3⁺T 細胞を完全培地 [10%FCS(Sigma-Aldrich Japan, Hokkaido, Japan), 抗菌薬 (100 U/ml penicillin; 100mg/ml streptomycin, Nacalai tesque, Kyoto, Japan), 50 μ M 2-mercapto-ethanol (Katayama chemical, Osaka, Japan) を含有した RPMI-1640 溶液] で再調整し反応細胞 (Responder) として用い、アロ PBMC (アロ抗原; Allo-Ag) を 30Gy 放射線照射し増殖を停止して、同様に完全培地で再調整し使用した。hu-PBMC 再構築後に NSG マウスより採取した hCD45⁺リンパ球は、マウス細胞を除去するため抗ヒト CD3 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて Auto MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) により hCD3⁺T 細胞を分離して使用した。hCD3⁺T 細胞の分離純度は Flow cytometry を用いて評価した。反応細胞、アロ抗原ともにそれぞれ 1 well あたり 1.5×10^5 個を 96 well round-bottom plate (BD falcon, BD, New Jersey, USA) に播種し、37°C、5%二酸化炭素下で 5 日間共培養した。Positive control として反応細胞と同量 (1.5×10^5 個) の T 細胞活性化ビーズ (Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28, Invitrogen, San Diego, USA) を用いて刺激した。5 日後に細胞を回収し、Flow cytometry を用いて解析した。反応細胞中の Ki67 陽性 (Ki67⁺) 細胞を増殖細胞として評価した。

② 細胞内蛍光色素染色による評価: 前述の反応細胞を Violet Proliferation Dye (VPD, BD Horizon, New Jersey, USA)、刺激するアロ PBMC (アロ抗原) を Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE, eBioscience, San Diego, USA) でそれぞれ染色し、MLR を施行し Flow cytometry を用いて解析した。健常人または生体肝移植後レシピエントより採取した hu-PBMC、もしくは hu-PBMC 再構築後に NSG マウスより採取した hCD3⁺T 細胞を反応細胞として使用し、健常人または生体肝移植ドナーより採取したアロ PBMC をそれぞれアロ抗原 (3rd party 抗原、ドナー抗原) として用いた。3rd party は全て同一の健常人より採取した hu-PBMC を用いた。hu-PBMC 再構築後に NSG マウスより採取した hCD45⁺ リンパ球は、抗ヒト CD3 マイクロビーズを用いて hCD3⁺T 細胞を分離して使用した。hCD3⁺T 細胞の分離純度は Flow cytometry を用いて評価した。反応細胞は 1 μ M VPD で染色し、アロ PBMC は 1 μ M CFSE で染色後に 30Gy 放射線照射し増殖を停止して、それぞれ完全培地で再調整し使用した。反応細胞、アロ抗原ともにそれぞれ 1 well あたり 1.5×10^5 個を 96 well round-bottom plate に播種し、37 度、5% 二酸化炭素下で 5 日間共培養した。Positive control として反応細胞と同量 (1.5×10^5 個) の T 細胞活性化ビーズを用いて刺激した。5 日後に細胞を回収し、Flow cytometry を用いて解析した。増殖細胞はアロ抗原に対して増殖した細胞 (%) から反応細胞のみで増殖した細胞 (%) を引いた数値で評価した。

HLA タイピング

健常人、肝移植後レシピエント、ドナーを含めたすべての実験集団に対して採取した血液を用いて、HLA タイピング (A-B-DR) を施行した。タイピングは WAKFlow HLA タイピング試薬 (Wakunaga Pharmaceutical Co. Ltd, Osaka, Japan) を用いた。

統計学的検討

全ての統計学的検討は、GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software) を用いて施行した。実験集団の年齢は中央値を用いて、その他の全ての変数は平均値 $\pm$ 標準誤差を用いて表記した。各群間を比較したデータは one way ANOVA で評価し、前後値を比較したデータは paired t-test もしくは t-test で評価した。有意差がある場合、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、または $P < 0.001$ はそれぞれ、図中で*、**または***として表記した。

結果

1. hu-PBMC-NSG モデルの作成

まず NSG マウスに hu-PBMC の再構築が可能であるか、また可能であった場合、hu-PBMC 投与量の至適量がどれほどであるかを検討する目的で、健常者 (n=2~5, 図 3) の hu-PBMC を $5.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ 個を NSG マウス腹腔内に投与し 14 日後にマウス尾静脈より末梢血を採取して検討を行った。当初、NSG マウスに前処置をせずに検討したところ、hu-PBMC 1.0×10^7 個の投与でも hCD45⁺リンパ球の再構築は末梢血中の 10%以下であった。再構築後のリンパ球分画の測定や cell proliferation assay に用いるだけの hCD45⁺リンパ球を採取するためには多量のヒト末梢血と NSG マウスが必要であり、このモデルは不適と判断した。次にマウスに前処置として放射線照射を行うモデルを作成し検討した。NSG マウスに 2.0Gy 放射線照射を施行し、速やかに $0.5 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ 個の hu-PBMC をマウス腹腔内に投与したところ、14 日後のマウス末梢血中の hCD45⁺リンパ球の再構築は上昇した。今後の研究に使用するための十分な量の hCD45⁺リンパ球が採取でき、一人につき 30ml 程度のヒト末梢血の採取で研究を続行できる量として、hu-PBMC 2.5×10^6 個を NSG マウス腹腔内に投与するモデルを採用した。

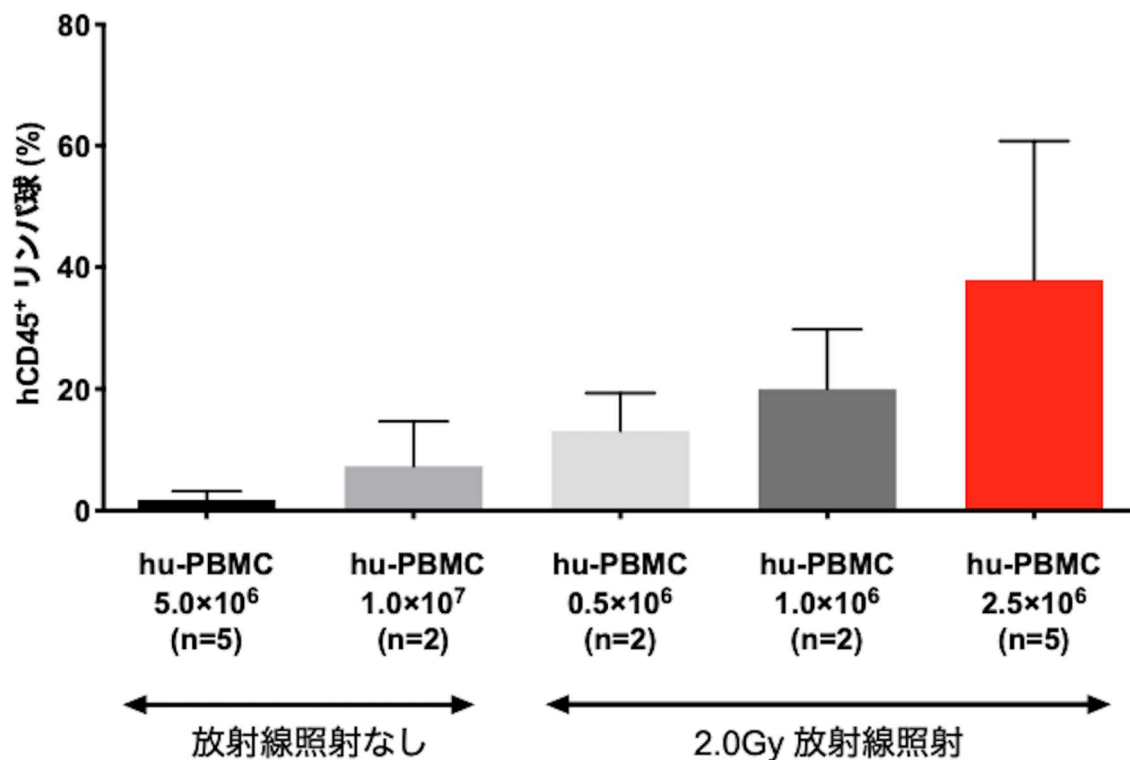


図3 hu-PBMC-NSGマウスの作成

hu-PBMC腹腔内投与後14日のマウス末梢血中のhCD45⁺リンパ球の割合を測定した。非放射線照射群のマウスに比べ、2.0Gy放射線照射群でのヒトリンパ球の再構築の上昇が認められた。

2. hu-PBMC-NSG 再構築前後の hCD45⁺リンパ球分画の変化

次に、作成した hu-PBMC-NSG モデルより採取した hCD45⁺リンパ球分画を測定し、本研究に使用できるかを検討した。hu-PBMC 投与後 14 日後のマウス末梢血中の hCD45⁺リンパ球分画を Flow cytometry を用いて評価した。hu-PBMC-NSG より採取した hCD45⁺リンパ球は 90%以上が hCD3⁺T 細胞であり (n=3, 図 4A)、有意に hCD3⁺T 細胞が再構築されることが示され、hCD4⁺/hCD8⁺T 細胞の比率に有意差は認めなかった (n=3, 図 4B)。また、hCD3⁻リンパ球では、1~2%と少量の B 細胞、樹状細胞が再構築されるものの単球や NK 細胞はほとんど再構築されないことが示された (n=3, 図 4C)。

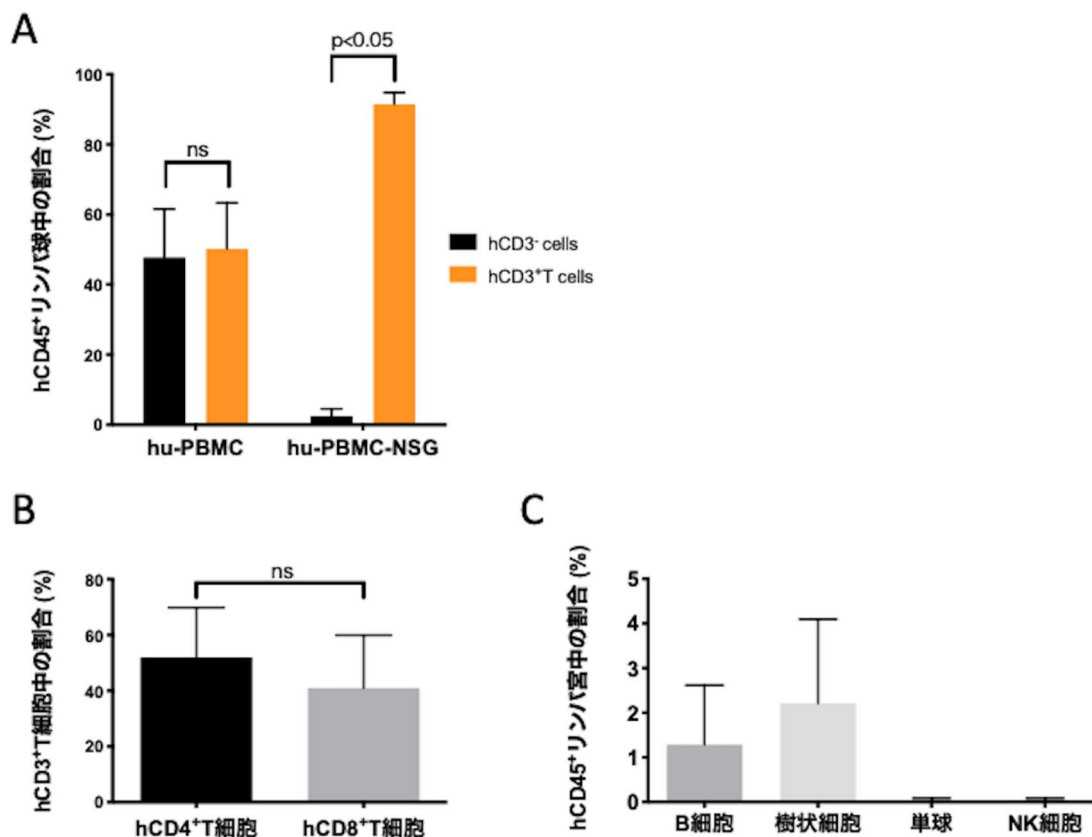


図4 hu-PBMC-NSG再構築前後のヒトリンパ球分画の変化

hu-PBMC腹腔内投与後14日のマウス末梢血中のhCD45⁺リンパ球におけるリンパ球分画を測定し、投与前のhu-PBMCと比較した。

(A) hu-PBMC-NSGでは、有意にhCD3⁺T細胞が再構築された (n=3)。

(B) 再構築後のT細胞分画の比較; hCD4⁺/hCD8⁺T細胞に有意な差は見られなかった (n=3)。

(C) 再構築後のhCD3⁺細胞分画; 極少量のB細胞、樹状細胞の再構築が見られた (n=3)。

3. *in vivo* cell proliferation assay, アロ抗原マウス静脈内投与モデルの作成

ヒト化マウスモデル (hu-PBMC-NSG) が完成し、続いて hCD45⁺リンパ球のアロ抗原に対する反応 (アロ反応) をマウス生体内 (*in vivo*) で観察・評価できるかを検討する目的でアロ抗原マウス静脈内投与モデルを作成した。hu-PBMC 投与後 21 日の hu-PBMC-NSG 尾静脈にアロ PBMC 3.0×10^6 個を投与し、0 (アロ PBMC 投与前), 1, 3, 5, 7 日でそれぞれマウス末梢血を採取した。採取した末梢血中の hCD4⁺/hCD8⁺T 細胞における Ki67⁺細胞を Flow cytometry で測定し、増殖細胞としてその推移を評価した。Ki67 は細胞増殖期における G0 以外の細胞に発現する核内抗原であり (Gerdes et al., 1991)、Flow cytometry により細胞採取時の増殖期にある全ての細胞を評価でき

るとされている (Soares et al., 2010)。アロ抗原投与群では Ki67⁺細胞の増減が Negative control と比べ大きくなっているものの、hCD4⁺/hCD8⁺T 細胞共に一定の傾向が見られなかった (n=2, それぞれにコントロール群・アロ抗原投与群 n=1~2, 図 5)。またマウス個体差による Ki67⁺細胞率の差も大きく定量的な評価が困難であると判断した。

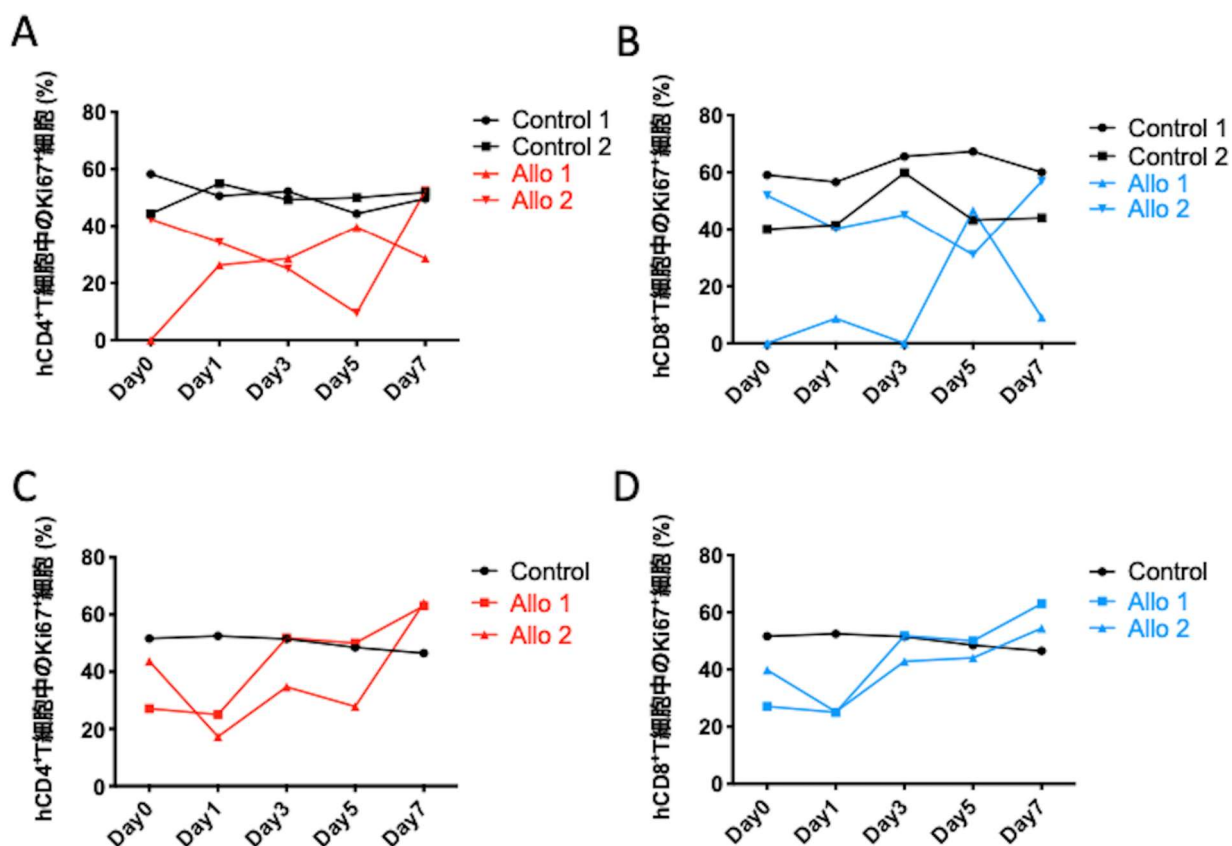


図5 in vivo cell proliferation assay, アロ抗原マウス静脈内投与モデル

hu-PBMC腹腔内投与後21日のマウス尾静脈にアロPBMC 3.0×10^6 個を投与した。Day0, 1, 3, 5, 7で末梢血を採取、hCD4⁺/hCD8⁺T細胞におけるKi67⁺細胞の推移を観察し、Control（アロ抗原非投与）と比較検討した。

(A), (B) hu-PBMC（健常者A）を再構築したhu-PBMC-NSG（Control; n=2, Allo-PBMC投与; n=2）にアロPBMC（健常者B）を投与。

(B) hCD4⁺T細胞におけるKi67⁺細胞の推移。(B)hCD8⁺T細胞におけるKi67⁺細胞の推移。

(C), (D) hu-PBMC（健常者A）を再構築したhu-PBMC-NSG（Control; n=1, Allo-PBMC投与; n=2）にアロPBMC（健常者B）を投与。

