



Title	新規化合物 “NK026680” とDonor specific transfusionの併用による免疫抑制効果
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12984
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/79790
Type	doctoral thesis
File Information	Shin_Emoto.pdf



学位論文

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)

2018 年 3 月

北海道大学

江本 慎
Shin Emoto

学位論文

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)

2018 年 3 月

北海道大学

江本 慎
Shin Emoto

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	3 頁
略語表	20 頁
実験方法	21 頁
実験結果	31 頁
考察	69 頁
総括および結論	77 頁
謝辞	78 頁
引用文献	79 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投稿中である。

1. Shin Emoto, Susumu Shibasaki, Akihisa Nagatsu, Ryoichi Goto, Hitoshi Ono, Yasutomo Fukasaku, Rumi Igarashi, Moto Fukai, Tsuyoshi Shimamura, Kan Saiga, Akinobu Taketomi, Masaaki Murakami, Satoru Todo, Kenichiro Yamashita. Triazolopyrimidine Derivative, NK026680, and Donor-Specific Transfusion Induces CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T Cells and Ameliorates Allograft Rejection in an Antigen-Specific Manner. Journal of Heart and Lung Transplantation, 2017. (投稿中)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. S Emoto, R Goto, S Shibasaki, A Nagatsu, H Ono, R Igarashi, T Aoyagi, M Fukai, T Shimamura, K Saiga, A Taketomi, S Todo, K Yamashita. Immunomodulation induced by a novel immunosuppressant, NK026680 plus donor specific transfusion permits a long-term cardiac allograft survival in mice. World Transplant Congress, San Francisco, July 26th-31st, 2014.

2. S Emoto, R Goto, S Shibasaki, A Nagatsu, H Ono, R Igarashi, M Fukai, T Shimamura, K Saiga, M Murakami, A Taketomi, S Todo, K Yamashita. In Vivo Expansion of Donor-Specific Regulatory T cells by a New Triazolopyrimidine Derivative and Donor-Specific Transfusion. American Transplant Congress, Philadelphia, May 2nd-6th, 2015.

3. 江本 慎, 柴崎 晋, 長津 明久, 小野 仁, 後藤 了一, 青柳 武史, 深井 原, 嶋村 剛, 武富 紹信, 藤堂 省, 山下 健一郎: NK026680 と Donor specific transfusion による免疫抑制効果. 第 49 回日本移植外科学会総会, 京都, 2013 年 9 月 5 日-7 日.

4. 江本 慎, 柴崎 晋, 後藤 了一, 長津 明久, 小野 仁, 五十嵐 瑠美, 深井 原, 嶋村 剛, 武富 紹信, 藤堂 省, 山下 健一郎: 新規免疫抑制剤 NK026680 と donor specific transfusion の併用による免疫抑制効果.

第 114 回日本外科学会定期学術集会，福岡，2014 年 4 月 3 日-5 日．

5．江本 慎，後藤 了一，柴崎 晋，長津 明久，小野 仁，青柳 武史，
深井 原，武富 紹信，嶋村 剛，藤堂 省，山下 健一郎：NK026680
と donor specific transfusion 併用による免疫抑制効果．第 50 回日本移植
外科学会総会，東京，2014 年 9 月 10 日-12 日．

6．江本 慎，後藤 了一，柴崎 晋，長津 明久，小野 仁，深井 原，
嶋村 剛，雑賀寛，武富 紹信，藤堂 省，山下 健一郎：新規免疫抑制剤
NK026680 と donor specific transfusion の併用によるドナー特異的免疫修
飾効果．第 115 回日本外科学会定期学術集会，名古屋，2015 年 4 月 16 日
-18 日．

緒言

<臓器移植の歴史>

・移植の黎明期

1954 年 12 月 23 日、Murray らの手によって、糸球体腎炎によって腎不全となった患者に対し、患者の一卵性双子の同胞から摘出された腎臓が移植された¹。移植された臓器は速やかに機能し、患者は免疫抑制剤なしで 9 年間生存した。死因は糸球体腎炎の再発であり、移植は完全に成功した。この成功を機に、固形臓器移植の領域は飛躍的に進歩した。

移植の技術的な飛躍は血管外科の Carrel によってなされた。19 世紀初頭、Carrel は自身の新たな血管吻合の技術についての論文を出版した²。彼は、この技術を用いてイヌの自己腎の異所性腎移植を報告し、技術的には固形臓器移植は可能であることを示した。1936 年には Yuronoy がヒトで初めて腎移植を行った。死体腎が使用されたこの移植では、初期に少量の排尿があったが、急性拒絶により腎臓は失われた。その後、欧米各地で少しずつ腎移植が行われ、骨盤内の後腹膜に腎を移植する手技が確立した。ボストンの Peter Bent Brigham Hospital で、Murray が 11 例の腎移植を施行し、一例のみ 5 か月間、移植腎が機能しながら生き延びた³。そして、彼らのグループは、最初の移植医療の成功にたどり着いた。

・急性拒絶反応との戦い

Murray らの成功を皮切りに、欧米各地で一卵性双生児間の腎移植が行われるようになり、それと同時に同種異型移植の研究が活発に行われるようになった。Holman らは、1925 年に、広範な熱傷を負った子供たちに皮膚移植を行っていたが、繰り返し移植を行うことで、初回移植よりも早く拒絶されることを報告し、ボランティアのドナーの「蛋白質」に感作されたためではないかと考察した⁴。こうした拒絶反応を抑えることが移植医療には必要であり、1950 年代より免疫抑制についての模索が始まった。最初に検討されたのが全身放射線照射 (sublethal-total body irradiation) とステロイドによる免疫抑制であった^{5,6}。この免疫抑制療法により、多くの患者が感染症により亡くなり、別の方法による免疫抑制の開発が急がれた。

Schwartz と Dameshek により新たな境地が拓けた。もともと急性リンパ性白血病の治療薬であった 6-mercaptopurine (6-MP) に免疫抑制作用があることが見出された^{7,8}。Murray らは、イヌの腎移植モデルを用いて、さま

ざまな 6-MP の変化体の中で azathioprine のみ長期のグラフト生着を実現できることを発見した。Murray らは azathioprine とステロイドを併用することでヒトの腎移植で 1 年生着率 40～50%を実現した⁹。

Azathioprine とステロイドの併用による免疫抑制法の発見により、献腎移植と human leukocyte antigen (HLA)合致の家族をドナーとした生体腎移植が 1960 年から 1970 年代初頭にかけて徐々に増加した。透析の進歩も腎移植による死亡率の低下の一助となった。1980 年代に cyclosporine-A (CsA)が開発され¹⁰、1 年生着率は 70～80%に改善した。それに伴い、肝移植、膵移植、心移植など、腎臓以外の臓器の移植も臨床的に確立された。その後も次々と新たな免疫抑制剤の開発が進んだ。1990 年代初頭には FK506 (tacrolimus)が^{11,12}、1995 年には Mycophenolate mofetil が、1999 年には mammalian target of rapamycin (mTOR)阻害剤 (Sirolimus)が開発された¹³。新たに開発された免疫抑制剤を組み合わせる使用することにより、副作用を抑えつつより強力に急性拒絶反応を抑制することができるようになった¹⁴。薬剤やレジメンの開発以外にも、生物製剤のような新たな領域の免疫抑制剤の開発も進んだ。最初はポリクローナルな抗胸腺抗体であったが、T 細胞に特異的なモノクローナル抗体 (OKT3)が開発され、臨床応用された。また、ヒト化された抗 CD25 モノクローナル抗体が開発され、臨床で使用された。その後も B 細胞に対する抗 CD20 モノクローナル抗体、主に骨髄移植の領域で使用される抗 CD52 抗体、2011 年に Food and Drug Association (FDA)に承認された cytotoxic T lymphocyte antigen (CTLA)-4Ig などが次々に開発され、研究や臨床で大きな効果が期待された¹³。

・移植医療における成熟期の課題

免疫抑制剤の進歩の元、2002 年には HLA 合致移植でグラフト 10 年生着率は 70～75%を達成した¹⁵。特に急性拒絶反応を経験しない患者では移植の成績が良いことが判明した¹⁶。逆に、急性拒絶を乗り越えても、最終的にグラフトロスに陥ること症例があることが問題となった。慢性拒絶にはさまざまな要因が絡んでおり、移植時からその後の急性拒絶のエピソードまでがリスク因子に含まれる。しかしながら、移植後数年間良好な機能を維持してきたグラフトでさえ、徐々にグラフト障害が進むことがあり、vasculopathy の状態に陥った¹⁷。徐々に進行するグラフト機能低下の原因としては、HLA に対するアロ反応性 IgG やドナー HLA に対する T 細胞の priming などが考えられた¹⁷⁻¹⁹。慢性拒絶はすべての移植臓器に起き得、移植後 1 年以降の

グラフトロスの最も多い原因である¹⁷。移植直後のように高いレベルでの免疫抑制剤の使用は長期には使用できず、免疫抑制剤の減量によってアロ抗原の認識とアロ抗原に対する活性化が起きるのは必然である。移植でよく使用される DNA 合成阻害剤や *carcineurin inhibitor* (CNIs)、*sirolimus* などは、*naïve* なリンパ球は効果的に抑制するが、*memory T* 細胞や *priming* された *effector T* 細胞に対する抑制が弱い²⁰。グラフトが機能不全に陥っていなくとも、生検でグラフトの損傷が認められる場合には、慢性拒絶が示唆される²¹。慢性拒絶の要因としては、免疫原性反応と非免疫原性反応に分類され¹⁵、免疫原性反応としては HLA の *mismatch*、抗ドナー抗体の存在、免疫抑制剤の不足などを原因とし、急性拒絶反応や顕在化しないグラフト損傷が起き、*indirect pathway* によるアロ反応の活性化と慢性液性拒絶の誘導が考えられる。また、非免疫原性反応としては、虚血再灌流障害、脳死、高齢ドナー、移植手術の質の問題、高血圧・高脂血症、サイトメガロウイルス感染、ポリオマウイルス感染、慢性的な *CNI* 毒性などが挙げられる。アロ抗原に対する免疫反応や免疫に依存しない慢性拒絶の要因に対して移植後早期の段階から介入し、慢性拒絶を防ぐことはいまだに非常に困難な課題である^{15,17}。

また、どのような患者で免疫抑制剤を離脱できるかの指標となりうる検査がいまだに存在しない²²。移植初期に集中的に介入し、免疫寛容を誘導することが、移植医療の最終的な目標である²²。

<免疫寛容と制御性 T 細胞>

・「獲得された免疫寛容」の発見

胎盤を共有する二卵性の仔牛は、両方の血液のキメラを形成し、一方から他方へ皮膚を移植しても拒絶されない^{23,24}。この発見が、移植後免疫寛容のコンセプトを生み出した。*Medawar* らは新生児期にドナー系統の細胞を輸注することにより、ドナー系統の皮膚が拒絶されなくなることを発見した²⁵。この“*inducible tolerance*”の考え方は *Burnet* が提唱した「自己-非自己理論」や“*clonal deletion*”の考えに合致した^{26,27}。

・初期の免疫寛容における研究

制御性 T 細胞の研究は、キメラやリンパ球消去の実験ではなく、アロ反応性 T 細胞の抑制、*signal 1*（抗原/*major histocompatibility complex* (MHC)-II と *CD3/T cell receptor* (TCR)の相互作用）や *signal 2*（共刺激分

子刺激)の抑制、部分的な T 細胞の消去などの実験から始まった²⁸。初期の研究では、アロ抗原特異的抗体を誘導する齧歯類のモデルが用いられた^{29,30}。このモデルではアロ反応性リンパ球の clonal deletion を機序とせず、Batchelor と Welsh らによって”split tolerance”と名付けられた³¹。ひとたび免疫寛容が成立すると、ドナーリンパ球や naïve なレシピエントと同種同型のリンパ球、抗原に感作された同種同型のリンパ球を輸注しても免疫寛容は破綻しなかった³²。このため、免疫寛容が成立したグラフトは免疫原性が低下したのではないかと考えられた。免疫寛容が成立したレシピエントの末梢血を同種同型のマウスに輸血すると、二次移植したグラフトの生着期間が延長し³³、免疫寛容はほかの naïve なマウスに「移入できる (adaptive)」ことが判明した。これらの実験結果は免疫寛容が成立する理由はグラフトの免疫原性の低下だということは示唆するが、なぜ naïve な二次グラフトまで受け入れられるのかまでは説明できなかった^{31,34}。

・液性免疫と免疫寛容

ドナー特異的アロ抗体がグラフト生着期間を延長することから、アロ抗原のブロックや免疫複合体、オプソニン化などが免疫寛容の誘導や維持に必要なのではないかと考えられた³⁵。しかし、免疫寛容となったレシピエントの B 細胞や血清では免疫寛容を移せないことから、アロ抗体のみでは説明できなかった³⁶。1970 年～1980 年代に、抗イディオタイプ抗体や T 細胞に免疫を制御する働きがあることが示唆された^{37,38}。同じころ、Niels と Milstein、Kohler はモノクローナル抗体を発見し³⁹、この発見によりマウスやラットのモデルでの研究手法が飛躍的に進歩した。これらの突破口を機に、まず、抗イディオタイプ抗体やブロック抗体は免疫寛容に必要ではないことがわかった⁴⁰。他の機序として、アロ反応性 T 細胞の anergy (無反応)、indirect pathway による T 細胞の感作などが考えられた⁴¹。

・抑制性 T 細胞

1970 年に Gershon らが抑制性 T 細胞の概念を提唱した⁴²。最初のエビデンスは、抗リンパ球グロブリンを投与されリンパ球を消去されたホストに、免疫寛容となったホストの細胞を輸注することにより、グラフト生着期間が延長したことである⁴³。この Brent らの研究は、アロ抗原特異的な抑制の証拠として画期的であった。さらに、胎児期に免疫寛容を誘導できたレシピエントから T 細胞を移入することで、ドナー特異的にグラフト生着期間を延長した⁴⁴。細胞輸注を受けたレシピエントはドナーとのキメラを形成

(chimerism)し、キメラ細胞が再生した胸腺で T 細胞を再教育することが機序であると報告された⁴⁵。1970 年代後半から 1980 年代前半にかけて、多くの研究者が、骨髄細胞でも胸腺細胞でもなく、末梢血リンパ球により免疫寛容を移入できることを示した^{43,46}。放射線照射を行ったホストに免疫寛容となったマウスの脾細胞を移入すると、特別な追加治療をせずともグラフト生着期間を延ばすことができた⁴⁶。また、免疫寛容となったレシピエントマウスから T 細胞の移入を受けたマウスはアロ抗原を産生せず、B 細胞や血清では免疫寛容を移せなかった⁴⁷。免疫寛容マウスの T 細胞は、血液からリンパ節への移入が起こらず、この性質は活性化メモリー T 細胞に似ていた⁴⁸。

・胸腺の免疫寛容における役割

齧歯類で、幼少期に胸腺を摘出すると自己抗体が産生される⁴⁹。成体マウスであっても、胸腺摘出は自己免疫疾患を誘発する⁵⁰。Gershon と Kondo は、胸腺細胞に抗原非特異的抑制性細胞が潜んでいることを最初に発見した⁴²。胸腺細胞は拒絶を誘発せず⁵¹、それどころか naïve T 細胞による拒絶反応を抑制する⁵²。胸腺にアロ抗原を注射すると、その抗原に対する免疫寛容が誘導できる⁵³。胸腺はある種の免疫寛容モデルでは必須であるが、一方で免疫寛容が成立したマウスの胸腺にはドナー特異的抑制性細胞は存在しない⁵⁴。

・T 細胞 subset と抑制性 T 細胞

T 細胞は拒絶の中心的役割を果たす⁵⁵。1980 年代前半、CD4⁺ T 細胞と CD8⁺ T 細胞が拒絶の中心であるとわかった^{56,57}。CD8⁺ T 細胞は CD4⁺ T 細胞に刺激され、拒絶反応や^{55,57}、Graft Versus Host (GVH)反応を引き起こし⁵⁸、Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)の主体を担うことが判明した⁵⁹。

T 細胞に subset があると報告されてから、その中に抑制性の subset があることが徐々に明らかになった。可溶性イディオタイプや I-J が I-J⁺CD8⁺ 抑制性 T 細胞から産生されると報告され、盛んに研究された^{60,61}。ところが、マウスの H-2 領域にコードされているはずの I-J 遺伝子が見つからなかったため⁶²、300 以上の論文で I-J⁺CD8⁺ 抑制性 T 細胞が報告されているにもかかわらず、I-J⁺CD8⁺ 抑制性 T 細胞の研究は急速に廃れた。

1980 年代中盤、naïve T 細胞は拒絶に働く一方、免疫寛容マウスの CD4⁺ T 細胞はドナーグラフトを拒絶できないことが発見された^{34,63}。CD8⁺ T 細胞

胞や B 細胞よりも、主に CD4⁺ T 細胞が抑制に関わるとする報告が多数見られることから⁶⁴、抑制の主役は CD4⁺ T 細胞であることが徐々に明らかとなった。

・ CD4⁺ T 細胞とサイトカイン

CD4⁺ T 細胞はその増殖のためにサイトカインが必要であり、抑制性 CD4⁺ T 細胞も抑制能にもサイトカインが必要ではないかと考えられ、検証された^{63,65}。Concanavalin-A (ConA) とリンパ球を培養した培養上清には Interleukin (IL)-2 を含むさまざまなサイトカインが含まれる。この上清を用いて *ex vivo* でドナー抗原と培養した免疫寛容マウスの CD4⁺ T 細胞は、naïve T 細胞によって引き起こされる拒絶反応を抑制した⁶⁶。ドナー抗原を加えないで培養した場合には免疫寛容マウスの CD4⁺ T 細胞は免疫抑制能を失った。ConA 上清は IL-2 を含んでいることから、IL-2 受容体 α 鎖である CD25 に注目が集まった。免疫寛容マウスの CD4⁺ CD25⁻ T 細胞は免疫寛容を移入できないうえ、グラフトを拒絶した⁵⁴。また、ConA 上清およびドナー抗原と *ex vivo* で培養した免疫寛容マウスの CD4⁺ T 細胞のグラフト生着延長効果は抗 CD25 抗体の投与により阻害された⁵⁴。

1980 年代中盤から、IL-2 はアロ反応性 T 細胞から産生され、拒絶反応を促進する重要なサイトカインと考えられていた⁶⁷。抗 CD25 抗体や IL-2-毒素複合体はアロ反応性 T 細胞 clone を抹消し、拒絶反応を抑制する⁶⁷。ほとんどすべての IL-2 や CD25 に関する研究は、移植の拒絶反応に焦点が当てられていた。免疫寛容を誘導するためには、CD25⁺ T 細胞を減少させる必要があると考えられていた。そのため、CD4⁺ CD25⁺ T 細胞が免疫寛容を誘導するという事実は、主要なパラドクスだった。IL-2 が免疫賦活よりも免疫抑制に重要であるという事実は、IL-2 や IL-2 受容体のノックアウトマウスによって明らかとなった。IL-2 や IL-2 受容体のノックアウトマウスは、自己免疫疾患を発症し、移植臓器を拒絶する⁶⁸。

1980 年代後半には、helper T cell (Th)1 や Th2 といった概念が提唱された⁶⁹。免疫寛容マウスでは、IL-2 や Interferon (IFN)- γ を産生する Th1 よりも、IL-4、IL-10、IL-13 などのサイトカインを産生する Th2 が有意であると考えられた⁷⁰。しかし、この仮説は普遍的には当てはまらず、Th2 も拒絶反応を引き起こした。Waldmann らのグループが、CD4⁺ T 細胞が免疫寛容を移すことができることを報告し、Th1/Th2 の観点ではなく、制御性 T 細胞の観点に再び火をつけた⁷¹。

・制御性 T 細胞

1995 年、Sakaguchi らは胸腺由来の CD4⁺ CD25⁺ T 細胞が自己免疫疾患を抑制することを報告した⁷²。CD4⁺ CD25⁺ T 細胞は制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) と呼ばれるようになり、その制御能の機序が研究された。Treg は CTLA-4 を介して抗原提示細胞 (antigen-presenting cell: APC) に発現している CD80/86 と結合し、APC に indoleamin 2,3-deoxygenase (IDO) の産生を促し、トリプトファンから免疫抑制物質であるキヌレニンの産生を促して T 細胞を抑制する⁷³。その他、APC に抑制性に働く IL-10 の産生⁷⁴、T 細胞を抑制する Transforming growth factor (TGF)- β の産生⁷⁵、IL-35 の産生などが Treg の抑制性機序として考えられている⁷⁶。

胸腺 Treg が持つ TCR の repertoire は非常に広範で、主に自己抗原を認識するよう教育されている⁷⁷。胸腺 Treg は自己免疫性疾患の抑制に働いていると考えられているが、胸腺 Treg にわずかに混じるアロ反応性制御性 T 細胞が活性化し増殖することで、移植臓器の免疫寛容を誘導すると考えられている⁷⁸。胸腺由来の Treg は、forkhead box P3 (Foxp3) を発現しており、FOXP3 遺伝子領域にある "Treg-specific demethylation region (TSDR)" が非メチル化されており⁷⁹、それが Foxp3 発現を安定化させ、CD25 の発現や IL-2 の産生抑制を実現している。Foxp3 mRNA は、腎移植モデルにおいて、拒絶時に尿中に増加を示し、Treg が拒絶時にグラフト内に集積することでグラフト保護に働くと考えられている⁸⁰。グラフトや二次リンパ組織から採取した CD4⁺ CD25⁺ T 細胞は単独では免疫寛容を移入できず、CD4⁺ CD25⁻ T 細胞からのサイトカインが必要と考えられている⁶⁶。抗原特異的 Treg は、CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁺ T 細胞から、特異抗原と TGF- β によって誘導される⁸¹。抗原特異的 Treg は CD62L を発現していず、血液からリンパ組織へ移動しない。活性化された Treg は炎症組織内に遊走し、炎症を抑制する⁸²。活性化された Treg は、活性化された effector T 細胞と同様にケモカイン受容体を発現し、Th1/2/17 と同様の機序で炎症組織に遊走する⁸³。

CD4⁺ T 細胞は、effector T 細胞であれ Treg であれ、APC 上の MHC class II に提示された抗原を indirect presentation によって認識する⁸⁴。移植における免疫寛容は、しばしば indirect presentation を必要とする⁸⁵。CD4⁺ Treg は indirect presentation により特異抗原を認識し、維持され、免疫寛容を誘導する⁸⁶。抗原特異的 Treg の誘導と維持にはさまざまな報告がなされており、また Treg を用いた細胞治療も検討されている。いずれにしても、Treg は現在、免疫寛容の key phenotype と考えられており、移植医療にお

ける免疫寛容の実現に期待が寄せられている⁸⁷。

<DST の歴史>

・術前輸血の臨床効果

1970 年代前半までは、抗原感作によるグラフトロスの可能性が高くなる懸念から、腎移植前の患者に対しては輸血療法を控えるべきと考えられていた。ところが、輸血療法を受けた患者の方が、輸血療法を受けなかった患者よりもグラフト生着期間が長かった。Opelz らは、10 単位以上の輸血を移植前に受けた患者の 1 年生着率が 66%であるのに対し、輸血されなかった患者は 29%であったと報告した⁸⁸。グラフトとは関係のない 3rd-party の輸血をランダムに受けた患者も、輸血を受けなかった患者に比べ、1 年生着率が向上した⁸⁹。回数を多くすればより大きな効果が得られるというわけではないことも報告された⁹⁰。時にドナーからの輸血が行われたため、特に術前のドナー輸血は donor-specific transfusion (DST) と呼ばれた。

ヒト MHC-class II である HLA-DR には 10 の common antigen が存在するため、ランダムに 2 回輸血を受ければ、40%の確率でドナーの HLA-DR に暴露されることになる。そのため、ランダムな複数回の輸血は、ドナーの血液を輸血されたのとはほぼ同じ機序で作用していると考えられた⁹¹。

1980 年代前半、移植前の輸血は有益で、固形臓器の生着期間を改善すると考えられた。Potter らは、DST を行った小児腎移植 37 例で、6 年のグラフト生着率が 93%と報告した⁹²。他の報告では 20 例の小児腎移植で 3 年生着率が 90%と報告された⁹³。しかし一方で、小児腎移植における DST の効果はないとする報告もあった⁹⁴。新規免疫抑制剤の開発と、HLA-DR の適正なマッチング、拒絶反応のマネジメントの向上なども相まって、DST の価値は次第に薄れていった⁹⁵。Scornik らは術前輸血の是非を問うため、文献的 review を行った⁹⁶。全血輸血、白血球フィルターを通した赤血球輸血、もしくは通していない赤血球輸血を行った文献を対象とし、移植の成績と抗原感作を検討した。移植の成績については、術前輸血でよいとするものと、変わらないと結論付けたもの、むしろ悪化したというものに分かれたが、術前輸血の成績がよい論文は CNIs の登場以前の文献であり、免疫抑制剤や術後管理が洗練された 1990 年代以降では成績は変わらないかむしろ悪化することがわかった。また、抗原感作については、決して悪い影響はないとする報告がある一方、全体としては拒絶とグラフト生着期間の短縮と強い相関

があるとする報告があった。感作による抗ドナー抗体の出現は通常、拒絶とグラフト生着期間の短縮に影響するため、DST による抗ドナー抗体の出現でドナー候補を取りやめるなどの問題が起きた。このような理由から、現在では DST は臨床では行われていないのが現状である。しかし研究の分野ではドナー特異的免疫寛容を誘導できるモデルとしていまだに盛んに研究されており、将来的に臨床にも十分に応用可能であると考えている研究者もある^{97,98}。

・ DST についての研究

研究領域において、DST は古くから広く研究されてきた。その免疫抑制能は疑う余地はないが、その機序にはいまだ一定の見解はない。報告されているもので、①キメラ化 (chimerism)、②ある種の抗体の産生、③制御性 T 細胞を含む抑制性 T 細胞の誘導、④アロ反応性 T 細胞の clonal deletion もしくは anergy、⑤T 細胞 subset の変化、⑥サイトカイン産生の修飾などに分類される⁹⁹。

以下に、DST についての一般事項、および免疫抑制機序について概説する。

■ DST における樹状細胞の関与

レシピエントマウスに MHC-class II^{-/-}マウスを使用すると、DST による免疫抑制効果が阻害される⁹⁸。このことは、レシピエントの MHC-class II 分子が DST による免疫寛容誘導に必要であることを示している。実際、DST の機序には indirect presentation が重要とする報告が散見される^{100,101}。MHC-class II 分子は、APC 上で外来抗原を提示する分子であり、CD4⁺ T 細胞への抗原提示に重要であることから、DST による免疫抑制機序の根幹には CD4⁺ T 細胞が主要な役割を果たしていることが想像される。DST では通常、抗原感作のリスクを下げる目的で免疫抑制剤が併用される^{102,103}。非炎症環境下では樹状細胞は免疫寛容を誘導すると考えられており¹⁰⁴、免疫抑制剤による免疫抑制下で DST によって供給されたドナー抗原がレシピエントの樹状細胞上の MHC-class II に提示され、CD4⁺ T 細胞を介してドナー抗原特異的な免疫制御環境を作り上げているのではないかと考えられた。

また、Ochando らは、DST により供給されたドナー抗原を取り込んだ細胞は CD11c⁺ B220⁺ Gr-1⁺ PDCA-1⁺ plasmacytoid 樹上細胞であると報告しており¹⁰⁵、DST モデルにおいてどのような樹状細胞が関与しているのか、詳細な研究が待たれる。

■ 供血源

DST は、当初、術前輸血から発展した概念であるため、通常は全血が用いられる¹⁰⁶が、実験的には脾細胞を用いることが多い。Balshi らは、ラットの心移植モデルで、DST の供血源として赤血球のみでは不十分であり、UV 照射した全血を使用することを勧めている¹⁰⁷。また、Markees らは供血源についての興味深い研究を行った。彼らは供血源として、脾細胞、リンパ節の細胞、胸腺、骨髄、赤血球、buffy coat で回収した細胞などを選定し、さまざまな供血源で DST を行った¹⁰⁸。その結果、脾細胞やリンパ節の細胞に比べ、胸腺ではわずかに生着期間が劣り、骨髄や赤血球ではほとんど生着期間が延長しなかった。骨髄細胞は IL-10 や IFN- γ などのサイトカイン産生に影響し、Treg の誘導を阻害するため、抑制能を発揮できなかったのではないかと考察されている。また、DST に B 細胞^{109,110} や apoptotic cell¹¹¹、CD11b⁺ 樹状細胞¹¹² を用いて行う方法も報告されている。

DST に MHC-class I ^{-/-}、MHC- II ^{-/-}、CD40^{-/-}、CD80/86^{-/-}を用いても成績に変わりはないことから⁹⁸、DST においてはこれらの分子は抗原としての提示の対象ではなく、ドナーの APC による抗原提示やドナーの APC からレシピエントの APC に MHC が移動する semi-direct presentation の関与は低いものと考えられた。

CD47 は樹状細胞やマクロファージなどに発現する inhibitory receptor signal regulatory protein- α (SIRP α)のリガンドで、さまざまな細胞に発現し、貪食から逃避している。CD47^{-/-} ドナーで DST を行くと、DST の免疫寛容誘導効果が阻害される¹¹³。報告者は、CD47^{-/-}の細胞は樹状細胞に速やかに貪食され、これがアロ反応性を高める可能性があると考えしている。

通常の DST とは異なるが、1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (ECDI)で固定した脾細胞を使うことで、ドナー特異的免疫寛容を誘導できるとする報告がある^{114,115}。

■ DST のタイミングと回数

DST のタイミングは、移植モデルや併用する免疫抑制剤により、さまざまである。通常は術前に行うが、術直前に DST を行うとする報告¹¹⁶、術後に DST を行ったとする論文もある¹¹⁷。最もよく研究されている方法はおそらく抗 CD154 抗体 (MR-1) を併用したレジメンであるが^{98,100,105,113,118-126}、通常移植 7 日前 (day -7) に DST を行う。Wood らの研究室では、抗 CD4 抗体 (YTS177) を併用するレジメンで、day -27 に 1 回のみ DST を行う方