(C) hCD4⁺T細胞におけるKi67⁺細胞の推移。(D)hCD8⁺T細胞におけるKi67⁺細胞の推移。

4. in vivo cell proliferation assay, アロ抗原 マウス腹腔内投与モデルの作成

次に hCD45⁺リンパ球のアロ反応を *in vivo* で観察・評価できるかを検討する目的でアロ抗原マウス腹腔内投与モデルを作成した。hu-PBMC 投与後 21 日の hu-PBMC-NSG マウス腹腔内にアロ PBMC 3.0×10^6 個を投与し、0 (アロ PBMC 投与前), 3 日でそれぞれマウス腹腔内洗浄液を採取した。前項と同様に腹腔内洗浄液から採取した hCD4⁺/hCD8⁺T 細胞における Ki67⁺細胞を増殖細胞として評価した。アロ抗原投与群・コントロール群とも、hCD4⁺/hCD8⁺T 細胞における Ki67⁺細胞の変化に乏しく、両群ともに一定の傾向を見出すことはできなかった (n=2, それぞれにコントロール群・アロ抗原投与群 n=1~2, 図 6)。

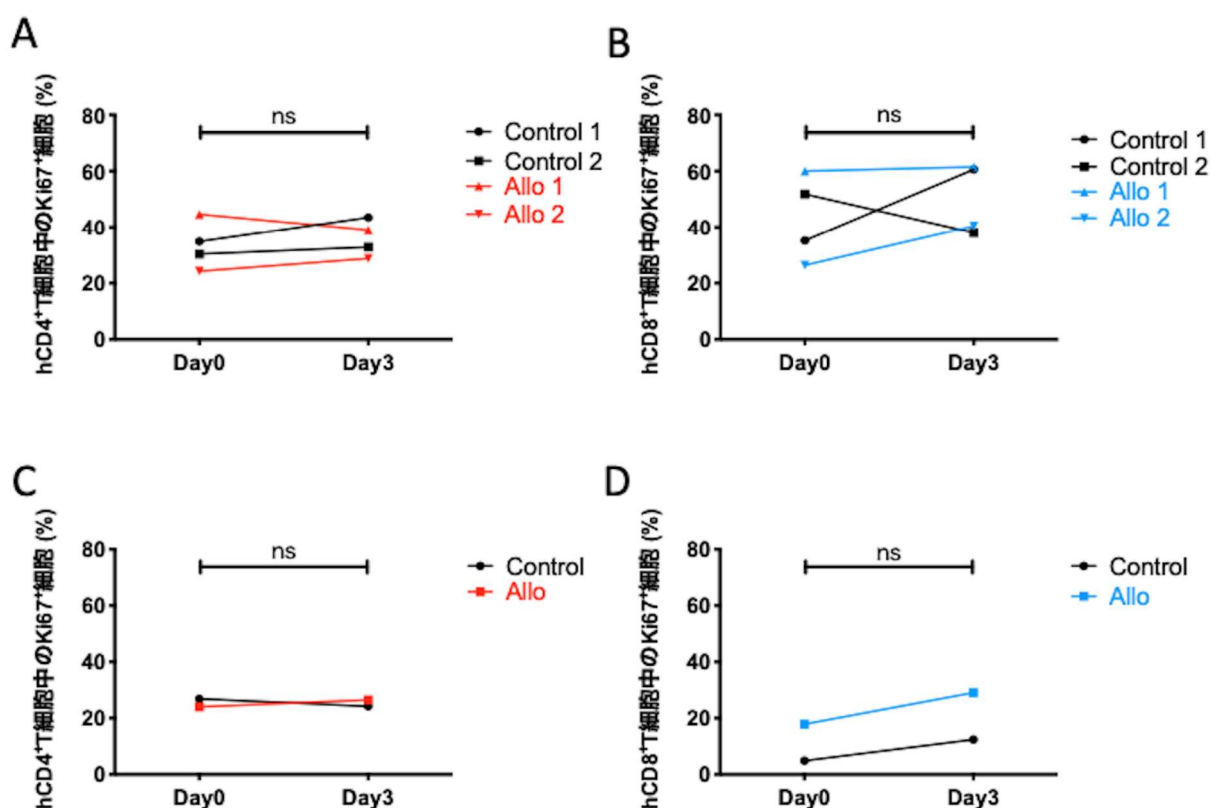


図6 in vivo cell proliferation assay, アロ抗原マウス腹腔内投与モデル

hu-PBMC腹腔内投与後21日のマウス腹腔内にアロPBMC 3.0×10^6 個を投与した。Day0, 3で腹腔内洗浄液を採取、hCD4⁺/hCD8⁺T細胞におけるKi67⁺細胞の推移を観察し、Control（アロ抗原非投与）と比較検討した。

(A), (B) hu-PBMC（健常者A）を再構築したhu-PBMC-NSG（Control; n=2, Allo-PBMC投与; n=2）にアロPBMC（健常者B）を投与。

(B) hCD4⁺T細胞におけるKi67⁺細胞の推移。(B)hCD8⁺T細胞におけるKi67⁺細胞の推移。

(C), (D) hu-PBMC（健常者A）を再構築したhu-PBMC-NSG（Control; n=1, Allo-PBMC投与; n=1）にアロPBMC（健常者B）を投与。

(C) hCD4⁺T細胞におけるKi67⁺細胞の推移。(D)hCD8⁺T細胞におけるKi67⁺細胞の推移。

5. Ex vivo cell proliferation assay モデルの作成

hu-PBMC-NSG による *in vivo* でのアロ反応の観察・評価は困難であると判断し、次に hu-PBMC-NSG より hCD45⁺リンパ球を生体外 (*ex vivo*) に採取し、*in vitro* でアロ反応を観察できるモデルを作成した。hu-PBMC 投与後 21 日の hu-PBMC-NSG マウスより hCD45⁺リンパ球を採取し、hCD3⁺T 細胞を単離した後、アロ抗原と反応させる MLR を施行した。hu-PBMC-NSG 再構築前の hu-PBMC を用いた MLR の結果と hu-PBMC-NSG より採取した hCD3⁺T 細胞の MLR 結果と比較検討した。hCD3⁺T

細胞の単離は抗ヒト CD3 マイクロビーズを用いて positive selection で分離した。単離純度は 94.3% と良好であり、また、単離した hCD3⁺T 細胞の 97.4% が hCD45⁺リンパ球であることも確認し、マウス細胞の混入は極微量であることが示された (n=3, 図 7)。Ki67⁺細胞を増殖細胞として評価した場合、hu-PBMC による MLR と hu-PBMC-NSG から採取した hCD3⁺T 細胞を用いた MLR では hCD4⁺/hCD8⁺T 細胞とも、CD3/CD28 刺激にもアロ抗原にも良好な反応が見られた。さらに CD3/CD28 刺激に比べアロ反応が弱いことも含め、両者の MLR は同様の反応傾向が見られた (n=1, 図 8) が、全体的な反応強度が hu-PBMC-NSG での MLR で弱い印象であった。また、反応細胞、アロ抗原をそれぞれ VPD、CFSE で染色し、Flow cytometry で増殖細胞を評価した場合も同様に、hu-PBMC による MLR と hu-PBMC-NSG による MLR では hCD4⁺/hCD8⁺T 細胞とも、CD3/CD28 刺激にもアロ抗原にも良好な反応が見られ、両者の MLR は同様の反応傾向を認めた (n=1, 図 9)。さらに、Ki67⁺細胞による評価よりもより強い反応が見られることが示された。これまでの結果より、今後の生体肝移植後レシピエントを用いた研究については、この細胞内蛍光色素染色による評価を用いた *Ex vivo* cell proliferation assay モデルを採用し、評価を行う方針とした。

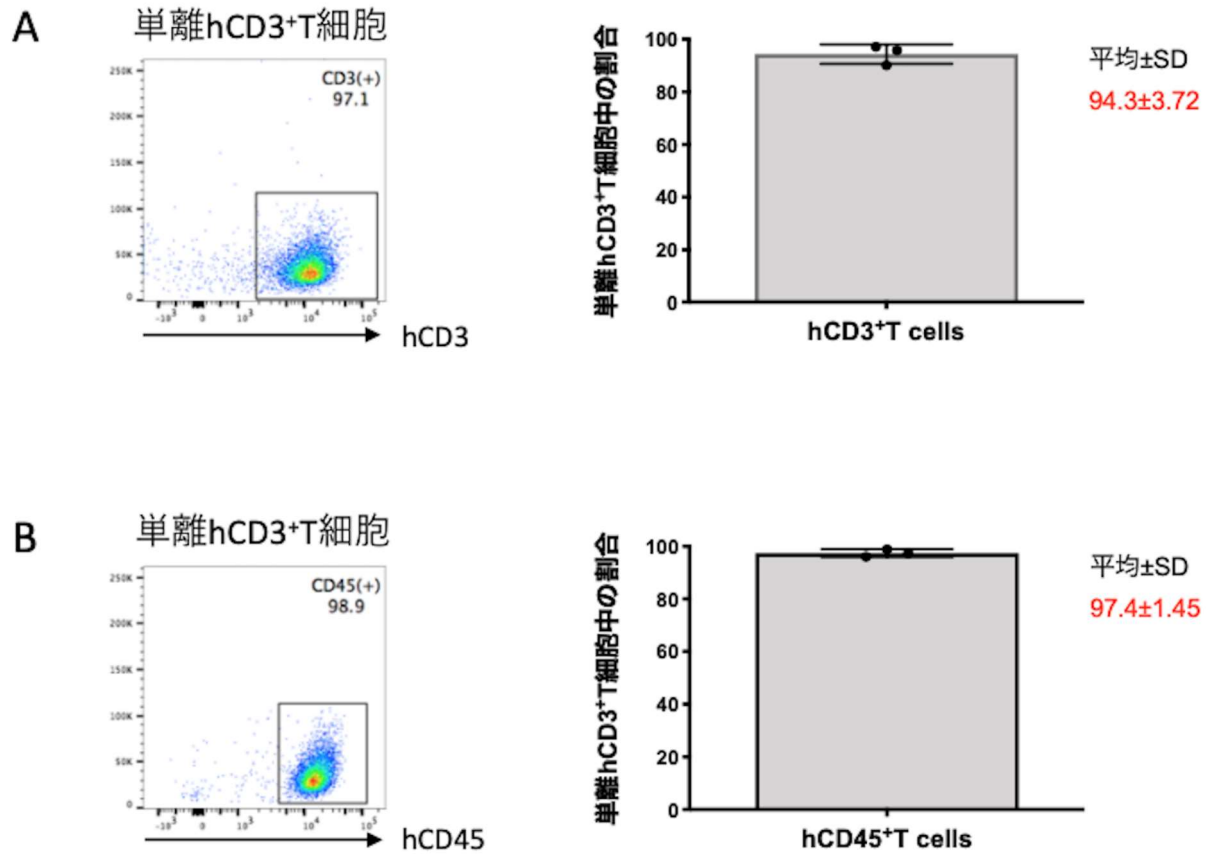


図7 hu-PBMC-NSGマウスより採取したhCD3⁺T細胞の純度

hu-PBMC腹腔内投与後21日のマウスの末梢血・脾・骨髓より採取したhu-PBMCを抗ヒトCD3マイクロビーズを用いて単離した。単離したhCD3⁺T細胞の純度とhCD3⁺T細胞がヒト由来であることをフローサイトメトリーを用いて評価した。

(A) 単離したhCD3⁺T細胞の純度 (n=3)

(B) 単離したhCD3⁺T細胞中のhCD45⁺細胞純度(n=3)

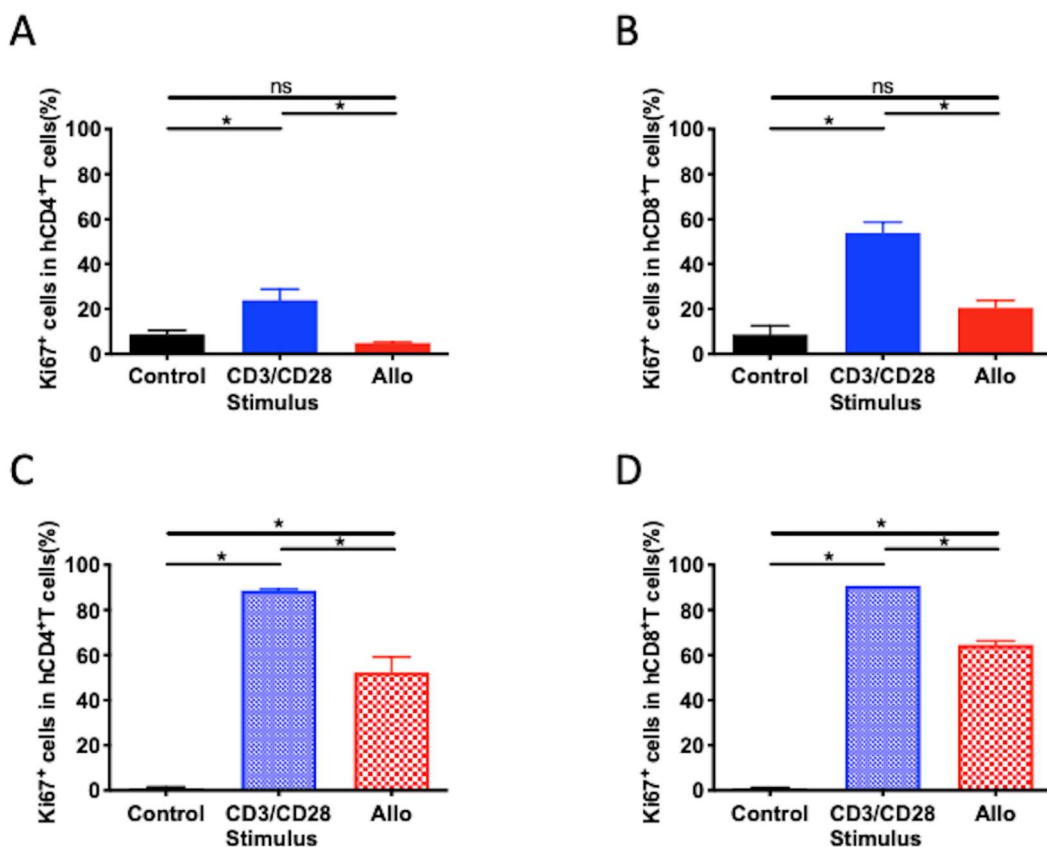


図8 ex vivo cell proliferation assay, Ki67陽性細胞による評価

hu-PBMC腹腔内投与後21日のマウス (hu-PBMC-NSGマウス) の末梢血・脾・骨髄より採取したhCD3⁺T細胞を放射線照射し増殖を停止したアロ抗原、もしくはCD3/CD28ビーズと5日間共培養し (MLR)、回収した細胞のCD4⁺/CD8⁺陽性細胞におけるKi67⁺細胞の割合を評価し、hu-PBMCによるMLRの結果と比較した。

(A), (B) hu-PBMC-NSGから採取したhCD3⁺細胞によるMLR (n=1)

(A) hCD4⁺T cell, (B) hCD8⁺T cell

(C), (D) hu-PBMC ((A), (B)と同一のhu-PBMCの組み合わせ) によるMLR (n=1)

(C) hCD4⁺T cell, (D) hCD8⁺T cell

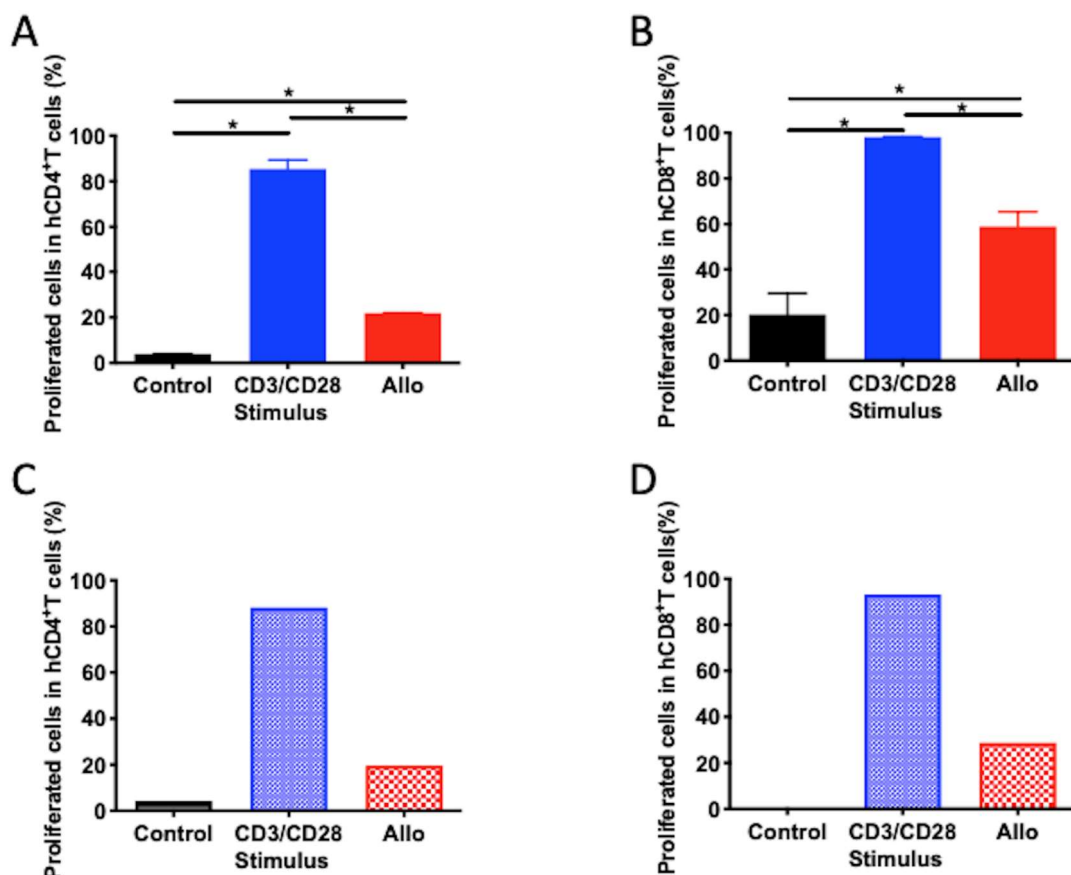


図9 ex vivo cell proliferation assay, Ki67陽性細胞による評価

hu-PBMC腹腔内投与後21日のマウス (hu-PBMC-NSGマウス) の末梢血・脾・骨髄より採取したhCD3⁺T細胞をVPD染色し、放射線照射し増殖を停止しCFSE染色をしたアロ抗原、もしくはCD3/CD28ビーズと5日間共培養し (MLR)、回収した細胞のCD4⁺/CD8⁺陽性細胞の増殖をフローサイトメトリーで評価し、hu-PBMCによるMLRの結果と比較した。

(A), (B) hu-PBMC-NSGから採取したhCD3⁺細胞によるMLR (n=1)

(A) hCD4⁺T cell, (B) hCD8⁺T cell

(C), (D) hu-PBMC ((A), (B)と同一のhu-PBMCの組み合わせ) によるMLR (n=1)

(C) hCD4⁺T cell, (D) hCD8⁺T cell

6. 健常者・肝移植後レシピエントにおける hu-PBMC-NSG マウスにおける hCD45⁺リンパ球の再構築

hu-PBMC 腹腔内投与後 14 日後のマウス末梢血中の hCD45⁺リンパ球の割合は健常者 (n=5) で $20.9 \pm 2.72\%$ (Mean $\pm$ SEM)、生体肝移植後レシピエント 14 例では、免疫抑制療法中レシピエント (On IS レシピエント, n=10) で $40.88 \pm 6.52\%$ 、免疫抑制剤中止レシピエント (Off IS レシピエント, n=4) で $39.78 \pm 11.82\%$ であり、健常者、肝移植後レシピエント共に全例で hu-PBMC の NSG マウスへの再構築は成功

した（図 10 A~C）。hu-PBMC の NSG マウスへの再構築率は、健常者、免疫抑制療法中レシピエント、免疫抑制剤中止レシピエントの 3 群で有意差は認めなかったが、健常者では生体肝移植後レシピエントの 2 群に比べ低い傾向が見られた（vs On IS recipients $p=0.16$, vs Off IS recipients $p=0.32$, one-way ANOVA, 図 10D）。

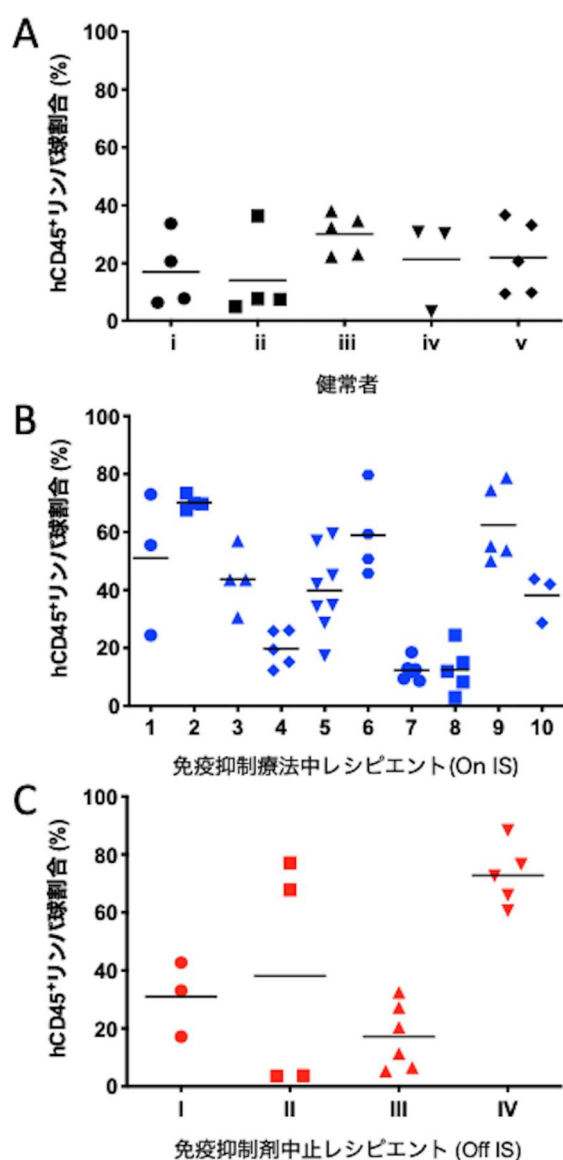


図10 hu-PBMC-NSGマウスの末梢血におけるhCD45⁺リンパ球比率

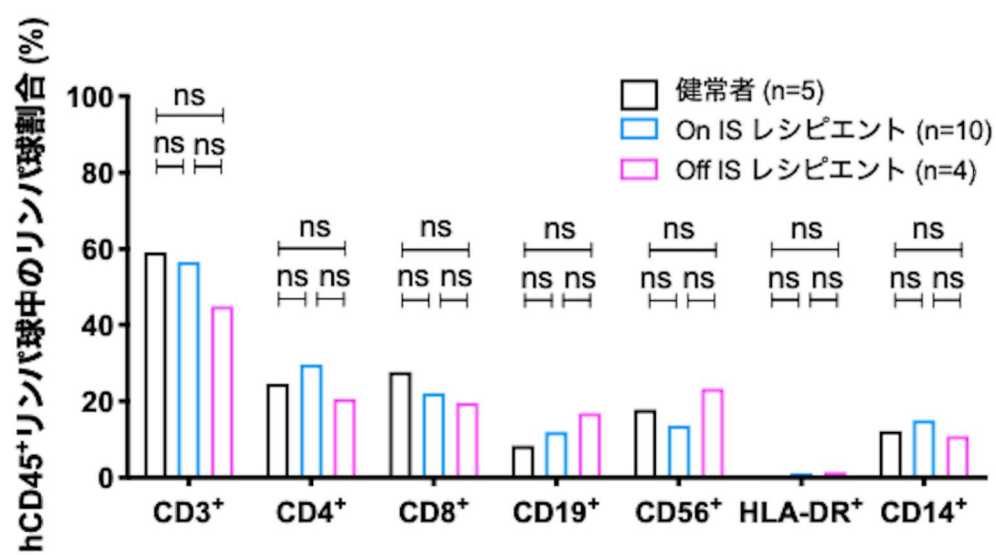
2.5×10^6 hu-PBMC腹腔内投与後14日の3~8匹のNSGマウス（8~16週齢）の末梢血におけるhCD45⁺リンパ球の割合を評価した。(A) 健常者; i~v。(B) 免疫抑制療法中の肝移植後レシピエント (On IS); 1~10。(C) 免疫抑制剤を中止できた肝移植後レシピエント (Off IS); I~IV。(D) 各群におけるhCD45⁺リンパ球の再構築率に差があるかを検討した。健康者（黒丸）、レシピエント（On IS; 青い四角、Off IS; 赤い三角）の平均再構成率を縦軸に示した。健康者のhCD45⁺リンパ球の再構成率は、レシピエントのそれよりも低い傾向を認めた（vs On IS; $p = 0.16$, vs Off IS; $p = 0.32$, one-way ANOVA）。

7. NSG への再構築前後のヒトリンパ球分画の検討

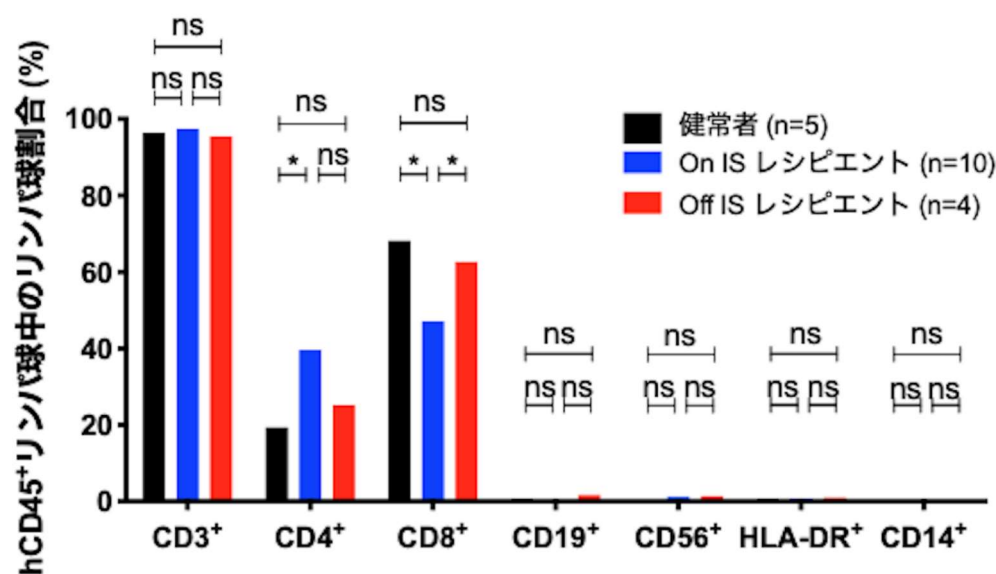
健常者と生体肝移植後レシピエントの hu-PBMC を NSG マウスに再構築した際に、どのようなリンパ球が再構築されるのかを調べる目的で、再構築前の hu-PBMC (Fresh PBMC) の各群のリンパ球分画と hu-PBMC 腹腔内投与 3 週間後 (hu-PBMC-

NSG) のマウス末梢血と脾臓内における hCD45⁺リンパ球分画を測定、比較した。Fresh PBMC において、健常者 (n=5) と免疫抑制療法中レシピエント (On IS レシピエント, n=10)、免疫抑制剤中止レシピエント (Off IS レシピエント, n=4) では、リンパ球分画に相違は見られなかった (図 11A)。hu-PBMC-NSG 末梢血における hCD45⁺リンパ球分画では、全ての群で hCD3⁺T 細胞が 90%以上と優位な細胞集団となり (健常者; $59.17 \pm 2.98 \rightarrow 96.35 \pm 1.39 \%$, $p < 0.001$, On IS; $55.98 \pm 7.43 \rightarrow 97.50 \pm 0.82 \%$, $p < 0.001$, Off IS; $44.81 \pm 7.40 \rightarrow 95.53 \pm 1.58 \%$, $p < 0.05$, paired t-test, 図 11 B, D)、特に hCD8⁺T 細胞の有意な増加 (健常者; $27.63 \pm 3.45 \rightarrow 68.14 \pm 3.98 \%$, $p < 0.001$, On IS; $20.33 \pm 3.79 \rightarrow 47.17 \pm 3.09 \%$, $p < 0.001$, Off IS; $19.52 \pm 3.51 \rightarrow 62.69 \pm 6.96 \%$, $p < 0.01$, paired t-test, 図 11D) を認めた。免疫抑制療法中レシピエントでは他の 2 群に比べ CD4⁺/CD8⁺T 細胞比が大きくなる傾向が見られたが、各群間でリンパ球分画に有意な相違は見られなかった (図 11B)。また、hCD3⁺CD19⁺B 細胞、hCD3⁺CD19⁺CD56⁺NK 細胞、hCD3⁺CD19⁺HLA-DR⁺樹状細胞、hCD3⁺CD19⁺CD14⁺単球 (Maecker et al., 2012) は hu-PBMC-NSG 末梢血中には観察されなかった (図 11B)。hu-PBMC-NSG 脾臓内でも、末梢血と同様に hCD3⁺T 細胞の優位に再構築を認めた (健常者; $59.17 \pm 2.98 \rightarrow 86.45 \pm 3.08 \%$, $p < 0.01$, On IS; $55.98 \pm 7.43 \rightarrow 86.61 \pm 2.84 \%$, $p < 0.01$, Off IS; $44.81 \pm 7.40 \rightarrow 85.15 \pm 4.14 \%$, $p < 0.05$, paired t-test, 図 11 C, E)。さらに hCD8⁺T 細胞の有意な増加 (健常者; $27.63 \pm 3.45 \rightarrow 55.21 \pm 2.49 \%$, $p < 0.01$, On IS; $20.33 \pm 3.79 \rightarrow 38.95 \pm 2.42 \%$, $p < 0.01$, Off IS; $19.52 \pm 3.51 \rightarrow 50.56 \pm 6.88 \%$, $p < 0.05$, paired t-test, 図 11E) を認め、免疫抑制中レシピエントにおいて CD4⁺/CD8⁺陽性 T 細胞比が大きくなる傾向があった (図 11C)。一方、hu-PBMC-NSG 末梢血と異なり、脾細胞では hCD3⁺CD19⁺B 細胞、hCD3⁺CD19⁺HLA-DR⁺樹状細胞の再構築が確認された (図 11C)。

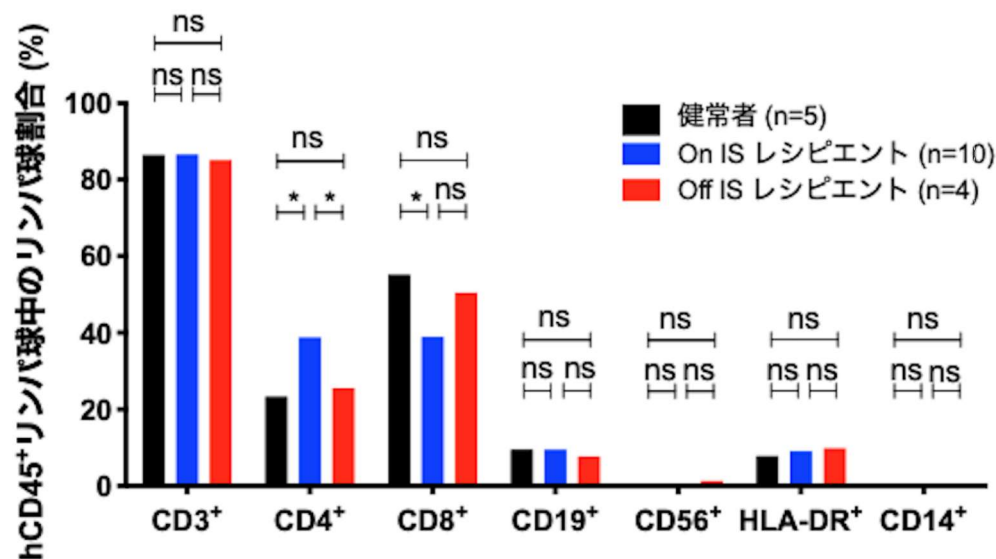
A



B



C



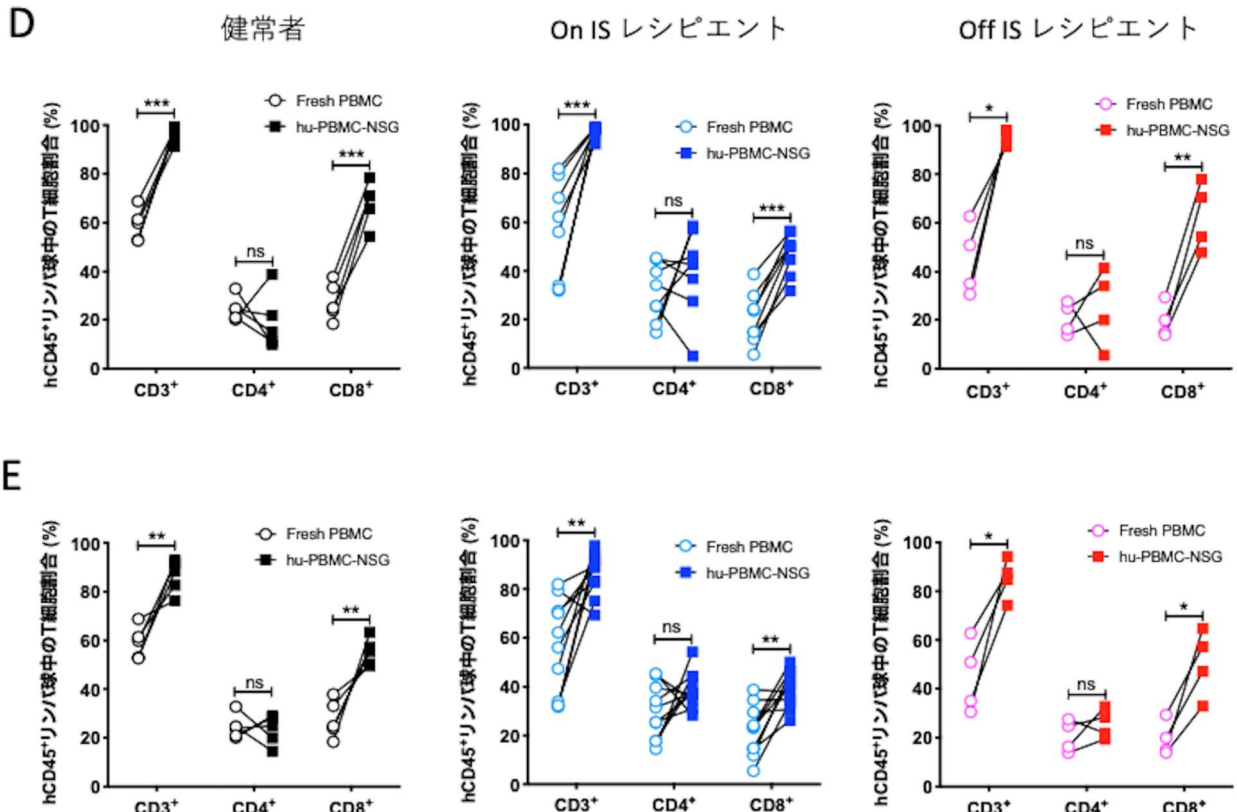


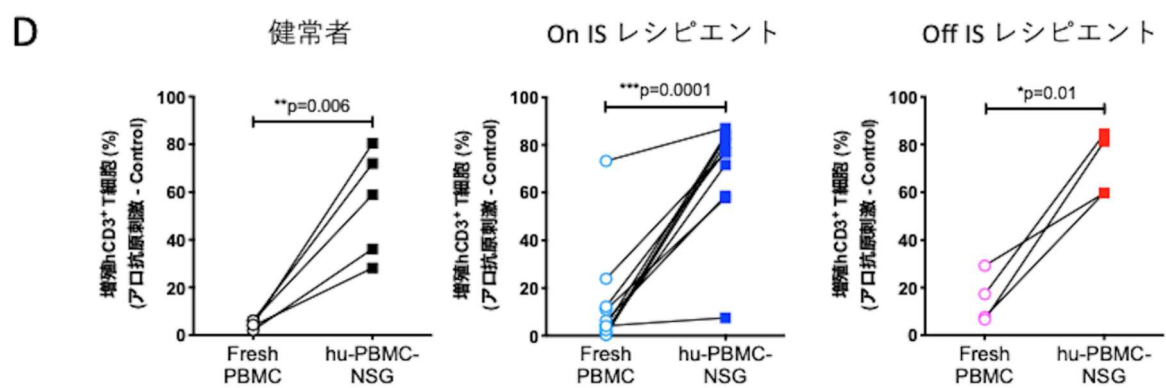
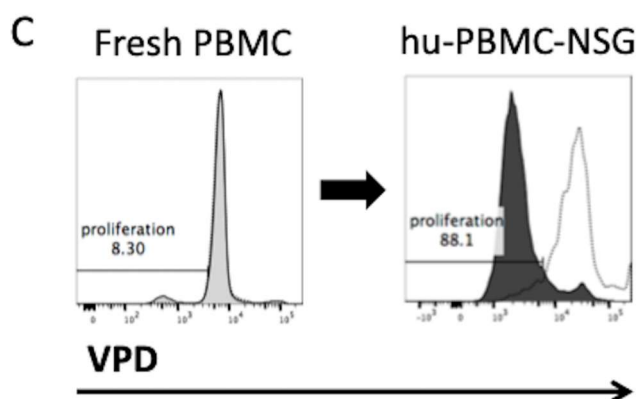
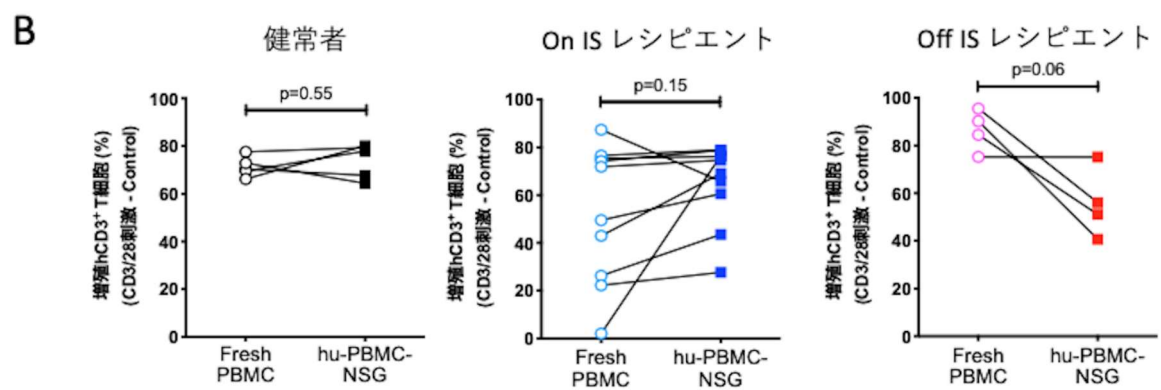
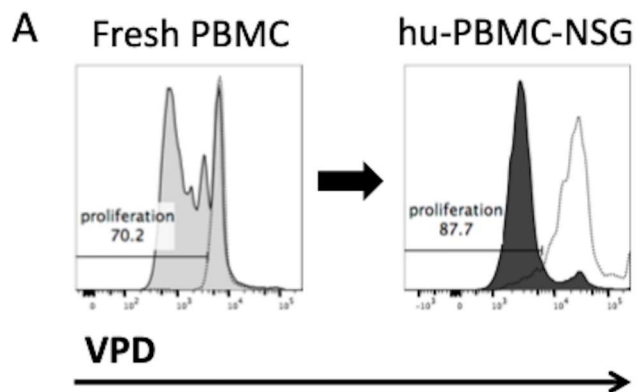
図11 hu-PBMC (Fresh PBMC)とhu-PBMC-NSGにおけるhCD45⁺リンパ球分画の検討