法を報告している^{101,127-129}。DSTのタイミングに関しては、Kitadeらがラットを用いて検証している。ラットの心移植モデルで、day 0にDSTを行った場合にはグラフト生着期間はほぼ延長せず、day -6に行った場合には緩やかにグラフト生着期間が延長し、day -12に行うと免疫寛容が得られた¹³⁰。Abeらはラットの肝移植モデルでさらに長期間を検討しており、4回DSTを行い、最後のDSTから7日目に移植した場合、37日目に移植した場合にはほぼ免疫寛容となるが、107日後だとグラフト生着期間は有意に短縮した¹³¹。グラフトを移植しないと免疫寛容を担う細胞が誘導されず^{121,131,132}、グラフト内のpassenger leukocyteが免疫寛容の誘導に重要との報告もある¹³³。DSTを行った後に適切な時期に移植を行うことが肝要である。

DSTとして血液を打つ回数は1回とする報告が多いが、複数回打つ方法も報告されている。Bushellらは、1回のDSTよりも5回DSTを行った方がより強い抑制能を持ったCD25⁺ T細胞を誘導でき、皮膚グラフトの生着期間が長くなることを報告した¹³⁴。また、彼らは、臨床を想定し、ドナー系統に限らないランダムな同種異型のDSTでも複数回行うことでグラフト生着期間を延長できることを示した¹³⁵。

■DSTとの併用薬剤・生物製剤

DST単独では抗原感作の問題があり^{102,136}、マウスでは通常なんらかの免疫抑制作用を有する薬剤や生物製剤（モノクローナル抗体など）を併用する。

薬剤については、もともとは臨床でazathioprineが併用され、有効性が示されていた¹³⁷。CNIsの開発により、CsAやFK506などの併用の有効性も報告されている^{138,139}。CNIsについては、DSTによる免疫寛容誘導効果を阻害するとも考えられている⁹⁷。DSTの機序のひとつにTregの誘導があるが、CNIsはTregの増殖に必要なIL-2の産生を抑えるため、ドナー特異的Tregの誘導が阻害されるためと考えられている。CNIsを使用する場合には投与量や投与のタイミングが重要となる¹⁴⁰。その他、cyclophosphamide¹⁴¹、mTOR阻害剤(ciclosporin)¹⁴²、Heme oxygenase (HO)-1の発現を誘導するcobalt protoporphyrin IX (CoPPIX)¹⁴³、deoxyspergualin¹⁴⁴、NF- κ Bの阻害剤であるdehydroxymethylleukotoxin A¹⁴⁵など、さまざまな薬剤がDSTとの併用で免疫修飾効果を発揮することが報告されている。

DSTとの併用で最もよく研究されているものは抗CD154抗体(MR-1)と

考えられる^{98,105,109,113,116,120-126,146-149}。さまざまな移植モデルで、完全に免疫寛容を誘導できる場合がある。また、Wood らの研究室では抗 CD4 抗体 (YTS177) を併用したレジメンを用いている¹²⁷⁻¹²⁹。CTLA-4Ig を併用したレジメン¹⁵⁰、MR-1 に抗 lymphocyte function associated-antigen (LFA)-1 抗体を併用するレジメン¹⁵¹ などが報告されている。

■DST による免疫抑制機序

①chimerism (キメラ化)

Starzl は microchimerism が固形臓器移植における免疫寛容の鍵だと考えていた¹⁵²⁻¹⁵⁴。Microchimerism とは、固形臓器移植後に時折見られる現象で、レシピエントに対して非常に少ない（通常は 0.1% 以下の）ドナー細胞がレシピエント体内に生着する現象であり、移植臓器内に潜んでいたドナーの末梢血造血幹細胞がレシピエントの末梢血や組織へ移行することによって起きると言われている¹⁵⁵。Microchimerism がグラフト生着に及ぼす機序や影響についての詳細はいまだ解明されていないが¹⁵⁶、長期生着している移植腎や移植肝からの生検で、ドナーとレシピエントのリンパ球が共存している症例が報告されており、microchimerism の証拠と考えられている¹⁵³。DST の経門脈投与を行った移植小腸モデルでキメラ化が認められたことから¹⁵⁷、DST のひとつの機序として microchimerism が挙げられている。末梢血にはわずかながら造血幹細胞が含まれており、DST に含まれるこの造血幹細胞が microchimerism に重要なのではないかと考えられた。しかしながら、DST モデルでグラフト長期生着のレシピエントに microchimerism が認められなかったとする報告や¹⁵⁸、microchimerism が認められていながらグラフトが拒絶されたとする報告もある¹⁵⁹。加えて、DST に放射線照射したドナーの血液を使用した場合でもグラフト生着延長効果が見られることから、microchimerism のみでは DST の機序を十分には説明できない¹⁶⁰。

②抗体の関与

DST により、抗 Fc 受容体抗体が産生され、これがハプロ半合致移植の成績を向上させたとする報告がある¹⁶¹。DST が抑制性細胞を誘導し、抗イディオタイプ抗体や非特異抗体の産生を促進させることで、アロ抗原に対する免疫反応を調整しているのではないかとする報告もある¹⁶²。しかし、B 細胞や抗体の免疫寛容への関与はわずかであるとする報告もあり⁴⁷、これらの

研究結果は抗体の副次的な役割を表しているに過ぎないのかもしれない。

③抑制性 T 細胞

抑制性 CD4⁺ T 細胞（特に CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞：Treg）は、DST の免疫抑制機序として最も多く報告されており、抑制能を担う細胞として最有力であると考えられる^{105,120,124,125,127-129,131,146}。先述の通り、1980 年代中頃から CD4⁺ T 細胞が免疫寛容を担う主要な細胞であると考えられてきたが、Markees らは、抗 CD4 抗体を用いると DST の免疫修飾効果が消失することを見出し、DST のモデルにおいても CD4⁺ T 細胞が重要な役割を担うことを示した¹²⁴。Kingsley らは、DST によって誘導された CD4⁺ CD25⁺ T 細胞には免疫寛容を移す能力があることを示した¹²⁷。CD4⁺ CD25⁺ T 細胞は細胞接触により抑制能を発揮するが⁸⁷、DST によりグラフト内の Treg が増加すると報告されており^{146,163}、グラフト内での effector T 細胞の抑制に寄与しているものと考えられた。組織遊走に関わるケモカインである CCR4 のノックアウトマウスをレシピエントに用いると、グラフト内の Treg が減少し、グラフトが拒絶される¹²⁰。Treg の抑制機序のひとつである CTLA-4 を中和すると DST の免疫修飾効果を阻害されることから¹²⁷、グラフト内への Treg の遊走と CTLA-4 による細胞接触が、DST における免疫抑制機序のひとつと考えられた。

Treg には胸腺由来の naturally occurring Treg (nTreg)と induced Treg (iTreg)が報告されている⁸⁷。Ovalbmin-transgenic マウスと ovalbmin を特異抗原とする OT-I、OT-II T 細胞を用いた研究では、DST によってドナー特異的 Treg が誘導されることが報告され^{125,146}、抗原特異的制御性 T 細胞は胸腺ではなく、末梢で誘導されることが示された。

Treg が免疫寛容の誘導と維持のいずれに関わるかの研究も報告されている。DST と抗 CD154 抗体を用いた免疫寛容モデルにおいて、day -11 に抗 CD25 抗体を投与して Treg を消去すると免疫寛容が誘導されなくなるが、day 50 に投与してもグラフト生着期間に影響がなく、Treg は免疫寛容の誘導には必要だが維持には必要ではない可能性がある¹⁶⁴。

④Clonal deletion もしくは anergy

ある特定抗原を認識する T 細胞 clone は、共刺激分子 (signal 2)やある種のサイトカインによる刺激 (signal 3)が欠如した状態で T 細胞受容体刺激 (signal 1)を受けた場合、Fas を介した細胞死を起こすことが知られており (clonal deletion)¹⁶⁵、この現象によって特定抗原に対する免疫応答が制

御されていると考えられている。また、アロ反応性 T 細胞がその特異抗原に対して反応・増殖しなくなる現象を clonal anergy という¹⁶⁶。

Maurik らは、TCR transgenic T 細胞を RAG^{-/-}マウスに移入するモデルで、DST と抗 CD154 抗体 (MR-1) を併用した時にのみ、心移植後にアロ反応性 CD4⁺ T 細胞の clonal deletion が見られたと報告し¹²¹、DST と MR-1 の併用によるグラフト生着延長効果の機序のひとつが clonal deletion であると報告した。また、Iwakoshi らは、TCR transgenic マウスを用いて、DST+MR-1 の併用治療で、CTLA-4 依存性にアロ反応性 CD8⁺ T 細胞の clonal deletion が起きることを報告した¹²²。抗 CD4 抗体で CD4 を消去すると、CD8⁺ T 細胞の deletion が得られなくなるとする報告もあり、CD4⁺ T 細胞の subset が CD8⁺ T 細胞の抑制に関わる可能性が示唆される¹⁶⁴。

また、Quezada らは、DST によって CD4⁺ T 細胞の活性化マーカー (CD69、CD44、CD62L) の発現が抑えられ、Th1 サイトカイン (IL-2、IFN- γ) の産生が抑制されることを報告し、DST の機序のひとつにアロ反応性 T 細胞の anergy が関与することを示した¹⁴⁷。この anergy は、抗 CD25 抗体や抗 glucocorticoid-induced TNF- α receptor (GITR) 抗体によって阻害されるため、T 細胞の anergy には Treg が関与している可能性が考えられた。

⑤ T 細胞 subset の変化

通常 T 細胞は CD4⁺ T 細胞と CD8⁺ T 細胞に分類されるが、CD8⁺ T 細胞はその殺細胞作用により、グラフトの拒絶に寄与する¹⁶⁷。Treg に対する CD8⁺ T 細胞の比が高いと拒絶に傾くと報告されており¹⁶⁸、免疫バランスがグラフト保護に重要であることが示唆される。DST により Treg/CD8 比が上昇することが報告されており、Treg と CD8⁺ T 細胞のバランスが免疫抑制状態を反映する可能性が示唆された^{119,123}。また、Pinelli らは、DST によって Treg/effector T 細胞比が上昇し、グラフト保護に働いていることを報告した¹²⁵。

CD4⁺ CD25⁻ T 細胞は effector T 細胞として機能し、拒絶を促進するが、Banuelos らは、DST により免疫寛容の誘導には CD4⁺ CD25⁻ T 細胞より分泌される IFN- γ が重要な役割を果たすと報告し¹⁶⁴、Treg 以外の CD4⁺ T 細胞 subset の変化の重要性も示唆された。

⑥ サイトカイン産生の変化

CD4⁺ T 細胞には IL-2 や IFN- γ を産生して拒絶を促進する Th1 や、IL-4、IL-10 などの抑制性サイトカインを産生する Th2 に分類されるが、DST は

Th2 サイトカイン産生を調整する働きが報告されている。DST により Th2 サイトカイン産生を促すことで、TNF- α の産生低下、白血球遊走因子の抑制、移植臓器の白血球の遊走の低下などの効果を示すことが報告されている¹⁶⁹。IFN- γ については拒絶反応の促進のみではなく、免疫寛容の誘導に必要なサイトカインであるとする報告が多数認められる^{170,171}。IFN- γ 欠乏や中和抗体の使用で、免疫抑制の効果が阻害されるが¹⁷²、IFN- γ の抑制性機序はさまざまであり、CD8⁺ T 細胞の抑制¹⁷³、Treg の誘導¹⁷⁴ や維持¹⁷⁵、effector T 細胞の apoptosis¹¹⁷ などが報告されている。DST を用いた免疫抑制モデルにおいて、Treg の IFN- γ 産生が増加するとする報告や¹²⁹、CD4⁺ CD25⁻ T 細胞からの IFN- γ が抑制に重要とする報告¹⁴⁴ など、IFN- γ の免疫抑制への関与を示唆する報告が散見される。一方で、免疫寛容マウスでより IFN- γ の産生が少なかったとする報告もあり^{118,145}、IFN- γ はやはり拒絶を誘発するサイトカインとも考えられている。IFN- γ がグラフト生着に寄与するか否かは、IFN- γ の量やタイミング、場所、産生細胞などが関係している可能性がある¹³⁰。

その他の抑制性サイトカインには IL-10 や TGF- β などが挙げられる⁸⁷。Goto らは DST と NF- κ B 阻害剤 (DHMEQ) の併用で、アロ心グラフト移植後 7 日目の脾細胞からの IL-10 産生や TGF- β 産生が増加したことを報告した¹⁴⁵。DST を用いた免疫寛容モデルでは、IL-10 の中和によってグラフト生着延長効果が阻害され^{101,127}、IL-10 は DST による免疫寛容誘導効果においても重要なサイトカインであると考えられた。Josien らは、DST によってグラフト内の TGF- β 産生細胞が移植後早期に増加し、抗 TGF- β 抗体の投与により、DST によるグラフト生着延長効果が阻害されることから、グラフト内での TGF- β 産生が免疫寛容に重要であると報告した¹⁷⁶。また、Abe らは DST によって誘導した CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞の TGF- β 産生が亢進したことから、TGF- β が免疫抑制に重要であると報告した¹³¹。TGF- β 欠乏マウスでは Foxp3 の発現が低下することから¹⁷⁷、TGF- β は Foxp3 の発現や維持に必要で、DST による免疫抑制機序の一端を担っていると考えられる。

<NK026680>

・概要

NK026680 は日本化薬株式会社（東京）によって開発された新規

triazolopyrimidine 誘導体で¹⁷⁸、合成ヘテロ環を有している。triazolopyrimidine 誘導体のひとつである trapidil は虚血再灌流を抑制し¹⁷⁹、狭心症やステント内肉芽形成を抑制する¹⁸⁰。また、trapidil は、単球やマクロファージの CD40 発現を抑制することで、IL-6、IL12、TNF- α などの炎症性サイトカインの産生を抑制することが報告されている^{181,182}。NK026680 は trapidil と同様の分子構造を有することから、免疫抑制作用が期待され、開発された。

・毒性・薬物動態

NK026680 は抗炎症作用を示し、MHC-class I および II の不適合での骨髄移植で GVH 反応を有意に抑え、SCG/Kj マウスにおける糸球体腎炎の発症を抑制したと報告されている^{178,183}。また、移植領域ではラットの移植肝の生着延長効果、マウスでの移植心の生着延長効果が示されている^{184,185}。Saiga らは NK026680 の遺伝毒性および細胞毒性について検討を行っている。NK026680 は umu-test では 5 mg/ml で、micronucleus test では 500 mg/kg の経口投与で、それぞれ遺伝毒性を認めていない¹⁷⁸。また、細胞毒性であるが、20 mg/kg で 20 日間マウスに投与したところ、体重減少や感染症を認めず、肝・胆嚢・膵・腎・小腸・大腸などに組織学的な変性を認めなかった¹⁷⁸。当教室の研究では、NK026680 を 500 ng/ml で 8 時間作用させたときの T 細胞の生存率は 85.3%であり、control と有意差がないことから、この濃度での細胞毒性は許容しうるものであると考えた¹⁸⁵。また、40 mg/kg/日で 2 週間経口投与した場合も、わずかな体重減少と下痢を認めるのみで、感染や死亡などの主要合併症を認めなかった¹⁸⁵。3 mg/kg の経口投与により、10 分で最高血中濃度に達し、その値は 1280 nM であった。半減期は 2.4 時間で、0.5% carboxymethylcellulose に溶解した場合の生体利用率は 50.9%であった¹⁷⁸。ヒトでの毒性の検証がなされておらず、今後の検証が必要と考えられた。

・NK026680 の免疫抑制機序

NK026680 は主に樹状細胞を抑制する。Saiga らは、ヒトの単球由来樹状細胞で、NK026680 が CD83、CD80/86 および MHC-class II の発現を抑えることを示し、NK026680 は樹状細胞の成熟や活性化を抑制することを報告した¹⁷⁸。当教室でも同様に、NK026680 を用いてマウスの骨髄から誘導した樹状細胞の成熟および活性化は抑制され、その未熟樹状細胞をマウスに静脈投与することでアロ移植心の生着が延長することを報告した¹⁸⁶。Ex

in vivo で NK026680 と培養した樹状細胞では、細胞内転写因子 **c-Jun**、**c-Fos** が抑制され、**IL-12** の産生が有意に抑制された。この抑制樹状細胞は、**T** 細胞の **IFN- γ** 産生を抑制し、**IL-10** 産生を増加させ、*in vivo* で制御性 **T** 細胞の割合を増加させた¹⁸⁶。NK026680 は樹状細胞だけでなく、**T** 細胞の活性化と **IFN- γ** や **IL-2** などの **Th1** サイトカインの産生を抑制した¹⁸⁵。

<本研究の目的>

NK026680 は主に樹状細胞の成熟を抑制する薬剤である。DST によるドナー特異的免疫抑制作用には樹状細胞によるドナー抗原の提示が必須であり、DST に免疫抑制剤を併用することでグラフト生着延長効果が高められる。本研究では、樹状細胞の成熟を抑制する NK026680 を DST と併用することによる免疫修飾効果につき検討した。

<本研究の結論>

NK026680 と DST の併用治療は、抗原特異的にアロ移植心の生着を著明に延長した。NK026680 と DST の併用により、ドナー抗原特異的な **Treg** が誘導され、移植後にグラフト内で **Treg** が増加し、**CD8⁺** **T** 細胞の活性化は抑制された。また、抗 **CD25** 抗体の投与で **Treg** を消去することにより、NK026680 と DST の併用治療によるマウスのアロ移植心生着延長効果は阻害された。

本研究により、NK026680 による固形臓器移植における新たな免疫抑制療法の可能性が示唆された。

略語表

本文中および図中で使用した略後は以下の通りである。

ACK: ammonium-chloride-potassium
APC: antigen presenting cell
CFSE: 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CNIs: calcineurin inhibitors
ConA: concanabalin-A
CsA: cyclosporine A
CTLA-4: cytotoxic T lymphocyte antigen-4
DST: donor-specific transfusion
DMSO: dimethyl sulfoxide
ELISPOT: enzyme-linked immune spot
FACS: fluorescence-activated cell sorter
FCS: fetal calf serum
Foxp3: forkhead box P3
HLA: human leukocyte antigen
IDO: indolamine 2,3-deoxygenase
IFN- γ : interferon-gamma
IL: interleukin
2ME: 2-mercaptoethanol
MHC: major histocompatibility complex
MLR: mixed lymphocyte reaction
mTOR: mammalian target of rapamycin
PBS: phosphate buffer saline
PD-L: programmed death ligand
PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
TCR: T cell receptor
TGF- β : transforming growth factor- β
Th: helper T cell
Treg: regulatory T cell

実験方法

本研究の実験計画書は、国立大学法人北海道大学動物実験委員会に承認され、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に従って施行された。

1) 動物

C57BL/6 (B6; H-2^b)、BALB/c (H-2^d)、C3H (H-2^k)のオスのマウスを 7～9 週齢で日本 SLC 株式会社（静岡）より購入し、北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設内で、病原体より隔離された状態で管理した。マウスはすべて 8 週齢以上で実験に使用した。

2) 抗体および薬剤

FACS 用の抗体として、PE-Cy7-CD3 ϵ (clone 17A2)、APC-H7-CD4 (GZK-1.5)、V500-CD8a (53-6.7)、Brilliant Violet 421-CD25 (PC61)、FITC-CD44 (IM7)、PE-CD62L (MEL-14)、FITC-CD69 (H1.2F3)、biotin-MHC-class II (I-Ab) (AF6-120.1)、FITC-CD40 (3/23)、PE-CD80 (16-10A1)、PE-CD86 (GL1)、FITC-IFN- γ を BD pharmingen (San Diego, CA, USA) より、APC-Foxp3 (FJK-16s)、biotin-PD-L2 (MIH5) を eBioscience (San Diego, CA, USA)より、Pacific Blue-H-2K^d (SF1-1.1)、APC-CD11c (N418)、biotin-PD-L1 (TY25)を BioLegend (San Diego, CA, USA)より、それぞれ購入して使用した。

ELISPOT 用の抗体として、mouse IL-2 or IFN- γ ELISPOT Capture antibody (BD Bioscience)および detection antibody (BD Bioscience)を使用した。

抗 CD25 抗体 (PC61)は、北海道大学大学院医学研究科 遺伝子制御研究所 分子神経免疫学分野教授 村上 正晃先生より提供していただいた hybridoma を培養し、上清より精製して使用した。

NK026680 は日本化薬株式会社（東京）より無償で提供していただいた。

3) 治療プロトコルおよび移植手術

① 移植手術

(ア) 使用マウス

ドナー：8 週齢以上の BALB/c (H2^d)

レシピエント：8 週齢以上の C57BL6 (H2^b)

3rd-party：8 週齢上の C3H (H2^k)

(イ) 手順

既報に則り、手術手技を確立した¹⁸⁷。

移植日を day 0 と定め、レシピエントマウスにドナーマウスもしくは 3rd-party のマウスから採取した心グラフトを腹腔内に移植する。

- ・イソフルレンを気化器で気化し、ドナーマウスの呼吸が止まらない適当な濃度で吸入させ、全身麻酔をかける。
- ・剃毛後に開腹し、小腸をよけて鉗で腹部大動脈と下大静脈を切離し、脱血する。
- ・横隔膜を切開し、開胸する。肋骨を脊椎付着部で切離し、胸郭を頭側に脱転して視野を展開する。
- ・よく冷却した 10 E/ml のヘパリン 1 ml を下大静脈より投与する。心臓が冷却され、拍動が停止する。
- ・下大静脈、上大静脈の順に 7-0 絹糸で結紮する。
- ・上行大動脈および肺動脈を、できるだけ首を長くするようにして切離する。肺動脈は左右の分岐より中枢側で切離する。
- ・肺動静脈および奇静脈を 7-0 絹糸で一喝して結紮する。これで心臓がハーベストされる。
- ・心臓は on ice の 10 E/ml のヘパリン生食に浸けて保存する。
- ・ドナーと同様にレシピエントマウスに全身麻酔をかける。
- ・膀胱・生殖器を尾側へ、小腸を頭側へ、直腸を左側へ脱転し、視野を展開する。
- ・レシピエントの腹部大動脈と下大静脈を露出し、スプーンクランプをかける。
- ・30 G 針で腹部大動脈、下大静脈を穿刺し、ヘパリン生食でフラッシュする。そのまま吻合孔を鉗で作成する。腹部大動脈は頭側に、下大静脈は尾側に吻合孔を作成する。
- ・10-0 の縫合糸（河野製作所、東京）で血管縫合する。グラフトの大動脈とレシピエントの腹部大動脈を、グラフトの肺動脈とレシピエントの下大静脈をそれぞれ連続縫合で吻合する。
- ・クランプを外す。グラフト内の血流は、上行大動脈→冠動脈→右心房

→右心室→肺動脈と流れ、レシピエントに還流する。灌流に問題なければ拍動が始まる。

- ・閉腹する。

②治療プロトコル

(ア) DST

- ・ドナー系統 (H2^d)もしくは 3rd-party (H2^k)のマウスを頸椎脱臼し、脾臓を摘出する。
- ・1×phosphate buffer serine (PBS)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を入れたシャーレに 70 μm の cell strainer (BD Falcon, San Diego, CA, USA)を乗せ、脾臓を 1ml シリンジの内筒ですりつぶす。
- ・conical tube (BD Falcon, San Diego, CA, USA)に回収し、遠心分離する (×300 g、5 分、4℃)。
- ・上清を破棄、Ammonium-Chloride-Potassium (ACK) lysing buffer (Lonza, Walkersville, MD, USA)0.5～1.0 ml を添加し、3 分常温で静置して赤血球を溶血させる。
- ・再び遠心し、cell count の後、1×PBS で脾細胞 100×10⁶ 個/ml に調整し 200 μl (=脾細胞 20×10⁶ 個)を陰茎静脈より全身麻酔下のレシピエントに投与する。
- ・投与日は移植予定日 (day 0)の 7 日前 (day -7)とする。

(イ) NK026680 の経口投与

- ・0.5% carboxymethylcellulose を作成する。carboxymethylcellulose (Kanto Chemical CO., INC. Tokyo, JAPAN) 200 mg を conical tube に取り分け、滅菌精製水 40 ml を加えて溶解する。
- ・NK026680 の原末を 0.5% carboxymethylcellulose で溶解し、4 mg/ml とする。4 mg/ml の NK026680 を、マウスの体重 1 g あたり 0.01 ml (=40 mg/kg)、経口投与器を用いて 1 日 1 回食道内に投与する。投与前によく懸濁して投与する。
- ・day -7 から day 6 まで、毎日投与する。
- ・NK026680 と DST を併用する場合には DST 投与後に、移植当日に NK026680 を投与する場合には移植終了後に、それぞれ NK026680 を経口投与する。

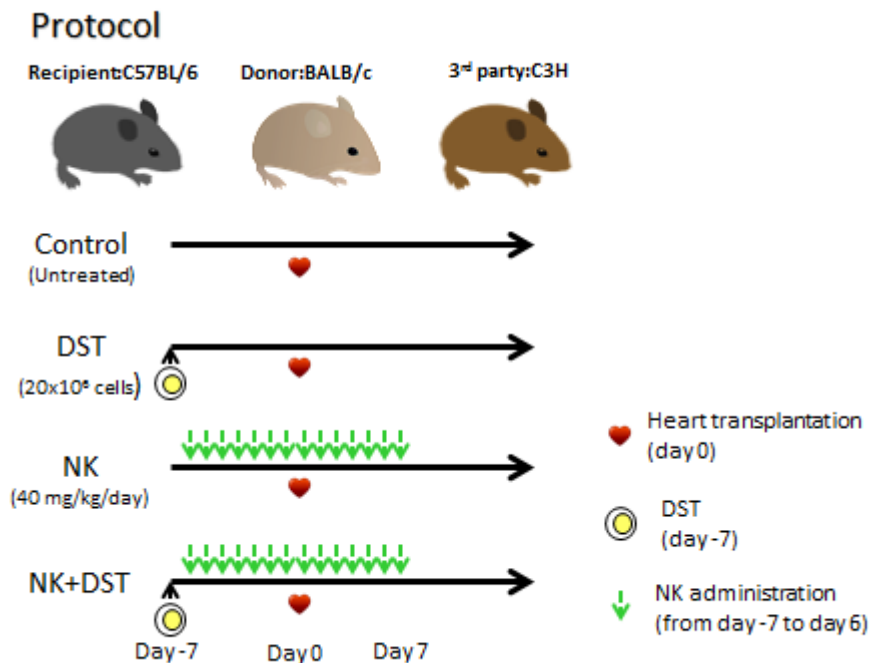


Figure 1

治療プロトコルを示す。治療を施さない無治療群、DST の投与のみを行う DST 群、NK026680 の経口投与のみを行う NK 群、DST と NK026680 経口投与を併用する NK+DST 群の 4 群を検証した。移植日を day 0 とした。

DST として、ドナー系統（もしくは 3rd-party）の脾細胞 20.0×10^6 個を移植予定日 7 日前（day -7）に静脈内投与した。NK026680 は 40 mg/kg を 1 日 1 回、day -7～day 6 の 14 日間、経口投与した。

拒絶反応については、腹壁を通した心拍動を触知することで評価した。触診で心拍動の静止を確認した後に、試験開腹を行って肉眼的にも心拍動が完全静止していることを確認し、拒絶と判断した。

（ウ）抗 CD25 抗体（PC61）の投与

- ・ hybridoma を培養し、抗体を回収する。培養液（RPMI1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)+10% fetal calf serum (FCS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)+ペニシリン+ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA))を作成し、100 mm シャーレ (BD Falcon, San Diego, CA, USA)を用いて、37℃ 5%-CO₂ で培養する。
- ・ 抗体を精製する。エコノカラム (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)に

ProteinG (GE healthcare, Buckinghamshire, UK)を入れ、1×PBSを通してエタノールを除去する。

- ・ hybridoma の培養液を回収し、1500 rpm、4℃、5 分で遠心して、上清を濾紙で濾過し、さらにフィルター付きボトル (AGC テクノグラス、静岡) を使用して濾過する。
- ・ 濾過した上清を ProteinG の入ったカラムを通し、ProteinG に抗体を吸着させる。
- ・ 0.1 M、pH 2.7 のグリシン溶液を 2～3 ml、ProteinG が攪拌されないようにゆっくり入れる。回収用エッペンに 1 M のトリス (pH 8.0) を入れておき、回収時に中和されるようにする。
- ・ 透析膜を通し、グリシンを除去する。
- ・ 測定器で蛋白濃度を測定し、1×PBS で 1.0 mg/ml に調整する。
- ・ 抗 CD25 抗体をレシピエントマウスに投与する場合、DST 投与直前に、全身麻酔下に陰茎静脈より抗体を含む溶液を 250 μ l (=250 μ g) 静脈投与する。

4) Fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis

①細胞の回収

(ア) 脾細胞の回収

- ・ 3) ②DST と同様の操作で脾細胞を回収する。

(イ) グラフト浸潤細胞の回収

- ・ Roswell Park Memorial Institute (RPMI)1640 5 ml+50 mg/ml CollagenaseIV (Sigma-Aldrich) 100 μ l で 1 mg/ml に調整する。On ice の 100 mm 培養皿 (BD Falcon)に CollagenaseIVを取りおく。
- ・ mouse 全身麻酔下に開腹し、心臓が動いている間に下行大動脈より 10 E/ml のヘパリン生食でフラッシュし、グラフトを切除する。
- ・ on ice のままクリーンベンチへ移動し、ベンチ内でハサミを用いて心臓を細かく刻む。
- ・ 1 時間、37℃、5%CO₂ 下で静置する。
- ・ 70 μ m cell strainer と 1 ml シリンジの内筒を用いて破碎し、濾過する。
- ・ 遠心分離し (×300 g、5 分、4℃)、1×PBS で 5.0×10^6 個/ml 調整

しておく。

②蛍光抗体による細胞染色

(ア) 表面抗原および死細胞核の染色：CD 抗原、7AAD、MHC-class I および MHC-class II を染色の際には、特殊な膜透過処理は必要ない。

- ・セルストレーナー付サンプルチューブ (BD Falcon) に、200 μ l (=1.0 $\times 10^6$ 個) の細胞懸濁液を取り分け、遠心 ($\times 300$ g、5 分、4 $^{\circ}$ C)。
- ・表面抗原の染色抗体および 7-AAD を 1 μ l 添加し、Vortex で攪拌する。20 分ほど暗所で静置する。
- ・1 $\times$ PBS を 500 $\sim$ 1000 ml 添加し、遠心 ($\times 300$ g、5 分、4 $^{\circ}$ C)
- ・2%ホルマリン-PBS 溶液 200 μ l で懸濁し、固定する。