フローサイトメトリーによりhCD45⁺リンパ球におけるhCD3⁺T細胞, hCD3⁺CD4⁺T細胞, hCD3⁺CD8⁺T細胞, hCD3⁺CD19⁺B細胞, hCD3⁺CD19⁺CD56⁺NK細胞, hCD3⁺CD19⁺HLA-DR⁺樹状細胞, hCD3⁺CD19⁺CD14⁺単球の分画を測定した。各群のFresh PBMC (A)、hu-PBMC-NSG末梢血 (B)、hu-PBMC-NSG脾細胞 (C)におけるリンパ球分画を示す。hu-PBMC-NSG末梢血、脾細胞においてhCD4⁺T細胞、hCD8⁺T細胞分画がOn IS群で他群に比較し相違があった以外、hu-PBMCにおける分画も含め有意な違いは認めなかった (A)~(C)。各Dataは2~3の独立した実験を施行し、mean ± SEMで示した。各群でFresh PBMCとhu-PBMC-NSG末梢血 (D)・脾細胞 (E)においてhCD3⁺T細胞とその分画がどのように変化するかを検討した。全ての群でhCD3⁺T細胞、特にhCD8⁺T細胞の割合がFresh PBMCに比べ有意に上昇していた (D, E)。One-way ANOVA (A~C), paired t-test (D, E), *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001.

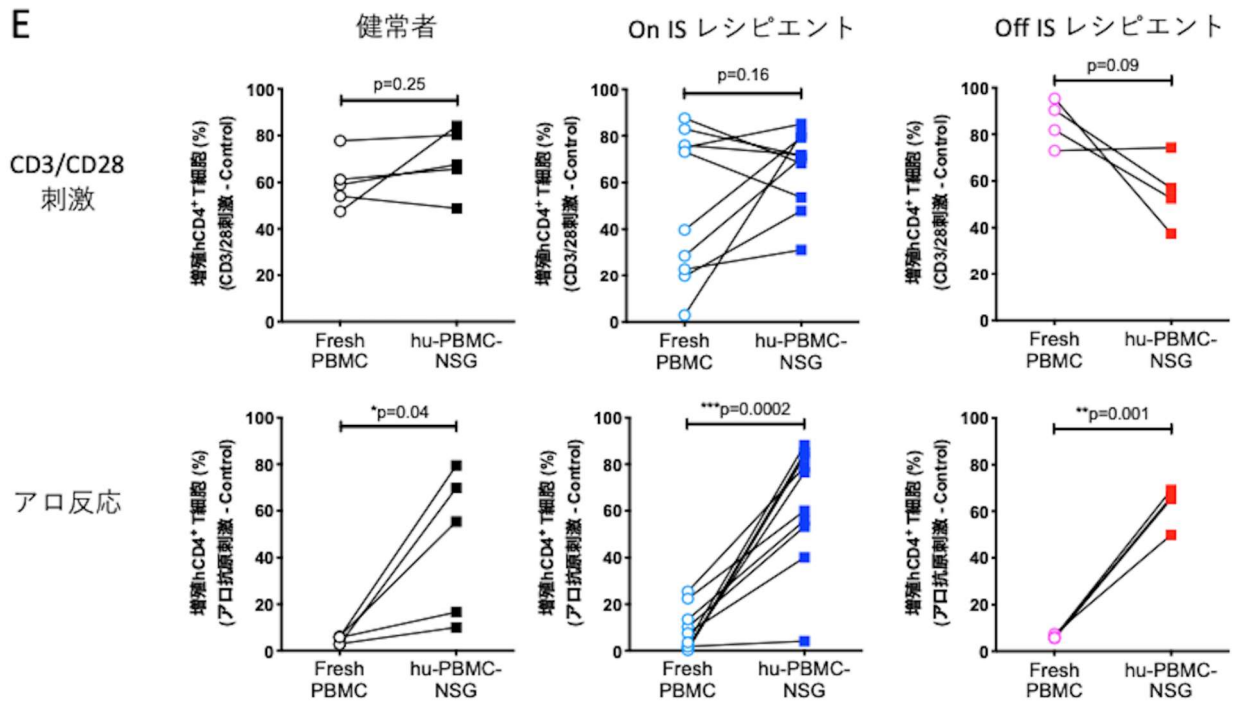
8. hu-PBMC-NSG における hCD3⁺T 細胞のアロ反応性の増幅

hu-PBMC-NSG における hCD3⁺T 細胞が Fresh PBMC の hCD3⁺T 細胞と同様の反応性を示すかを調べるため、hu-PBMC-NSG 末梢血、脾細胞、骨髓細胞より採取した hCD3⁺T 細胞の CD3/CD28 増殖刺激に対する反応を VPD 染色による T cell proliferation assay を用いて観察した。健常者 (n=5)、免疫抑制療法中レシピエント (On IS レシピエント, n=10)、免疫抑制剤中止レシピエント (Off IS レシピエント,

n=4) における hu-PBMC-NSG の hCD3⁺T 細胞は CD3/CD28 増殖刺激に対し十分な増殖反応を示し、その増殖細胞の割合は Fresh PBMC における割合に比べて有意差を認めなかった (健常者; p=0.55, On IS; p=0.15, Off IS; p=0.06, paired t-test, 図 12 A, B)。続いて、アロ抗原 (HLA mismatch ≤3, 表, 1~3) に対する hCD3⁺T 細胞の増殖を VPD/CFSE 染色による MLR を用いて観察した。アロ抗原に対する hCD3⁺T 細胞の増殖割合は、健常者では、Fresh PBMC で 4.50 ± 0.76% (Mean ± SEM)であったのに対し、hu-PBMC-NSG の hCD3⁺T 細胞では、55.14 ± 10.07%と有意に上昇していた (p<0.01, paired t test, 図 12 C, D)。この傾向は、免疫抑制療法中レシピエント、免疫抑制剤中止レシピエントでも同様であった (On IS; Fresh PBMC 13.90 ± 6.96%, hu-PBMC-NSG 68.45 ± 7.48%, p<0.001, Off IS; Fresh PBMC 15.24 ± 2.25%, hu-PBMC-NSG 71.36 ± 6.72%, p<0.05, paired t-test, 図 12 C, D)。hCD4⁺/hCD8⁺T 細胞に関しても同様の検討を行った。hCD4⁺/hCD8⁺T 細胞いずれも hu-PBMC-NSG での反応は、Fresh PBMC に比べ CD3/CD28 刺激に対して同等、もしくはやや低下していた (図 12 E, F 上段)。一方、アロ反応ではすべての群で hu-PBMC-NSG での反応は、Fresh PBMC に比べ有意に増幅した (図 12 E, F 下段)。hCD4⁺T 細胞と hCD8⁺T 細胞における反応増幅の傾向には大きな違いは見られなかった。hu-PBMC-NSG の hCD3⁺T 細胞は、Fresh PBMC に比べ、CD3/CD28 増殖刺激に対しては同等の十分な反応を示す一方で、アロ抗原に対しては反応が有意に増幅することが示された。



E



F

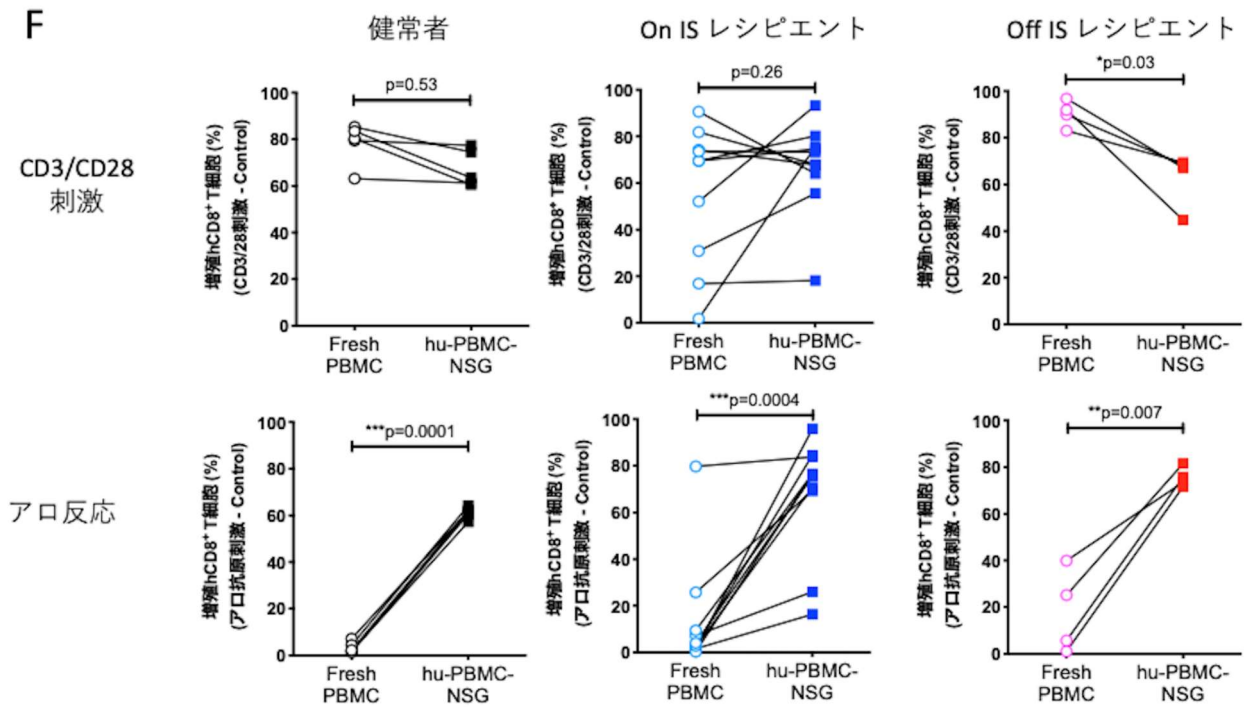


図12 hu-PBMC (Fresh PBMC)と hu-PBMC-NSGにおけるCD3/CD28刺激、アロ抗原刺激に対するhCD3⁺T細胞の反応性の検討

Fresh PBMC (白抜き丸)と hu-PBMC-NSGより採取したhCD3⁺T細胞 (塗りつぶし四角)に CD3/CD28刺激を行い、刺激に対して増殖したhCD3⁺T細胞 (A,B)、hCD4⁺T細胞 (E, 上段)、hCD8⁺T細胞 (F, 上段)の割合を比較検討した。(B, E, F) 健常者; 左、On IS; 中央、Off IS; 右。(A) hCD3⁺T細胞増殖におけるヒストグラム (点線はcontrol; 刺激なし)。

Fresh PBMC (白抜き丸)と hu-PBMC-NSGより採取したhCD3⁺T細胞 (塗りつぶし四角)に CD アロ抗原刺激を行い、刺激に対して増殖したhCD3⁺T細胞 (C,D)、hCD4⁺T細胞 (E, 下段)、hCD8⁺T細胞 (F, 下段)の割合を比較検討した。(D, E, F) 健常者; 左、On IS; 中央、Off IS; 右。(C) hCD3⁺T細胞増殖におけるヒストグラム (点線はcontrol; 刺激なし)。

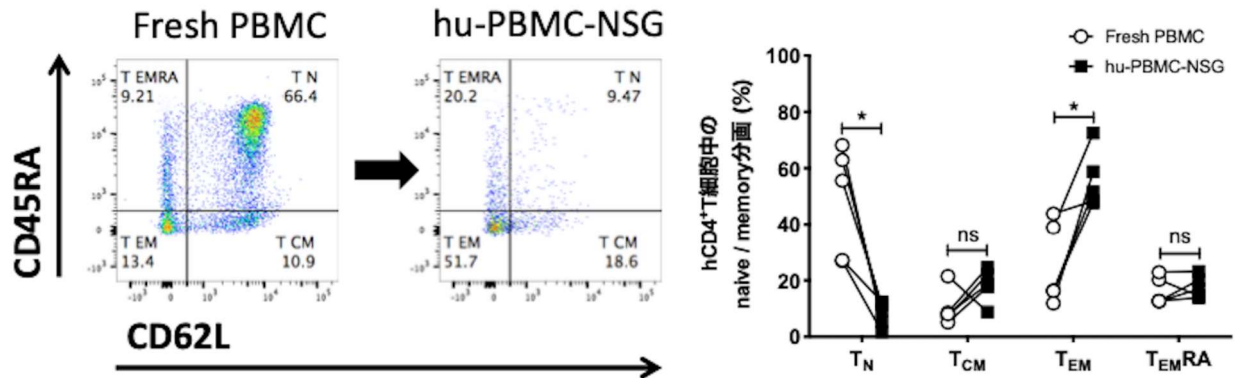
CD3/CD28刺激にはFresh PBMC、hu-PBMC-NSG共に同等に反応する一方で、アロ抗原に対するhCD3⁺T細胞応答は、hu-PBMC-NSGにおいてFresh PBMCに比べ有意に増強することが全群で観察された。paired t-test (B, D, E, F), *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001.

9. hu-PBMC (Fresh PBMC)と hu-PBMC-NSG における hCD4⁺,および hCD8⁺T 細胞分画の検討

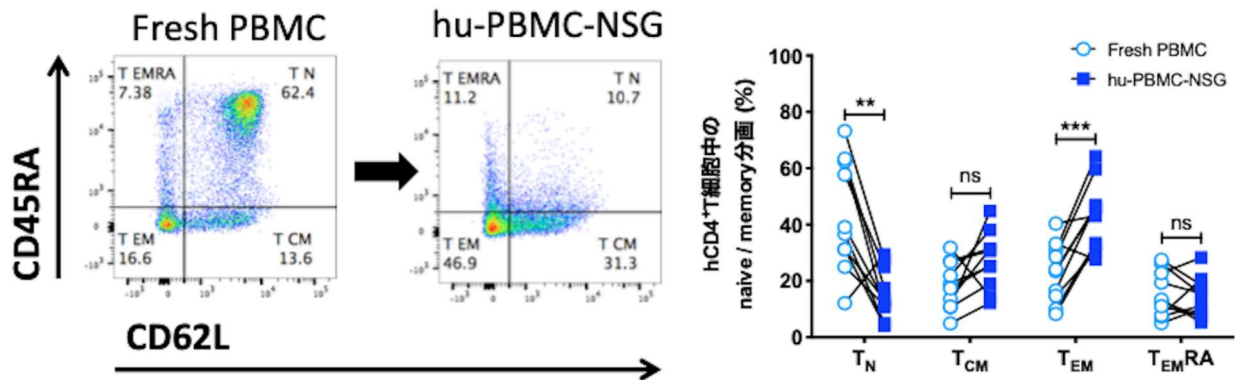
hu-PBMC-NSG の hCD3⁺T 細胞アロ反応が、Fresh PBMC に比べ増幅されることが明らかとなった。このアロ反応増幅が起こる原因を解明するため hu-PBMC の NSG マウスへの再構築前後で T 細胞分画がどのように変化するかを比較、検討した。まず、臓器移植におけるアロ反応の主体である T 細胞(Sayegh and Turka, 1998)(Heeger, 2003)の中で、Naïve/Memory 分画がどのように変化するかを調べる目的で、Fresh PBMC と hu-PBMC-NSG 脾細胞中の hCD4⁺/hCD8⁺T 細胞における Naïve, Memory 分画を測定した。ヒト化マウスモデルを用いた以前の報告(Ali et al., 2012; Zaitsev et al., 2017 ; King et al., 2008)と一致して hCD4⁺T 細胞では、健常者 (n=5)、免疫抑制療法中レシピエント (On IS レシピエント, n=10)、免疫抑制剤中止レシピエント (Off IS レシピエント, n=4)の全ての群で hu-PBMC-NSG における CD45RA⁺CD62L^{hi} Naïve T 細胞 (T_N) の有意な減少 (健常者; 48.16 ± 8.85 → 8.08 ± 2.00 %, p<0.05, On IS; 40.64 ± 5.91 → 15.70 ± 2.84 %, p<0.01, Off IS; 45.15 ± 10.46 → 4.93 ± 1.24 %, p<0.05, paired t-test, 図 13 A~C) と CD45RA⁺CD62L^{lo} effector memory T 細胞 (T_{EM})の有意な増加 (健常者; 25.50 ± 6.61 → 55.82 ± 4.61 %, p<0.05, On IS; 23.03 ± 3.33 → 43.05 ± 3.88 %, p<0.001, Off IS; 45.15 ± 10.49 → 4.933 ± 1.24 %, p<0.05, paired t-test, 図 13 A~C) がみられた。同様に hCD8⁺T 細胞でも、T_Nの減少傾向 (健常者; 30.49 ± 8.24 → 17.42 ± 3.79%, p=0.14, On IS; 42.69 ± 6.06 → 24.47 ± 4.23 %, p<0.01, Off IS; 40.40 ± 6.35 → 8.45 ± 1.09 %, p<0.01, paired t test, 図 13 E~F) 、T_{EM}の有意な増加 (健常者; 8.62 ± 2.01 → 30.78 ± 4.29%, p<0.01, On IS; 8.94 ± 1.79 → 32.61 ± 4.31 %, p<0.001, Off IS; 7.53 ± 2.04 → 54.70 ± 2.11 %, p<0.01, paired t test, 図 13 D~F)

が見られた。また hCD8⁺T 細胞では、hCD45RA⁺CD62L^{hi} central memory T 細胞 (T_{CM}) の増加傾向 (健常者; $1.70 \pm 1.01 \rightarrow 11.25 \pm 3.69 \%$, $p=0.06$, On IS; $4.50 \pm 1.23 \rightarrow 17.38 \pm 2.80 \%$, $p<0.01$, Off IS; $3.70 \pm 1.34 \rightarrow 21.50 \pm 2.52 \%$, $p<0.05$, paired t-test, 図 13 D~F) を認めた。以上より、ヒト化マウスに再構築した hCD3⁺T 細胞のアロ抗原反応増幅に、hu-PBMC 再構築後の hCD4⁺T_{EM}、hCD8⁺T_{CM}、T_{EM} への細胞集団の変化が関与している可能性が示唆された。

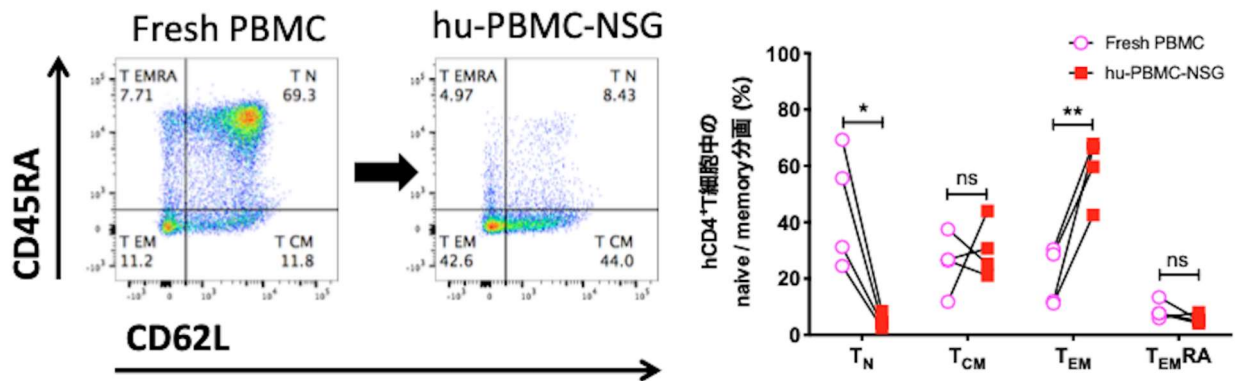
A



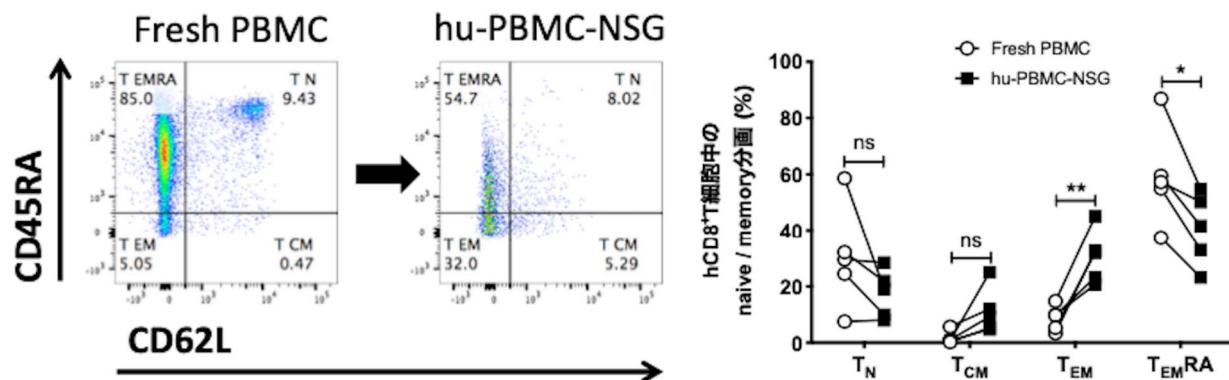
B



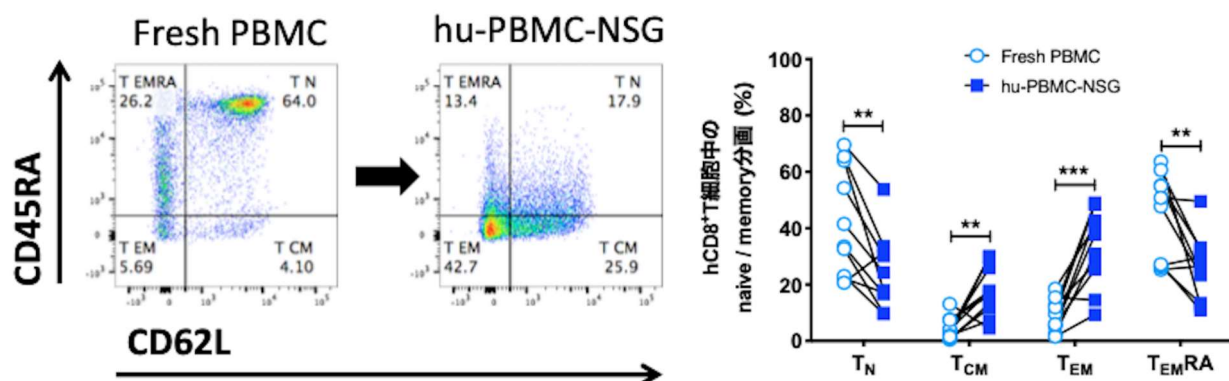
C



D



E



F

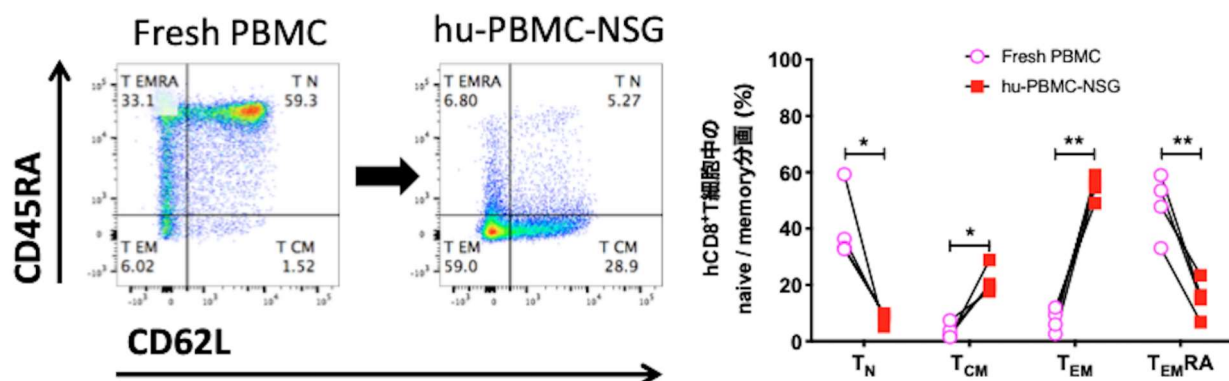


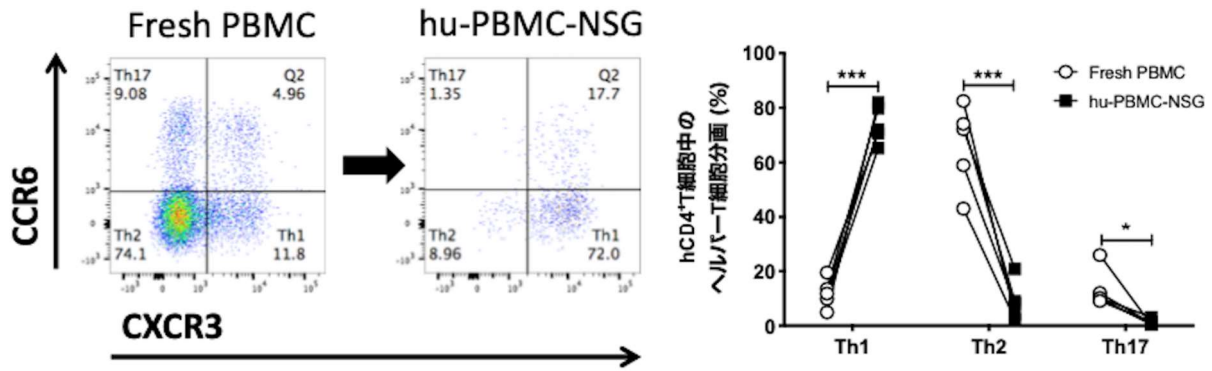
図13 hu-PBMC (Fresh PBMC)と hu-PBMC-NSGにおけるhCD4⁺,およびhCD8⁺T細胞分画の検討

Fresh PBMC (白抜き丸)と hu-PBMC-NSG (塗りつぶし四角)におけるhCD3⁺CD4⁺T細胞 (A~C), hCD3⁺CD8⁺T細胞 (D~E)のnaïve, memory分画の変化をフローサイトメトリーを用いて検討した。健康人 (n=5, A, D)、On IS (n=10, B, E)、Off IS (n=4, C, F)。各図の左には代表的なdot plots imageを示した。hCD45RA⁺CD62L⁺ naïve T (T_N) cell, hCD45⁻CD62L⁺ central memory T (T_{CM}) cell, hCD45RA⁻CD62L⁻ effector memory T (T_{EM}) cell, hCD45RA⁺CD62L⁻ terminally differentiated effector memory T (T_{EM}RA) cell (A~F)。 Paired t-test, *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001.

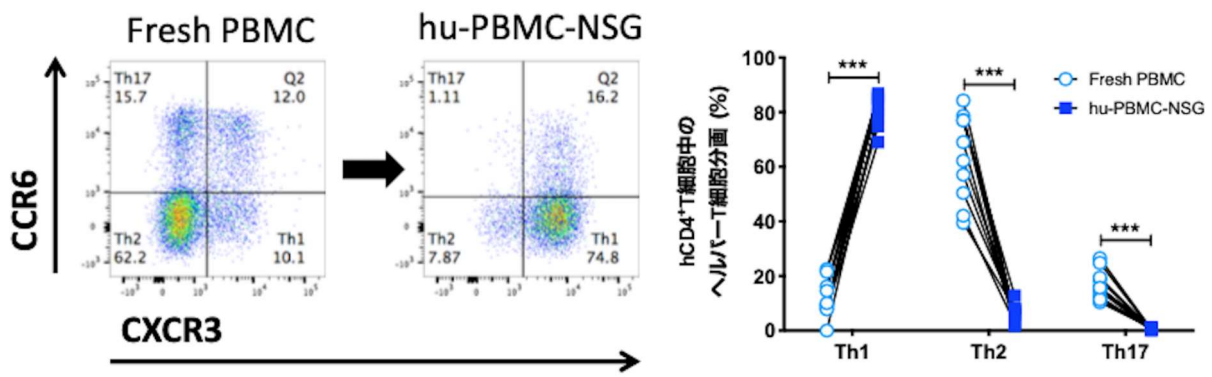
10. hu-PBMC (Fresh PBMC)と hu-PBMC-NSG おける hCD4⁺ヘルパーT 細胞分画の検討

また、アロ抗原に対する反応である拒絶反応には Th1/Th17 細胞が重要な役割を果たすことが知られている (Afzali et al., 2007 ; Atalar et al., 2009 ; Wang et al., 2011)。そこで、hu-PBMC の NSG マウスへの再構築前後での hCD4⁺T 細胞におけるヘルパーT 細胞分画 (Th1/Th2/Th17) の違いを検討した。全ての群で、Fresh PBMC では CCR6⁻CXCR3⁻Th2 細胞が優位であったが、hu-PBMC-NSG では CCR6⁻CXCR3⁺Th1 細胞優位へと変化することが明らかとなった (Th1: 健康者; 11.92 ± 2.38 → 73.94 ± 3.07 %, p<0.001, On IS; 11.91 ± 2.17 → 80.81 ± 1.81 %, p<0.001, Off IS; 14.18 ± 3.50 → 75.35 ± 4.07 %, p<0.01, paired t test, Th2: 健康者; 66.18 ± 6.89 → 8.85 ± 3.23 %, p<0.001, On IS; 63.73 ± 5.06 → 6.34 ± 1.03 %, p<0.001, Off IS; 52.23 ± 9.38 → 8.69 ± 1.50 %, p<0.05, paired t-test, 図 14 A~C)。以上から hu-PBMC 再構築後の Th1 優位が、アロ反応増幅に関与している可能性が示唆された。最後に制御性 T 細胞 (T_{REG}) の変化の有無を調べる目的で、hCD4⁺T 細胞における CD25^{hi}CD127^{lo}FoxP3⁺T_{REG} の変化を検討した。健康者、免疫抑制療法中レシピエント、免疫抑制剤中止レシピエントの全ての群で明らかな傾向を示さなかった (paired t-test, 図 14 D)。

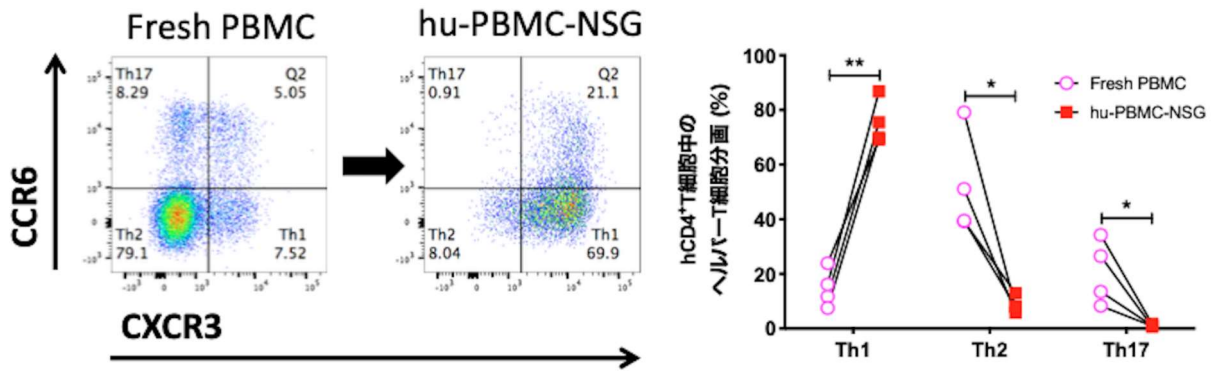
A



B



C



D

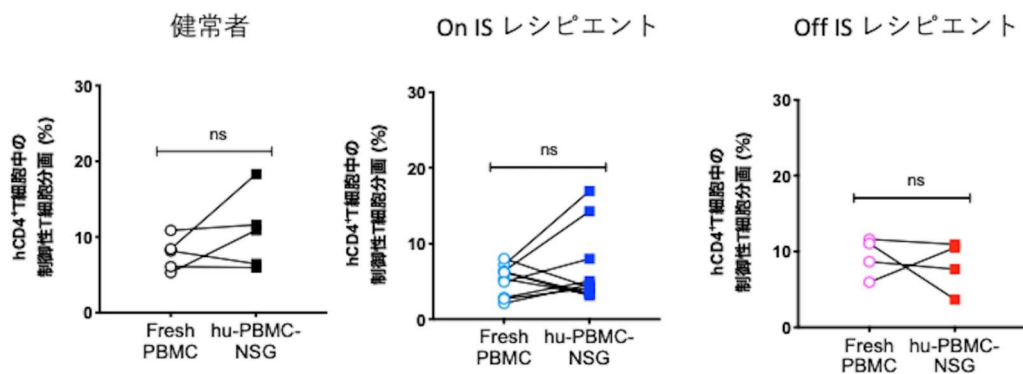


図14 hu-PBMC (Fresh PBMC)とhu-PBMC-NSGにおけるhCD4⁺T細胞のヘルパーT細胞分画および制御性T細胞の検討

Fresh PBMC (白抜き丸)とhu-PBMC-NSG (塗りつぶし四角)におけるhCD3⁺CD4⁺T細胞のヘルパーT細胞 (A~C)分画の変化、および制御性T細胞 (T_{REG})をフローサイトメトリーを用いて検討した。(A) 健康人 (n=5,)、(B) On IS (n=10)、(C) Off IS (n=4)。各図の左には代表的なdot plots imageを示した。CXCR3⁺CCR6⁻ Th1, CXCR3⁻CCR6⁻ Th2, CXCR3⁻CCR6⁺ Th17 cell (A-F)。CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}Foxp3⁺ regulatory T (T_{REG}) cell (D)。Paired t-test, *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001.