(イ) 細胞内転写因子の染色：Foxp3 染色の際には、細胞膜の透過処理を行う。

- ・4) ② (ア) の手順で表面抗原および 7-AAD を染色。
- ・1 $\times$ PBS で懸濁し、遠心 ($\times 300$ g、5 分、4 $^{\circ}$ C)
- ・Fixation/permeabilization buffer と Fix/perm-diluent (eBioscience) を 1:3 で混合した溶液を 300 μ l 入れ、懸濁して 30 分静置。
- ・Permeabilization Wash buffer (eBioscience) を Water (Sigma-Aldrich) で 10 倍希釈したものを 500 ml 加え、遠心。2 回洗浄する。
- ・Foxp3 染色抗体 (eBioscience) を 1 μ l 添加し、Vortex で攪拌する。

30 分静置。

- ・10 倍希釈の Wash buffer で洗浄。
- ・2%ホルマリン-PBS 200 μ l で懸濁し、固定する。

(ウ) 細胞内サイトカイン染色：IFN- γ 、IL-2 を染色の際には、細胞を boost したのちに細胞膜の透過処理を行い、染色する。

- ・3) ②DST と同様の操作で脾細胞を回収する。
- ・培養液 (perfect medium) を作成する。FCS を、56 $^{\circ}$ C の恒温槽に 30 分漬け置き、非動化する。RPMI1640 (Sigma-Aldrich) 450 ml に非動化した FCS 50 ml およびペニシリン+ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) 5 ml を添加し、10%FCS-RPMI1640 を作成。10% FCS-RPMI1640 50 ml に 0.5M-2 mercaptoethanol (2ME) を 5 μ l 添加し、perfect medium とした。

- ・回収した脾細胞を perfect medium で懸濁し、 5.0×10^6 /ml に調整する。
- ・96well round-bottom plate (BD Falcon)に細胞液を 100 μ l/well (=0.5 $\times 10^6$ 個)を播種し、100 μ l の perfect medium を追加して全量を 200 μ l とする。
- ・boost のための薬剤を調整する。Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)(Sigma-Ardrich)の原末 1 mg を dimethyl sulfoxide (DMSO) 10 ml に溶解して 0.1 mg/ml とし、perfect medium 249 μ l + 0.1 mg/ml の PMA 1 μ l を混合する。PMA の最終濃度が 40 ng/ml となるように、この溶液を 20 μ l/well で添加する。また、Ionomycin (Sigma-Ardrich)原液 750 μ g/ml 6 μ l + perfect medium 219 μ l を混合し、Ionomycin の最終濃度が 1.0 μ g/ml となるように、10 μ l/well で添加する。
- ・PMA および Ionomycin 添加後、37°C、5%CO₂ 下で 4 時間培養する。
- ・サイトカイン染色のため、monensin (Sigma-Ardrich)を用いて Golgi stop を掛ける。monensin 原液 3.6 μ l + perfect medium 447.4 μ l を混合し、最終濃度が 2 μ g/ml となるように 20 μ l/well で添加する。
- ・monensin 添加後、37°C、5%CO₂ 下で 2 時間培養する。
- ・細胞を回収し、1 $\times$ PBS で希釈して遠心 ($\times 300$ g、5 分、4°C)。
- ・4) ② (ア) の手順で表面抗原および死細胞核を染色する。
- ・1 $\times$ PBS 500 ml 程度で希釈し、遠心 ($\times 300$ g、5 分、4°C)。
- ・細胞膜透過処理を行う。Cytofix/cytoperm (BD pharmingen)を 200 μ l 添加し Vortex で攪拌する。冷暗所 (4°C) で 20 分静置する。
- ・Perm Wash Buffer を 500 μ l 添加し、遠心 ($\times 300$ g、5 分、4°C)。
- ・蛍光抗体を 1 μ l 添加し、Vortex で攪拌する。30 分静置する。
- ・Perm Wash Buffer を 500 μ l 添加し、遠心 ($\times 300$ g、5 分、4°C)。
- ・2%ホルマリン-PBS 200 μ l で懸濁し、固定する。

(エ) 抗原による再刺激：生体内にドナーもしくは 3rd-party の脾細胞を静脈投与することで、in vivo での抗原刺激を加え、FACS での phenotype の変化を観察する。Kingsley らは、レシピエント予定のマウスに、グラフトの代わりに抗原として血液を投与することで、レシピエントが抗原刺激を受けた際の反応を知ることができることを報告した¹²⁷。

- ・DST と同様の要領で、無治療もしくは治療を施したレシピエントマ

ウスに、day 0 でドナーもしくは 3rd-party の脾細胞 20×10^6 個を陰茎静脈より投与する。

- ・ 24 時間後、レシピエントマウスを犠牲死させ、脾臓を回収する。
- ・ 4) ② (ア) (イ) (ウ) の要領で表面抗原、死細胞核、転写因子やサイトカインの染色を行う。

(オ) 解析 : FACS-Canto II (BD bioscience)により、解析を行った。あらかじめ compensation を取った template を用いて解析する。データ解析は FlowJo ver.7.6.5 (Tree Star, Ashland, OR, USA)を用いて行った。

5) Mixed lymphocyte reaction (MLR)

①³H-Thymidine による細胞分裂の検出 : 細胞分裂を ³H-Thymidine の uptake により定量化する。

Responder : C57BL6 (H2^b)

Stimulator : BALB/c (H2^d)

- ・ 3) ②DST と同様の要領で Responder、Stimulator の脾細胞を回収する。
- ・ 4) ② (ウ) に記載の perfect medium を作成し、Responder、Stimulator とともに 5.0×10^6 個/ml に調整する。
- ・ Stimulator が分裂しないよう、放射線照射を行う。30 Gy を照射する。
- ・ 96 well round-bottom plate に Responder、Stimulator とともに 100 μ l/well ($=0.5 \times 10^6$ 個/well) ずつ播種する。
- ・ 37°C、5%CO₂ 下で 2~4 日間培養する。
- ・ 回収の 8 時間前に ³H-thymidine (ParkinElmer, Waltham, MA, USA) で pulse する。³H-thymidine 1 μ l ($=1 \mu$ Ci) /well で添加する。
- ・ Harvesnter で回収し、MicroBeta (ParkinElmer)を用いて β 線をカウントする。
- ・ 3 well の平均を n=1 とし、平均±標準誤差で評価した。

②5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)を用いた細胞分裂の検出 : 分裂前に細胞質に取り込まれた CFSE が分裂により希釈

され、蛍光度が低下することを利用して、細胞分裂を検出する。

Responder : C57BL6 (H2^b)

Stimulator : BALB/c (H2^d)もしくは C3H (H2^k)

- ・②DST と同様の要領で Responder、Stimulator の脾細胞を回収する。
- ・ CFSE を調整する。CFSE (eBioscience)を DMSO 90 μ l で溶解して 10 mM とし、RPMI1640 で調整して最終濃度 1～5 μ M に調整する。Lot により蛍光強度が異なるため、調整後に FACS-Canto II で確認し、至適濃度で実験を行う。
- ・ 至適濃度の CFSE 溶液で Responder を懸濁し、37℃、5%CO₂ 下で 10 分間培養する。
- ・ よく冷えた非働化 FCS を加え、遠心 (×300 g、5 分、4℃)。
- ・ perfect medium で 5.0×10^6 個/ml に調整する。
- ・ Stimulator は 5) ①と同様に 5.0×10^6 個/ml に調整後、30 Gy の放射線照射を行う。
- ・ 96 well round-bottom plate に Responder、Stimulator とも 100 μ l (=0.5×10⁶ 個) ずつ播種する。
- ・ 37℃、5%CO₂ 下で 3 日間培養する。
- ・ 回収し、4)の要領で表面抗原、死細胞核染色、転写因子の染色を行う。BALB/c の細胞は BALB/c の MHC-class I (H-2K^d)を染色し、gate-out することで解析から除外した。

6) Enzyme-Linked Immuno Spot (ELISPOT)

Responder : C57BL6 (H2^b)

Stimulator : BALB/c (H2^d)もしくは C3H (H2^k)

- ・ ELISPOT のプレートを準備する。96 well ELISPOT MultiScreen (Millipore, Billerica, MA, USA) に Capture Antibody (BD Bioscience)2 μ l+1×PBS 400 μ l を混合し、100 μ l/well で分注する。冷暗所で 24 時間静置する。
- ・ 5) ①の要領で、Responder、Stimulator を調整する。
- ・ ELISPOT プレートの抗体溶液を破棄し、Responder、Stimulator を 100 μ l (=0.5×10⁶ 個) ずつ播種する。
- ・ 37℃、5%CO₂ で 24 時間培養する。
- ・ 培養液を破棄し、Water (Sigma-Ardrich)で 2 回洗浄、ELISPOT 用

Wash buffer (1×PBS+0.05%Tween20)で 3 回洗浄。

- Detection antibody 2 μ l + Dilution Buffer (10%FBS+1×PBS)500 μ l を混合し、100 μ l/well で分注し、2 時間室温で静置する。
- 抗体溶液を破棄し、Wash buffer で 4 回洗浄。
- Steptavidin-HRP (BD Bioscience)4 μ l + Dilution buffer 400 μ l を混合し、100 μ l/well で分注する。1 時間室温で静置する。
- 抗体溶液を破棄し、Wash buffer で 4 回洗浄し、1×PBS で 2 回洗浄する。
- AEC substrate (BD Bioscience)1 ml + AEC chromogen (BD Bioscience) 1 滴を混合し、100 μ l/well で分注。10 分間反応させ、Water で反応を止めて溶液を破棄。
- Water で 2 回洗浄後、乾燥させて、KS ELISPOT reader (Carl Zeiss, Germany)で spot をカウントする。
- 2 well の平均を $n=1$ とし、平均値 $\pm$ 標準誤差で評価した。

7) 統計学的解析

- 測定結果は、平均値 $\pm$ 標準誤差（或いは、標準偏差）で標記した。
- グラフト生着曲線は、Kaplan-Meier 法を用いて記載した。
- グラフト生着期間は、log-rank test を用いて比較検討した。
- 独立した 2 群間の比較検討には Student's t -test を使用した。
- 独立した多群間の比較検定には分散分析（Tukey 法）を使用した。
- p value < 0.05 の場合を統計学的に有意差ありと判定した。
- 全ての統計学的処理は、StatMateIV for Windows（ATMS、東京）を用いて計算した。

実験結果

① NK026680 と DST の併用は、マウスにおいてドナー特異的にアロ移植心の生着を著明に延長した。

【目的】NK026680 と DST の併用が免疫抑制効果を持つかどうかを調べるため、われわれはまず、NK026680 と DST の併用治療を施した C57BL/6 (H2^b) マウスに BALB/c (H2^d) マウスの心臓を腹腔内に移植し、生着期間が延長するかを調べた。また、NK026680 と DST の併用治療の効果にドナー特異性があるかどうかを検討するため、NK026680 とドナー系統(H2^d)の脾細胞を用いた DST を行ったレシピエントマウス (H2^b) に対して、3rd-party である C3H (H2^k) の心臓を移植した。NK026680 と、3rd-party である C3H (H2^k) の脾細胞を用いた DST を併用したレシピエント (H2^b) に、ドナー系統 (H2^d) の心臓を移植した。

【結果】

(ア) NK026680 と DST を併用治療により、グラフト生着期間は著明に延長した。

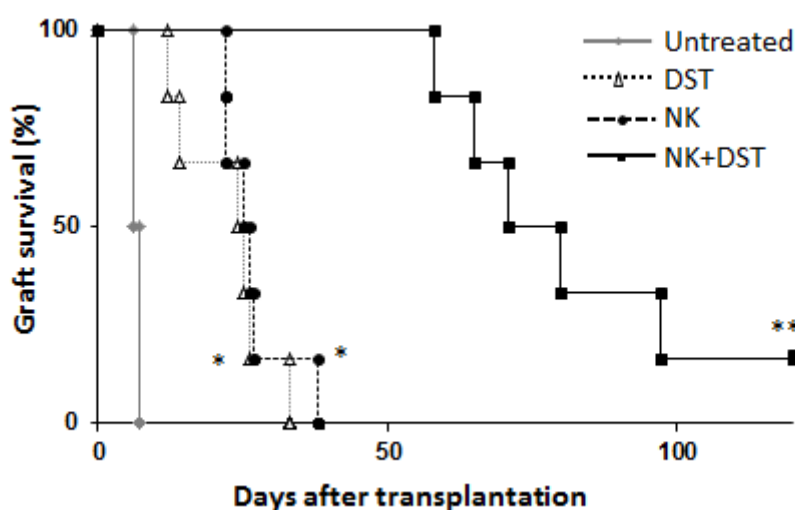


Figure 2

治療を施さない C57BL/6 マウスは、全例 7 日以内に BALB/c マウスの心臓グラフトを拒絶した (n=6)。DST 単独、もしくは NK026680 単剤治療を行

った場合のアロ移植心の生着期間の中央値はそれぞれ 24.5 日、25.5 日であり、無治療に比べてアロ移植心の生着期間を有意に延長した ($n=6$, * $p<0.05$: vs. control)。また、NK026680 と DST を併用した場合、アロ移植心の生着期間の中央値は 75.5 日であり、無治療群、DST 単独群、NK026680 単剤治療群と比較して著明な生着期間の延長を認めた ($n=6$, ** $p<0.01$: vs. control, DST, NK)。

(イ) NK026680 とドナー系統の DST を施行したレシピエントマウスに 3rd-party の心グラフトを移植すると、ドナー系統の心グラフトよりもグラフト生着期間は有意に短かった。

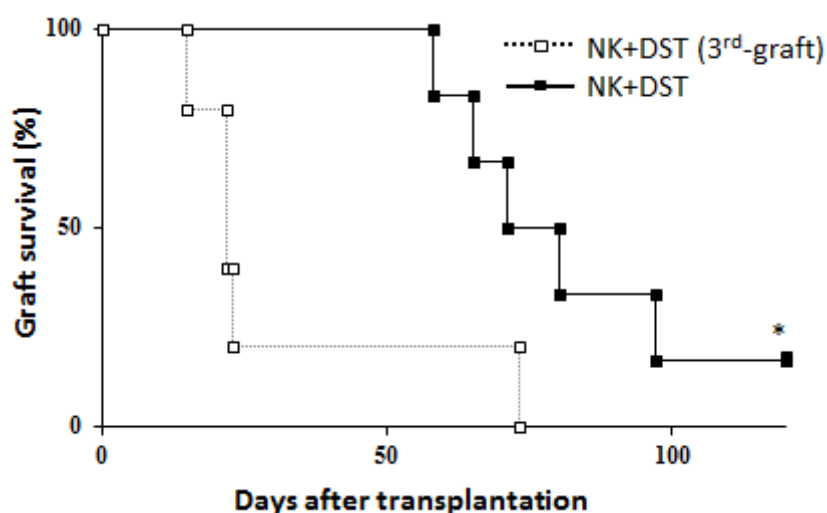


Figure 3

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を施行したレシピエントマウス (H2^b) に 3rd-party (H2^k) の心臓を移植したときのグラフト生着期間の中央値は 22.0 日であり、NK026680 とドナー系統の DST を施行してドナー系統の心グラフトを移植した場合のグラフト生着期間と比較して有意に短かった ($n=6$, * $p<0.05$: vs. NK+DST)

(ウ) NK026680 と 3rd-party (H2^k) の DST を施行したレシピエントマウス (H2^b) にドナー系統 (H2^d) のグラフトを移植すると、ドナー系統の DST を施行した場合よりグラフト生着期間は有意に短い。

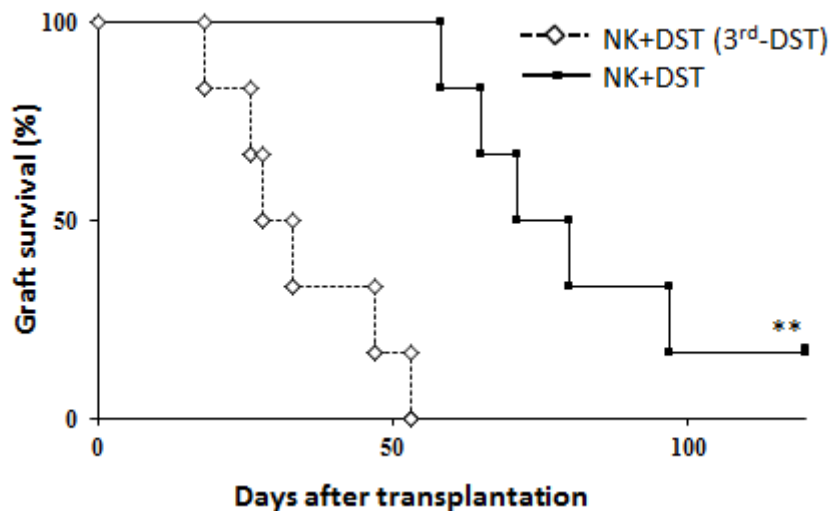


Figure 4

NK026680 と 3rd-party (H2^k) の DST を施行したレシピエントマウス (H2^b) にドナー系統 (H2^d) の心臓を移植したときのグラフト生着期間の中央値は 30.5 日であり、NK026680 とドナー系統の DST を施行してドナー系統の心臓グラフトを移植した場合のグラフト生着期間と比較して有意に短かった (n=6, ** p<0.01 vs. NK+DST)

② NK026680 と DST の併用療法により、MLR は亢進し、ドナー抗原で刺激した際の IL-2、IFN- γ の産生は亢進する。

【目的】NK026680 と DST の併用療法は、ドナー抗原に対する免疫抑制環境をレシピエント内部に作り上げる可能性があると考えられた。そこで、NK026680 と DST で治療したレシピエントマウスのドナーに対する免疫応答を検討するため、移植直前のレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を回収し、ドナー (H2^d) の脾細胞との反応性を *in vitro* で検討した。

【結果】

(ア) NK026680 と DST を併用すると、ドナー抗原に対する脾細胞の分裂は亢進する。

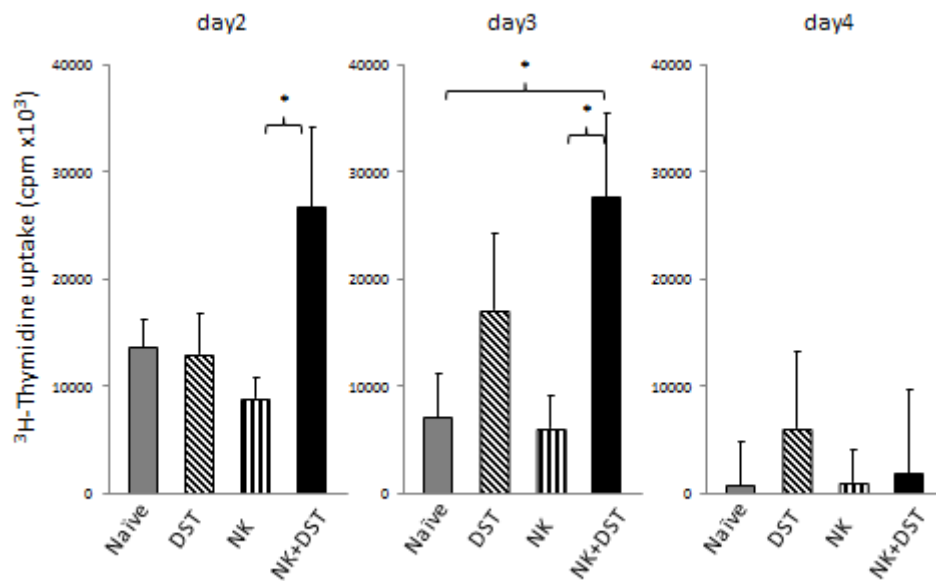


Figure 5

各群の day 0 のレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を回収し、放射線照射したドナー系統 (H2^d) の脾細胞と混合培養した (MLR)。培養から 2 日目、3 日目、4 日目に回収して ³H-Thymidine の取り込みを測定した。2 日目では NK 群と比べ、3 日目では無治療群、NK 群と比べ、NK+DST 群で有意に ³H-Thymidine の取り込みが亢進した (n=3, * p<0.05)。4 日目に回収した場合、いずれの群でも ³H-Thymidine の取り込みは低下しており、burn-out したものと考えられた。

(イ) NK026680 と DST を併用すると、ドナー抗原に対する IL-2 および IFN- γ の産生が亢進する。

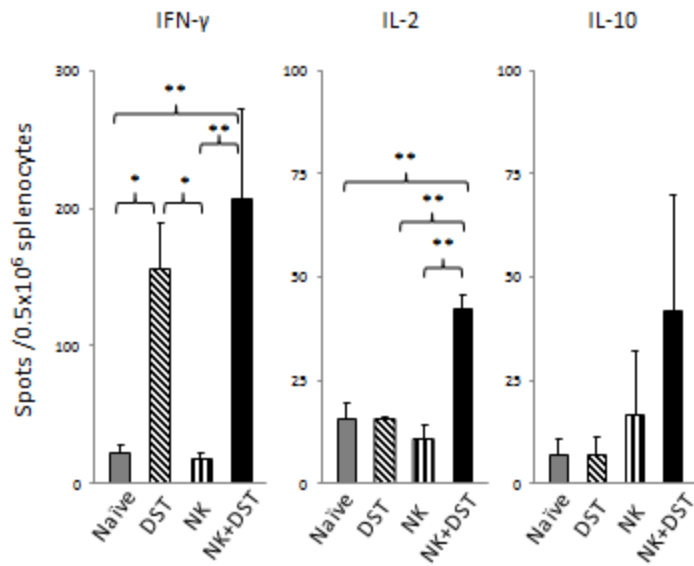


Figure 6

各群の day 0 のレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞と、放射線照射したドナーマウス (H2^d) の脾細胞を混合して 24 時間培養し、各サイトカイン産生を調べた。IFN- γ 産生細胞は naïve マウス、NK 群に比べ、DST 群、NK+DST 群で有意に増加した (n=3, * p<0.05, ** p<0.01)。また、IL-2 産生細胞は、naïve マウス、DST 群、NK 群に比べ、NK+DST 群で有意に増加した。IL-10 産生細胞については、各群で有意差を認めなかった。

(ウ) NK026680 と DST の併用治療により増加する IFN- γ および IL-2 産生細胞は、ドナー抗原に特異的である。

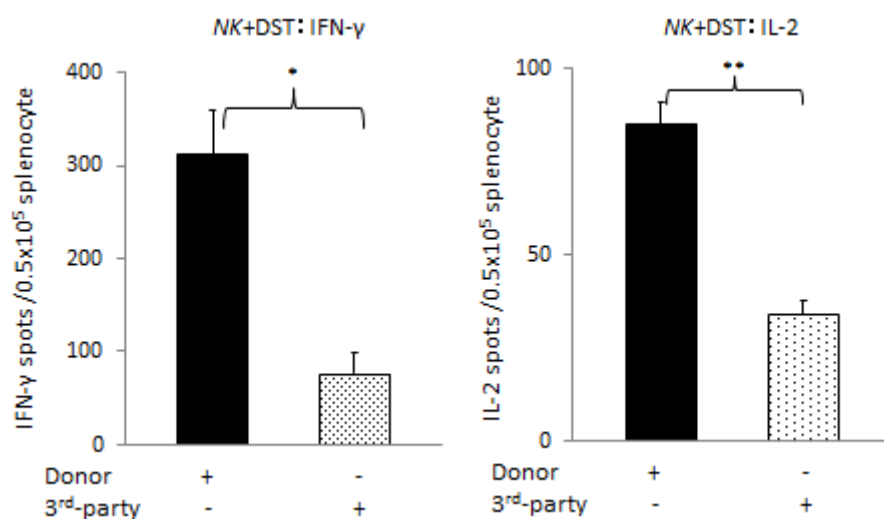


Figure 7

NK026860 と DST を併用したレシピエントマウス (H2^b) より day 0 に採取した脾細胞を、ドナー系統 (H2^d)、3rd-party (H2^k) の脾細胞と混合培養してサイトカイン産生細胞を調べた。3rd-party に対する IFN- γ 、IL-2 産生細胞は、ドナー抗原に対する IFN- γ 、IL-2 産生細胞よりも有意に少なかった。

③ NK026680 と DST の併用治療により、レシピエントの脾臓内でドナー抗原刺激により制御性 T 細胞が増加する。

【目的】

NK026680 と DST の併用治療が制御性 T 細胞に与える影響を調べる目的で、移植前の脾細胞中の CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞について検討した。

【結果】

(ア) NK026680 と DST の併用治療により、ドナー抗原による刺激を加えることで、脾細胞中の制御性 T 細胞の割合が増加する。

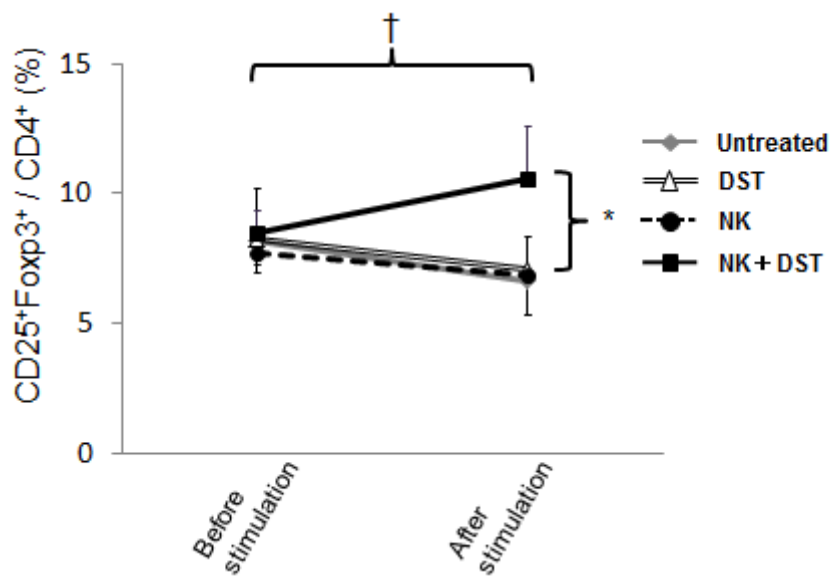


Figure 8

各群のレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を day 0 に採取し、FACS で CD4⁺ T 細胞中の CD25⁺ Foxp3⁺ 細胞の割合を検討したところ、各群の脾細胞中の CD25⁺ Foxp3⁺ 細胞の割合に有意差を認めなかった。そこで、ドナー抗原としてドナー系統の脾細胞 20×10^6 個を day 0 に静脈注射することでレシピエントマウスに抗原刺激を加えたところ、NK+DST 群でのみ CD25⁺ Foxp3⁺ 細胞の割合が有意に増加した (n=3、* p<0.05 vs all other groups、† p<0.05 vs NK+DST before antigen stimulation)。

(イ) 抗原刺激による制御性 T 細胞の増加はドナー特異的である。

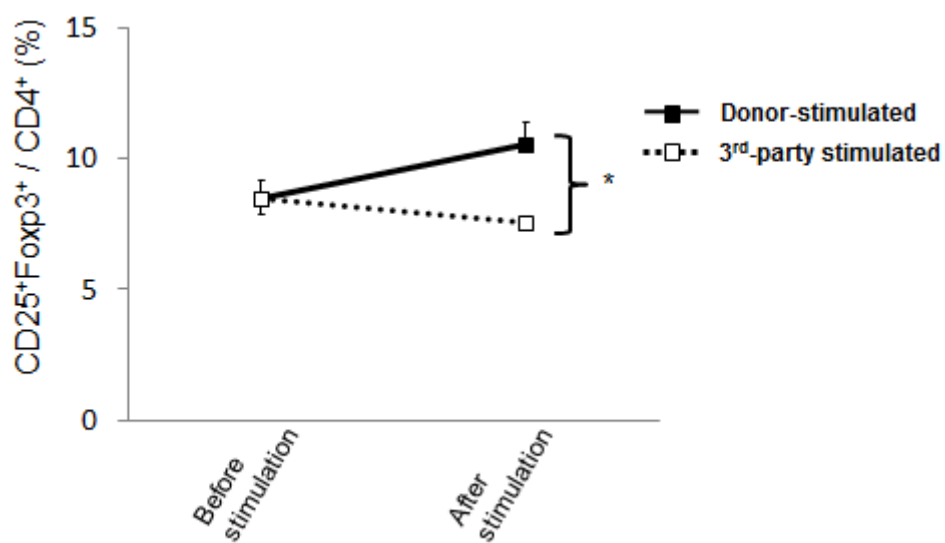


Figure 9

NK026680 と DST を併用した day 0 のレシピエントマウス (H2^b) に、抗原刺激としてドナー系統 (H2^d) もしくは 3rd-party (H2^k) の 20×10^6 個の脾細胞を静脈注射し、翌日レシピエントの脾細胞を回収して CD4⁺ T 細胞中の CD25⁺ Foxp3⁺ 細胞の割合を調べた。3rd-party 抗原で刺激した場合、脾細胞中の CD25⁺ Foxp3⁺ 細胞の割合の増加を認めず、ドナー抗原で刺激した場合に比べて有意に低かった (n=3, * p<0.05)。

(ウ) NK026680 と DST の併用治療により誘導された CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞は、in vitro でドナー抗原刺激により増殖する。

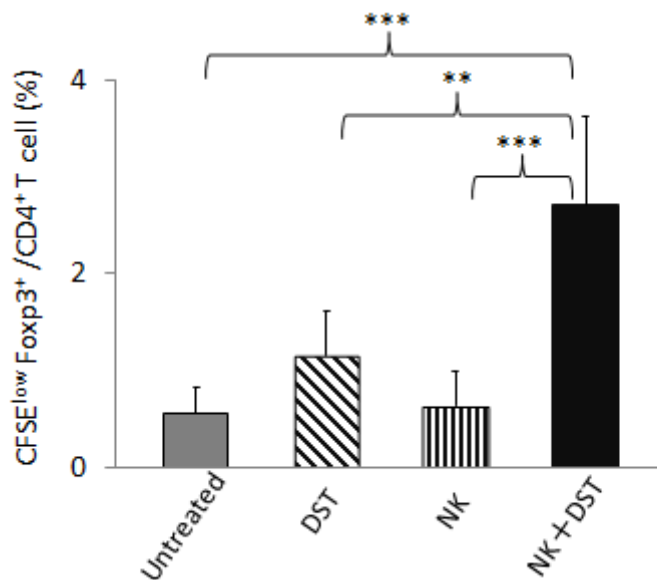


Figure 10

各群の day 0 の脾細胞を回収し、CFSE で染色してドナー系統の脾細胞と 3 日間混合培養し、CD4⁺ T 細胞中の分裂した (CFSE の染色強度の低下した) Foxp3⁺ 細胞の割合を検討した。混合培養に使用したドナーの細胞は、ドナー系統の MHC-class I を染色し、除外した。NK+DST 群の CD4⁺ T 細胞中、分裂した Foxp3⁺ 細胞の割合は他 3 群に比べて有意に多かった (n=4, ** p<0.01, *** p<0.001)。