11. 生体肝移植後レシピエント hu-PBMCs と hu-PBMCs 再構築後の hCD3⁺T 細胞におけるアロ反応変動性の検討

これまでの研究より hu-PBMC-NSG における hCD3⁺T 細胞は、hu-PBMC に比べ、Memory 細胞、Th 1 細胞が有意に増加し、アロ反応性が増幅することが示された。そこで、生体肝移植後レシピエントにおいて、ドナー抗原と 3rd party 抗原に対するアロ反応性が、hu-PBMC 再構築前後でどのように変化するかを調べる目的で、生体肝移植後レシピエントにおける Fresh PBMC と hu-PBMC-NSG の hCD3⁺T 細胞を用いて MLR を施行し、ドナー抗原・3rd party 抗原に対する反応性の変化を観察、検討した。まず、免疫抑制療法中レシピエント (n=10) において検討を行った。Fresh PBMC を用いた MLR では、7 例 (#1, 3, 4, 5, 6, 7, 8) がドナー抗原・3rd party 抗原両者に対する反応が弱かった。また、2 例 (#9, 10) は 3rd party 抗原に対する反応は保たれているにも関わらずドナー抗原に対する反応性の低下 (Donor Ag-specific hyporesponsiveness) が見られた。さらに、1 例 (#2) はドナー抗原・3rd party 抗原に対して非常に強く反応が見られた (図 15 A)。対して、hu-PBMC-NSG の hCD3⁺T 細胞を用いた MLR では、全ての症例で、前述のようにアロ反応増幅が見られ、ドナー抗原と 3rd party 抗原に対する反応の違いを明瞭に観察することができ、8 例では、ドナー抗原に対する反応が低くなる傾向があった。一方、#1, #2 はドナー抗原に対する反応が Fresh PBMC を用いた MLR に比べ強く見られた (図 15 B)。実際にこの 2 例は肝移植後頻回な拒絶反応の既往を認めていた (表 2, 図 2)。hu-PBMC-NSG マウスにおけるドナー抗原への強い反応は、レシピエントにおける拒絶反応の高リスクの指標となり得る可能性が示された。続いて、免疫抑制剤中止レシピエント (n=4) における検討を行った。既報では、免疫抑制剤を中止できた、いわゆる免疫寛容症例では hu-PBMC を用いた MLR で Donor Ag-specific hyporesponsiveness を認めることが示されている (Nafady-Hego et al., 2016)。本検討でも免疫抑制剤中止レシピエント 4 症例は全て Fresh PBMC、hu-PBMC-NSG を用いた MLR で Donor Ag-specific hyporesponsiveness を認め (図 15 A, B)、hu-PBMC-NSG で再構築された hCD3⁺T 細胞

胞も Donor Ag-specific hyporesponsiveness は保たれていることが示唆された。さらに、ドナー抗原に対する反応は 3rd party 抗原に対する反応に比べ ($[\text{Donor} - 3^{\text{rd}} \text{ party}] / 3^{\text{rd}} \text{ party} \times 100$)、30%以上の低下(range 32.48 – 92.77%) を認めた。hu-PBMC-NSG において観察される Donor Ag-specific hyporesponsiveness は、肝移植後レシピエントの免疫抑制剤減量の可能性を示唆するものと考えられる。次に hu-PBMC-NSG を用いた MLR において $[\text{Donor} - 3^{\text{rd}} \text{ party}] / 3^{\text{rd}} \text{ party} \times 100$ の 30%以上の低下が見られる症例を免疫抑制療法中レシピエント 10 例で検討すると、ドナー抗原に対する反応が低下していた 8 例のうち 4 例 (#3, 5, 7, 9) で免疫抑制剤中止レシピエントと同様の Donor Ag-specific hyporesponsiveness が観察された (図 15 C)。

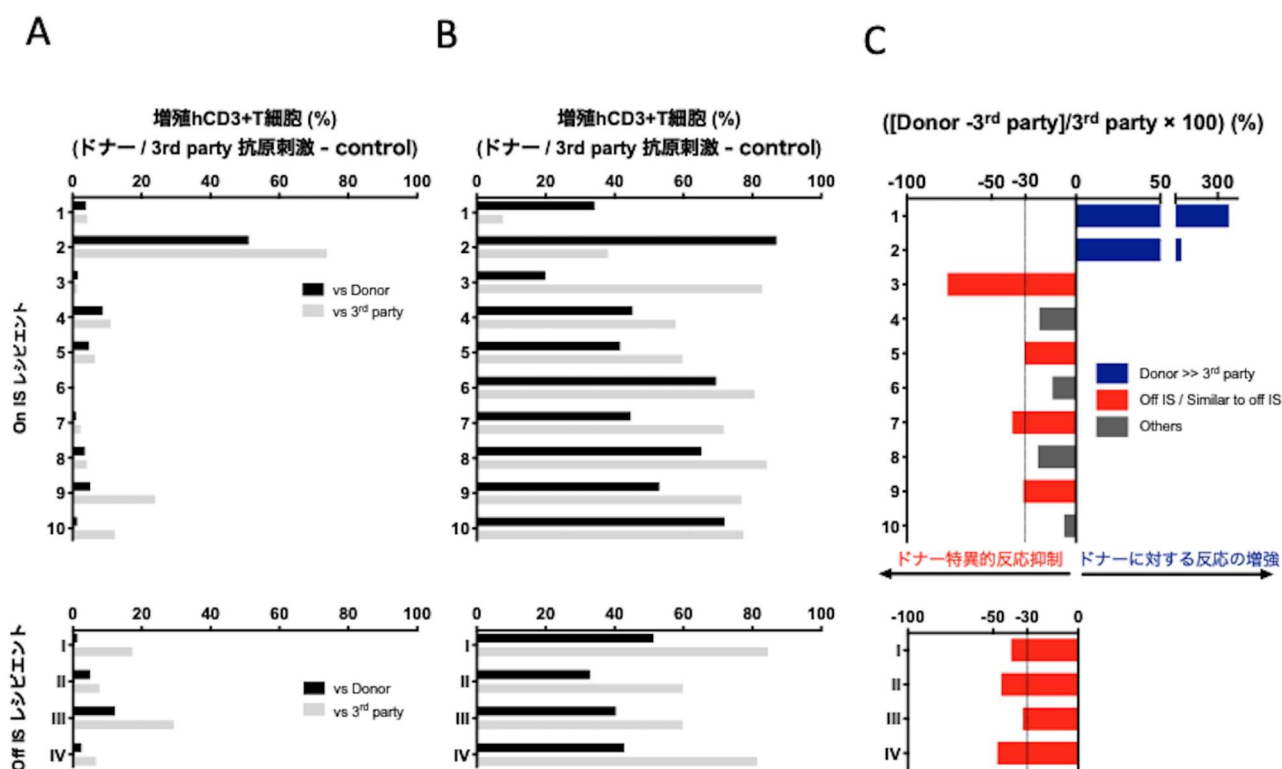


図15 肝移植後レシピエントでのhu-PBMC (Fresh PBMC)とhu-PBMC-NSGにおけるhCD3⁺T細胞のアロ反応変動性の検討

(A, B) Fresh PBMC (A), hu-PBMC-NSG (B) を用いた各レシピエントのMLRにおけるhCD3⁺T細胞の増殖割合を横軸に示す。各ドナーに対する反応を黒い帯、3rd Partyに対する反応を灰色の帯で示した。それぞれ上段が免疫抑制療法中レシピエント、下段が免疫抑制剤中止レシピエントである。
 (C) hu-PBMC-NSGによるMLR結果において、ドナー抗原に対する反応を3rd partyに対する反応を、 $[\text{Donor} - \text{third party}] / \text{third party} \times 100$ の計算式で比較した。免疫抑制剤中止レシピエントでは4例全てで30%以上の低下を認めた (C, 下段)。免疫抑制療法中レシピエントは免疫抑制剤中止レシピエントと同様に30%以上の低下を認めるもの (Similar to off IS; 赤い帯)、ドナーに対する反応が強く、Fresh PBMCによるMLR結果とドナーと3rd partyに対する反応が逆転したもの (Donor >> 3rd party; 青い帯)、その他 (others)に分類された。

考察

今回、我々は生体肝移植後レシピエントの免疫状態を評価する新しい免疫状態の観察、機序解析のツールとしてヒト化マウスモデルを用いたレシピエントの免疫状態解析法の確立を試みた。

ヒト化マウスモデルは個人のヒト免疫状態を評価するツールとして発展し、近年の免疫不全マウスの開発に伴いヒト細胞・組織の再構築における最適なモデルが確立されており(Shultz et al., 2007)、我々はヒト免疫細胞の再構築が良好であるとされている NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm/Wjl}/Sz (NOD/SCID/IL2r γ ^{null}; NSG) マウスを採用し研究を行った。

まず、健常人に対して hu-PBMC-NSG マウスの作成、マウス内の hCD45⁺リンパ球分画の観察、hu-PBMC-NSG 再構築後のアロ反応の評価を検討した。NSG マウスの健常人における研究では、 $1\sim 2\times 10^7$ 個の hu-PBMC 投与後 14~21 日目に、15~35%の hCD45⁺リンパ球が NSG マウスに再構築されることが示されている(Harui et al., 2011; Racki et al., 2010; Hilger et al., 2016)。さらに、NSG マウスに前処置として亜致死量の放射線照射 (2.0Gy) を行うことで、より少量の hu-PBMC ($1\sim 5\times 10^6$ 個) 投与で、より高率な hCD45⁺リンパ球 (20%~50%) の再構築が可能であることが報告されている(Ali et al., 2012; Fujii et al., 2015; King et al., 2009)。また、臓器移植後レシピエントの臨床試料を用いた研究では、移植後 3 週間未満の肺移植レシピエントから 5.0×10^6 個の hu-PBMC を NOD rag^{-/-}IL-2Rgc^{-/-}マウスに腹腔内投与し、投与後 4 週間で末梢血中に 30%~40%の CD45⁺リンパ球が確認された(Siemeni et al., 2016)。本研究では、当初 NSG マウスに前処置を行わず、hu-PBMC を投与し再構築するモデルの確立を目指したが、hCD45⁺リンパ球の再構築率が低く、多量の血液サンプルを必要とした。このため、マウスに 2.0Gy 放射線照射を施行することで hu-PBMC 投与 14 日後の hu-PBMC-NSG に 20~40%の hCD45⁺リンパ球の再構築に成功し、本モデルを採用した (図 3)。また、既報ではヒト化マウスで再構成されたリンパ球の大部分は hCD3⁺T 細胞集団と B 細胞のサブセットであり、単球はまれであるとされている(Ali et al., 2012; Hilger et al., 2016)。本研究でも、hu-PBMC-NSG 作成後に再構築された hCD45⁺リンパ球分画を測定し、hCD3⁺T 細胞が優位な分画となること、hCD3⁺リンパ球では少量の B 細胞、樹状細胞が再構築され、単球、NK 細胞はほとんど再構築されないことを確認した (図 4)。さらに、このモデルでは hu-PBMC 投与後 21 日目までに、移植片対宿主病 (GVHD) による体重減少もマウスの死亡も観察されなかった。このことから hu-PBMC-NSG マウスモデルは、再構築した hu-PBMC のアロ抗原に対する反応性を評価し得ると考えた。こ

のモデルは、生体内の複雑な免疫ネットワークの評価 (*in vivo* assessment)を可能にし、生体肝移植後レシピエント個々の免疫状態の理解を深めることで、免疫抑制剤のより正確な投与量調整に寄与する可能性がある。

ヒト化マウスを用いたヒトアロ反応を検討した先行研究として、免疫不全マウスに hu-PBMC やヒト T 細胞を再構築させ、先行移植したヒト皮膚(Racki et al., 2010 ; Issa et al., 2010 ; Zaitzu et al., 2017 ; Sagoo et al., 2013)、ヒト臍島、ヒト血管に (King et al., 2008 ; Wu et al., 2013 ; Lorber et al., 1999)に対する拒絶反応を検討した報告がある。また、臓器移植後レシピエントのドナー抗原を含めたアロ抗原に対する反応を、レシピエント hu-PBMC とアロ抗原をマウスの耳介や足底に注入し炎症反応を *in vivo* で観察する Trans-vivo DTH assay の報告 (VanBuskirk et al., 2000 ; Pelletier et al., 2007)がある。これらの方法論は全て、*in vivo* でヒト免疫反応を観察できるものであるが、細胞や組織の傷害、細胞浸潤の観察、炎症所見の観察を行うものであり、ヒト免疫反応を定量的に評価できるものではない。我々は、肝移植後レシピエントのドナー、3rd party 抗原に対する反応を定量的に観察することで、個々の免疫状態を詳細に把握し、免疫抑制剤の調整を行う指標となることを目的とした。まず、*in vivo* で免疫状態を観察するモデルとして、hu-PBMC-NSG にアロ抗原を投与し、末梢血、腹腔内洗浄液から hCD45⁺リンパ球を採取、増殖細胞を評価する方法論を検討した。どちらのモデルも control に比べ、増殖細胞の指標である Ki67⁺リンパ球の変動が強く見られたことから、何かしらのアロ反応が起こっていることは示唆された (図 5, 6)。しかし、マウス個体差による変動も大きく、また頻回な hu-PBMC やアロ抗原の投与、末梢血や腹腔内洗浄液の採取というマウス個体に対するストレスが強く、評価前や評価中に衰弱もしくは死亡してしまうマウスも存在したため、定量的な評価が困難であると判断した。

in vivo における検討とこれまでの報告から、hu-PBMC-NSG に再構築した hCD45⁺リンパ球はアロ抗原に対して反応することが示唆された。そこで、hu-PBMC-NSG より採取した hCD45⁺リンパ球を *in vitro* (*ex vivo*)でアロ抗原と反応させ増殖細胞を Flowcytometry で評価できるのではないかと考えた。hu-PBMC-NSG 由来の hCD45⁺リンパ球を *in vitro* でアロ抗原と反応させる MLR を用いて、再構築前の Fresh PBMC での反応と比較した。健常者における hu-PBMC-NSG、Fresh PBMC を用いた検討では、両者とも control (刺激なし)では細胞増殖がほとんど見られず、CD3/CD28 刺激に強く反応し、アロ抗原刺激に対しても CD3/CD28 刺激ほど強い反応は見られず、同様の反応傾向を示した (図 8, 9)。しかし、増殖細胞を Ki67⁺細胞で評価した場合、Fresh PBMC に比べ、全体的に反応が弱い傾向を認めた (図 8)。後述するが、CFSE や VPD といった細胞内蛍光色素ラベリングによる増殖細胞

反応を評価した場合、hu-PBMC-NSG においてはアロ反応の増幅が観察された。これは、hu-PBMC-NSG に再構築されたヒト T 細胞が Fresh PBMC に比べ活性化された状態になり、このことで増殖周期が早まっている可能性がある。Ki67 は現時点で増殖期にある細胞を評価できるため、細胞の増殖周期が早まり MLR 評価の時点で増殖を終えてしまった細胞に関しては Ki67 は陰性となってしまう可能性があり、これが、反応が弱く評価されてしまった原因ではないかと考えた。モデル作成時の状況で n=1 での検討であり、原因についてはさらなる個体での検討が必要ではあるが、CFSE/VPD 染色での評価では、アロ抗原投与時から増殖した全ての細胞を評価することが可能であり、hu-PBMC-NSG を用いた結果がより Fresh PBMC での反応に近く、本研究では増殖細胞の評価に細胞内染色法を採用した。

hu-PBMC-NSG モデル、アロ反応 *ex vivo* 評価モデルを確立したのちに、肝移植後レシピエントの hu-PBMC を用いた検討を行った。まず、hu-PBMC-NSG での hCD45⁺リンパ球の再構築率について検討した。hu-PBMC 投与 14 日後の hu-PBMC-NSG 末梢血には全例で 20-40% の hCD45⁺リンパ球の再構築を認め、肝移植後レシピエントでも健常者と同等以上の hCD45⁺リンパ球の再構築を確認できた (3 群で有意差無し。図 10)。

健常者、肝移植後レシピエントでの hu-PBMC-NSG における hCD45⁺リンパ球分画は、既報の通り hCD3⁺T 細胞が 90% 程度と優位な集団で、B 細胞・樹状細胞は数%に留まり、単球・NK 細胞はほとんど観察できなかった。hCD3⁺T 細胞では、健常者、免疫抑制剤中止レシピエントで hCD4/hCD8 比が 0.28 (0.07-0.87) と hCD8⁺T 細胞が優位な細胞集団であった (図 11)。これまでの報告では、hu-PBMC-NSG における hCD4/hCD8 比は 0.5-2.0 と我々の結果よりも hCD4⁺T 細胞がより多く再構築されていた (King et al., 2008 ; King et al., 2009 ; De La Rochere et al., 2018)。しかし、より少ない 5.0×10^6 個の hu-PBMC 投与で hu-PBMC-NSG を作成した場合、hCD4/hCD8 比はさらに小さく、個体変動も大きくなることが報告されている (King et al., 2009)。本研究では、外来患者からの負担を最小限にするため、診療に用いる血液量に加え、許容できる少量の血液 (30 ml) を採取し、 $15-25 \times 10^6$ 個の hu-PBMC を分離した。できる限り個々のマウスにおける再構築率を含めた結果の違いが全体に与える影響を少なくするために、マウス 1 匹あたりに少数の hu-PBMC (2.5×10^6) を可能な限り多数 (3-8 匹) の NSG マウスに投与し、再構築された hCD45⁺リンパ球の平均を用いて評価を行なった。このため、既報よりも hCD4/hCD8 比が小さくなったものと考えられた。また、免疫抑制療法中レシピエントでは、他の 2 群に比べ hCD4/hCD8 比が大きくなる傾向が見られた (図 11)。hu-PBMC-NSG における hCD8⁺T 細胞の再構築は hCD4⁺T 細胞のサポートが必要で

あることが報告されており (Wagar et al., 2000 ; Ito et al., 2017)、免疫抑制剤による T 細胞機能抑制の影響により hCD8⁺T 細胞の再構築が相対的に少なくなったことが考えられた。

ヒト化マウスモデルにおける hCD3⁺T 細胞分画は、hu-PBMC 投与 2-3 週後のマウス末梢血、脾細胞、腹腔内洗浄液において hCD4⁺および hCD8⁺T 細胞の 80-90%が hCD45RO⁺の memory phenotype となることが報告され (Ali et al., 2012 ; Zaitsev et al., 2017 ; King et al., 2008 ; Wagar et al., 2000)、本研究でも hu-PBMC-NSG において hCD4⁺、hCD8⁺T 細胞ともに hCD45RA の発現が減弱し、memory phenotype が優位になることが示された。

免疫不全マウスに T 細胞を投与、再構築した際に起こる homeostatic proliferation により naïve T 細胞は抗原非依存性に memory phenotype を獲得すること (Gudmundsdottir and Turka, 2001)、homeostatic proliferation に際し、T 細胞の T cell receptor 発現が上昇しペプチドに対する高い親和性を獲得すること (Kassiotis et al., 2003)が示されている。また、Gudmundsdottir らは、homeostatic proliferation 下での Ovalbumin (OVA)特異的 T 細胞が、共刺激がなくとも OVA 抗原に対して強い増殖反応を示すことを明らかにした。さらに single minor Ag の違いのみである雌雄の B6 マウスを用いて、雄の wild type (WT) 腎は雌の WT に移植しても拒絶されないが、雌の WT 脾細胞を homeostatic proliferation により再構築した雌の B6 RAG^{-/-}マウスに移植した場合には速やかに拒絶されることが示され (Moxham et al., 2008)、homeostatic proliferation により抗原非依存性に増殖した T 細胞は急性拒絶反応に関与する memory T 細胞が含まれていることが明らかになっている (Wu et al., 2004)。このことから homeostatic proliferation により増殖した memory T 細胞はより小さい抗原刺激で活性化し、急性拒絶反応に関与する T 細胞が含まれると考えられた。本研究では、Fresh PBMC と hu-PBMC-NSG におけるアロ反応性を比較・検討し、hu-PBMC-NSG における hCD3⁺T 細胞のアロ反応性が健常者、肝移植後レシピエントに関わらず Fresh PBMC に比べ増幅されていることを明らかにした。これは上述する既報と一致している (図 12)。また近年、CD45RA 発現を減弱させた T_{EM}RA 欠損 T 細胞のドナー特異的免疫反応の減弱と CD62L 発現を減弱させた T_{CM} 欠損 T 細胞が通常より 3-5 倍の強いドナー抗原に対する反応を示すこと (Mangare et al., 2019)、また、臓器移植における急性拒絶反応を引き起こす主な細胞が T_{EM} であることが報告されている (Wood and Goto, 2012)。ヒト化マウスモデルにおいては T_{EM} はヒト内皮細胞の傷害を引き起こすが、T_{CM} にそれを引き起こす作用はなく、hCD4⁺T_{EM} はアロ内皮細胞に対して T_{CM} に比べ多くの IFN γ を産生することが明らかとなっている (Shiao et al., 2007)。さらに hCD4⁺T 細胞のみを再構築させたヒト化マ