(エ) NK026680 と DST の併用により誘導された CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞の抗原刺激に対する増殖は、ドナー特異的である。

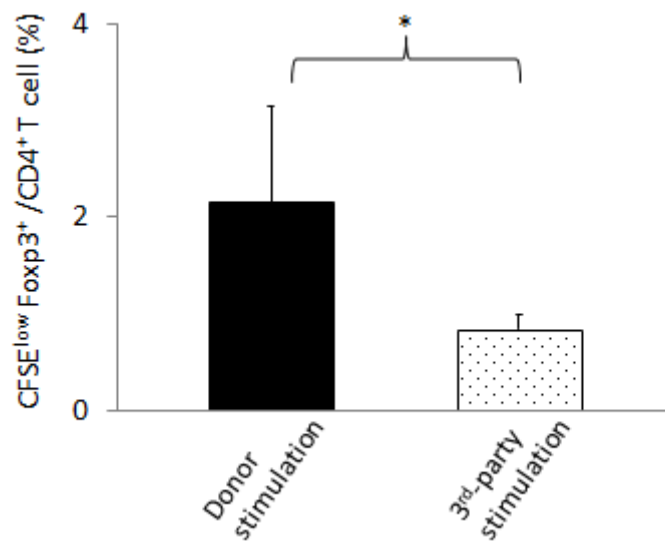


Figure 11

NK026680 と DST を併用した day 0 のレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を回収し、CFSE で染色してドナー系統 (H2^d) もしくは 3rd-party (H2^k) の脾細胞と 3 日間混合培養して、CD4⁺ T 細胞中の分裂した Foxp3⁺ 細胞の割合を検討した。ドナー系統もしくは 3rd-party の脾細胞は、それぞれの MHC-class I を染色することで除外した。CD4⁺ T 細胞中の分裂した Foxp3⁺ 細胞の割合は、ドナー抗原で刺激した時の方が 3rd-party 抗原で刺激した時よりも有意に多かった (n=4, * p<0.05)。

④NK026680 と DST を併用することで、抗原刺激に対する CD8⁺ T 細胞の増殖は抑制される。

【目的】

NK026680 と DST の併用治療により抗原刺激に対する CD4⁺、CD8⁺ T 細胞の細胞増殖がどのように変化するかを調べる目的で、CD4⁺ T 細胞と CD8⁺ T 細胞の抗原刺激に対する増殖を in vitro で検証した。

【結果】

(ア) NK026680 と DST の併用により、DST によって惹起されるドナー抗原刺激に対する CD8⁺ T 細胞の細胞増殖が抑制される。

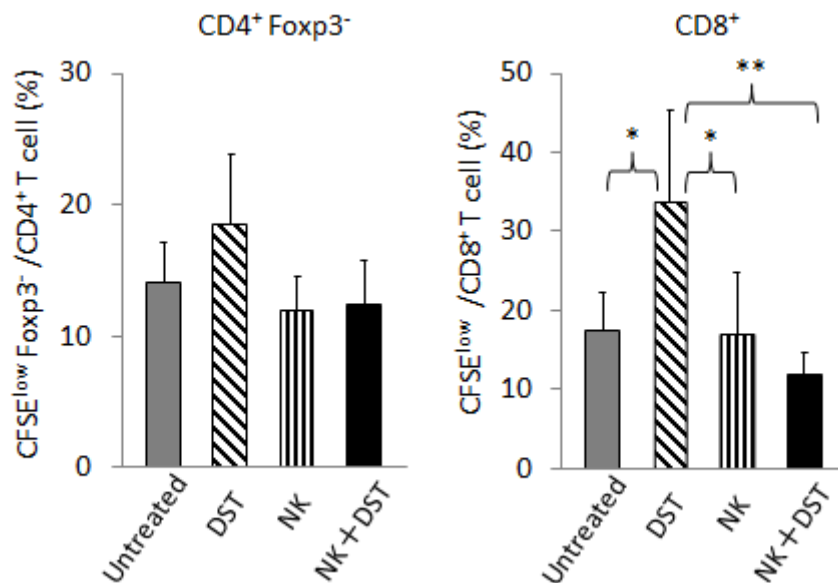


Figure 12

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用した day0 のレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を回収し、CFSE で染色してドナー系統の脾細胞と混合培養し、CFSE の希釈された細胞の割合を検討した。CD4⁺ T 細胞中の Foxp3⁻ CFSE^{low} の細胞の割合は各群で有意差を認めなかった。一方、CD8⁺ T 細胞中の CFSE^{low} の割合は、DST 群で他群に比べて有意に増加した (n=3、* p<0.05、** p<0.01)。

(イ) NK026680 と DST の併用により、抗原刺激によって増殖する T 細胞は CD8 優位から CD4 優位となる。

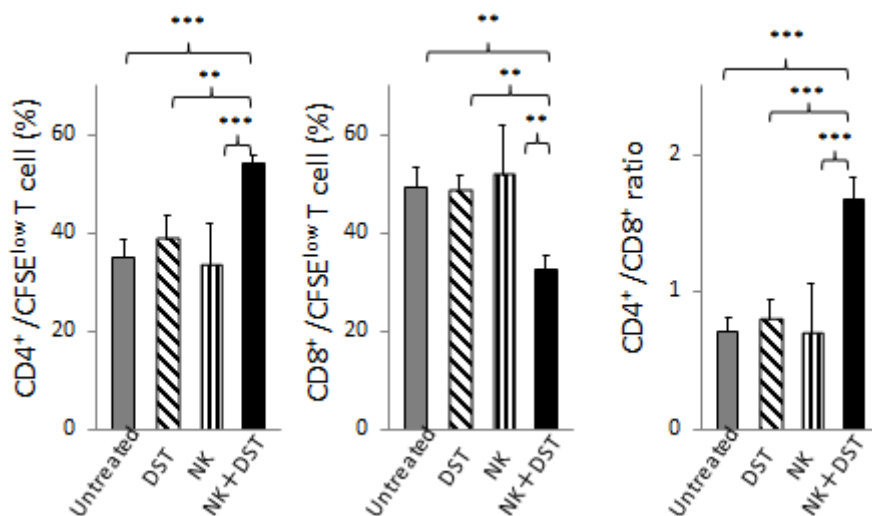


Figure 13

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用した day 0 のレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を回収し、CFSE で染色してドナー系統の脾細胞と混合培養し、CFSE の希釈された T 細胞内の CD4⁺ および CD8⁺ 細胞の割合を検討した。NK+DST 群で、CFSE^{low} T 細胞中の CD4⁺ 細胞の割合が有意に高く、CD8⁺ 細胞の割合は有意に低かった。CD4⁺/CD8⁺ 比は NK+DST 群で他群の約 2 倍と、有意に高かった (n=3、* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001)。

(ウ) NK026680 と DST の併用により見られる抗原刺激に対する CD4⁺/CD8⁺比の増加は、ドナー抗原特異的である。

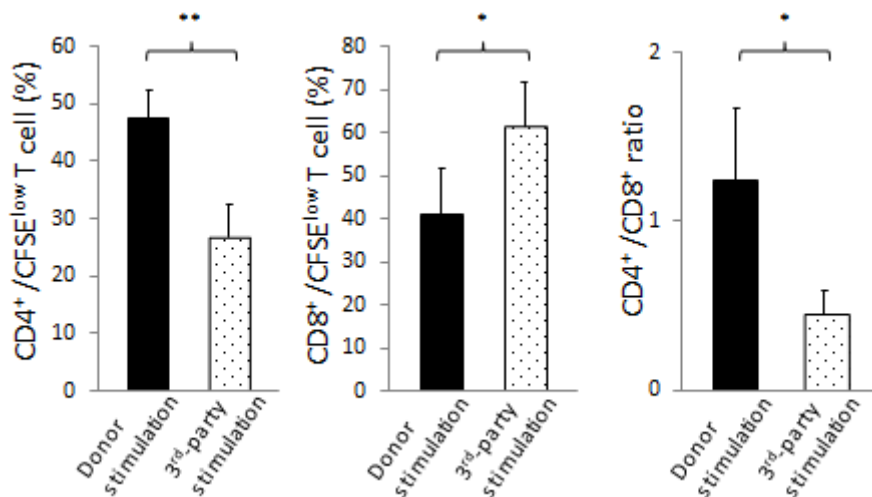


Figure 14

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用した day 0 のレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を回収し、CFSE で染色してドナー系統もしくは 3rd-party の脾細胞と混合培養し、CFSE の希釈された T 細胞内の CD4⁺ および CD8⁺ 細胞の割合を検討した。ドナー系統の脾細胞で刺激した場合の CFSE^{low} T 細胞中の CD4⁺ 細胞の割合は、3rd-party の脾細胞で刺激した場合に比べて有意に高く、CD8⁺ 細胞の割合は有意に低かった。ドナー系統の脾細胞で刺激した場合の CD4⁺/CD8⁺ 比は 3rd-party の場合に比べて約 2 倍で、有意に高かった (n=3、* p<0.05、** p<0.01)。

⑤NK026680 と DST の併用治療は、抗原刺激に対する effector T 細胞の早期活性化を抑制する。

【目的】

NK026680 と DST の併用により、T 細胞の早期の活性化が抑えられるかを調べる目的で、CD4⁺ Foxp3⁻ および CD8⁺ T 細胞の早期活性化マーカーである CD69 について検討した。

【結果】

(ア) NK026680 と DST の併用により、ドナー抗原刺激に暴露された際の CD4⁺ Foxp3⁻ T 細胞の活性化は抑制される。

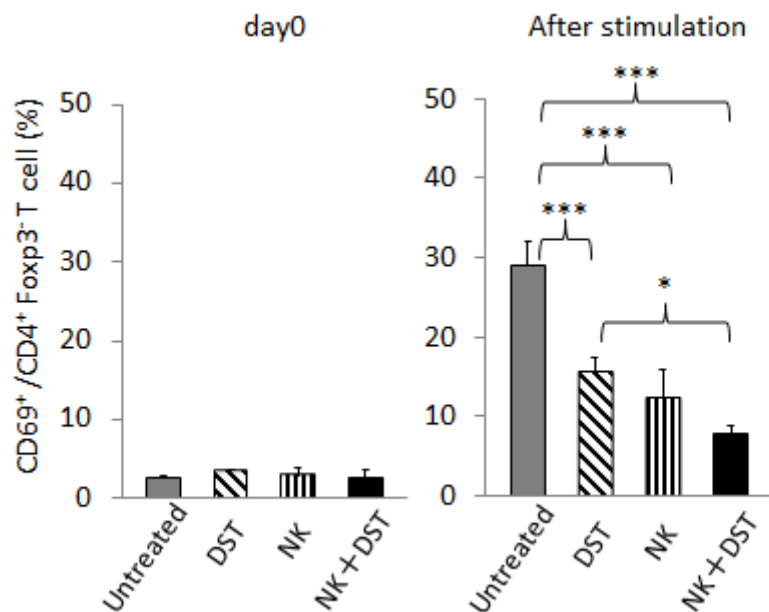


Figure 15

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用した day 0 のレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を回収し、CD4⁺ T 細胞中の CD69 の発現を調べたところ、各群で CD69 の発現に変わりはない。次に、day 0 にドナー系統の脾細胞を再投与してドナー抗原刺激し、24 時間後にレシピエントマウスの脾細胞を回収して CD69 の発現を調べたところ、無治療群では CD4⁺ T 細胞中の CD69 の発現が著明に亢進したのに対し、各治療群で有意に抑制

された。DST 群に比べ、NK+DST 群で、CD69 の発現は有意に抑制された (n=3、* p<0.05、*** p<0.001)。

(イ) NK026680 と DST の併用により、ドナー抗原刺激に暴露された際の CD8⁺ T 細胞の活性化は抑制される。

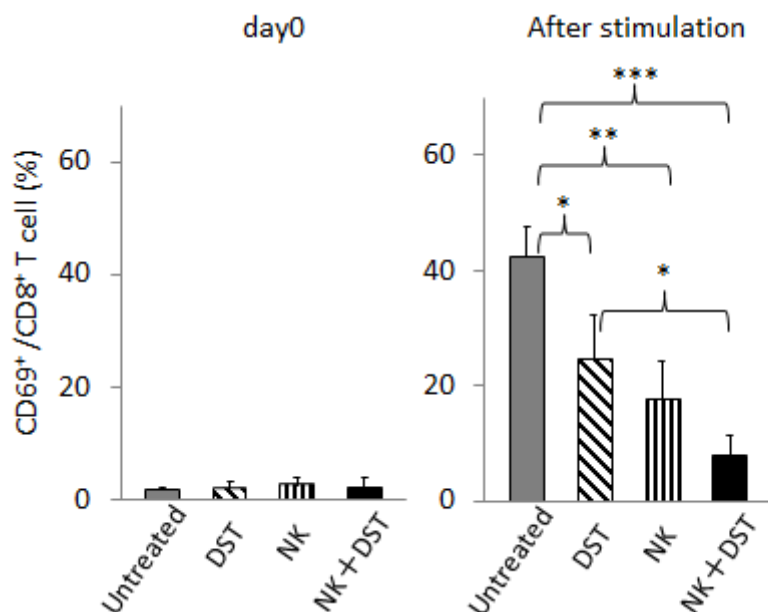


Figure 16

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用した day 0 のレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を回収し、CD8⁺ T 細胞中の CD69 の発現を調べたところ、各群で CD69 の発現に変わりはない。次に、day 0 にドナー系統の脾細胞を再投与してドナー抗原刺激し、24 時間後にレシピエントマウスの脾細胞を回収して CD69 の発現を調べたところ、無治療群では CD8⁺ T 細胞中の CD69 の発現が著明に亢進したのに対し、各治療群で有意に抑制された。DST 群に比べ、NK+DST 群で、CD69 の発現は有意に抑制された (n=3、* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001)。

⑥NK026680 と DST の併用治療は、CD4⁺ T 細胞の CD44 の発現を促進させ、CD8⁺ T 細胞の CD44 の発現と CD62L 陰転化を抑制する。

【目的】

T 細胞への抗原暴露は、抗原に対する反応性クローンを増加させる可能性が

考えられる。組織遊走に関与する CD44、リンパ節へのホーミングに関与する L-セレクトリン (CD62L) は、T 細胞の組織もしくはリンパ節への迅速な誘導を可能にすることから、メモリーもしくは活性化のマーカーとして知られる。NK026680 と DST の併用治療により、これらのマーカーの発現がどのように変化するかを検討した。

【結果】

(ア) NK026680 と DST の併用治療により、CD4⁺ T 細胞の CD44 の発現が亢進し、CD8⁺ T 細胞の CD44 発現が抑制される。

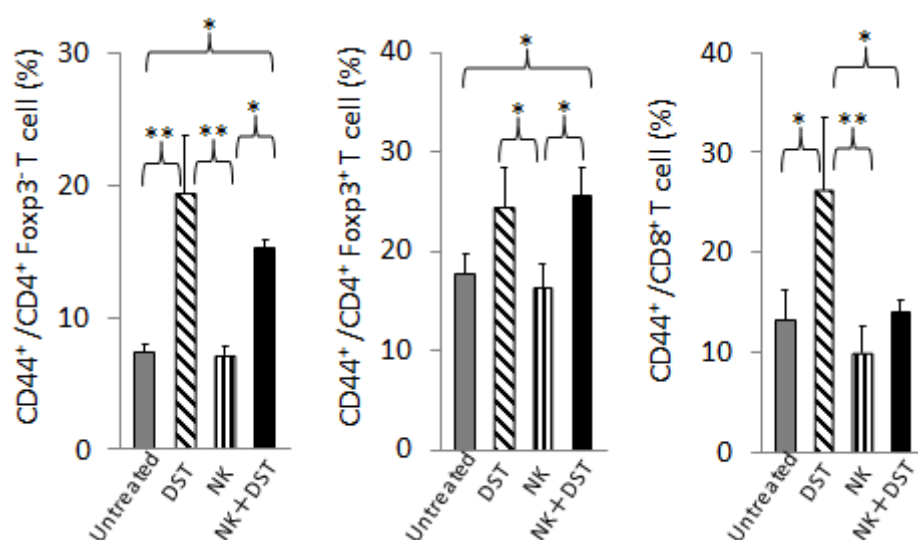


Figure 17

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用した day 0 のレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を回収し、CD4⁺Foxp3⁻ T 細胞、CD4⁺Foxp3⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞中の CD44 の発現を FACS で検討した。CD4⁺Foxp3⁻ T 細胞、CD4⁺Foxp3⁺ T 細胞のいずれの CD4⁺ T 細胞でも、無治療群、NK 群と比べて NK+DST 群で有意に増加した (n=3, * p<0.05)。CD8⁺ T 細胞では DST 群で見られる CD44 の発現亢進 (n=3, * p<0.05, ** p<0.01) が、NK+DST 群では見られなかった (n=3, * p<0.05)

(イ) NK026680 と DST の併用治療により、DST によって起きる CD8⁺ T 細胞上の CD62L 陰転化が抑制される。

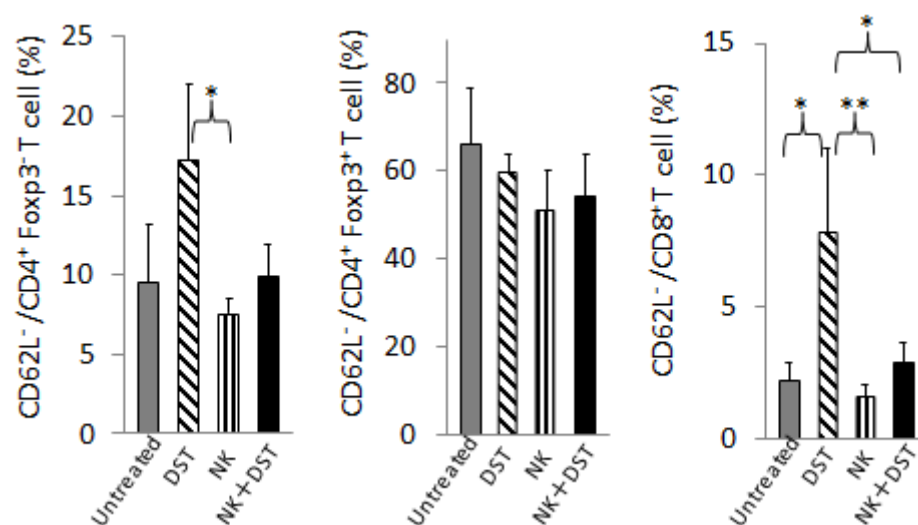


Figure 18

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用した day 0 のレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を回収し、CD4⁺ Foxp3⁻ T 細胞、CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞中の CD62L の発現を FACS で検討した。CD4⁺ Foxp3⁻ T 細胞、CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞のいずれの CD4⁺ T 細胞でも、CD62L の発現に関して NK+DST 群と他の群で有意な差を認めなかった。CD8⁺ T 細胞では DST 群で見られる CD62L 発現の陰転化 (n=3, * p<0.05、** p<0.01) が、NK+DST 群では見られなかった (n=3, * p<0.05)

⑥NK026680 と DST の併用治療は、CD4⁺ T 細胞からの IFN- γ 産生を促進し、CD8⁺ T 細胞からの IFN- γ 産生を抑制する。

【目的】

NK026680 と DST の併用治療により、CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞からのサイトカイン産生がどのように変化するかを検討した。

【結果】

(ア) NK026680 と DST の併用治療により、CD4⁺ T 細胞からの IFN- γ 産生が亢進し、DST によって起きる CD8⁺ T 細胞からの IFN- γ 産生亢進を抑制する。

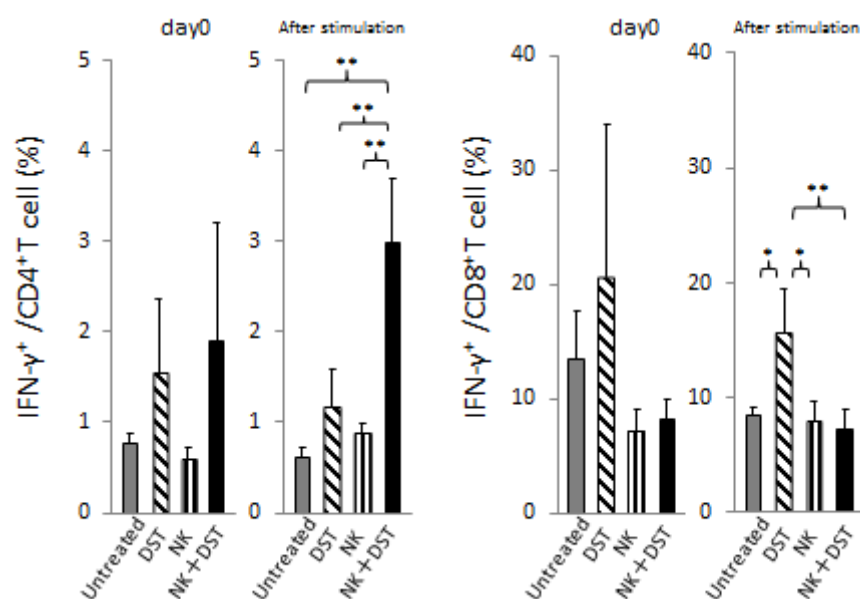


Figure 19

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用した day 0 のレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を回収し、CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞中の IFN-γ 産生細胞の割合を FACS で検討した。細胞染色前に、PMA/Ionomycin で刺激を加え、透過処理後に染色した。各群における day 0 での CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞の IFN-γ 産生細胞の割合に有意差を認めなかった。そこで、day 0 に donor 系統の脾細胞を静脈投与し、24 時間後に脾細胞を回収して同様に染色したところ、CD4⁺ T 細胞における IFN-γ 産生細胞の割合が他群に比べて有意に増加した (n=3, ** p<0.01)。また、CD8⁺ T 細胞の IFN-γ 産生細胞の割合は、DST 群で他群に比べて有意に高かった (n=3, * p<0.05, ** p<0.01)。

(イ) NK026680 と DST の併用治療は各 T 細胞の IL-2 産生細胞の割合に影響を与えない。

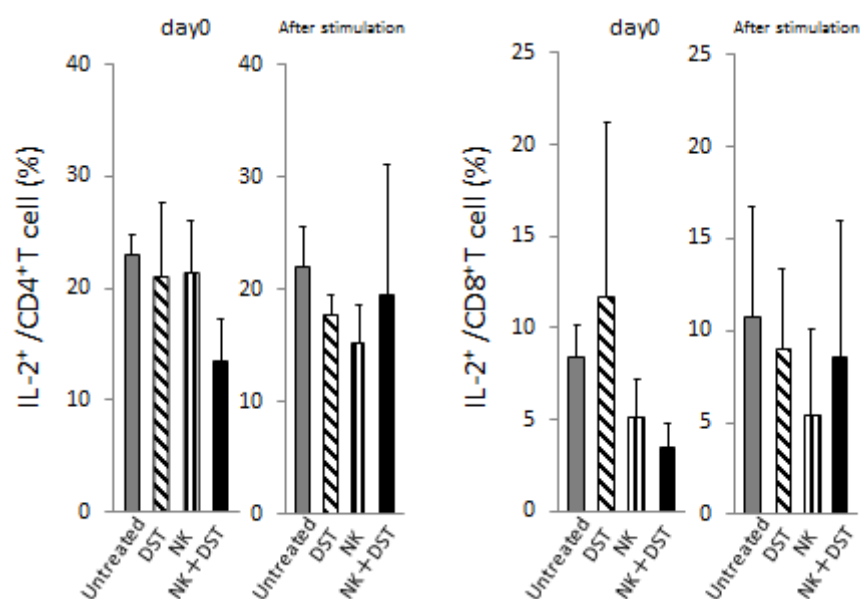


Figure 20

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用した day 0 のレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を回収し、CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞中の IL-2 産生細胞の割合を FACS で検討した。細胞染色前に、PMA/Ionomycin で刺激を加え、透過処理後に染色した。各群における day 0 での CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞の IL-2 産生細胞の割合に有意差を認めなかった。そこで、day 0 に donor 系統の脾細胞を静脈投与し、24 時間後に脾細胞を回収して同様に染色したが、各群における CD4⁺ T 細胞および CD8⁺ T 細胞の IL-2 産生細胞の割合に有意差を認めなかった(n=3)。

⑦NK026680 と DST の併用治療は、脾細胞中およびグラフト内の制御性 T 細胞を増加させる。

【目的】NK026680 と DST の併用治療により、移植後の脾細胞およびグラフト内の Treg について検討した。

【結果】

(ア) NK026680 と DST の併用治療は、術後 14 日目の脾細胞中の制御性 T 細胞の割合を増加させる。

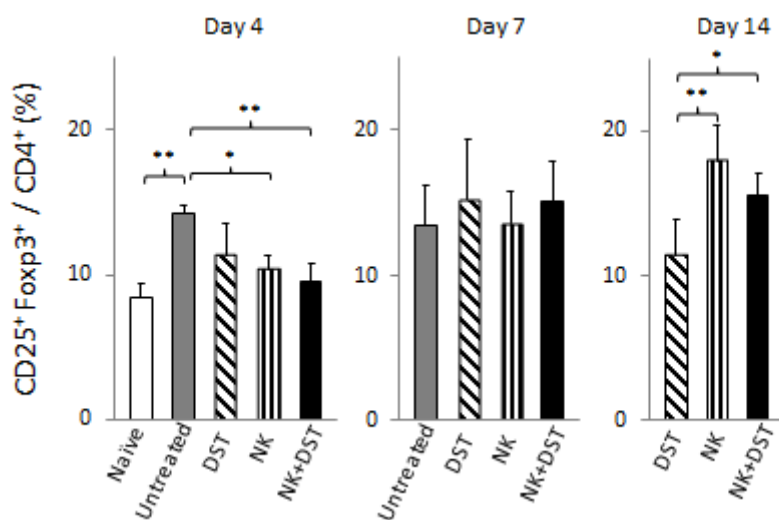


Figure 21

NK026680 とドナー系統（H2^d）の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス（H2^b）の脾細胞を day 4、day 7、day 14 に回収して CD4⁺ T 細胞中の CD25⁺ Foxp3⁺ 細胞の割合を解析した。day 4 ではむしろ無治療群で naïve、NK 群、NK+DST 群で CD4⁺ T 細胞中の CD25⁺ Foxp3⁺ 細胞の割合が有意に高かった（n=3、* p<0.05、** p<0.01）。day 7 では各群の CD4⁺ T 細胞中の CD25⁺ Foxp3⁺ 細胞の割合に有意差を認めなかったが、day 14 では DST 群に比べ、NK 群、NK+DST 群で CD4⁺ T 細胞中の CD25⁺ Foxp3⁺ 細胞の割合は有意に高かった（n=3、* p<0.05、** p<0.01）。

（イ）NK026680 と DST の併用治療は術後 7 日目のグラフト内の制御性 T 細胞の割合を増加させない。

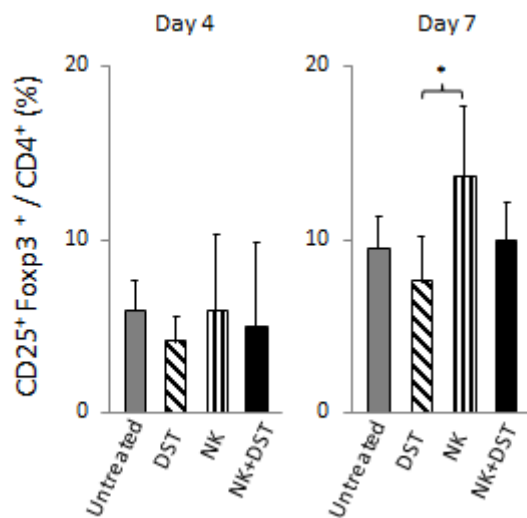


Figure 22

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス (H2^b) のグラフト浸潤細胞を day 4、day 7 に回収して CD4⁺ T 細胞中の CD25⁺ Foxp3⁺ 細胞の割合を解析した。day 4 では各群で CD4⁺ T 細胞中の CD25⁺ Foxp3⁺ 細胞の割合に有意差を認めなかった。day 7 では各群に比べ、NK+DST 群の CD4⁺ T 細胞中の CD25⁺ Foxp3⁺ 細胞の割合に有意差を認めなかった (n=4、* p<0.05)。

(ウ) NK026680 と DST の併用治療は術後 7 日目のグラフト内の制御性 T 細胞の細胞数を増加させる。

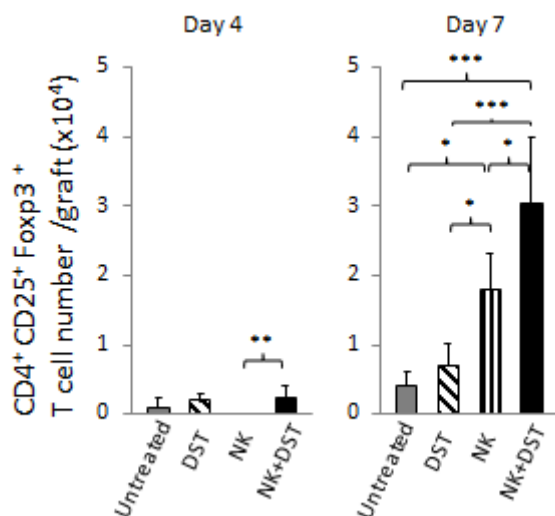


Figure 23

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス (H2^b) のグラフト浸潤細胞を day 4、day 7 に回収して CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞の細胞数を解析した。Day 4 では NK+DST 群で NK 群に比べ、グラフト内の CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞数が有意に多かった。また、day 7 では NK+DST 群で各群に比べ、グラフト内の CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞数が有意に多かった。(n=4、* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001)。

⑧NK026680 と DST の併用治療は、心移植後レシピエントの脾細胞中の CD8⁺ T 細胞の活性化を抑制する。

【目的】 移植後のレシピエントの免疫状態を観察する目的で、脾細胞中の CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞および CD8⁺ T 細胞の活性化マーカーである CD44 および CD62L の発現について検討した。

【結果】

(ア) NK026680 と DST の併用治療は、CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞上の CD44 の発現を抑制しない。

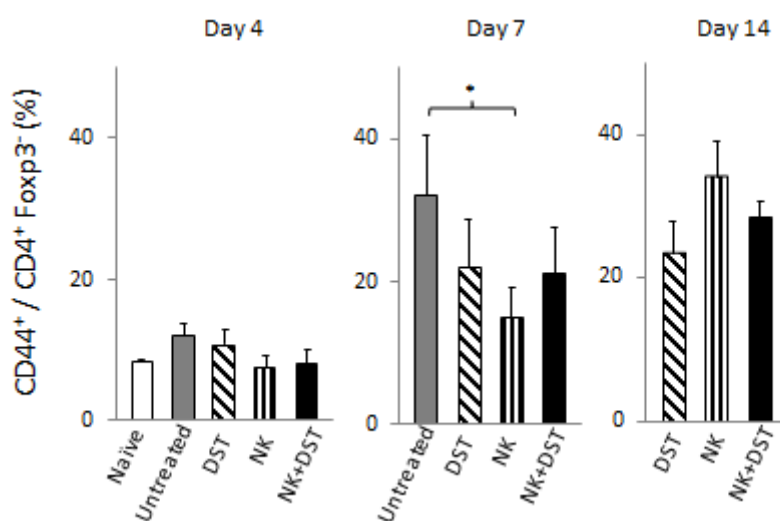


Figure 24

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を day 4、day 7、day 14 に回収して CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞上の CD44 の発現を調べた。いずれのタイミングでも各群で CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞上の CD44 の発現に有意差を認めなかった (n=3、* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001)。

(イ) NK026680 と DST の併用治療は、CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞上の CD62L の陰転化を抑制しない。

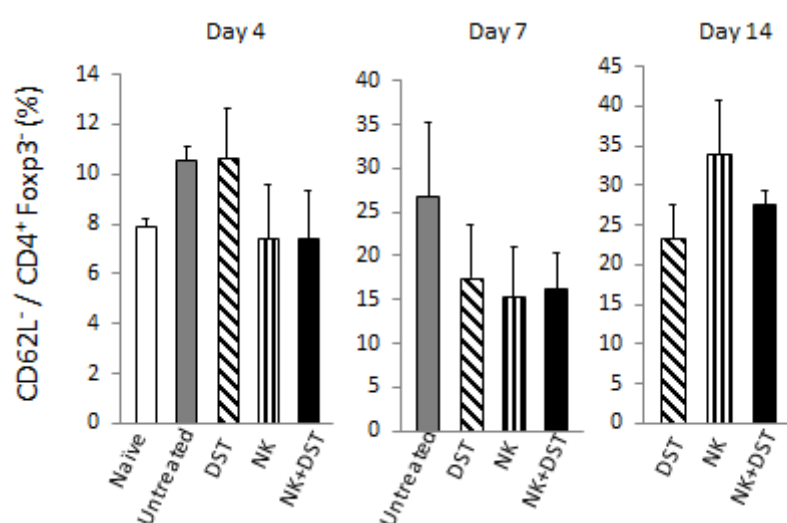


Figure 25

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を day 4、day 7、day 14 に回収して CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞上の CD62L の発現(陰転化)を調べた。いずれのタイミングでも各群で CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞上の CD62L 陰転化に有意差を認めなかった (n=3)。

(ウ) NK026680 と DST の併用治療は、CD8⁺ T 細胞上の CD44 の発現を抑制する。

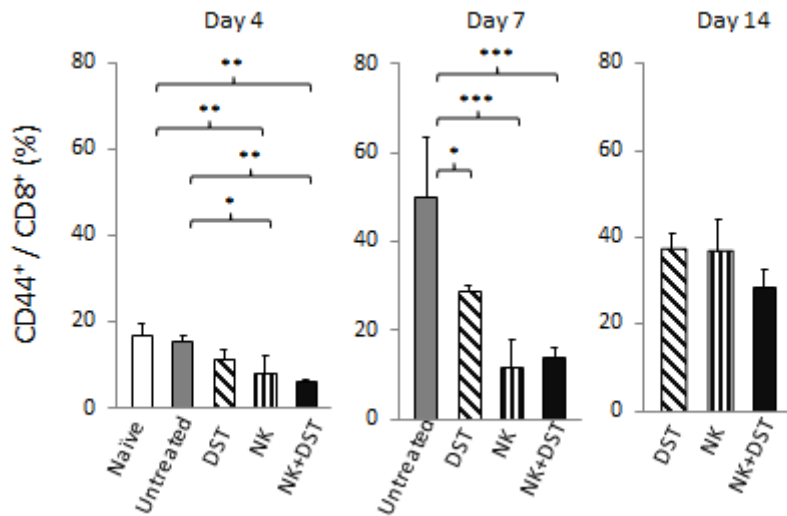


Figure 26

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を day 4、day 7、day 14 に回収して CD8⁺ T 細胞上の CD44 の発現を調べた。day 4 で、naïve、無治療群に比べ、NK 群、NK+DST 群で CD8⁺ T 細胞上の CD44 の発現が有意差に亢進した (n=4、* p<0.05、** p<0.01)。また、day 7 では各治療群で無治療群に比べて CD8⁺ T 細胞上の CD44 の発現が有意差に亢進した (n=3、* p<0.05、*** p<0.001)。

(エ) NK026680 と DST の併用治療は、CD8⁺ T 細胞上の CD62L の陰転化を抑制する。

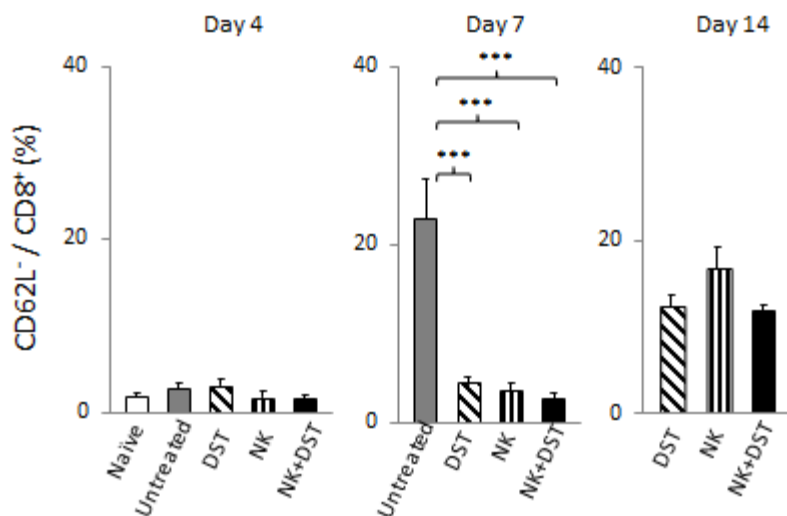


Figure 27

NK026680 とドナー系統（H2^d）の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス（H2^b）の脾細胞を day 4、day 7、day 14 に回収して CD8⁺ T 細胞上の CD62L の陰転化を調べた。day 7 では各治療群で無治療群に比べて CD8⁺ T 細胞上の CD44 の発現が有意差に亢進した（n=3、*** p<0.001）。

⑨NK026680 と DST の併用治療は、脾細胞中の IFN- γ 産生 CD8⁺ T 細胞の割合を低下させる。

【目的】

移植後のレシピエントの免疫状態を調べる目的で、移植後のレシピエントの脾細胞中の IFN- γ 産生細胞の割合について検討した。

【結果】

（ア）NK026680 と DST の併用治療は、IFN- γ 産生 CD4⁺ T 細胞の割合を変化させない。

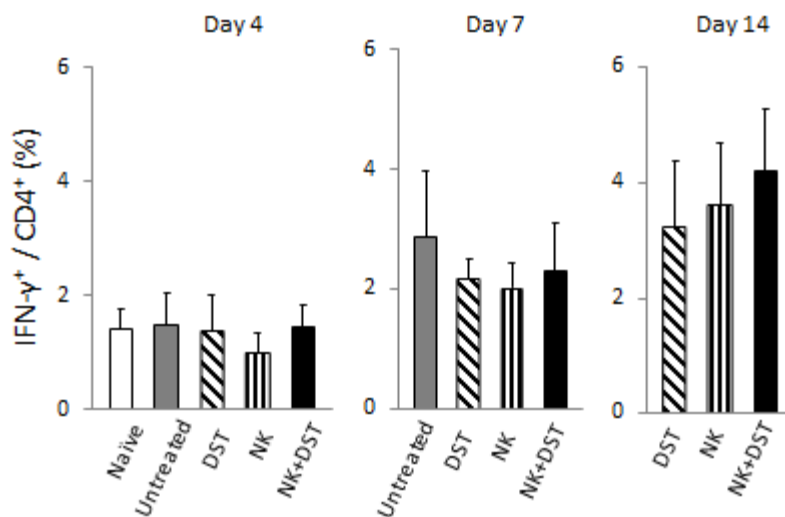


Figure 28

NK026680 とドナー系統（H2^d）の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス（H2^b）の脾細胞を day 4、

day 7、day 14 に回収し、PMA/Ionomycin で刺激したのちに CD4⁺ T 細胞中の IFN- γ 産生細胞の割合を検討したが、各群とも有意差を認めなかった (n=3)。

(イ) NK026680 と DST の併用治療は、IFN- γ 産生 CD8⁺ T 細胞の割合を減少させる。

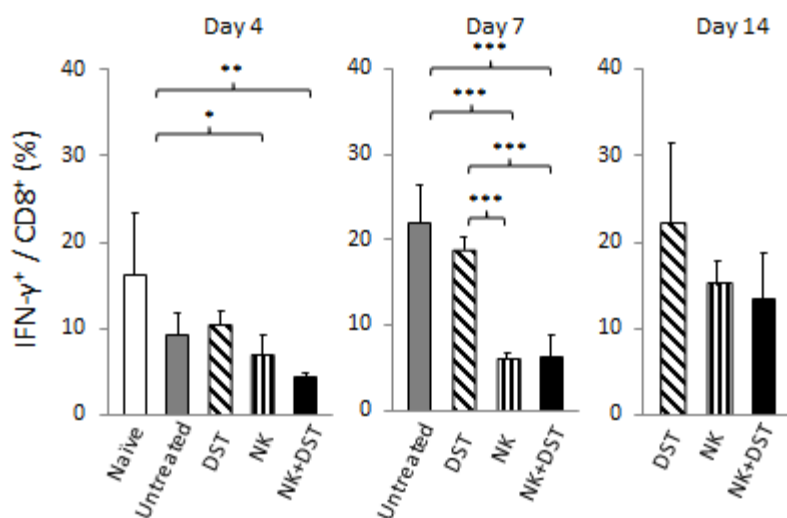


Figure 29

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を day 4、day 7、day 14 に回収し、PMA/Ionomycin で刺激したのちに CD8⁺ T 細胞中の IFN- γ 産生細胞の割合を検討した。day 4 での IFN- γ 産生細胞の割合は naïve に比べ、NK 群、NK+DST 群で低かった。また、day 7 では NK 群、NK+DST 群で、無治療群、DST 群に比べ、IFN- γ 産生細胞の割合は有意に低かった。day 14 では DST 群、NK 群、NK+DST 群で有意差を認めなかった (n=3、* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001)。

⑩NK026680 と DST の併用治療は、グラフト内の CD4⁺ T 細胞を増加させ、CD8⁺ T 細胞を抑制する。

【目的】NK026680 と DST の併用治療がグラフト内の T 細胞に及ぼす影響

を調べる目的で、グラフト内の T 細胞の割合を調べた。

【結果】

(ア) NK026680 と DST の併用治療は、グラフト内の CD4⁺ T 細胞の割合を増加させる。

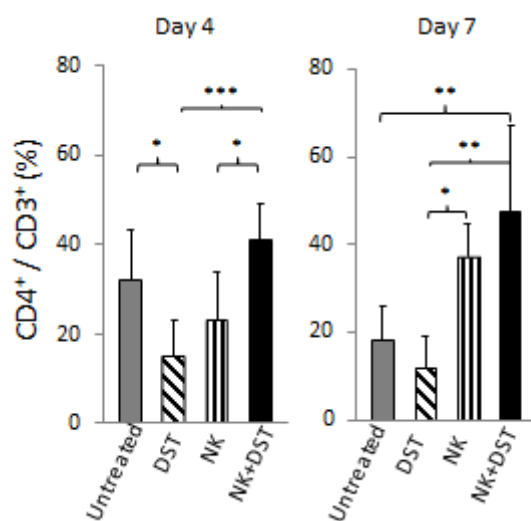


Figure 30

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス (H2^b) のグラフト浸潤細胞を day 4、day 7 に回収して T 細胞中の CD4⁺ 細胞の割合を検討した。day 4 では NK+DST 群で DST 群、NK 群に比べ T 細胞中の CD4⁺ 細胞の割合が有意に高かった。day 7 では無治療群、DST 群に比べ、NK+DST 群の T 細胞中の CD4⁺ 細胞の割合が有意に高かった (n=4、* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001)。

(イ) NK026680 と DST の併用治療は、グラフト内の CD4⁺ T 細胞の細胞数を増加させる。

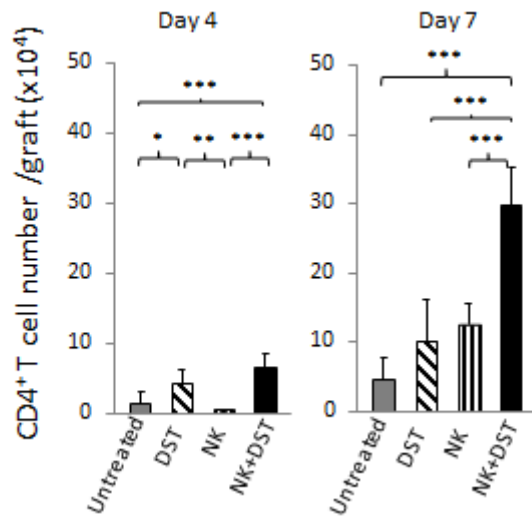


Figure 31

NK026680 とドナー系統（H2^d）の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス（H2^b）のグラフト浸潤細胞を day 4、day 7 に回収して CD4⁺ T 細胞数を検討した。day 4 では NK+DST 群で無治療群、NK 群に比べ CD4⁺ T 細胞数が有意に多かった。day 7 では他群に比べ、NK+DST 群の CD4⁺ T 細胞数が有意に多かった（n=4、* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001）。

（ウ）NK026680 と DST の併用治療は、グラフト内の CD8⁺ T 細胞の割合を減少させる。

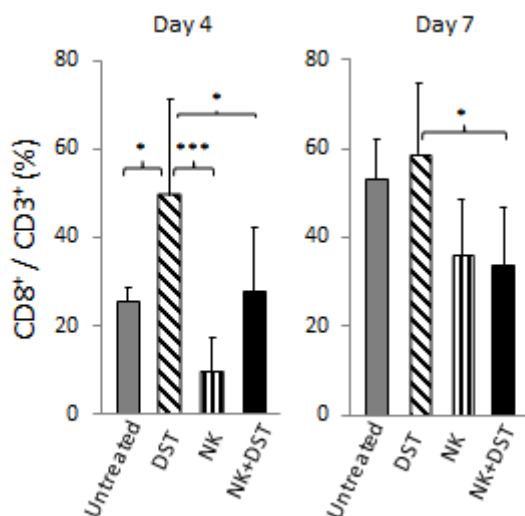


Figure 32

NK026680 とドナー系統（H2^d）の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス（H2^b）のグラフト浸潤細胞を day 4、day 7 に回収して T 細胞中の CD8⁺ 細胞の割合を検討した。day 4 では DST 群で他群に比べ T 細胞中の CD8⁺ 細胞の割合が有意に高かった。day 7 では NK+DST 群の T 細胞中の CD8⁺ 細胞の割合が DST 群に比べ、有意に低かった（n=4、* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001）。

（エ）NK026680 と DST の併用治療は、グラフト内の CD8⁺ T 細胞の細胞数を減少させる。

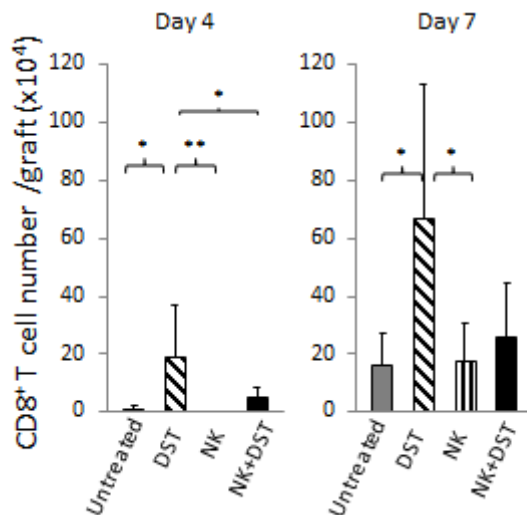


Figure 33

NK026680 とドナー系統（H2^d）の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス（H2^b）のグラフト浸潤細胞を day 4、day 7 に回収して CD8⁺ T 細胞数を検討した。day 4 では DST 群で、他群に比べ CD8⁺ T 細胞数が有意に多かった。day 7 では DST 群で、無治療群、NK 群に対し、有意に多かった。NK+DST 群は DST 群に比べ、少ない傾向にあった（n=4、* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001）。

（オ）NK026680 と DST の併用治療は、グラフト内の T 細胞を CD4⁺ 優位にシフトする。

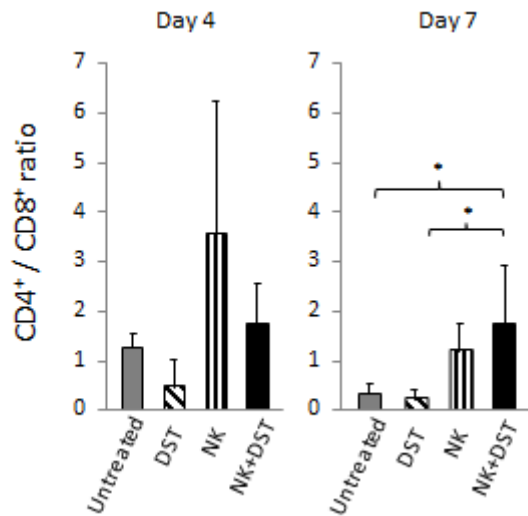


Figure 34

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス (H2^b) のグラフト浸潤細胞を day 4、day 7 に回収して、グラフト浸潤細胞内の CD4⁺/CD8⁺ 比を検討した。day 4 では各群で有意差を認めなかったが、day 7 では NK+DST 群で無治療群、DST 群に対して有意に CD4⁺/CD8⁺ 比が高かった (n=4、* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001)。

⑪NK026680 と DST の併用治療は、脾臓内およびグラフト内の樹状細胞を減少させる。

【目的】NK026680 と DST の併用治療が抗原提示細胞である樹状細胞に与える影響を調べる目的で、移植後 7 日目のレシピエントの脾臓内およびグラフト内の樹状細胞の割合、細胞数および活性化マーカーの発現について検討した。

【結果】

(ア) NK026680 と DST の併用治療は、脾臓内の樹状細胞の割合、細胞数を減少させる。

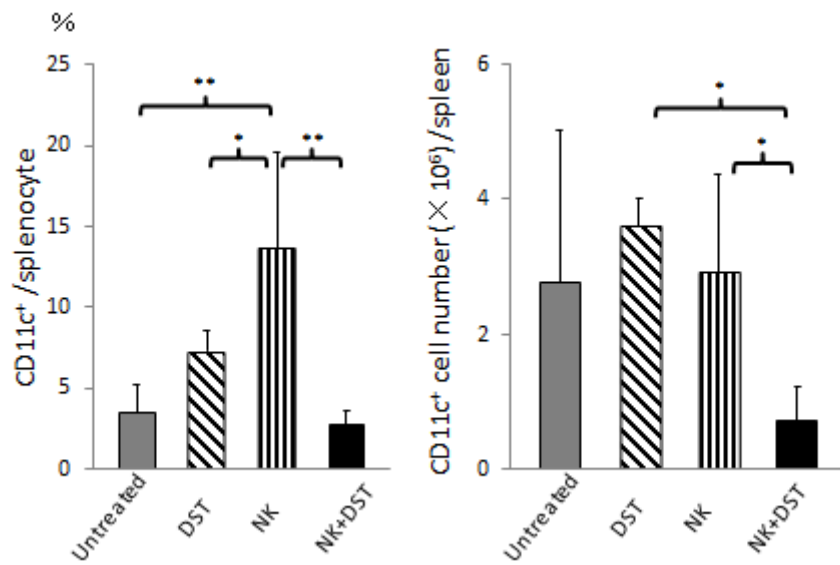


Figure 35

NK026680 とドナー系統（H2^d）の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス（H2^b）の脾細胞を day 7 に回収して CD11c⁺ 細胞（樹状細胞）を検討した。脾細胞中の CD11c⁺ 細胞の割合は NK+DST 群で NK 群に比べ、有意に低かった。また、脾臓内の CD11c⁺ 細胞数は DST 群、NK 群に比べて NK+DST 群で有意に少なかった（n=4、* p<0.05、** p<0.01）。

（イ）NK026680 と DST の併用治療は、脾臓内の樹状細胞の活性化を抑制する。

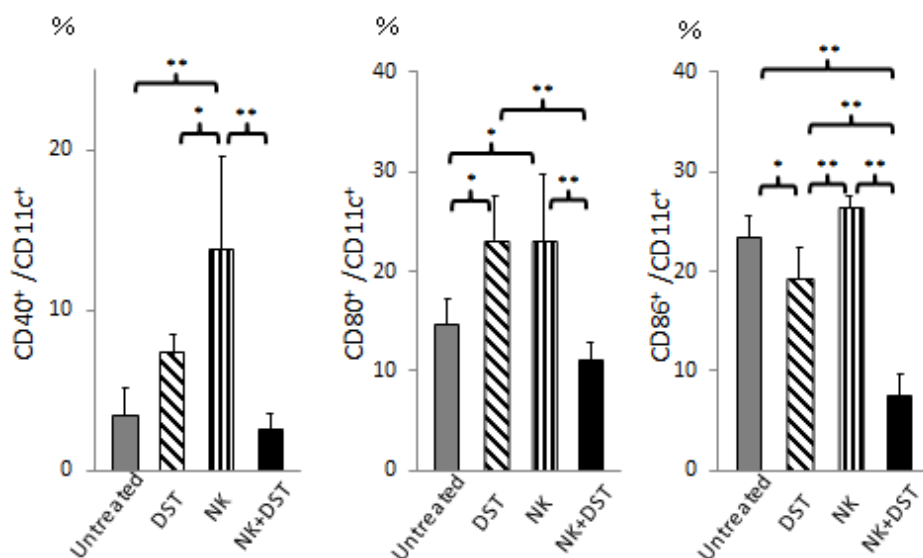


Figure 36

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を day 7 に回収して CD11c⁺ 細胞 (樹状細胞) の CD40、CD80、CD86 の発現について検討した。NK+DST 群で、脾細胞中の CD40 の発現は NK 群に比べ、CD80 は無治療群、NK 群に比べ、CD86 の発現は他群に比べてそれぞれ低かった (n=4、* p<0.05、** p<0.01)。

(ウ) NK026680 と DST の併用治療は、脾臓内の樹状細胞の MHC-class II の発現を抑制する。

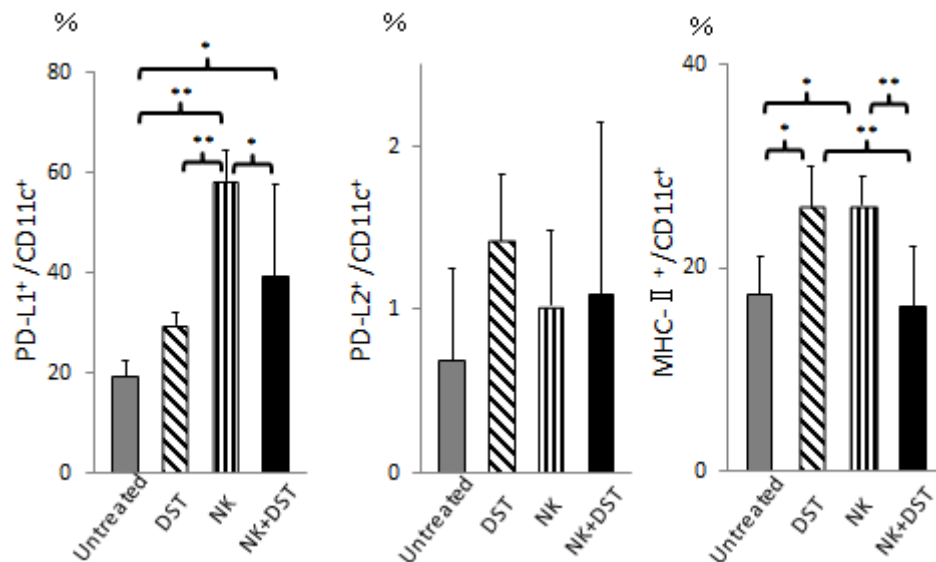


Figure 37

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス (H2^b) の脾細胞を day 7 に回収して CD11c⁺ 細胞 (樹状細胞) の PD-L1、PD-L2、MHC-class II の発現について検討した。NK+DST 群で、脾細胞中の PD-L1 の発現は無治療群、NK 群に比べ、MHC-II の発現は DST 群、NK 群に比べ、それぞれ低かった (n=4、* p<0.05、** p<0.01)。PD-L2 の発現は各群で有意差を認めなかった。

(エ) NK026680 と DST の併用治療は、グラフト内の樹状細胞の割合、細

胞数を減少させる。

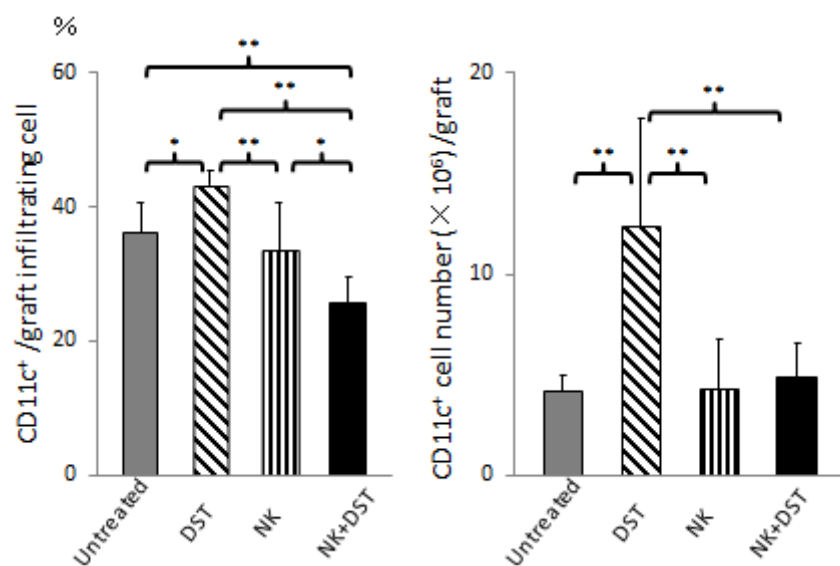


Figure 38

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス (H2^b) のグラフト浸潤細胞を day 7 に回収して CD11c⁺ 細胞 (樹状細胞) について検討した。グラフト内の樹状細胞の割合は、NK+DST 群で他群に比べて有意に低かった。また、細胞数は DST 群で他群に比べ、有意に高かった (n=4、* p<0.05、** p<0.01)。

(オ) NK026680 と DST の併用治療は、グラフト内の樹状細胞の活性化をむしろ亢進する。

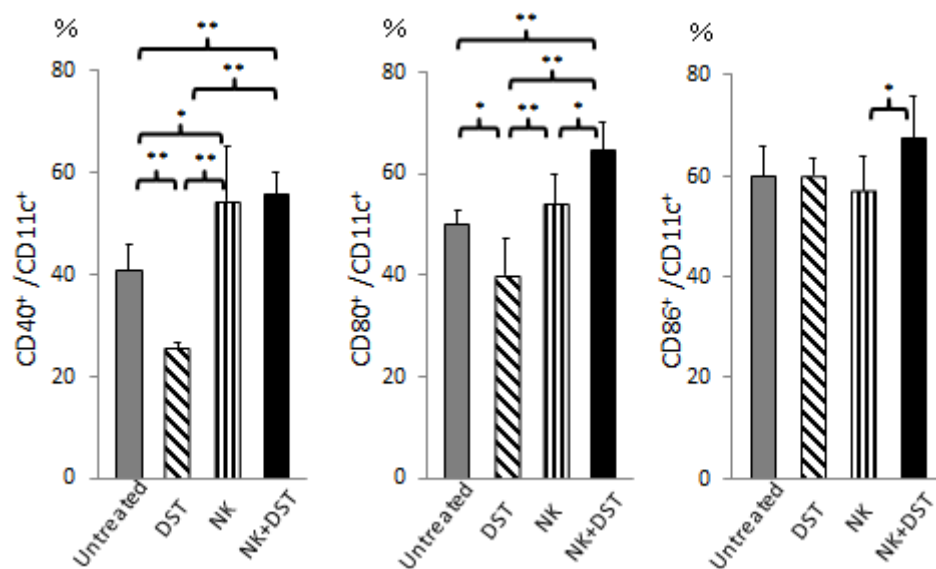


Figure 39

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス (H2^b) のグラフト浸潤細胞を day 7 に回収して CD11c⁺ 細胞 (樹状細胞) の CD40、CD80、CD86 の発現について検討した。グラフト内樹状細胞における CD40 の発現は、NK+DST 群で無治療群、DST 群に比べて有意に高かった。CD80 は他群に比べ、CD86 は NK 群に比べ、NK+DST 群で有意に高かった (n=4、* p<0.05、** p<0.01)。

(カ) NK026680 と DST の併用治療は、グラフト内の programmed-death ligand (PD-L)2 と MHC-class II の発現を亢進する。