ウスモデルでは、より高いレベルの IFN γ 、IL-2、IL-12 が検出され相対的に低いレベルの IL-4、IL-5、IL-13 が観察されると報告されている (Kawasaki et al., 2018)。またヒト化マウスモデルにおいては IFN γ 産生増加に関して多くの既報がある (Nadig et al., 2010 ; Abraham et al., 2015 ; Abraham et al., 2017)。本研究では、Th2 分画を示す表現型が優位な細胞集団であった Fresh PBMC (図 14) が hu-PBMC-NSG においては、拒絶反応に重要な役割を担う細胞である T_{EM} と Th1 に変化することを明らかにした (図 13, 14)。つまり本研究の hu-PBMC-NSG モデルは拒絶反応に強く関連する T 細胞を強調して評価できるモデルであると考えられる。

ヒト化マウスを用いる検討で、アロ反応性が増幅されること、また再構築により移植後のレシピエントの hu-PBMC が数週間免疫抑制剤に暴露されない期間を設けることができることから、次のステップとして、移植後レシピエントの hu-PBMC を用いたドナー抗原、3rd party 抗原に対する hu-PBMC-NSG のアロ反応について評価・検討を行った (図 15)。症例 1, 2 で観察された hu-PBMC-NSG でのドナー抗原に対する強い反応は、免疫抑制剤のない状態での急性拒絶反応の高いリスクを示唆するものではないかと考えた。実際、この 2 例は臨床的に移植後複数回の拒絶反応エピソードが認められた (図 2, 表 2)。症例 1 は免疫抑制剤に対する内服コンプライアンスが低く、それに伴う慢性的な拒絶反応を認めており、肝生検では C4d の血管内皮への陽性像と末梢血における de novo DSA の存在を認めている (表 4)。また、症例 2 は免疫抑制剤中止を目指した臨床試験 (承認番号 010- 0070) に登録されていたが、免疫抑制剤減量中に複数回の拒絶反応を発症してしまった症例であり、これら 2 例は免疫抑制剤減量による拒絶反応の高リスク群であると考えられる。しかし、症例 4 は、臨床的に複数回の拒絶反応が認められるにも関わらず、hu-PBMC-NSG ではドナー抗原に対する強い反応は認められなかった。この症例は水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) 感染に伴い免疫抑制剤を休止せざるを得なかった状況で、拒絶反応を発症しており、ウイルス感染に惹起された拒絶反応であった可能性がある。上記 2 例とは異なる臨床経過であり、hu-PBMC-NSG での反応も異なる結果となった可能性が示唆された。また、本研究では T 細胞のアロ反応に焦点をあて評価しているため、液性免疫または、自然免疫の評価はされておらず、それが各症例の臨床経過と本研究結果との相違につながっている可能性も否定はできない。しかし、hu-PBMC-NSG で donor-specific hyporesponsiveness が観察された症例 3, 5, 7, 9, I, II, III, IV では、臨床経過でも移植後の拒絶反応エピソードが 1 回以下であり、その拒絶反応も移植後 1 年以内と早期に起きたもののみである。hu-PBMC-NSG での MLR 結果が実臨床を反映している可能性が考えられる。上記本研究結果は、各レシピエントの免疫抑制剤のない状態での T 細胞アロ反応を観察している可能性がある。

移植後レシピエント由来の hu-PBMC のドナー抗原に対するアロ反応性を MLR で検討した報告によると、Ghobrial らは、donor-specific hyporesponsiveness がみられた症例では拒絶反応エピソードが有意に少なかったものの、免疫抑制剤減量は成功しなかったことを報告した (Ghobrial et al., 1994)。Sindhi らは、移植後 3 か月以内の拒絶反応を発症したレシピエントは、TAC 濃度に応じて、ドナー反応性が有意に増強することを示した (Sindhi et al., 2005)。Tanaka らは、CFSE-MLR を用いてレシピエントの免疫状態を 4 段階に分類し、免疫抑制剤の調整に成功、免疫抑制剤調整期間の拒絶反応エピソードが有意に低下したことを報告した (Tanaka et al., 2012)。MLR は古典的な T cell proliferation assay で比較的簡便であり、上記のような移植後の免疫状態や拒絶反応のリスク評価に有用性であると考えられる (Segall et al., 1996)。しかしながら、これらの報告は免疫抑制療法下にあるレシピエントの免疫状態を評価時点の'snap shot'として観察しており、免疫抑制剤を減量した際、もしくは中止した際のレシピエントのアロ反応性は予測できないと考えられる。本研究で採用した hu-PBMC-NSG モデルは、移植後レシピエント由来の hu-PBMC を NSG マウス生体内で数週間免疫抑制剤のない状態を保ち、その後の免疫状態を観察する。そのため、免疫抑制剤を減量、もしくは中止した後のアロ反応性を予測できる可能性があると考えられる。さらには、homeostatic proliferation により増殖した hCD45⁺リンパ球の反応は、ウイルス感染や薬物により引き起こされる lymphopenia 後の免疫反応を予測できる可能性も考えられる。即ち、前述の症例 1, 2 での hu-PBMC-NSG におけるドナー抗原への強い反応は、実臨床においては lymphopenia 後の拒絶反応のリスクを予測している可能性がある。

Homeostatic proliferation は自己免疫性疾患引き起こす (Singh et al., 2001) とされ、移植モデルにおいては免疫寛容導入を妨げ (Wu et al., 2004)、免疫寛容状態を維持するために必要な T 細胞の寛容性を喪失させる (Schietinger et al., 2012) などと報告されている。一方で、本研究では、2.5 年以上の長期間にわたり免疫抑制剤を中止出来ている免疫抑制剤中止レシピエント由来の hu-PBMC が、hu-PBMC-NSG における homeostatic proliferation 後にも donor-specific hyporesponsiveness が維持されていることを明らかにした。臓器移植のような持続的な抗原暴露は抗原特異的な T 細胞反応を抑制するとする報告 (Ramsdell and Fowlkes, 1992) や、Chosa らによる生着しているアログラフトを除去することで移植後の免疫寛容が喪失するといった報告 (Chosa et al., 2007) もあり、持続的な抗原暴露が免疫寛容の維持に必要である可能性がある。一方で、Schietinger らは免疫寛容となった T 細胞を持続的抗原暴露のない他のマウスに移植しても免疫寛容が持続することを示し (Schietinger et al., 2012)、免疫寛容の維持には必ずしも持続的抗原暴露が必要ではないとする報告もある。本研

究では免疫抑制剤中止レシピエント由来の hu-PBMC を NSG マウスに再構築する過程において、持続的な抗原提示としてのグラフトの暴露から離脱した環境を作り出したとみることにもできる。このようなグラフトの無い状態においても Fresh PBMC で観察された hCD3⁺T 細胞の donor-specific hyporesponsiveness は維持された。このドナー抗原が関与しないドナー特異的免疫抑制の維持機構について、今後更なる検討が必要と考えている。

制御性 T 細胞 (T_{REG}) は臓器移植における免疫寛容メカニズムの一役を担っているとの報告が多くされている。ヒト化マウスモデルにおいても、hu-T_{REG} が急性拒絶反応の抑制に関与していることが示されている (Nadig et al., 2010)。最近の報告では、免疫寛容が得られた実験動物モデルにおいて、ドナー抗原刺激後の induced T_{REG} の増加も観察されている (Hotta et al., 2016)。しかし、本研究での免疫抑制療法中と免疫抑制剤中止後のレシピエントにおいて、hu-PBMC-NSG における hu-T_{REG} に有意差は認められず、免疫抑制療法中レシピエントの図 15 における similar to Off IS 群でも hu-T_{REG} に明らかな傾向はみられなかった。本研究においてはウィルス性疾患を除いた症例を対象としており、PBC や PSC といった免疫異常が疑われる疾患や、NASH など多種多様な原疾患症例を含んでいる。臓器移植における免疫寛容導入プロトコルの多様性から、免疫寛容に必要なグラフト保護機構も様々である可能性があり、個別の免疫寛容維持機構の解析が必要になる可能性が示唆される (Todo et al., 2016)。

ヒト化マウスモデルにおいて、異種 GVHD は研究結果に負の影響をもたらす要素の一つである。実際、ヒト化マウスモデルでは hu-PBMC 投与後 4-8 週で GVHD を発症するとされ、hCD3⁺T 細胞機能評価に関しては、hu-PBMC 投与後短期間の評価のみでその有用性が確立されている (Walsh et al., 2017)。また、ヒト化マウスモデルにおいて再構築された hu-PBMC、特に hCD4⁺CD25⁻effector T 細胞がアロヒト皮膚に対して反応するが、自家皮膚に対しては反応しなかったこと (Issa et al., 2010 ; Zaitzu et al., 2017 ; Racki et al., 2010 ; Sagoo et al., 2013)、アロ臍島、アロ血管を拒絶すること (King et al., 2008 ; Wu et al., 2013 ; Lorber et al., 1999 ; Nadig et al., 2010) が示されている。本研究では、hu-PBMC 投与後 21 日で評価をしており、実際に hu-PBMC-NSG から採取した hCD45⁺リンパ球が NSG マウス細胞へ反応しないこと、自家抗原にも反応しないことも確認した。

結論

1. 本研究から得られた知見

- ・生体肝移植後レシピエントにおいても健常者と同様にヒト化マウスモデルが作成可能であった。
- ・hu-PBMC-NSG に再構築した hu-PBMC は hCD3⁺T 細胞が優位な細胞集団となり、特に T_{EM}、Th1 の増加が見られた。
- ・hu-PBMC-NSG に再構築した hCD3⁺T 細胞のアロ反応性は増幅した。
- ・hu-PBMC-NSG に再構築した hCD3⁺T 細胞のアロ反応性の検討では、免疫抑制剤のない状態でのレシピエントのアロ反応を観察できる可能性が示唆された。
- ・免疫抑制剤の中止できたレシピエントでは hu-PBMC-NSG に再構築した後も donor-specific hyporesponsiveness が維持された。

2. 本研究で得られた知見の意義

本研究で施行した NSG マウスを用いたヒト化マウスモデルによる生体肝移植後レシピエントの免疫状態を解析するアプローチは、レシピエントのアロ反応を増強させ、拒絶反応に関与する T_{EM}、Th1 に焦点を当てた評価が可能であった。本研究はヒト化マウス内で免疫抑制剤の影響下から離脱した状態を作り出し、より本来の免疫状態に近いレシピエントのドナー特異的なアロ反応性を観察した。臓器移植後の免疫抑制剤の調整に関する確立したバイオマーカーは現時点では存在せず、本研究で得られた知見はレシピエントの免疫状態を観察し得る一つの方法論として意義深い。

3. 本研究から得られた知見からどのような研究が展開されうるか

本研究では、生体肝移植後レシピエントの免疫抑制剤を減量、もしくは中止した後のドナー抗原特異的反応を観察できる可能性が示唆された。今後の研究でレシピエント末梢血やグラフト組織・細胞から得られる移植後免疫状態の指標が明らかになれば、本研究で得られた知見を加え、より詳細な免疫状態の評価が可能となり、レシピエントの個々のオーダーメイドな免疫抑制療法が実践できる可能性がある。また免疫抑制剤を中止できている症例の寛容維持機構について、抗原暴露の暴露を含めた更なる機序解析が期待される。

4. 今後の課題

今後さらなる症例の積み重ねと、レシピエントにおける拒絶反応のエピソードを含めた臨床経過の詳細な評価を行い、本研究で得られた知見の実臨床への応用が可能かどうかを検討していくことが課題となる。

謝辞

この場を借りて、指導的な立場で本研究の遂行に多大なる貢献をしていただいた、消化器外科学教室 I 武富 紹信 教授および後藤 了一 助教に感謝を申し上げます。

また、本研究において非常に示唆的な議論と助言をくださった、北海道大学学病院・医学部 移植外科 山下 健一郎 前教授、実験動物の繁殖・維持管理をして頂いた動物実験施設の土佐 紀子 先生および職員の方々、本研究の実験において技術的な補助をくださった消化器外科学教室 I の皆様に感謝を申し上げます

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費(JP16K10416, JP16K19884)、Novartis Research Grants 2017 の助成を受け行われたものです

利益相反

本研究に開示すべき利益相反状態はない

引用文献

- Abraham, S., Choi, J., Ye, C., Manjunath, N., and Shankar, P. (2015). IL-10 exacerbates xenogeneic GVHD by inducing massive human T cell expansion. *Clin. Immunol.* *156*, 58–64.
- Abraham, S., Guo, H., Choi, J., and Ye, C., Thomas, M, B., Ortega, N., Dwivedi, A., Manjunath, N., Yi, G., and Shankar, P. (2017). Combination of IL-10 and IL-2 induces oligoclonal human CD4 T cell expansion during xenogeneic and allogeneic GVHD in humanized mice. *Heliyon* *3*, e00276.
- Afzali, B., Lechler, R.I., and Hernandez-Fuentes, M.P. (2007). Allorecognition and the alloresponse: Clinical implications. *Tissue Antigens* *69*, 545–556.
- Ali, N., Flutter, B., Sanchez Rodriguez, R., Sharif-Paghaleh, E., Barber, L.D., Lombardi, G., and Nestle, F.O. (2012). Xenogeneic Graft-versus-Host-Disease in NOD-scid IL-2R γ null Mice Display a T-Effector Memory Phenotype. *PLoS One* *7*, 1–10.
- Atalar, K., Afzali, B., Lord, G., and Lombardi, G. (2009). Relative roles of Th1 and Th17 effector cells in allograft rejection. *Curr. Opin. Organ Transplant.* *14*, 23–29.
- Benitez, C., Londono, M.-C., Miquel, R., Manzia, T.-M., Abraldes, J.G., Lozano, J.-J., Martinez-Llordella, M., Lopez, M., Angelico, R., Bohne, F., et al. (2013). Prospective multicenter clinical trial of immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients. *Hepatology* *58*, 1824–1835.
- Benlloch, S., Berenguer, M., Prieto, M., Moreno, R., San Juan, F., Rayon, M., Mir, J., Segura, A., and Berenguer, J. (2004). De novo internal neoplasms after liver transplantation: increased risk and aggressive behavior in recent years? *Am. J. Transplant* *4*, 596–604.
- Calne, R.Y., Rolles, K., Thiru, S., McMaster, P., Craddock, G.N., Aziz, S., White, D.J.G., Evans, D.B., Dunn, D.C., Henderson, R.G., et al. (1979). Cyclosporin a Initially As the Only Immunosuppressant in 34 Recipients of Cadaveric Organs: 32 Kidneys, 2 Pancreases, and 2 Livers. *Lancet* *314*, 1033–1036.
- Chosa, E., Hara, M., Watanabe, A., Matsuzaki, Y., Nakamura, K., Hamano, K., Wood, K.J., and Onitsuka, T. (2007). Spleen plays an important role in maintaining tolerance after removal of the vascularized heart graft. *Transplantation* *83*, 1226–1233.

Costello, J.P., Mohanakumar, T., and Nath, D.S. (2013). Mechanisms of chronic cardiac allograft rejection. *Texas Hear. Inst. J.* *40*, 395–399.

De La Rochere, P., Guil-Luna, S., Decaudin, D., Azar, G., Sidhu, S.S., and Piaggio, E. (2018). Humanized Mice for the Study of Immuno-Oncology. *Trends Immunol.* *39*, 748–763.

Del Pilar Hernandez, M., Martin, P., and Simkins, J. (2015). Infectious complications after liver transplantation. *Gastroenterol. Hepatol.* *11*, 741–753.

Demetris, A. (2012). Importance of liver biopsy findings in immunosuppression management: biopsy monitoring and working criteria for patients with operational tolerance. *Liver Transplant.* *18*, 1154–1170.

de Oliveira, V.L., Keijsers, R.R.M.C., van de Kerkhof, P.C.M., Seyger, M.M.B., Fasse, E., Svensson, L., Latta, M., Norsgaard, H., Labuda, T., Hupkens, P., et al. (2012). Humanized Mouse Model of Skin Inflammation Is Characterized by Disturbed Keratinocyte Differentiation and Influx of IL-17A Producing T Cells. *PLoS One* *7*, e45509.

Feng, S., Ekong, U.D., Lobritto, S.J., Demetris, A.J., Roberts, J.P., Rosenthal, P., Alonso, E.M., Philogene, M.C., Ikle, D., Poole, K.M., et al. (2012). Complete immunosuppression withdrawal and subsequent allograft function among pediatric recipients of parental living donor liver transplants. *JAMA* *307*, 283–293.

Fernandez-Miranda, C., Guijarro, C., de la Calle, A., Loinaz, C., Gonzalez-Pinto, I., Gomez-Izquierdo, T., Larumbe, S., Moreno, E., and del Palacio, A. (1998). Lipid abnormalities in stable liver transplant recipients--effects of cyclosporin, tacrolimus, and steroids. *Transpl. Int.* *11*, 137–142.

Fujii, H., Luo, Z.J., Kim, H.J., Newbigging, S., Gassas, A., Keating, A., and Egeler, R.M. (2015). Humanized chronic graft-versus-host disease in NOD-SCID *il2r γ* ^{-/-} (NSG) mice with G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells following cyclophosphamide and total body irradiation. *PLoS One* *10*, 1–16.

Gerdes, J., Li, L., Schlueter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Gerlach, C., Stahmer, I., Kloth, S., Brandt, E., and Flad, H.D. (1991). Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am. J. Pathol.* *138*, 867–873.

Ghobrial, I.I., Morris, A.G., and Booth, L.J. (1994). Clinical significance of in vitro donor-specific hyporesponsiveness in renal allograft recipients as demonstrated by the MLR. *Transpl. Int.* *7*, 420–427.

Gudmundsdottir, H., and Turka, L.A. (2001). A Closer Look at Homeostatic Proliferation of CD4⁺ T Cells: Costimulatory Requirements and Role in Memory Formation. *J. Immunol.* *167*, 3699–3707.

Harui, A., Kiertscher, S.M., and Roth, M.D. (2011). Reconstitution of huPBL-NSG mice with donor-matched dendritic cells enables antigen-specific T-cell activation. *J. Neuroimmune Pharmacol.* *6*, 148–157.