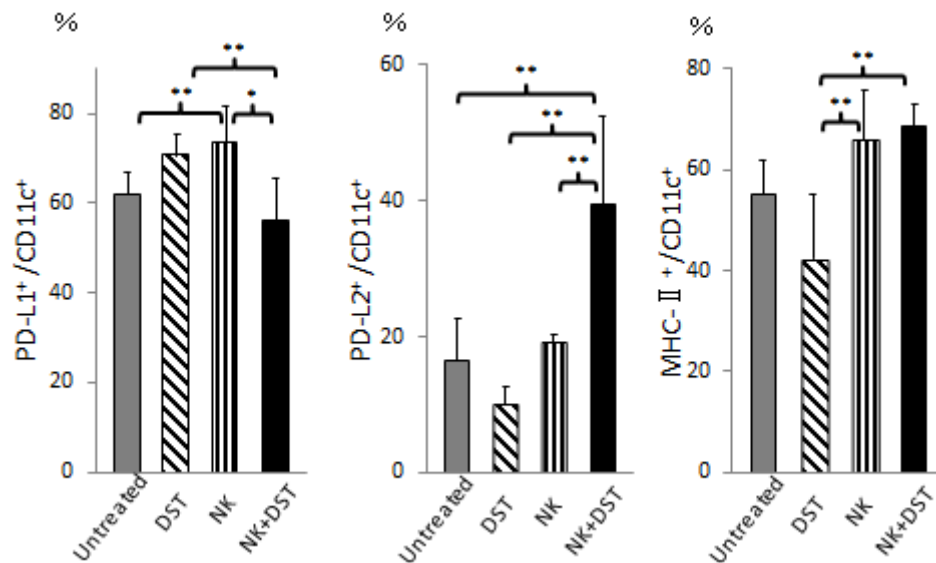


Figure 40

NK026680 とドナー系統（H2^d）の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植したレシピエントマウス（H2^b）のグラフト浸潤細胞を day 7 に回収して CD11c⁺ 細胞（樹状細胞）の PD-L1、PD-L2、MHC-class II の発現について検討した。グラフト内樹状細胞における PD-L1 の発現は、NK+DST 群で DST 群、NK 群に比べて有意に低かった。PD-L2 は他群に比べ、MHC-class II は DST 群に比べ、NK+DST 群で有意に高かった（n=4、* p<0.05、** p<0.01）。

⑫NK026680 と DST の併用治療によるグラフト延長効果は、CD25 陽性 T 細胞に依存する。

【目的】NK026680 と DST の併用によるグラフト延長効果における制御性 T 細胞の役割を調べる目的で、CD25⁺ T 細胞を消去したときの NK026680 と DST によるグラフト延長期間を検討した。

【結果】

（ア）抗 CD25 抗体の投与により、NK026680 と DST によるグラフト生着延長効果は阻害される。

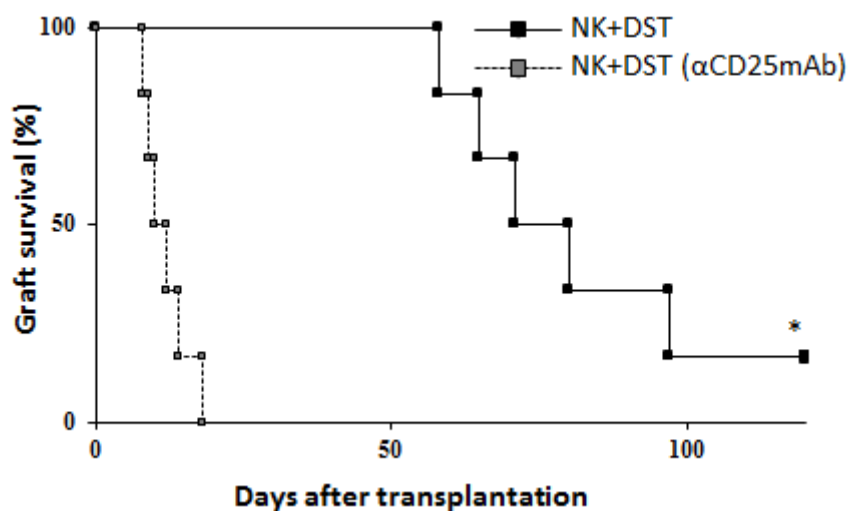


Figure 41

レシピエントマウス (H2^b) に、day -7 の DST 投与前に抗 CD25 抗体 (PC61) を 250 μg 静脈注射し、NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用して day 0 にドナー系統の心グラフトを移植した。NK026680 と DST を併用した場合、アロ移植心の生着期間の中央値は 75.5 日であったが、抗 CD25 抗体を投与することにより、アロ移植心の生着期間の中央値は 11.0 日と著明に短縮した (n=6, * p<0.01: vs. NK+DST 群)。

(イ) 抗 CD25 抗体の投与により、NK026680 と DST の併用治療によるグラフト内の制御性 T 細胞の増加が阻害される。

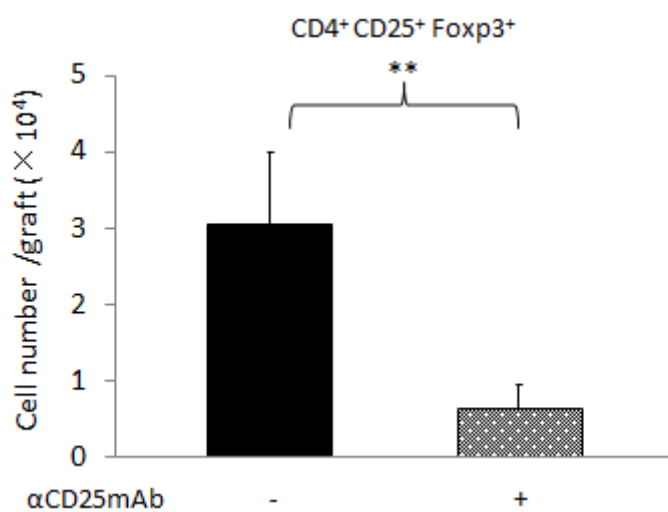


Figure 42

抗 CD25 抗体 (PC61) を静脈注射したレシピエントマウス (H2^b) に NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植し、day 7 にグラフト浸潤細胞を回収して CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞の細胞数を解析した。NK+DST 群に比較し、抗 CD25 抗体を投与した NK+DST 治療群 (抗 CD25 抗体投与群) では有意にグラフト内の CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞の細胞数が少なかった (n=4、** p<0.01)。

(ウ) 抗 CD25 抗体により、NK026680 と DST の併用治療によるグラフト内 T 細胞の CD4⁺/CD8⁺ バランスは変わらない。

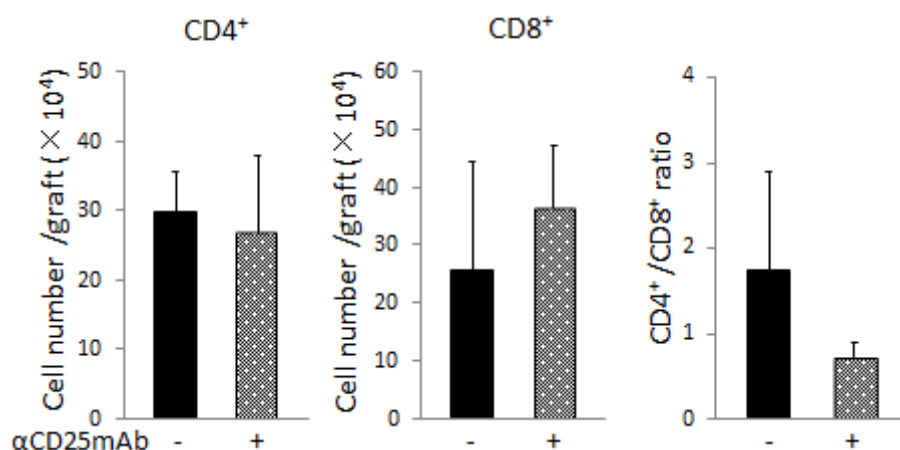


Figure 43

抗 CD25 抗体 (PC61) を静脈注射したレシピエントマウス (H2^b) に NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用し、day 0 に腹腔内にドナー系統の心臓を移植し、day 7 にグラフト浸潤細胞を回収して CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞の細胞数を解析した。NK+DST 群に比較し、抗 CD25 抗体投与群では有意にグラフト内の CD4⁺、CD8⁺ T 細胞の細胞数に有意差を認めなかった (n=4)。また、CD4⁺/CD8⁺ 比を比較したが、抗 CD25 抗体投与群と NK+DST 群で比に有意差を認めなかった。

(エ) 抗 CD25 抗体の投与により、NK026680 と DST の併用治療による in vitro での CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞の抗原刺激に対する細胞分裂は抑制される。

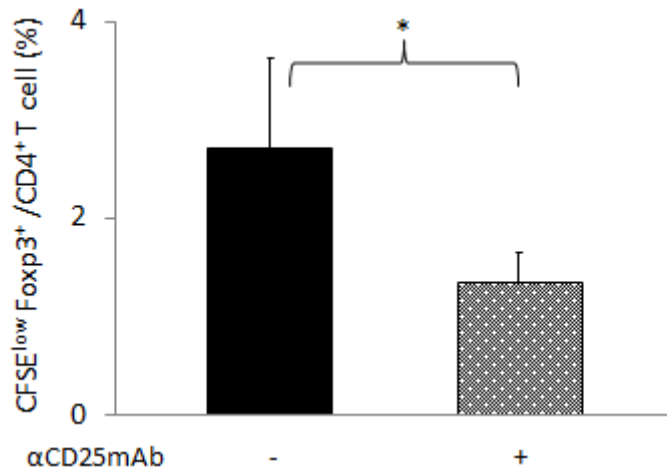


Figure 44

抗 CD25 抗体 (PC61) を静脈注射したレシピエントマウス (H2^b) に NK026680 とドナー系統 (H2^s) の DST を併用した。Day 0 に脾細胞を回収して CFSE で染色し、ドナー系統の脾細胞と 3 日間混合培養して、CD4⁺ T 細胞中の分裂した Foxp3⁺ 細胞の割合を検討した。NK+DST 群に比較し、抗 CD25 抗体投与群では有意に CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞の分裂が抑制された (n=4、* p<0.05)。

(オ) 抗 CD25 抗体の投与により、NK026680 と DST の併用治療による in vitro での分裂細胞の CD4/CD8 比は変わらない。

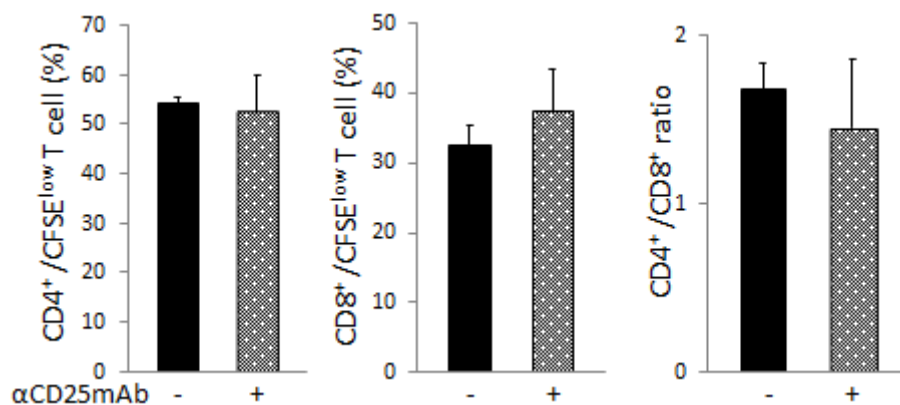


Figure 45

抗 CD25 抗体 (PC61) を静脈注射したレシピエントマウス (H2^b) に

NK026680 とドナー系統 (H2^d) の DST を併用した。Day 0 に脾細胞を回収して CFSE で染色し、ドナー系統の脾細胞と 3 日間混合培養して、CFSE の希釈された (分裂した) T 細胞中の CD4⁺ 細胞、CD8⁺ 細胞の割合を検討したところ、抗 CD25 抗体群の CD4⁺ 細胞、CD8⁺ 細胞の割合に有意差を認めなかった。CD4⁺/CD8⁺比に関しても有意差を認めなかった (n=4)。

考察

1. 本研究の意義と限界

本研究では、ドナー脾細胞の静脈投与（DST）に 14 日間の NK026680 の経口投与を併用により、MHC フルミスマッチのアロ移植心の生着期間が著明に延長された（Figure 2）。また、NK026680 と DST の併用治療によるグラフト生着延長効果は 3rd-party のグラフトではドナーグラフトに比べて有意に短く、（Figure 3、4）、NK026680 と DST の併用療法にドナー特異的な免疫修飾効果があることが示された。本研究の意義は、DST という簡便な手技でドナー特異性を持った免疫修飾効果が得られる点である。昨今さまざまな細胞治療や抗体治療が研究・開発されているが、手技が煩雑な場合、臨床で再現しにくい。また、抗体やサイトカインを投与する方法は、ヒトに応用する場合にはさまざまな予期しない免疫反応を惹起する可能性があり¹⁸⁸ 注意を要する。また、NK026680 は、現在臨床臓器移植の主要な免疫抑制剤であるカルシニューリン阻害剤（CNIs）のように制御性 T 細胞を含む免疫を強力に抑制せず、免疫寛容に対し促進的に作用することが判明した。本薬剤の分子生物学的な薬理作用を明らかにし、寛容誘導作用をさらに詳細に検討することにより、新しい免疫抑制剤としての強力な選択肢のひとつになりえると考えられた。

本研究の限界は、NK026680 のヒトに対する毒性が検証されていないこと、本研究で使用した治療プロトコルでは最終的にはグラフトが拒絶されることである。マウスやラットに対する毒性は検証されており、軽度の下痢を認めるのみであったが、ヒトでの検証がなされておらず、今後の研究が待たれる。また、本研究で検証した治療プロトコルでは、グラフト生着期間を 75.5 日（中央値）にまで延長させられたが、その後 6 例中 5 例で最終的にはグラフト拒絶に至った。NK026680 と DST の併用治療により急性期を脱したのち、長期に渡ってグラフト機能を維持するためには NK026680 の至適投与期間や投与量などをさらに検討する必要があると考えられた。NK026680 を継続的に内服させた場合の毒性についてはマウスでも検証されておらず、NK026680 を移植後 6 日目以降にも継続して内服させるのがよいのか、あるいは別の薬剤や治療を併用すべきなのかは今後も検証が必要と考えられた。

2. NK026680 と DST の併用治療と制御性 T 細胞

DST によるグラフト生着延長効果の機序は完全には解明されていないが、

制御性 T 細胞の誘導^{126,146}、免疫不応答の誘導¹¹⁸、アロ反応性 T 細胞の消去^{121,122}、抗 idiotypic 抗体¹⁶²、Th1/Th2 応答バランスの Th2 へのシフト¹⁸⁹ など、さまざまなものが報告されている。

本研究では *in vivo* 実験で、NK026680 と DST の併用治療により抗原刺激時の脾臓内およびグラフト内の CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 制御性 T 細胞の有意な増加を認め (Figure 8、23)、*in vitro* の実験では NK026680 と DST の併用治療により、ドナー抗原特異的な CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞の有意な増加を認めた (Figure 10)。また、抗 CD25 抗体の投与で NK026680 と DST の併用治療によるグラフト生着延長効果が阻害され (Figure 41)、グラフト内の制御性 T 細胞数は減少し (Figure 42)、NK026680 と DST の併用治療を受けたマウスの *in vitro* 実験で、day 0 の脾細胞の CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞の抗原刺激に対する増殖は見られなくなった (Figure 43)。これらの結果は、NK026680 と DST の併用療法によるドナー特異的なグラフト生着延長効果の主たるメカニズムが、ドナー特異的制御性 T 細胞の誘導に起因するものであると強く示唆しているものと考えられる。興味深いことに、移植後 7 日目の脾臓では各群で制御性 T 細胞の割合に変わりはなく、移植後 14 日目には NK 群、NK+DST 群で制御性 T 細胞の増加を認めた (Figure 21)。多くの報告で、DST を行った後にアログラフトを移植したマウスの二次リンパ組織 (脾臓や所属リンパ節) で制御性 T 細胞が増加すると報告された^{125,126,145,190,191}。一方、DST と抗 CD154 抗体を併用した皮膚移植モデルでは、移植後 7 日目の皮膚グラフト内に Foxp3⁺ 細胞が著明に増加したという報告もある¹⁴⁶。本研究で、術後 7 日目のグラフト内で制御性 T 細胞の増加を認めることから、移植後早期のグラフト内への制御性 T 細胞の浸潤もしくは増加がグラフト生着期間の延長に寄与する可能性が考えられた。脾臓内については術後 14 日目で制御性 T 細胞の増加を認めているものの、術後 4 日目ではむしろ無治療群で脾臓内の制御性 T 細胞の割合が増加していた。制御性 T 細胞は effector T 細胞による組織破壊の影響が自己に及ばないよう免疫のバランスを保持する働きをしており^{72,192}、術後早期の脾臓内での制御性 T 細胞の増加は、アロ移植心に対する免疫反応が自己に及ばないよう制御するためかもしれない。そのように考えた場合、脾臓内での制御性 T 細胞の動向のみでは、必ずしもグラフトの免疫状態を反映しないかもしれない。Zhang らは、豚島の腎被膜移植モデルを用いて、制御性 T 細胞はまずグラフト内に遊走し、その後二次リンパ組織に移行してグラフト保護に働くことを示した¹⁹³。Lakkis らは二次リンパ組織欠損マウスを用いて、免疫反応の場が二次リンパ組織であることを示したが¹⁹⁴、これらの研究結果を総

合すると、制御性 T 細胞はグラフト内で抗原提示を受け、二次リンパ組織で抗原特異的な effector T 細胞の活性化を抑えることでグラフト保護に働いている可能性が考えられる。

本研究では、NK026680 と DST の併用治療を施したレシピエントマウスの移植直前の脾細胞を調べたところ、制御性 T 細胞上の CD44 の発現が有意に亢進していた。CD44 はヒアルロン酸などの細胞外マトリクスと結合する接着因子で¹⁹⁵、活性化 T 細胞に発現し、T 細胞の組織への遊走に関与する¹⁹⁶。また、CD62L (L-selectin) は naïve T 細胞に発現し、リンパ節へのホーミングに関与し¹⁹⁷、活性化により陰転化する。これらふたつのマーカーは、memory phenotype の分類に使用される¹⁹⁸。制御性 T 細胞にもこれらのマーカーによる memory type の存在が報告されている^{199,200}。Chen らはマウスの妊娠モデルにおいて、CD44⁺ CD62L⁻ memory 制御性 T 細胞が所属リンパ節で早期に増殖し、CD4⁺ T 細胞や CD8⁺ T 細胞よりも早く胚に到達することで胚の拒絶を妨げて、妊娠を継続させていると報告した¹⁹⁹。本研究では CD62L の陰転化については各群で有意差を認めなかったが、NK026680 と DST の併用治療によって誘導された CD44⁺ 制御性 T 細胞が移植後早期に移植片に遊走することで、グラフト保護に働いている可能性があると考えられた。制御性 T 細胞の組織遊走には CCR4 や CCR8 の関与が指摘されており^{120,201}、NK026680 と DST の併用治療がこれらのケモカイン受容体の発現に与える影響についても検証が必要と考えられた。

3.NK026680 と DST の併用治療と樹状細胞

本研究で、NK026680 と DST の併用治療によるグラフト生着延長効果には、ドナー特異性が見られた (Figure 3、4)。また、制御性 T 細胞の増殖にもドナー特異性が認められた (Figure 9、11)。このことから、NK026680 と DST の併用によりドナー抗原特異的な制御性 T 細胞が誘導され、ドナー特異的な免疫抑制に寄与していると考えられた。制御性 T 細胞の誘導や増殖には、未熟樹状細胞や抑制性樹状細胞の関与が指摘されている^{84,105,202,203}。DST において、MHC-class II によるドナー抗原の indirect presentation が免疫抑制機序を発揮するために重要であり^{98,100,101}、DST により供給された抗原を取り込んだ樹状細胞を免疫抑制剤により修飾することで、免疫抑制効果が発揮される²⁰⁴。本研究でも DST によって投与されたドナー細胞がレシピエントの抗原提示細胞に取り込まれ、レシピエントの T 細胞に提示されることでドナー特異的な制御性 T 細胞が誘導もしくは増加していると考えられた。NK026680 は樹状細胞を修飾する免疫抑制剤として開発され¹⁷⁸、T

細胞への抑制作用があることが当教室での実験で明らかとなった¹⁸⁵。

本研究において、NK026680 と DST の併用治療が樹状細胞に及ぼす影響を検討したところ、NK026680 と DST の併用治療により脾臓内の樹状細胞数は有意に減少した (Figure 35)。また、活性化マーカーである共刺激分子 (CD40、CD80/86) の発現および MHC-class II の発現の割合は有意に減少した (Figure 36、37)。NK026680 による活性化マーカーと MHC-class II の発現の抑制は既報と一致している^{178,186}。いわゆる未熟樹状細胞は共刺激分子や MHC-class II の発現が抑制された樹状細胞であるが、未熟樹状細胞は T 細胞の anergy を引き起こし¹⁰⁴、また制御性 T 細胞を誘導する²⁰⁵と言われる。Turnquist らは、in vitro で rapamycin 存在下に誘導した樹状細胞は共刺激分子や MHC-class II の発現が抑制され、この樹状細胞の in vivo への投与で制御性 T 細胞を誘導し、アロ移植心の生着期間が著明に延長したと報告した²⁰⁶。未熟樹状細胞の抑制性機序のひとつに IDO 産生が報告されている。IDO はトリプトファン代謝酵素のひとつで、トリプトファン代謝産物で免疫抑制作用を有するキヌレニンを生産し、T 細胞の活性化抑制と制御性 T 細胞の増殖に寄与する^{207,208}。当教室では、NK026680 存在下に in vitro で培養した樹状細胞は IDO 産生が亢進していることを明らかにしており¹⁸⁶、NK026680 と DST の併用治療において、未熟樹状細胞内の IDO 産生亢進がグラフト生着延長効果の機序の一端を担っている可能性があると考えられた。

グラフト内の樹状細胞は割合、細胞数ともに NK026680 と DST の併用治療により減少したが、興味深いことに、NK026680 と DST の併用治療によりグラフト内の樹状細胞の共刺激分子の発現や MHC-class II の発現はむしろやや亢進した (Figure 39、40)。グラフト内では、脾臓内の樹状細胞と共刺激分子や MHC-class II の発現パターンが違うことは、脾臓内とグラフト内での樹状細胞の役割が異なる可能性を示唆している。一般的に、樹状細胞は免疫原性を持つ成熟樹状細胞と、免疫抑制性の未熟樹状細胞に分類されるが、それ以外にも抑制性の樹状細胞が存在するとされる¹⁰⁴。Munn らは、IFN- γ で活性化した樹状細胞に、共刺激分子や MHC-class II の発現が亢進していたにもかかわらず、IDO を強く発現し、抑制性の機能を持つことを報告した²⁰⁹。また、さまざまな条件下で、活性化マーカーを発現しながら炎症性サイトカインの分泌が抑制され、抑制性サイトカインや分子の発現が亢進している semimature 樹状細胞の存在が報告されている²¹⁰⁻²¹²。Christensen らは、Lactobacillus 属と in vitro で共培養した樹状細胞は、活性化マーカーを発現していながらも、IL-6、IL-12、TNF- α などの炎症性サ

イトカイン産生が抑制され、抑制性サイトカインである IL-10 の産生が亢進していることを明らかにした²¹¹。また、Akbari らは、活性化マーカーを発現した樹状細胞が、IL-10 を産生し、喘息を引き起こす免疫反応を抑制したと報告した²¹²。Semimature DC と mature DC は表面マーカーだけでは判別ができず、本研究において、NK026680 と DST の併用治療によりグラフト内で増加した DC が抑制性のものである可能性は否定できない。本研究で、グラフト内の樹状細胞が抑制能を持つか否かについては、樹状細胞のサイトカイン産生能や IDO 産生などの機能分子を調べる必要があると考えられた。

グラフト内樹状細胞の他の免疫抑制機序として考えられるのが PD-L2 分子である。本研究で、NK026680 と DST の併用治療によってのみ、グラフト内樹状細胞の PD-L2 の発現が亢進した (Figure 40)。PD-L2 は B7 family に属する共刺激分子の一種で、T 細胞上に発現する PD-1 と結合することにより、T 細胞に抑制的に作用する²¹³。Pena-Cruz らは、抗 PD-L2 中和抗体により、*in vitro* での皮膚ランゲルハンス細胞による T 細胞増殖が亢進することを示し、PD-L2 の T 細胞増殖抑制効果を示した²¹⁴。一方、Hori らはマウスの角膜移植モデルで、Sandner らはマウスの皮膚移植モデルで、それぞれ抗 PD-L1 抗体が拒絶を加速させるのに対し、抗 PD-L2 抗体では拒絶を加速させなかったことを示した^{215,216}。本研究におけるグラフト内樹状細胞上の PD-L2 がどのような機序でどの程度グラフト生着延長に寄与するかは不明である。PD-L2 の働きについては未解明の部分も多く、今後の研究が待たれる。

3. NK026680 と DST の併用治療と CD4⁺ T 細胞 subset

抗 CD25 抗体の投与により、NK026680 と DST の併用治療によるアロ移植心生着延長効果は著しく阻害された (Figure 41)。この実験結果は、NK026680 と DST の併用治療によるアロ移植心生着延長効果を担う細胞が CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 制御性 T 細胞である可能性が最も高いことを示しているが、抗 CD25 抗体は CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞も消去していることは留意すべきである。Thebault らは、ラットの心移植モデルで、免疫寛容となったグラフト内に CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞のみではなく CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞も増加し、CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞から産生される IFN- γ が免疫寛容に重要であることを示した¹⁴⁴。本研究でも、NK026680 と DST の併用治療により、グラフト内には CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞のみではなく、CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞も増加しており (data not shown)、本

研究でも CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 制御性 T 細胞以外の細胞もアロ移植心の生着延長に寄与した可能性を否定はできない。

多くの研究で、免疫抑制治療を行うと、レシピエントマウスの脾細胞とアロ脾細胞による MLR は抑制される。当初、NK026680 と DST の併用治療でも day 0 のレシピエントマウスの脾細胞とドナーの脾細胞による MLR は抑制されるものと推察していたが、興味深いことに、結果は予想に反し亢進した (Figure 5)。また、IFN- γ や IL-2 などの炎症性サイトカインも産生が亢進していた (Figure 6)。³H-thymidine を用いた MLR では実際にどの細胞集団が増殖しているか判別できない。そこで、どのような T 細胞が増殖しているかを検証するために、day0 のレシピエントマウスの脾細胞を CFSE で染色して MLR を行ったところ、NK026680 と DST の併用治療により制御性 T 細胞がドナー特異的に増殖した (Figure 10、11)。制御性 T 細胞は本来 anergic な細胞集団と言われていたが²¹⁷、本研究で NK026680 と DST の併用治療により誘導された制御性 T 細胞にはドナー抗原特異的な細胞増殖能が備わっていることが判明した。分裂した (CFSE^{low}) CD4⁺ T 細胞の約 20% が Foxp3⁺ T 細胞であり、残りの 80% は Foxp3⁻ 細胞であった。このアロ反応性 CD4⁺ Foxp3⁻ T 細胞中に免疫抑制性 T 細胞もしくは制御性 T 細胞をサポートするような細胞集団が存在する可能性は否定できない。CD4⁺ T 細胞は免疫寛容が確立されるうえでの key phenotype とも言われ¹²⁴、CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 制御性 T 細胞以外にも免疫抑制に関わる CD4⁺ T 細胞集団が多数報告されている。CD4⁺ Foxp3⁻ IL-10 産生 Tr1²¹⁸ や TGF- β 産生 Th3²¹⁹ などがその代表であるが、本研究でも制御性 T 細胞以外の抑制性の CD4⁺ T 細胞が関与している可能性が示唆される。

CFSE-MLR では、NK026680 と DST の併用治療を行った場合に他群に比し、CD4⁺ T 細胞および Foxp3⁺ CD4⁺ T 細胞がアロ抗原刺激後に有意に増殖した (Figure 10)。CD8⁺ T 細胞の増殖は DST 単独の治療の場合、他群に対して有意に亢進した (Figure 12)。これはグラフト浸潤細胞の細胞数を非常によく反映しており、NK026680 と DST の併用治療では CD4⁺ T 細胞および CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞のグラフト浸潤を促進し、DST 単独治療だと CD8⁺ T 細胞のグラフト浸潤を促進している (Figure 23、31、33)。興味深いことは、CFSE-MLR でのアロ反応性 (つまりアロ抗原との培養で分裂する) T 細胞のうちの CD8⁺ T 細胞に対する CD4⁺ T 細胞の割合 (CD4/CD8 比) は、NK026680 と DST を併用した場合にのみ CD4 に有意にシフトしていることである。さらに、NK026680 と DST を併用した場合

でも、3rd-party による抗原刺激ではこのような CD4 へのシフトは見られないことから、CD4/CD8 比がなんらかの免疫抑制機序を反映しているものと推察された。

4. NK026680 と DST の併用治療と CD8⁺ T 細胞

本研究では、NK026680 と DST の併用治療による免疫抑制機序のひとつとして、CD8⁺ T 細胞の抑制が示唆された。DST 単独治療では、移植直前の CD8⁺ T 細胞上の CD44 発現の亢進と CD62L の陰転化 (Figure 17、18)、およびアロ抗原に対する細胞増殖の亢進を認め (Figure 12)、IFN- γ 産生 CD8⁺ T 細胞が増加し (Figure 19)、移植後のグラフト内の CD8⁺ T 細胞の著明な浸潤を認めた (Figure 32、33)。しかし、この DST による CD8⁺ T 細胞の priming は、NK026680 との併用により有意に抑制された (Figure 12、17-19、29、32、33)。Iwakoshi らは、ドナー抗原に特異的なトランスジェニックマウス由来の CD8⁺ T 細胞を用いて、DST と抗 CD154 抗体によりこのドナー特異的 CD8⁺ T 細胞は消去 (deletion) されることを示した¹²²。また、Ferrer らは、DST と抗 CD154 抗体による治療が、アロ反応性 IFN- γ 産生 CD8⁺ T 細胞を抑制することを報告している¹¹⁸。

制御性 T 細胞が CD8⁺ T 細胞を抑制するとする報告が散見されるが^{123,150}、一方で、Banuelos らは DST と抗 CD154 抗体を使用した皮膚・膵島移植モデルで、抗 CD25 抗体は CD8⁺ T 細胞の消去 (deletion) を抑制しないことを報告した¹⁶⁴。本研究でも、抗 CD25 抗体の投与を行っても、グラフト内 CD8⁺ T 細胞の細胞数は投与を行わない場合と有意差がなく (Figure 43)、術前のアロ反応性 CD8⁺ T 細胞の割合にも有意差を認めなかった (Figure 45)。従って、NK026680 と DST の併用治療における CD8⁺ T 細胞の抑制機序は、制御性 T 細胞に非依存的である可能性が考えられた。

5. NK026680 と DST の併用治療と Th1 サイトカイン

本研究では、NK026680 と DST の併用治療は、移植前の状態で、レシピエント脾細胞のアロ抗原に対する IL-2 と IFN- γ の産生を亢進した (Figure 6)。IL-2 は「T 細胞の成長因子」と言われ²²⁰、免疫を賦活すると考えられてきた。実際、ヒトでは抗 IL-2 受容体抗体が臨床応用されており、臓器移植で良好な成績を収めている²²¹。また、IFN- γ も炎症性サイトカインとして知られ、マクロファージなどの自然免疫系を賦活し、固形臓器移植では急性拒絶を引き起こす^{222,223}。一方、Bishop らは、移植肝が生着する際に、二次リンパ組織における CD4⁺ T 細胞からの IL-2、IFN- γ の産生が亢進す

ることを報告し²²⁴、Yan らはラットの腎および肝移植モデルで、DST によるアロ移植片の生着が延長したレシピエント内の脾臓で、移植後早期の IFN- γ 、IL-2 産生が上昇することを報告した¹¹⁷。これらの報告は、移植片の生着の際に、Th1 サイトカインが必要であることを示唆している。実際、IFN- γ ナレシピエントでは、抗 CD40L 抗体による免疫寛容は誘導されず²²⁵、IFN- γ は免疫寛容成立における重要なサイトカインである。

IL-2 が免疫抑制に関わる機序としては、アポトーシスによるアロ反応性 T 細胞の消去²²⁶、CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞の活性化・増殖²²⁷ などが報告されており、また、IFN- γ がそれに関わる機序としては、T 細胞の消去²²⁸、制御性 T 細胞の活性化や誘導^{144,229} などが報告されている。IL-2 は通常 CD4⁺ T 細胞から分泌されるが¹¹⁷、本研究では、CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞とも各群で有意差を認めず、どのように IL-2 産生が亢進したのかは不明である。IFN- γ については、NK026680 と DST の併用治療により、移植直前 (day 0) の脾細胞の CD4⁺ T 細胞からの分泌が著明に亢進し、一方で、DST 単独治療の場合には脾細胞の CD8⁺ T 細胞からの IFN- γ 分泌が亢進していた (Figure 19)。心移植後には CD4⁺ T 細胞からの IFN- γ 産生は各群で有意差を認めなかったが、CD8⁺ T 細胞からの IFN- γ 産生は NK026680 と DST の併用治療により著明に抑制された (Figure 29)。IFN- γ の分泌のタイミングや分泌細胞などが免疫抑制や免疫賦活に重要と考えられており^{118,129,130}、本研究でも CD4⁺ T 細胞の IFN- γ 産生が免疫制御に、CD8⁺ T 細胞からの IFN- γ 産生は免疫賦活に働いた可能性がある。また、心移植後の CD4⁺ T 細胞からの IFN- γ は各群で有意差を認めないことから、移植早期の短期間において CD4⁺ T 細胞からの IFN- γ 産生がグラフトの長期生着に重要である可能性が示唆された。

総括及び結論

①本研究全体から得られた新知見

- ・ 新規化合物 NK026680 は DST と併用することにより、アロ移植心の生着を著明に延長する。
- ・ NK026680 と DST の併用治療によるアロ移植心生着延長効果はドナー特異的である。
- ・ NK026680 と DST の併用治療により、ドナー特異的制御性 T 細胞が誘導される。
- ・ NK026680 と DST の併用治療により、CD8⁺ T 細胞は抑制される。
- ・ 抗 CD25 抗体の投与により、NK026680 と DST の併用治療によるアロ移植心生着延長効果は抑制される。
- ・ 抗 CD25 抗体の投与により、グラフト内の制御性 T 細胞の増加が抑制される。

②新知見の意義

ドナー特異的な免疫抑制による移植臓器の生着期間の延長は、固形臓器移植の目標である。本研究で、新規化合物 NK026680 が、DST と併用することにより、ドナー特異的制御性 T 細胞を誘導できることを示したことは、移植医療における臨床応用の可能性を拓いた。NK026680 を休薬した後も長期に渡りグラフト生着を維持できたことは特筆に値する。また、本研究は、ドナー特異的制御性 T 細胞の生物学的特性を研究するうえで、有用なモデルの一つとなりうることを示した。

③今後の研究展開と課題

ヒトへの応用にあたり、大動物を用いた NK026680 の毒性試験と、DST 併用による免疫抑制効果の検証は必須である。また、本実験において、最終的にはグラフトが拒絶される機序を明らかにし、グラフト生着を永続させるために必要な追加治療、もしくは併用薬剤などの検討が必要と考えられた。

謝辞

本博士論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I 博士課程在学中において行った研究をまとめたものです。研究計画の立案から、基礎論文、博士論文作成の全ての過程に至るまで、終始厳しくも温かく御指導御鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究科移植外科学講座特任教授 山下健一郎先生へ心より感謝申し上げます。本研究を遂行し、基礎論文を作成するにあたり、御指導を賜りました前北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I 教授 藤堂省先生へ深く感謝申し上げます。また、学位論文を作成するにあたり、多大なる御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I 教授 武富紹信先生へ深謝致します。また、研究遂行への御助言を賜り、快く hybridoma を提供して下さった北海道大学大学院医学研究科分子神経免疫学分野教授 村上正晃先生に深謝いたします。NK026680 を御提供下さった日本化薬株式会社医薬研究所 雑賀寛様に感謝申し上げます。研究にあたってご助言を賜りましたまた北海道大学病院 臓器移植医療部 嶋村剛先生に感謝申し上げます。CFSE-MLR のプロトコルを提供してくださり、実験結果にご助言を賜りました広島大学大学院医歯薬保健学研究科消化器・移植外科学教授 大段秀樹先生、准教授 田中友加先生に感謝申し上げます。最後に、実験を共に手伝って下さり、論文作成にも多大なる御助言を頂きました北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I 柴崎晋先生、長津明久先生、後藤了一先生、小野仁先生、深作慶友先生、小林希様、五十嵐瑠美様、堀米正敏様、北海道大学医学研究院 移植外科学分野 深井原先生、および研究室の後輩の皆様方に心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1 Merrill, J. P. The artificial kidney. *N. Engl. J. Med.* **246**, 17-27 (1952).
- 2 Carrel, A. La Technique operateire des Amasomoses Vasculaires et la Transplantation des Visceres. *Lyon Med.* **98**, 859-864 (1902).
- 3 Papalois, V. E., Hakim, N. S. & Najarian, J. S. The history of Transplantation. *London: Imperial College Press*, 76-99 (2003).
- 4 Holman, E. Protein sensitization in iso-skin grafting: is the latter of practical value? *Surg. Gynecol. Obstet.* **38**, 100-106 (1924).
- 5 Merrill, J. P., Murray, J. E., Harrison, J. H., Friedman, E. A., Dealy, J. B. & Dammin, G. J. Successful homotransplantation of the kidney between nonidentical twins. *N. Engl. J. Med.* **262**, 1251-1260 (1960).
- 6 Hamberger, J., Vaysee, J., Crosnier, J., Auvert, J., Lalanne, C. M. & Hopper, J. Renal homotransplantation in man after radiation of the recipient: experience with six patients since 1959. *Am. J. Med.* **32**, 854-871 (1962).
- 7 Schwartz, R. & Dameshek, W. Drug-induced immunological tolerance. *Nature* **183**, 1682-1683 (1959).
- 8 Schwartz, R., Eisner, A. & Dameshek, W. The effect of 6-mercaptopurine on primary and secondary immune responses. *J. Clin. Invest.* **38**, 1394-1403 (1959).
- 9 Murray, J. E., Merrill, J. P., Harrison, J. H., Wilson, R. E. & Dammin, G. J. Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *N. Engl. J. Med.* **268**, 1315-1323 (1963).
- 10 Kahan, B. D. Cyclosporine. *N. Engl. J. Med.* **321**, 1725-1738 (1989).
- 11 Todo, S., Demetris, A., Ueda, Y., Imventarza, O., Cadoff, E., Zeevi, A. & Starzl, T. E. Renal transplantation in baboons under FK 506. *Surgery* **106**, 444-450; discussion 450-441 (1989).
- 12 Starzl, T. E., Todo, S., Fung, J., Demetris, A. J., Venkataramman, R. & Jain, A. FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet* **2**, 1000-1004 (1989).
- 13 Sass, D. A. & Doyle, A. M. Liver and Kidney Transplantation: A Half-Century Historical Perspective. *Med. Clin. North Am.* **100**, 435-448 (2016).
- 14 Meier-Kriesche, H. U., Schold, J. D., Srinivas, T. R. & Kaplan, B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am. J. Transplant.* **4**, 378-383 (2004).
- 15 Sayegh, M. H. & Carpenter, C. B. Transplantation 50 years later--progress,

- challenges, and promises. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2761-2766 (2004).
- 16 Hariharan, S., Johnson, C. P., Bresnahan, B. A., Taranto, S. E., McIntosh, M. J. & Stablein, D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N. Engl. J. Med.* **342**, 605-612 (2000).
 - 17 Pascual, M., Theruvath, T., Kawai, T., Tolkoff-Rubin, N. & Cosimi, A. B. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* **346**, 580-590 (2002).
 - 18 Vella, J. P., Spadafora-Ferreira, M., Murphy, B., Alexander, S. I., Harmon, W., Carpenter, C. B. & Sayegh, M. H. Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation* **64**, 795-800 (1997).
 - 19 Ciubotariu, R., Liu, Z., Colovai, A. I., Ho, E., Itescu, S., Ravalli, S., Hardy, M. A., Cortesini, R., Rose, E. A. & Suciu-Foca, N. Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts. *J. Clin. Invest.* **101**, 398-405 (1998).
 - 20 Lakkis, F. G. & Sayegh, M. H. Memory T cells: a hurdle to immunologic tolerance. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 2402-2410 (2003).
 - 21 Nankivell, B. J., Borrows, R. J., Fung, C. L., O'Connell, P. J., Allen, R. D. & Chapman, J. R. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2326-2333 (2003).
 - 22 Salama, A. D., Remuzzi, G., Harmon, W. E. & Sayegh, M. H. Challenges to achieving clinical transplantation tolerance. *J. Clin. Invest.* **108**, 943-948 (2001).
 - 23 Owen, R. D. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. *Science* **102**, 400-401 (1945).
 - 24 Anderson, D. The use of skin grafting to distinguish between monozygotic and dizygotic twins in cattle. *Heredity* **5**, 379-397 (1951).
 - 25 Billingham, R. E., Brent, L. & Medawar, P. B. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* **172**, 603-606 (1953).
 - 26 Burnet, F. M. & Fenner, F. The production of antibodies. *2nd ed. Melbourne and London: Macmillan* (1949).
 - 27 Burnet, F. M. The clonal selection theory of acquired immunity. *London: Cambridge University Press* (1959).
 - 28 Hall, B. M. CD4+CD25+ T Regulatory Cells in Transplantation Tolerance: 25 Years On. *Transplantation* **100**, 2533-2547 (2016).

- 29 Batchelor, J. R., Fabre, J. & Morris, P. J. Passive enhancement of kidney allografts: potentiation with antithymocyte serum. *Transplantation* **13**, 610-613 (1972).
- 30 French, M. E. & Batchelor, J. R. Immunological enhancement of rat kidney grafts. *Lancet* **2**, 1103-1106 (1969).
- 31 Batchelor, J. R. & Welsh, K. L. Mechanisms of enhancement of kidney allograft survival. *Brit. Med. Bull.* **32**, 3113-3117 (1976).
- 32 Hall, B. M., Jelbart, M. E. & Dorsch, S. E. Alloreactivity in rats treated with cyclosporin A to prolong cardiac graft survival. *Transplant. Proc.* **15**, 504-507 (1983).
- 33 Lechler, R. I. & Batchelor, J. R. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J. Exp. Med.* **155**, 31-41 (1982).
- 34 Hall, B. M., Jelbart, M. E., Gurley, K. E. & Dorsch, S. E. Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. Mediation of specific suppression by T helper/inducer cells. *J. Exp. Med.* **162**, 1683-1694 (1985).
- 35 Hutchinson, I. V. & Zola, H. Antigen-reactive cell opsonization (ARCO): a mechanism of immunological enhancement. *Transplantation* **23**, 464-469 (1977).
- 36 Hall, B. M., Gurley, K. & Dorsch, S. E. Specific unresponsiveness in rats with prolonged allograft survival is dependent upon the graft and suppressor T cells. *Transplant. Proc.* **19**, 495-496 (1987).
- 37 Binz, H. & Wigzell, H. Successful induction of specific tolerance to transplantation antigens using autoimmunisation against the recipient's own natural antibodies. *Nature* **262**, 294-295 (1976).
- 38 Dorsch, S. & Roser, B. Suppressor cells in transplantation tolerance. II. Identification and probable mode of action of chimeric suppressor T cells. *Transplantation* **33**, 525-529 (1982).
- 39 Jeme, N. K. The generative grammar of the immune system. Nobel lecture, 8 December 1984. *Biosci. Rep.* **5**, 439-451 (1984).
- 40 Batchelor, J. R. Antiidiotypic responses in the suppression of allograft rejection. *Transplant. Proc.* **21**, 57-58 (1989).
- 41 Braun, M. Y., McCormack, A., Webb, G. & Batchelor, J. R. Evidence for clonal anergy as a mechanism responsible for the maintenance of transplantation

- tolerance. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1462-1468 (1993).
- 42 Gershon, R. K. & Kondo, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* **18**, 723-737 (1970).
- 43 Kilshaw, P. J., Brent, L. & Pinto, M. Suppressor T cells in mice made unresponsive to skin allografts. *Nature* **255**, 489-491 (1975).
- 44 Dorsch, S. & Roser, B. T cells mediate transplantation tolerance. *Nature* **258**, 233-235 (1975).
- 45 Cross, A. M., Leuchars, E. & Miller, J. F. Studies on the recovery of the immune response in irradiated mice thymectomized in adult life. *J. Exp. Med.* **119**, 837-850 (1964).
- 46 Hall, B. M., Roser, B. J. & Dorsch, S. E. A model for study of the cellular mechanisms that maintain long-term enhancement of cardiac graft survival. *Transplant. Proc.* **11**, 958-961 (1979).
- 47 Hall, B. M. Mechanisms maintaining enhancement of allografts. I. Demonstration of a specific suppressor cell. *J. Exp. Med.* **161**, 123-133 (1985).
- 48 Hall, B. M., Dorsch, S. & Roser, B. The cellular basis of allograft rejection in vivo. II. The nature of memory cells mediating second set heart graft rejection. *J. Exp. Med.* **148**, 890-902 (1978).
- 49 Thiviolet, J., Monier, J. C., Ruel, J. P. & Richard, M. H. Antinuclear autoantibodies in Swiss mice thymectomized at birth. *Nature* **214**, 1134-1136 (1967).
- 50 Penhale, W. J., Farmer, A., McKenna, R. P. & Irvine, W. J. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clin. Exp. Immunol.* **15**, 225-236 (1973).
- 51 Kilshaw, P. J. & Brent, L. Further studies on suppressor T cells in mice unresponsive to H-2-incompatible skin grafts. *Transplant. Proc.* **9**, 717-719 (1977).
- 52 Hall, B. M. & Dorsch, S. E. Cells mediating allograft rejection. *Immunol. Rev.* **77**, 31-59 (1984).
- 53 Jaques, B. C., Ahmiedat, H., Alastair Gracie, J., Marshall, H. E., Middleton, S. E., Bolton, E. M. & Bradley, J. A. Thymus-dependent, anti-CD4-induced tolerance to rat cardiac allografts. *Transplantation* **66**, 1291-1299 (1998).
- 54 Hall, B. M., Pearce, N. W., Gurley, K. E. & Dorsch, S. E. Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. III. Further characterization of the CD4+

- suppressor cell and its mechanisms of action. *J. Exp. Med.* **171**, 141-157 (1990).
- 55 Hall, B. M. Cells mediating allograft rejection. *Transplantation* **51**, 1141-1151 (1991).
- 56 Hall, B. M., de Saxe, I. & Dorsch, S. E. The cellular basis of allograft rejection in vivo. III. Restoration of first-set rejection of heart grafts by T helper cells in irradiated rats. *Transplantation* **36**, 700-705 (1983).
- 57 Dallman, M. J. & Mason, D. W. Role of thymus-derived and thymus-independent cells in murine skin allograft rejection. *Transplantation* **33**, 221-223 (1982).
- 58 Brideau, R. J., Carter, P. B., McMaster, W. R., Mason, D. W. & Williams, A. F. Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* **10**, 609-615 (1980).
- 59 Stumbles, P. & Mason, D. Activation of CD4+ T cells in the presence of a nondepleting monoclonal antibody to CD4 induces a Th2-type response in vitro. *J. Exp. Med.* **182**, 5-13 (1995).
- 60 Okumura, K., Herzenberg, L. A., Murphy, D. B. & McDevitt, H. O. Selective expression of H-2 (i-region) loci controlling determinants on helper and suppressor T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **144**, 685-698 (1976).
- 61 Taniguchi, M. & Miller, J. F. Enrichment of specific suppressor T cells and characterization of their surface markers. *J. Exp. Med.* **146**, 1450-1454 (1977).
- 62 Steinmetz, M., Minard, K., Horvath, S., McNicholas, J., Srelinger, J., Wake, C., Long, E., Mach, B. & Hood, L. A molecular map of the immune response region from the major histocompatibility complex of the mouse. *Nature* **300**, 35-42 (1982).
- 63 Pearce, N. W., Spinelli, A., Gurley, K. E., Dorsch, S. E. & Hall, B. M. Mechanisms maintaining antibody-induced enhancement of allografts. II. Mediation of specific suppression by short lived CD4+ T cells. *J. Immunol.* **143**, 499-506 (1989).
- 64 Ligocki, A. J. & Niederkorn, J. Y. Advances on Non-CD4 + Foxp3+ T Regulatory Cells: CD8+, Type 1, and Double Negative T Regulatory Cells in Organ Transplantation. *Transplantation* **99**, 1553-1559 (2015).
- 65 Pearce, N. W., Spinelli, A., Gurley, K. E. & Hall, B. M. Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. V. Dependence of CD4+ suppressor cells on the presence of alloantigen and cytokines, including interleukin 2. *Transplantation*

- 55, 374-380 (1993).
- 66 Plain, K. M., Verma, N. D., Tran, G. T., Nomura, M., Boyd, R., Robinson, C. M., Hodgkinson, S. J. & Hall, B. M. Cytokines affecting CD4(+) T regulatory cells in transplant tolerance. Interleukin-4 does not maintain alloantigen specific CD4(+)CD25(+) Treg. *Transpl. Immunol.* **29**, 51-59 (2013).
 - 67 Soulillou, J. P., Peyronnet, P., Le Mauff, B., Hourmant, M., Olive, D., Mawas, C., Delaage, M., Hirn, M. & Jacques, Y. Prevention of rejection of kidney transplants by monoclonal antibody directed against interleukin 2. *Lancet* **1**, 1339-1342 (1987).
 - 68 Steiger, J., Nickerson, P. W., Steurer, W., Moscovitch-Lopatin, M. & Strom, T. B. IL-2 knockout recipient mice reject islet cell allografts. *J. Immunol.* **155**, 489-498 (1995).
 - 69 Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**, 2348-2357 (1986).
 - 70 He, X. Y., Chen, J., Verma, N., Plain, K., Tran, G. & Hall, B. M. Treatment with interleukin-4 prolongs allogeneic neonatal heart graft survival by inducing T helper 2 responses. *Transplantation* **65**, 1145-1152 (1998).
 - 71 Qin, S., Cobbold, S. P., Pope, H., Elliott, J., Kioussis, D., Davies, J. & Waldmann, H. "Infectious" transplantation tolerance. *Science* **259**, 974-977 (1993).
 - 72 Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155**, 1151-1164 (1995).
 - 73 Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Fioretti, M. C. & Puccetti, P. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* **3**, 1097-1101 (2002).
 - 74 Rubtsov, Y. P., Rasmussen, J. P., Chi, E. Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W. R., Jr., Muller, W. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* **28**, 546-558 (2008).
 - 75 Andersson, J., Tran, D. Q., Pesu, M., Davidson, T. S., Ramsey, H., O'Shea, J. J.

- & Shevach, E. M. CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *J. Exp. Med.* **205**, 1975-1981 (2008).
- 76 Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S. & Vignali, D. A. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**, 566-569 (2007).
- 77 Kuczma, M., Pawlikowska, I., Kopij, M., Podolsky, R., Rempala, G. A. & Kraj, P. TCR repertoire and Foxp3 expression define functionally distinct subsets of CD4⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* **183**, 3118-3129 (2009).
- 78 Hall, B. M., Tran, G. T., Verma, N. D., Plain, K. M., Robinson, C. M., Nomura, M. & Hodgkinson, S. J. Do Natural T Regulatory Cells become Activated to Antigen Specific T Regulatory Cells in Transplantation and in Autoimmunity? *Front. Immunol.* **4**, 208 (2013).
- 79 Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061 (2003).
- 80 Afaneh, C., Muthukumar, T., Lubetzky, M., Ding, R., Snopkowski, C., Sharma, V. K., Seshan, S., Dadhania, D., Schwartz, J. E. & Suthanthiran, M. Urinary cell levels of mRNA for OX40, OX40L, PD-1, PD-L1, or PD-L2 and acute rejection of human renal allografts. *Transplantation* **90**, 1381-1387 (2010).
- 81 Regateiro, F. S., Chen, Y., Kendal, A. R., Hilbrands, R., Adams, E., Cobbold, S. P., Ma, J., Andersen, K. G., Betz, A. G., Zhang, M., Madhiwalla, S., Roberts, B., Waldmann, H., Nolan, K. F. & Howie, D. Foxp3 expression is required for the induction of therapeutic tissue tolerance. *J. Immunol.* **189**, 3947-3956 (2012).
- 82 Graca, L., Cobbold, S. P. & Waldmann, H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J. Exp. Med.* **195**, 1641-1646 (2002).
- 83 Campbell, D. J. & Koch, M. A. Phenotypical and functional specialization of FOXP3⁺ regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 119-130 (2011).
- 84 Yamazaki, S., Inaba, K., Tarbell, K. V. & Steinman, R. M. Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells including suppressors of alloreactivity. *Immunol. Rev.* **212**, 314-329 (2006).
- 85 Bell, Y., Shoskes, D., Morris, P. & Wood, K. Induction of specific unresponsiveness using transfected cells expressing donor major histocompatibility complex molecules: evidence for indirect presentation of allopeptides in vivo. *Transplant. Proc.* **25**, 359 (1993).
- 86 Ochando, J. C., Krieger, N. R. & Bromberg, J. S. Direct versus indirect allorecognition: Visualization of dendritic cell distribution and interactions

- during rejection and tolerization. *Am. J. Transplant.* **6**, 2488-2496 (2006).
- 87 Wood, K. J., Bushell, A. & Hester, J. Regulatory immune cells in transplantation. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 417-430 (2012).
- 88 Opelz, G., Sengar, D. P., Mickey, M. R. & Terasaki, P. I. Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants. *Transplant. Proc.* **5**, 253-259 (1973).
- 89 Pfaff, W. W., Fennell, R. S., Howard, R. J., Ireland, J. F. & Scornik, J. C. Planned random donor blood transfusion in preparation for transplantation. Sensitization and graft survival. *Transplantation* **38**, 701-703 (1984).
- 90 Frisk, B., Brynger, H. & Sandberg, L. Two random transfusions before primary renal transplantation--four years' experience from a single center. *Transplant. Proc.* **14**, 386-388 (1982).
- 91 Jackson, A., McSherry, C., Butters, K., Diko, M., Almond, P. S., Matas, A. J. & Reinsmoen, N. L. Pretransplant exposure to donor HLA-DR antigen in random transfusion units and the development of donor antigen-specific hyporeactivity. *Hum. Immunol.* **55**, 148-153 (1997).
- 92 Potter, D., Garovoy, M., Hopper, S., Terasaki, P. & Salvatierra, O., Jr. Effect of donor-specific transfusions on renal transplantation in children. *Pediatrics* **76**, 402-405 (1985).
- 93 Broyer, M., Gagnadoux, M. F., Guest, G., Beurton, D., Niaudet, P., Habib, R. & Busson, M. Kidney transplantation in children: results of 383 grafts performed at Enfants Malades Hospital from 1973 to 1984. *Adv. Nephrol. Necker Hosp.* **16**, 307-333 (1987).
- 94 Chavers, B. M., Nevins, T. E., Knaack, M., Melvin, T. & Mauer, S. M. Early acute tubular necrosis, late rejection in pediatric renal transplantation with donor-specific transfusions. *Transplant. Proc.* **19**, 1526-1527 (1987).
- 95 Opelz, G. Improved kidney graft survival in nontransfused recipients. *Transplant. Proc.* **19**, 149-152 (1987).
- 96 Scornik, J. C., Bromberg, J. S., Norman, D. J., Bhandari, M., Gitlin, M. & Petersen, J. An update on the impact of pre-transplant transfusions and allosensitization on time to renal transplant and on allograft survival. *BMC Nephrol.* **14**, 217 (2013).
- 97 Wood, K. J., Bushell, A. & Jones, N. D. Immunologic unresponsiveness to alloantigen in vivo: a role for regulatory T cells. *Immunol. Rev.* **241**, 119-132 (2011).

- 98 Kishimoto, K., Yuan, X., Auchincloss, H., Jr., Sharpe, A. H., Mandelbrot, D. A. & Sayegh, M. H. Mechanism of action of donor-specific transfusion in inducing tolerance: role of donor MHC molecules, donor co-stimulatory molecules, and indirect antigen presentation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 2423-2428 (2004).
- 99 Siemionow, M. & Agaoglu, G. Role of blood transfusion in transplantation: a review. *J. Reconstr. Microsurg.* **21**, 555-563 (2005).
- 100 Quezada, S. A., Fuller, B., Jarvinen, L. Z., Gonzalez, M., Blazar, B. R., Rudensky, A. Y., Strom, T. B. & Noelle, R. J. Mechanisms of donor-specific transfusion tolerance: preemptive induction of clonal T-cell exhaustion via indirect presentation. *Blood* **102**, 1920-1926 (2003).
- 101 Hara, M., Kingsley, C. I., Niimi, M., Read, S., Turvey, S. E., Bushell, A. R., Morris, P. J., Powrie, F. & Wood, K. J. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J. Immunol.* **166**, 3789-3796 (2001).
- 102 Kamel, G., Stephan, A., Masri, M. A., Barbari, A., Kelany, H., Younan, F. & Karam, A. Donor-specific transfusion under the new cyclosporine A formulation Consupren versus azathioprine, Imuran. *Transplant. Proc.* **29**, 2960-2961 (1997).
- 103 Cheigh, J. S., Suthanthiran, M., Fotino, M., Riggio, R. R., Schechter, N., Stubenbord, W. T., Rubin, A. L. & Stenzel, K. H. Minimal sensitization and excellent renal allograft outcome following donor-specific blood transfusion with a short course of cyclosporine. *Transplant. Proc.* **23**, 1023 (1991).
- 104 Svajger, U. & Rozman, P. Tolerogenic dendritic cells: molecular and cellular mechanisms in transplantation. *J. Leukoc. Biol.* **95**, 53-69 (2014).
- 105 Ochando, J. C., Homma, C., Yang, Y., Hidalgo, A., Garin, A., Tacke, F., Angeli, V., Li, Y., Boros, P., Ding, Y., Jessberger, R., Trinchieri, G., Lira, S. A., Randolph, G. J. & Bromberg, J. S. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat. Immunol.* **7**, 652-662 (2006).
- 106 Salvatierra, O., Jr., Vincenti, F., Amend, W., Potter, D., Iwaki, Y., Opelz, G., Terasaki, P., Duca, R., Cochrum, K., Hanes, D., Stoney, R. J. & Feduska, N. J. Deliberate donor-specific blood transfusions prior to living related renal transplantation. A new approach. *Ann. Surg.* **192**, 543-552 (1980).
- 107 Balshi, J. D., Francfort, J. W. & Perloff, L. J. The influence of ultraviolet irradiation on the blood transfusion effect. *Surgery* **98**, 243-250 (1985).
- 108 Markees, T. G., Pearson, T., Cuthbert, A., Pearson, A. L., Shultz, L. D., Leif, J.,

- Phillips, N. E., Mordes, J. P., Greiner, D. L. & Rossini, A. A. Evaluation of donor-specific transfusion sources: unique failure of bone marrow cells to induce prolonged skin allograft survival with anti-CD154 monoclonal antibody. *Transplantation* **78**, 1601-1608 (2004).
- 109 Niimi, M., Pearson, T. C., Larsen, C. P., Alexander, D. Z., Hollenbaugh, D., Aruffo, A., Linsley, P. S., Thomas, E., Campbell, K., Fanslow, W. C., Geha, R. S., Morris, P. J. & Wood, K. J. The role of the CD40 pathway in alloantigen-induced hyporesponsiveness in vivo. *J. Immunol.* **161**, 5331-5337 (1998).
- 110 Gao, J., McIntyre, M. S., D'Souza, C. A. & Zhang, L. Pretransplant infusion of donor B cells enhances donor-specific skin allograft survival. *PLoS One* **8**, e77761 (2013).
- 111 Morelli, A. E. & Larregina, A. T. Apoptotic cell-based therapies against transplant rejection: role of recipient's dendritic cells. *Apoptosis* **15**, 1083-1097 (2010).
- 112 Ikemoto, T., Takita, M., Levy, M. F., Shimada, M. & Naziruddin, B. CD11b(+) cells in donor-specific transfusion prolonged allogeneic skin graft survival through indoleamine 2,3-dioxygenase. *Cell Immunol.* **283**, 81-90 (2013).
- 113 Wang, Y., Wang, H., Bronson, R., Fu, Y. & Yang, Y. G. Rapid dendritic cell activation and resistance to allotolerance induction in anti-CD154-treated mice receiving CD47-deficient donor-specific transfusion. *Cell Transplant.* **23**, 355-363 (2014).
- 114 Luo, X., Pothoven, K. L., McCarthy, D., DeGutes, M., Martin, A., Getts, D. R., Xia, G., He, J., Zhang, X., Kaufman, D. B. & Miller, S. D. ECDI-fixed allogeneic splenocytes induce donor-specific tolerance for long-term survival of islet transplants via two distinct mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 14527-14532 (2008).
- 115 Chen, G., Kheradmand, T., Bryant, J., Wang, S., Tasch, J., Wang, J. J., Zhang, Z. & Luo, X. Intra-graft CD11b(+) IDO(+) cells mediate cardiac allograft tolerance by ECDI-fixed donor splenocyte infusions. *Am. J. Transplant.* **12**, 2920-2929 (2012).
- 116 Garcia, M. R., Ledgerwood, L., Yang, Y., Xu, J., Lal, G., Burrell, B., Ma, G., Hashimoto, D., Li, Y., Boros, P., Grisotto, M., van Rooijen, N., Matesanz, R., Tacke, F., Ginhoux, F., Ding, Y., Chen, S. H., Randolph, G., Merad, M., Bromberg, J. S. & Ochando, J. C. Monocytic suppressive cells mediate