Heeger, P.S. (2003). T-cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update. *Am. J. Transplant.* *3*, 525–533.

Hilger, N., Glaser, J., Müller, C., Halbich, C., Müller, A., Schwertassek, U., Lehmann, J., Ruschpler, P., Lange, F., Boldt, A., et al. (2016). Attenuation of graft-versus-host-disease in NOD scid IL-2R γ ^{-/-} (NSG) mice by ex vivo modulation of human CD4⁺ T cells. *Cytom. Part A* *89*, 803–815.

Hotta, K., Aoyama, A., Oura, T., Yamada, Y., Tonsho, M., Huh, K.H., Kawai, K., Schoenfeld, D., Allan, J.S., Madsen, J.C., et al. (2016). Induced regulatory T cells in allograft tolerance via transient mixed chimerism. *1*, 1–13.

Issa, F., Hester, J., Goto, R., Nadig, S.N., Goodacre, T.E., and Wood, K. (2010). Ex vivo-expanded human regulatory T cells prevent the rejection of skin allografts in a humanized mouse model. *Transplantation* *90*, 1321–1327.

Ito, R., Katano, I., Kawai, K., Yagoto, M., Takahashi, T., Ka, Y., Ogura, T., Takahashi, R., and Ito, M. (2017). A Novel Xenogeneic Graft-Versus-Host Disease Model for Investigating the Pathological Role of Human CD4⁺ or CD8⁺ T Cells Using Immunodeficient NOG Mice. *Am. J. Transplant.* *17*, 1216–1228.

Kassiotis, G., Zamoyska, R., and Stockinger, B. (2003). Involvement of avidity for major histocompatibility complex in homeostasis of naive and memory T cells. *J. Exp. Med.* *197*, 1007–1016.

Kawai, T., Sachs, D.H., Sprangers, B., Spitzer, T.R., Saidman, S.L., Zorn, E., Tolkoﬀ-Rubin, N., Preffer, F., Crisalli, K., Gao, B., et al. (2014). Long-term results in recipients of combined HLA-mismatched kidney and bone marrow transplantation without maintenance immunosuppression. *Am. J. Transplant* *14*, 1599–1611.

Kawasaki, Y., Sato, K., Hayakawa, H., Takayama, N., Nakano, H., Ito, R., Mashima, K., Oh, I., Minakata, D., Yamasaki, R., et al. (2018). Comprehensive Analysis of the Activation and Proliferation Kinetics and Effector Functions of Human Lymphocytes, and Antigen Presentation Capacity of Antigen-Presenting Cells in Xenogeneic Graft-Versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *24*, 1563–1574.

Kenney, L.L., Shultz, L.D., Greiner, D.L., and Brehm, M.A. (2016). Humanized Mouse Models for Transplant Immunology. *Am. J. Transplant.* *16*, 389–397.

Kim, S. Il (2014). Bacterial infection after liver transplantation. *World J. Gastroenterol.* *20*, 6211–6220.

King, M., Pearson, T., Shultz, L.D., Leif, J., Bottino, R., Trucco, M., Atkinson, M.A., Wasserfall, C., Herold, K.C., Woodland, R.T., et al. (2008). A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene. *Clin. Immunol.* *126*, 303–314.

King, M.A., Covassin, L., Brehm, M.A., Racki, W., Pearson, T., Leif, J., Laning, J., Fodor, W., Foreman, O., Burzenski, L., et al. (2009). Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. *Clin. Exp. Immunol.* *157*, 104–118.

Li, Y., Koshiba, T., Yoshizawa, A., Yonekawa, Y., Masuda, K., Ito, A., Ueda, M., Mori, T., Kawamoto, H., Tanaka, Y., et al. (2004). Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am. J. Transplant.* *4*, 2118–2125.

Lorber, M.I., Wilson, J.H., Robert, M.E., Schechner, J.S., Kirkiles, N., Qian, H.Y., Askenase, P.W., Tellides, G., and Pober, J.S. (1999). Human allogeneic vascular rejection after arterial transplantation and peripheral lymphoid reconstitution in severe combined immunodeficient mice. *Transplantation* *67*, 897–903.

Lucey, M.R., Terrault, N., Ojo, L., Hay, J.E., Neuberger, J., Blumberg, E., and Teperman, L.W. (2013). Long-term management of the successful adult liver transplant: 2012 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the American Society of Transplantation. *Liver Transplant.* *19*, 3–26.

Maecker, H.T., McCoy, J.P., and Nussenblatt, R. (2012). Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 191–200.

Magee, C., and Pascual, M. (2003). The growing problem of chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N. Engl. J. Med.* *349*, 994–996.

Mangare, C., Tischer-Zimmermann, S., Riese, S.B., Dragon, A.C., Prinz, I., Blasczyk, R., Maecker-Kolhoff, B., and Eiz-Vesper, B. (2019). Robust Identification of Suitable

T-Cell Subsets for Personalized CMV-Specific T-Cell Immunotherapy Using CD45RA and CD62L Microbeads. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 1-23.

Martinez-Llordella, M., Puig-Pey, I., Orlando, G., Ramoni, M., Tisone, G., Rimola, A., Lerut, J., Latinne, D., Margarit, C., Bilbao, I., et al. (2007). Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am. J. Transplant* *7*, 309–319.

Martinez-Llordella, M., Lozano, J.J., Puig-Pey, I., Orlando, G., Tisone, G., Lerut, J., Benitez, C., Pons, J.A., Parrilla, P., Ramirez, P., et al (2008). Using transcriptional profililing to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J. Clin. Invest.* *118*, 2845-2857.

Mazariegos, G. V, Reyes, J., Marino, I.R., Demetris, A.J., Flynn, B., Irish, W., McMichael, J., Fung, J.J., and Starzl, T.E. (1997). Weaning of immunosuppression in liver transplant recipients. *Transplantation* *63*, 243–249.

Millan, O., Rafael-Valdivia, L., Torrademe, E., Lopez, A., Fortuna, V., Sanchez-Cabus, S., Lopez-Pua, Y., Rimola, A., and Brunet, M. (2013). Intracellular IFN-gamma and IL-2 expression monitoring as surrogate markers of the risk of acute rejection and personal drug response in de novo liver transplant recipients. *Cytokine* *61*, 556–564.

Moreau, A., Varey, E., Anegon, I., Cuturi, M.C., (2013). Effector mechanisms of rejection. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *3*, a015461.

Moxham, V.F., Karegli, J., Phillips, R.E., Brown, K.L., Tapmeier, T.T., Hangartner, R., Sacks, S.H., and Wong, W. (2008). Homeostatic Proliferation of Lymphocytes Results in Augmented Memory-Like Function and Accelerated Allograft Rejection. *J. Immunol.* *180*, 3910–3918.

Nadig, S.N., Wi, J., Wu, D.C., Warnecke, G., Zhang, W., Luo, S., Schiopu, A., Taggart, D.P., and Wood, K.J. (2010). In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo – expanded human regulatory T cells. *Nat. Med.* *16*, 809–814.

Nafady-Hego, H., Li, Y., Ohe, H., Elgendy, H., Zhao, X., Sakaguchi, S., Bishop, G.A., and Koshiba, T. (2016). Utility of CD127 combined with FOXP3 for identification of operational tolerance after liver transplantation. *Transpl. Immunol.* *36*, 1–8.

Neil, D.A.H., and Hubscher, S.G. (2002). Histologic and biochemical changes during the evolution of chronic rejection of liver allografts. *Hepatology* *35*, 639–651.

Newell, K.A., Asare, A., Kirk, A.D., Gisler, T.D., Bourcier, K., Suthanthiran, M., Burlingham, W. J., Marks, W.H., Sanz, I., Lechler, R.I., et al. (2010). Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.* *120*, 1836-1847.

Orlando, G., Soker, S., and Wood, K. (2009). Operational tolerance after liver transplantation. *J. Hepatol.* *50*, 1247–1257.

Pelletier, R.P., Bickerstaff, A.A., Adams, P.W., and Orosz, C.G. (2007). Evaluation of immune regulation in transplant patients using the trans vivo delayed type hypersensitivity assay. *Hum. Immunol.* *68*, 514–522.

Racki, W.J., Covassin, L., Brehm, M., Pino, S., Ignatz, R., Dunn, R., Laning, J., Graves, S.K., Rossini, A.A., Shultz, L.D., et al. (2010). NOD-scid IL2r γ null mouse model of human skin transplantation and allograft rejection. *Transplantation* *89*, 527–536.

Ramos, H.C., Reyes, J., Abu-Elmagd, K., Zeevi, A., Reinsmoen, N., Tzakis, A., Demetris, A.J., Fung, J.J., Flynn, B., McMichael, J., et al. (1995). Weaning of immunosuppression in long-term liver transplant recipients. *Transplantation* *59*, 212–217.

Ramsdell, F., and Fowlkes, B.J. (1992). Maintenance of in vivo tolerance by persistence of antigen. *Science* *257*, 1130–1134.

Ravaioli, M., Neri, F., Lazzarotto, T., Bertuzzo, V.R., Di Gioia, P., Stacchini, G., Morelli, M.C., Ercolani, G., Cescon, M., Chiereghin, A., et al. (2015). Immunosuppression Modifications Based on an Immune Response Assay: Results of a Randomized, Controlled Trial. *Transplantation* *99*, 1625–1632.

Robertson, A.G.N., Griffin, S.M., Murphy, D.M., Pearson, J.P., Forrest, I.A., Dark, J.H., Corris, P.A., and Ward, C. (2009). Targeting allograft injury and inflammation in the management of post-lung transplant bronchiolitis obliterans syndrome. *Am. J. Transplant.* *9*, 1272–1278.

Sagoo, P., Ali, N., Garg, G., Nestle, F.O., Lechler, R.I., and Lombardi, G. (2013). Europe PMC Funders Group Human Regulatory T Cells with Alloantigen Specificity Are More Potent Inhibitors of Alloimmune Skin Graft Damage than Polyclonal Regulatory T Cells. *Sci. Transl. Med.* *3*, 1–21.

Sayegh, M.H., and Turka, L.A. (1998). The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* *338*, 1813–1821.

Schietinger, A., Delrow, J.J., Basom, R.S., Blattman, J.N., and Greenberg, P.D. (2012). Rescued tolerant CD8 T cells are preprogrammed to reestablish the tolerant state. *Science* *335*, 723–727.

Segall, M., Noreen, H., Edwins, L., Haake, R., Shu, X.O., and Kersey, J. (1996). Lack of correlation of MLC reactivity with acute graft-versus-host disease and mortality in unrelated donor bone marrow transplantation. *Hum. Immunol.* *49*, 49–55.

Shiao, S.L., Kirkiles-smith, N.C., Benjamin, R., Mcniff, J.M., Carr, E.J., and Jordan, S, P. (2007). Human Effector Memory CD4+ T Cells Directly Recognize Allogeneic Endothelial Cells In Vitro and In Vivo. *J. Immunol.* *179*, 4397-4404

Shultz, L.D., Ishikawa, F., and Greiner, D.L. (2007). Humanized mice in translational biomedical research. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 118–130.

Siemeni, T., Knöfel, A.K., Madrahimov, N., Sommer, W., Avsar, M., Salman, J., Ius, F., Frank, N., Büchler, G., Jonigk, D., et al. (2016). In Vivo Development of Transplant Arteriosclerosis in Humanized Mice Reflects Alloantigen Recognition and Peripheral Treg Phenotype of Lung Transplant Recipients. *Am. J. Transplant.* *16*, 3150–3162.

Sindhi, R., Magill, A., Bentejewski, C., Abdullah, A., Tresgaskes, M., Seward, J., Janosky, J., and Zeevi, A. (2005). Enhanced donor-specific alloreactivity occurs independently of immunosuppression in children with early liver rejection. *Am. J. Transplant.* *5*, 96–102.

Singh, B., Read, S., Asseman, C., Malmstrom, V., Mottet, C., Stephens, L.A., Stepankova, R., Tlaskalova, H., and Powrie, F. (2001). Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol. Rev.* *182*, 190–200.

Soares, A., Govender, L., Hughes, J., Mavakla, W., de Kock, M., Barnard, C., Pienaar, B., Janse van Rensburg, E., Jacobs, G., Khomba, G., et al. (2010). Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. *J. Immunol. Methods* *362*, 43–50.

Starzl, T.E., and Fung, J.J. (2010). Themes of liver transplantation. *Hepatology* *51*, 1869-1884.

Tanaka, Y., Tashiro, H., Onoe, T., Ide, K., Ishiyama, K., and Ohdan, H. (2012). Optimization of immunosuppressive therapy based on a multiparametric mixed lymphocyte reaction assay reduces infectious complications and mortality in living donor liver transplant recipients. *Transplant. Proc.* *44*, 555–559.

Taubert, R., Danger, R., Londono, M.-C., Christakoudi, S., Martinez-Picola, M., Rimola, A., Manns, M.P., Sanchez-Fueyo, A., and Jaeckel, E. (2016). Hepatic Infiltrates in Operational Tolerant Patients After Liver Transplantation Show Enrichment of Regulatory T Cells Before Proinflammatory Genes Are Downregulated. *Am. J. Transplant* *16*, 1285–1293.

Taylor, D.O., Edwards, L.B., Boucek, M.M., Trulock, E.P., Aurora, P., Christie, J., Dobbels, F., Rahmel, A.O., Keck, B.M., and Hertz, M.I. (2007). Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult heart transplant report--2007. *J. Hear. Lung Transplant.* *26*, 769–781

Tisone, G., Orlando, G., Cardillo, A., Palmieri, G., Manzia, T.M., Baiocchi, L., Lionetti, R., Anselmo, A., Toti, L., and Angelico, M. (2006). Complete weaning off immunosuppression in HCV liver transplant recipients is feasible and favourably impacts on the progression of disease recurrence. *J. Hepatol.* *44*, 702–709.

Todo, S., Yamashita, K., Goto, R., Zaitzu, M., Nagatsu, A., Oura, T., Watanabe, M., Aoyagi, T., Suzuki, T., Shimamura, T., et al. (2016). A pilot study of operational tolerance with a regulatory T-cell-based cell therapy in living donor liver transplantation. *Hepatology* *64*, 632–643.

Tokita, D., Mazarioglos, G.V., Zahorchak, A.F., Chien, N., Abe, M., Raimondi, G., and Thomson, A.W. (2008). High PD-L1/CD86 ratio on plasmacytoid dendritic cells correlates with elevated T-regulatory cells in liver transplant tolerance. *Transplantation* *85*, 369-377.

Tryphonopoulos, P., Tzakis, A.G., Weppler, D., Garcia-Morales, R., Kato, T., Madariaga, J.R., Levi, D.M., Nishida, S., Moon, J., Selvaggi, G., et al. (2005). The role of donor bone marrow infusions in withdrawal of immunosuppression in adult liver allotransplantation. *Am. J. Transplant* *5*, 608–613.

VanBuskirk, A.M., Burlingham, W.J., Jankowska-Gan, E., Chin, T., Kusaka, S., Geissler, F., Pelletier, R.P., and Orosz, C.G. (2000). Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J. Clin. Invest.* *106*, 145–155.

Verleden, G.M., Vos, R., Vanaudenaerde, B., Dupont, L., Yserbyt, J., Van Raemdonck, D., and Verleden, S. (2015). Current views on chronic rejection after lung transplantation. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* *28*, 1131–1139.

Wagar, E.J., Cromwell, M.A., Shultz, L.D., Woda, B.A., Sullivan, J.L., Hesselton, R.M., and Greiner, D.L. (2000). Regulation of Human Cell Engraftment and

Development of EBV-Related Lymphoproliferative Disorders in Hu-PBL- scid Mice .
J. Immunol. *165*, 518–527.

Walsh, N.C., Kenney, L.L., Jangalwe, S., Aryee, K.-E., Greiner, D.L., Brehm, M.A., and Shultz, L.D. (2017). Humanized Mouse Models of Clinical Disease. *Annu. Rev. Pathol.* *12*, 187–215.

Wang, S., Li, J., Xie, A., Wang, G., Xia, N., Ye, P., Rui, L., and Xia, J. (2011). Dynamic changes in Th1, Th17, and FoxP3+ T cells in patients with acute cellular rejection after cardiac transplantation. *Clin. Transplant.* *25*, 177-186.

Wang, Y., Burns, W.R., Tang, P.C.Y., Yi, T., Schechner, J.S., Zerwes, H.G., Sessa, W.C., Lorber, M.I., Pober, J.S., and Tellides, G. (2004). Interferon-gamma plays a nonredundant role in mediating T cell-dependent outward vascular remodeling of allogeneic human coronary arteries. *FASEB J.* *18*, 606–608.

Wiebe, C., Gibson, I.W., Blydt-Hansen, T.D., Pochinco, D., Birk, P.E., Ho, J., Karpinski, M., Goldberg, A., Storsley, L., Rush, D.N., et al. (2015). Rates and determinants of progression to graft failure in kidney allograft recipients with de novo donor-specific antibody. *Am. J. Transplant.* *15*, 2921–2930.

Wood, K.J., and Goto, R. (2012). Mechanisms of Rejection : Current Perspectives. *Transplantation* *93*, 1–10.

Wu, D.C., Hester, J., Nadig, S.N., Zhang, W., Trzonkowski, P., Gray, D., Hughes, S., Johnson, P., and Wood, K.J. (2013). Ex Vivo Expanded Human Regulatory T Cells Can Prolong Survival of a Human Islet Allograft in a Humanized Mouse Model. *Transplantation* *96*, 707–716.

Wu, Z., Bensinger, S.J., Zhang, J., Chen, C., Yuan, X., Huang, X., Markmann, J.F., Kassaei, A., Rosengard, B.R., Hancock, W.W., et al. (2004). Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance. *Nat. Med.* *10*, 87–92.

Xiao, F., Ma, L., Zhao, M., Huang, G., Mirenda, V., Dorling, A., Lechler, R., and Lombardi, G. (2014). Ex vivo expanded human regulatory T cells delay islet allograft rejection via inhibiting islet-derived monocyte chemoattractant protein-1 production in CD34+ stem cells-reconstituted NOD-scid IL2r γ null mice. *PLoS One* *9*, 1–12.

Yoshizawa, A., Ito, A., Li, Y., Koshiba, T., Sakaguchi, S., Wood, K.J., and Tanaka, K. (2005). The roles of CD25+CD4+ regulatory T cells in operational tolerance after living donor liver transplantation. *Transplant. Proc.* *37*, 37–39.

Zaitzu, M., Issa, F., Hester, J., Vanhove, B., and Wood, K.J. (2017). Selective blockade of CD28 on human T cells facilitates regulation of alloimmune responses. JCI Insight 2. 1-13.

公益社団法人 日本臓器移植ネットワーク NEWS LETTER. vol.23. 2019.

<https://www.jotnw.or.jp/files/page/datas/newsletter/doc/nl23.pdf>