- cardiovascular transplantation tolerance in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 2486-2496 (2010).
- 117 Yan, Y., Shastry, S., Richards, C., Wang, C., Bowen, D. G., Sharland, A. F., Painter, D. M., McCaughan, G. W. & Bishop, G. A. Posttransplant administration of donor leukocytes induces long-term acceptance of kidney or liver transplants by an activation-associated immune mechanism. *J. Immunol.* **166**, 5258-5264 (2001).
- 118 Ferrer, I. R., Wagener, M. E., Song, M. & Ford, M. L. CD154 blockade alters innate immune cell recruitment and programs alloreactive CD8⁺ T cells into KLRG-1(high) short-lived effector T cells. *PLoS One* **7**, e40559 (2012).
- 119 Verghese, D. A., Yadav, A., Bizargity, P., Murphy, B., Heeger, P. S. & Schroppel, B. Costimulatory blockade-induced allograft survival requires Beclin1. *Am. J. Transplant.* **14**, 545-553 (2014).
- 120 Lee, I., Wang, L., Wells, A. D., Dorf, M. E., Ozkaynak, E. & Hancock, W. W. Recruitment of Foxp3⁺ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. *J. Exp. Med.* **201**, 1037-1044 (2005).
- 121 van Maurik, A., Fazekas de St Groth, B., Wood, K. J. & Jones, N. D. Dependency of direct pathway CD4⁺ T cells on CD40-CD154 costimulation is determined by nature and microenvironment of primary contact with alloantigen. *J. Immunol.* **172**, 2163-2170 (2004).
- 122 Iwakoshi, N. N., Mordes, J. P., Markees, T. G., Phillips, N. E., Rossini, A. A. & Greiner, D. L. Treatment of allograft recipients with donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody leads to deletion of alloreactive CD8⁺ T cells and prolonged graft survival in a CTLA4-dependent manner. *J. Immunol.* **164**, 512-521 (2000).
- 123 Kalache, S., Lakhani, P. & Heeger, P. S. Effects of preexisting autoimmunity on heart graft prolongation after donor-specific transfusion and anti-CD154. *Transplantation* **97**, 12-19 (2014).
- 124 Markees, T. G., Phillips, N. E., Gordon, E. J., Noelle, R. J., Shultz, L. D., Mordes, J. P., Greiner, D. L. & Rossini, A. A. Long-term survival of skin allografts induced by donor splenocytes and anti-CD154 antibody in thymectomized mice requires CD4(+) T cells, interferon-gamma, and CTLA4. *J. Clin. Invest.* **101**, 2446-2455 (1998).
- 125 Pinelli, D. F., Wagener, M. E., Liu, D., Yamniuk, A., Tamura, J., Grant, S., Larsen, C. P., Suri, A., Nadler, S. G. & Ford, M. L. An anti-CD154 domain

- antibody prolongs graft survival and induces Foxp3(+) iTreg in the absence and presence of CTLA-4 Ig. *Am. J. Transplant.* **13**, 3021-3030 (2013).
- 126 Burrell, B. E. & Bromberg, J. S. Fates of CD4+ T cells in a tolerant environment depend on timing and place of antigen exposure. *Am. J. Transplant.* **12**, 576-589 (2012).
- 127 Kingsley, C. I., Karim, M., Bushell, A. R. & Wood, K. J. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J. Immunol.* **168**, 1080-1086 (2002).
- 128 Francis, R. S., Feng, G., Tha-In, T., Lyons, I. S., Wood, K. J. & Bushell, A. Induction of transplantation tolerance converts potential effector T cells into graft-protective regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* **41**, 726-738 (2011).
- 129 Sawitzki, B., Kingsley, C. I., Oliveira, V., Karim, M., Herber, M. & Wood, K. J. IFN- γ production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo. *J. Exp. Med.* **201**, 1925-1935 (2005).
- 130 Kitade, H., Kawai, M., Koshiba, T., Giulietti, A., Overbergh, L., Rutgeerts, O., Valckx, D., Waer, M., Mathieu, C. & Pirenne, J. Early Accumulation of Interferon- γ in Grafts Tolerized by Donor-Specific Blood Transfusion: Friend or Enemy? *Transplantation* **78**, 1747-1755 (2004).
- 131 Abe, Y., Urakami, H., Ostanin, D., Zibari, G., Hayashida, T., Kitagawa, Y. & Grisham, M. B. Induction of Foxp3-expressing regulatory T-cells by donor blood transfusion is required for tolerance to rat liver allografts. *PLoS One* **4**, e7840 (2009).
- 132 Kataoka, M., Margenthaler, J. A., Ku, G. & Flye, M. W. Development of infectious tolerance after donor-specific transfusion and rat heart transplantation. *J. Immunol.* **171**, 204-211 (2003).
- 133 Josien, R., Heslan, M., Brouard, S., Souillou, J. P. & Cuturi, M. C. Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion. *Blood* **92**, 4539-4544 (1998).
- 134 Bushell, A., Karim, M., Kingsley, C. I. & Wood, K. J. Pretransplant blood transfusion without additional immunotherapy generates CD25+CD4+ regulatory T cells: a potential explanation for the blood-transfusion effect. *Transplantation* **76**, 449-455 (2003).
- 135 Bushell, A., Morris, P. J. & Wood, K. J. Induction of operational tolerance by random blood transfusion combined with anti-CD4 antibody therapy. A protocol with significant clinical potential. *Transplantation* **58**, 133-139 (1994).

- 136 Zhang, G., Chen, G., Liu, L., Qiu, J. & Chen, L. A novel accelerated rejection model for mouse cardiac transplantation involving presensitization with donor splenocytes. *J. Surg. Res.* **181**, 146-155 (2013).
- 137 Newton, W. T. & Anderson, C. B. Planned preimmunization of renal allograft recipients. *Surgery* **74**, 430-436 (1973).
- 138 Ahmed, S. M., Baslaim, G., Eshelby, D., Guttman, R. D. & Tchervakov, J. I. The effect of transfusion with donor-specific peripheral lymphocytes, whole blood or erythrocytes on cardiac allograft survival in cyclosporine-treated rats. *Transplantation* **57**, 634-637 (1994).
- 139 Sato, Y., Farges, O., Buffello, D., Hatakeyama, K. & Bismuth, H. Cytokine mRNA expression in the liver after administration of donor leukocytes. *Transplant. Proc.* **30**, 3855-3857 (1998).
- 140 Kawai, M., Kitade, H., Mathieu, C., Waer, M. & Pirenne, J. Inhibitory and stimulatory effects of cyclosporine A on the development of regulatory T cells in vivo. *Transplantation* **79**, 1073-1077 (2005).
- 141 Lee, K., Nguyen, V., Lee, K. M., Kang, S. M. & Tang, Q. Attenuation of donor-reactive T cells allows effective control of allograft rejection using regulatory T cell therapy. *Am. J. Transplant.* **14**, 27-38 (2014).
- 142 Wu, K., Xiang, F., Yuan, J., Zeng, Z., Zhou, H., Chang, S. & Chen, Z. K. A combination of donor specific transfusion and rapamycin prolongs cardiac allograft survival in mice. *Transplant. Proc.* **40**, 3699-3701 (2008).
- 143 Yamashita, K., Ollinger, R., McDaid, J., Sakahama, H., Wang, H., Tyagi, S., Csizmadia, E., Smith, N. R., Soares, M. P. & Bach, F. H. Heme oxygenase-1 is essential for and promotes tolerance to transplanted organs. *FASEB J.* **20**, 776-778 (2006).
- 144 Thebault, P., Condamine, T., Heslan, M., Hill, M., Bernard, I., Saoudi, A., Josien, R., Anegon, I., Cuturi, M. C. & Chiffolleau, E. Role of IFN γ in allograft tolerance mediated by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by induction of IDO in endothelial cells. *Am. J. Transplant.* **7**, 2472-2482 (2007).
- 145 Goto, R., Yamashita, K., Aoyagi, T., Ueki, S., Uno, M., Oura, T., Kobayashi, N., Igarashi, R., Shibasaki, S., Wakayama, K., Hirokata, G., Shibata, T., Zaitzu, M., Umezawa, K., Ozaki, M. & Todo, S. Immunomodulatory effect of nuclear factor-kappaB inhibition by dehydroxymethylepoxyquinomicin in combination with donor-specific blood transfusion. *Transplantation* **93**, 777-786 (2012).
- 146 Ferrer, I. R., Wagener, M. E., Song, M., Kirk, A. D., Larsen, C. P. & Ford, M. L.

- Antigen-specific induced Foxp3⁺ regulatory T cells are generated following CD40/CD154 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 20701-20706 (2011).
- 147 Quezada, S. A., Bennett, K., Blazar, B. R., Rudensky, A. Y., Sakaguchi, S. & Noelle, R. J. Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154-induced graft tolerance: the interplay of clonal anergy and immune regulation. *J. Immunol.* **175**, 771-779 (2005).
- 148 van der Touw, W., Burrell, B., Lal, G. & Bromberg, J. S. NK cells are required for costimulatory blockade induced tolerance to vascularized allografts. *Transplantation* **94**, 575-584 (2012).
- 149 Cippa, P. E., Gabriel, S. S., Kraus, A. K., Chen, J., Wekerle, T., Guimezanes, A., Wuthrich, R. P. & Fehr, T. Bcl-2 inhibition to overcome memory cell barriers in transplantation. *Am. J. Transplant.* **14**, 333-342 (2014).
- 150 Sucher, R., Fischler, K., Oberhuber, R., Kronberger, I., Margreiter, C., Ollinger, R., Schneeberger, S., Fuchs, D., Werner, E. R., Watschinger, K., Zelger, B., Tellides, G., Pilat, N., Pratschke, J., Margreiter, R., Wekerle, T. & Brandacher, G. IDO and regulatory T cell support are critical for cytotoxic T lymphocyte-associated Ag-4 Ig-mediated long-term solid organ allograft survival. *J. Immunol.* **188**, 37-46 (2012).
- 151 Shao, W., Chen, J., Dai, H., Peng, Y., Wang, F., Xia, J., Thorlacius, H., Zhu, Q. & Qi, Z. Combination of monoclonal antibodies with DST inhibits accelerated rejection mediated by memory T cells to induce long-lived heart allograft acceptance in mice. *Immunol. Lett.* **138**, 122-128 (2011).
- 152 Starzl, T. E. Chimerism and tolerance in transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101 Suppl 2**, 14607-14614 (2004).
- 153 Starzl, T. E., Demetris, A. J., Murase, N., Ildstad, S., Ricordi, C. & Trucco, M. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet* **339**, 1579-1582 (1992).
- 154 Starzl, T. E., Demetris, A. J., Trucco, M., Ramos, H., Zeevi, A., Rudert, W. A., Kocova, M., Ricordi, C., Ildstad, S. & Murase, N. Systemic chimerism in human female recipients of male livers. *Lancet* **340**, 876-877 (1992).
- 155 Eikmans, M., van Halteren, A. G., van Besien, K., van Rood, J. J., Drabbels, J. J. & Claas, F. H. Naturally acquired microchimerism: implications for transplantation outcome and novel methodologies for detection. *Chimerism* **5**, 24-39 (2014).
- 156 Burlingham, W. J. Chimerism after organ transplantation: is there any clinical

- significance? *Clin. Transplant.* **10**, 110-117 (1996).
- 157 Morin, N., Lamoureux, E., Lipman, M., Tector, J., Tchervenkov, J. I. & Metrakos, P. Donor-specific portal transfusion augments microchimerism in a porcine model of small bowel transplantation. *Transplant. Proc.* **32**, 1290-1291 (2000).
- 158 Shirwan, H., Wang, C., Barwari, L. & Cramer, D. V. Recipient-donor microchimerism is not a prerequisite for the maintenance of allograft tolerance. *Transplant. Proc.* **29**, 1182-1183 (1997).
- 159 Sivasai, K. S., Alevy, Y. G., Duffy, B. F., Brennan, D. C., Singer, G. G., Shenoy, S., Lowell, J. A., Howard, T. & Mohanakumar, T. Peripheral blood microchimerism in human liver and renal transplant recipients: rejection despite donor-specific chimerism. *Transplantation* **64**, 427-432 (1997).
- 160 Ito, H., Hamano, K., Gohra, H., Katoh, T., Fujimura, Y., Zempo, N. & Esato, K. Role of microchimerism on long-term graft survival after donor-specific transfusion in a rat heart transplantation model. *Transplant. Proc.* **30**, 3862-3864 (1998).
- 161 Macleod, A. M., Hillis, A. N., Mather, A., Bone, J. M. & Catto, G. R. Effect of cyclosporin, previous third-party transfusion, and pregnancy on antibody development after donor-specific transfusion before renal transplantation. *Lancet* **1**, 416-418 (1987).
- 162 Horuzsko, A., Gyodi, E., Reti, M., Onody, K., Perner, F., Kassay, M. & Petranyi, G. G. Non-cytotoxic blocking antibodies and suppressor cells induced by donor-specific transfusions in healthy volunteers and potential kidney transplant recipients. *Immunol. Lett.* **26**, 127-130 (1990).
- 163 Eisenberger, U., Seifried, A., Patey, N., Kappeler, A., Noel, L. H., Frey, F. J. & Korner, M. FoxP3 positive T cells in graft biopsies from living donor kidney transplants after donor-specific transfusions. *Transplantation* **87**, 138-142 (2009).
- 164 Banuelos, S. J., Markees, T. G., Phillips, N. E., Appel, M. C., Cuthbert, A., Leif, J., Mordes, J. P., Shultz, L. D., Rossini, A. A. & Greiner, D. L. Regulation of skin and islet allograft survival in mice treated with costimulation blockade is mediated by different CD4⁺ cell subsets and different mechanisms. *Transplantation* **78**, 660-667 (2004).
- 165 Wells, A. D., Li, X. C., Strom, T. B. & Turka, L. A. The role of peripheral T-cell deletion in transplantation tolerance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*

- 356, 617-623 (2001).
- 166 Delgoffe, G. M. & Powell, J. D. Feeding an army: The metabolism of T cells in activation, anergy, and exhaustion. *Mol. Immunol.* **68**, 492-496 (2015).
- 167 Trivedi, H. L. Immunobiology of rejection and adaptation. *Transplant. Proc.* **39**, 647-652 (2007).
- 168 Riella, L. V., Liu, T., Yang, J., Chock, S., Shimizu, T., Mfarrej, B., Batal, I., Xiao, X., Sayegh, M. H. & Chandraker, A. Deleterious effect of CTLA4-Ig on a Treg-dependent transplant model. *Am. J. Transplant.* **12**, 846-855 (2012).
- 169 Ichiguchi, O., Yamaguchi, Y., Akizuki, E., Matsumura, F., Matsuda, T., Yamada, S., Liang, J., Mori, K. & Ogawa, M. Prolonged survival of rat hepatic allografts treated with a pretransplant donor-specific blood transfusion is associated with reduced cytokine-induced neutrophil chemoattractant expression. *Transplantation* **65**, 465-472 (1998).
- 170 Bishop, D. K., Chan Wood, S., Eichwald, E. J. & Orosz, C. G. Immunobiology of allograft rejection in the absence of IFN- γ : CD8⁺ effector cells develop independently of CD4⁺ cells and CD40-CD40 ligand interactions. *J. Immunol.* **166**, 3248-3255 (2001).
- 171 Wood, K. J. & Sawitzki, B. Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo. *Trends. Immunol.* **27**, 183-187 (2006).
- 172 Konieczny, B. T., Dai, Z., Elwood, E. T., Saleem, S., Linsley, P. S., Baddoura, F. K., Larsen, C. P., Pearson, T. C. & Lakkis, F. G. IFN- γ is critical for long-term allograft survival induced by blocking the CD28 and CD40 ligand T cell costimulation pathways. *J. Immunol.* **160**, 2059-2064 (1998).
- 173 Coley, S. M., Ford, M. L., Hanna, S. C., Wagener, M. E., Kirk, A. D. & Larsen, C. P. IFN- γ dictates allograft fate via opposing effects on the graft and on recipient CD8 T cell responses. *J. Immunol.* **182**, 225-233 (2009).
- 174 Eljaafari, A., Li, Y. P. & Miossec, P. IFN- γ , as secreted during an alloresponse, induces differentiation of monocytes into tolerogenic dendritic cells, resulting in FoxP3⁺ regulatory T cell promotion. *J. Immunol.* **183**, 2932-2945 (2009).
- 175 Jiang, X. F., Zhu, L., Cui, Z. M., Guo, D. W., Sun, W. Y., Lin, L., Tang, Y. F., Wang, X. F. & Liang, J. Transplant long-surviving induced by CD40-CD40 ligand costimulation blockade is dependent on IFN- γ through its effect on CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Transpl. Immunol.* **24**, 113-118 (2011).
- 176 Josien, R., Douillard, P., Guillot, C., Muschen, M., Anegon, I., Chetrit, J.,

- Menoret, S., Vignes, C., Souillou, J. P. & Cuturi, M. C. A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J. Clin. Invest.* **102**, 1920-1926 (1998).
- 177 Marie, J. C., Letterio, J. J., Gavin, M. & Rudensky, A. Y. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **201**, 1061-1067 (2005).
- 178 Saiga, K., Toyoda, E., Tokunaka, K., Masuda, A., Matsumoto, S., Mashiba, H., Kuramochi, H., Nemoto, K., Abe, F., Kawagishi, N., Furukawa, H. & Ono, M. NK026680, a novel compound suppressive of dendritic cell function, ameliorates mortality in acute lethal graft-versus-host reaction in mice. *Bone Marrow Transplant.* **37**, 317-323 (2006).
- 179 Bagdatoglu, C., Saray, A., Surucu, H. S., Ozturk, H. & Tamer, L. Effect of trapidil in ischemia/reperfusion injury of peripheral nerves. *Neurosurgery* **51**, 212-219; discussion 219-220 (2002).
- 180 Maresta, A., Balducelli, M., Cantini, L., Casari, A., Chioin, R., Fabbri, M., Fontanelli, A., Monici Preti, P. A., Repetto, S. & De Servi, S. Trepidil (triazolopyrimidine), a platelet-derived growth factor antagonist, reduces restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Results of the randomized, double-blind STARC study. Studio Trepidil versus Aspirin nella Restenosi Coronarica. *Circulation* **90**, 2710-2715 (1994).
- 181 Zhou, L., Ismaili, J., Stordeur, P., Thielemans, K., Goldman, M. & Pradier, O. Inhibition of the CD40 pathway of monocyte activation by triazolopyrimidine. *Clin. Immunol.* **93**, 232-238 (1999).
- 182 Zhou, L., Schandene, L., Mordvinov, V. A., Chatelain, P., Pradier, O., Goldman, M. & Stordeur, P. Trepidil inhibits monocyte CD40 expression by preventing IFN-gamma-induced STAT1 S727 phosphorylation. *Int. Immunopharmacol.* **4**, 863-871 (2004).
- 183 Saiga, K., Tokunaka, K., Ichimura, E., Toyoda, E., Abe, F., Yoshida, M., Furukawa, H., Nose, M. & Ono, M. NK026680, a novel suppressant of dendritic cell function, prevents the development of rapidly progressive glomerulonephritis and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody in SCG/Kj mice. *Arthritis. Rheum.* **54**, 3707-3715 (2006).
- 184 Hara, Y., Funeshima-Fuji, N., Fujino, M., Tokunaka, K., Abe, F., Sato, Y., Hatakeyama, K., Takahara, S., Ezaki, T., Kimura, H. & Li, X. K. A novel chemical compound, NK026680, targets dendritic cells to prolong recipient

- survival after rat liver grafting. *Transplantation* **84**, 407-414 (2007).
- 185 Shibasaki, S., Yamashita, K., Goto, R., Oura, T., Wakayama, K., Hirokata, G., Shibata, T., Igarashi, R., Haga, S., Ozaki, M. & Todo, S. NK026680 inhibits T-cell function in an IL-2-dependent manner and prolongs cardiac allograft survival in rats. *Transpl. Immunol.* **26**, 42-49 (2012).
- 186 Shibasaki, S., Yamashita, K., Yanagawa, Y., Goto, R., Wakayama, K., Hirokata, G., Tsunetoshi, Y., Zaitzu, M., Igarashi, R., Haga, S., Ozaki, M. & Todo, S. Dendritic cells conditioned with NK026680 prolong cardiac allograft survival in mice. *Transplantation* **93**, 1229-1237 (2012).
- 187 Corry, R. J., Winn, H. J. & Russell, P. S. Primarily vascularized allografts of hearts in mice. The role of H-2D, H-2K, and non-H-2 antigens in rejection. *Transplantation* **16**, 343-350 (1973).
- 188 Wadman, M. London's disastrous drug trial has serious side effects for research. *Nature* **440**, 388-389 (2006).
- 189 Takeuchi, T., Lowry, R. P. & Konieczny, B. Heart allografts in murine systems. The differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance. *Transplantation* **53**, 1281-1294 (1992).
- 190 Kheradmand, T., Wang, S., Bryant, J., Tasch, J. J., Lerret, N., Pothoven, K. L., Houlihan, J. L., Miller, S. D., Zhang, Z. J. & Luo, X. Ethylenecarbodiimide-fixed donor splenocyte infusions differentially target direct and indirect pathways of allorecognition for induction of transplant tolerance. *J. Immunol.* **189**, 804-812 (2012).
- 191 Ochando, J. C., Yopp, A. C., Yang, Y., Garin, A., Li, Y., Boros, P., Llodra, J., Ding, Y., Lira, S. A., Krieger, N. R. & Bromberg, J. S. Lymph Node Occupancy Is Required for the Peripheral Development of Alloantigen-Specific Foxp3+ Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **174**, 6993-7005 (2005).
- 192 Liston, A. & Gray, D. H. Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 154-165 (2014).
- 193 Zhang, N., Schroppel, B., Lal, G., Jakubzick, C., Mao, X., Chen, D., Yin, N., Jessberger, R., Ochando, J. C., Ding, Y. & Bromberg, J. S. Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity* **30**, 458-469 (2009).
- 194 Lakkis, F. G., Arakelov, A., Konieczny, B. T. & Inoue, Y. Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat. Med.* **6**, 686-688 (2000).

- 195 Goodison, S., Urquidi, V. & Tarin, D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol. Pathol.* **52**, 189-196 (1999).
- 196 Baaten, B. J., Cooper, A. M., Swain, S. L. & Bradley, L. M. Location, location, location: the impact of migratory heterogeneity on T cell function. *Front. Immunol.* **4**, 311 (2013).
- 197 Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-712 (1999).
- 198 Mueller, S. N., Gebhardt, T., Carbone, F. R. & Heath, W. R. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 137-161 (2013).
- 199 Chen, T., Darrasse-Jeze, G., Bergot, A. S., Courau, T., Churlaud, G., Valdivia, K., Strominger, J. L., Ruocco, M. G., Chaouat, G. & Klatzmann, D. Self-specific memory regulatory T cells protect embryos at implantation in mice. *J. Immunol.* **191**, 2273-2281 (2013).
- 200 Darrasse-Jeze, G., Bergot, A. S., Durgeau, A., Billiard, F., Salomon, B. L., Cohen, J. L., Bellier, B., Podsypanina, K. & Klatzmann, D. Tumor emergence is sensed by self-specific CD44^{hi} memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 2648-2662 (2009).
- 201 Iellem, A., Mariani, M., Lang, R., Recalde, H., Panina-Bordignon, P., Sinigaglia, F. & D'Ambrosio, D. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **194**, 847-853 (2001).
- 202 Mahnke, K., Qian, Y., Knop, J. & Enk, A. H. Induction of CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood* **101**, 4862-4869 (2003).
- 203 Brenk, M., Scheler, M., Koch, S., Neumann, J., Takikawa, O., Hacker, G., Bieber, T. & von Bubnoff, D. Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T regulatory cells. *J. Immunol.* **183**, 145-154 (2009).
- 204 Vassalli, G. Dendritic cell-based approaches for therapeutic immune regulation in solid-organ transplantation. *J. Transplant.* **2013**, 761429 (2013).
- 205 Motta, J. M. & Rumjanek, V. M. Sensitivity of Dendritic Cells to Microenvironment Signals. *J. Immunol. Res.* **2016**, 4753607 (2016).

- 206 Turnquist, H. R., Raimondi, G., Zahorchak, A. F., Fischer, R. T., Wang, Z. & Thomson, A. W. Rapamycin-Conditioned Dendritic Cells Are Poor Stimulators of Allogeneic CD4⁺ T Cells, but Enrich for Antigen-Specific Foxp3⁺ T Regulatory Cells and Promote Organ Transplant Tolerance. *J. Immunol.* **178**, 7018-7031 (2007).
- 207 Harden, J. L. & Egilmez, N. K. Indoleamine 2,3-dioxygenase and dendritic cell tolerogenicity. *Immunol. Invest.* **41**, 738-764 (2012).
- 208 Khan, A., Fu, H., Tan, L. A., Harper, J. E., Beutelspacher, S. C., Larkin, D. F., Lombardi, G., McClure, M. O. & George, A. J. Dendritic cell modification as a route to inhibiting corneal graft rejection by the indirect pathway of allorecognition. *Eur. J. Immunol.* **43**, 734-746 (2013).
- 209 Munn, D. H., Sharma, M. D., Lee, J. R., Jhaver, K. G., Johnson, T. S., Keskin, D. B., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, S. J., Burgess, R., Slingluff, C. L., Jr. & Mellor, A. L. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* **297**, 1867-1870 (2002).
- 210 Huang, F. P., Platt, N., Wykes, M., Major, J. R., Powell, T. J., Jenkins, C. D. & MacPherson, G. G. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.* **191**, 435-444 (2000).
- 211 Christensen, H. R., Frokiaer, H. & Pestka, J. J. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J. Immunol.* **168**, 171-178 (2002).
- 212 Akbari, O., DeKruyff, R. H. & Umetsu, D. T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* **2**, 725-731 (2001).
- 213 Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 677-704 (2008).
- 214 Pena-Cruz, V., McDonough, S. M., Diaz-Griffero, F., Crum, C. P., Carrasco, R. D. & Freeman, G. J. PD-1 on immature and PD-1 ligands on migratory human Langerhans cells regulate antigen-presenting cell activity. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 2222-2230 (2010).
- 215 Hori, J., Wang, M., Miyashita, M., Tanemoto, K., Takahashi, H., Takemori, T., Okumura, K., Yagita, H. & Azuma, M. B7-H1-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. *J. Immunol.* **177**, 5928-5935 (2006).

- 216 Sandner, S. E., Clarkson, M. R., Salama, A. D., Sanchez-Fueyo, A., Yagita, H., Turka, L. A. & Sayegh, M. H. Mechanisms of tolerance induced by donor-specific transfusion and ICOS-B7h blockade in a model of CD4+ T-cell-mediated allograft rejection. *Am. J. Transplant.* **5**, 31-39 (2005).
- 217 Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J. & Sakaguchi, S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* **10**, 1969-1980 (1998).
- 218 Roncarolo, M. G., Gregori, S., Lucarelli, B., Ciceri, F. & Bacchetta, R. Clinical tolerance in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol. Rev.* **241**, 145-163 (2011).
- 219 Singh, B., Krawetz, M. D., De Lima, R. M., Mukherjee, R., Chaturvedi, P., Lee-Chan, E., Leiter, E. H. & Summers, K. L. Role of TGF-beta in Self-Peptide Regulation of Autoimmunity. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (2017).
- 220 Morgan, D. A., Ruscetti, F. W. & Gallo, R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* **193**, 1007-1008 (1976).
- 221 Nashan, B., Light, S., Hardie, I. R., Lin, A. & Johnson, J. R. Reduction of acute renal allograft rejection by daclizumab. Daclizumab Double Therapy Study Group. *Transplantation* **67**, 110-115 (1999).
- 222 Rocha, P. N., Plumb, T. J., Crowley, S. D. & Coffman, T. M. Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunol. Rev.* **196**, 51-64 (2003).
- 223 Belardelli, F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *APMIS* **103**, 161-179 (1995).
- 224 Bishop, G. A. & McCaughan, G. W. Immune activation is required for the induction of liver allograft tolerance: implications for immunosuppressive therapy. *Liver. Transpl.* **7**, 161-172 (2001).
- 225 Jiang, X., Sun, W., Guo, D., Cui, Z., Zhu, L., Lin, L., Tang, Y., Wang, X. & Liang, J. Cardiac allograft acceptance induced by blockade of CD40-CD40L costimulation is dependent on CD4+CD25+ regulatory T cells. *Surgery* **149**, 336-346 (2011).
- 226 Qian, S., Lu, L., Fu, F., Li, Y., Li, W., Starzl, T. E., Fung, J. J. & Thomson, A. W. Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts: evidence for deletion of cytotoxic T cells and implications for tolerance induction. *J.*

- Immunol.* **158**, 4654-4661 (1997).
- 227 Davidson, T. S., DiPaolo, R. J., Andersson, J. & Shevach, E. M. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* **178**, 4022-4026 (2007).
- 228 Yu, X. Z., Albert, M. H., Martin, P. J. & Anasetti, C. CD28 ligation induces transplantation tolerance by IFN-gamma-dependent depletion of T cells that recognize alloantigens. *J. Clin. Invest.* **113**, 1624-1630 (2004).
- 229 Feng, G., Wood, K. J. & Bushell, A. Interferon-gamma conditioning ex vivo generates CD25+CD62L+Foxp3+ regulatory T cells that prevent allograft rejection: potential avenues for cellular therapy. *Transplantation* **86**, 578-589 (2008).