

## 論 文 要 旨

**First experience with the use of a recombinant CD3 immunotoxin as induction therapy in pig-to-primate xenotransplantation: the effect of T-cell depletion on outcome**

ブタ・霊長類間異種腎移植導入期における Recombinant CD3

Immunotoxin の初期使用経験

—導入期 T細胞除去が Thymokidney 異種腎移植の予後に及ぼす影響—

西 村 博 昭

## 【序論および目的】

ブタ・霊長類間異種移植の最大の免疫バリアである異種間超急性拒絶反応は、ブタ細胞が発現する  $\alpha$  1,3-galactose (Gal)糖鎖抗原と霊長類血清に存在する抗 Gal 抗体が反応することにより引き起こされるが、Gal 抗原をノックアウトした GalT-KO ブタをドナーとすることによって、現在ではこの超急性拒絶反応は克服されている。しかしながらドナー胸腺移植を併用せずにブタ腎臓を移植した場合は、移植後 30 日以内に細胞性拒絶および細胞性拒絶に誘発される液性拒絶で拒絶される。一方、ブタ腎臓をドナー胸腺を血管移植することによる Thymokidney (胸腺腎)として同時移植した症例では、平均 50 日以上、最長 83 日の正常腎機能を呈し、異種移植腎が異種間超急性拒絶および細胞性拒絶反応を示さないことを報告している (山田ら、Nature Med 2005、Am J Transplant 2009)。この実験系では Thymokidney が免疫寛容誘導戦略の主軸であるが、Thymokidney が免疫制御能 (宿主 T 細胞の再教育) を発揮するには移植後 2-3 週間が必要である。したがって導入期に宿主の既存成熟 T 細胞による排除反応 (拒絶反応) から移植胸腺を守るためには、導入期に宿主の既存 T 細胞を一過性に除去する必要があることが小動物実験から示唆されている。本研究では (1) 前臨床ブタ・霊長類異種移植モデルでどの程度の T 細胞除去が必要となるか、(2) T 細胞除去はこれまでの polyclonal 抗体 (Antithymocyte globulin; ATG) 主体ではなく、CD3 陽性または CD2 陽性 T 細胞特異的除去を目的とした monoclonal 抗体 (anti-monkey CD3 recombinant immunotoxin; anti-CD3 rIT または anti-human CD2 antibody; LoCD2) 主体の導入療法で可能であるかの 2 点を検討した。

## 【材料および方法】

(A) 異種移植を行わないヒヒ 2 例 (Group1) に anti-CD3rIT を投与し、T 細胞除去効果を検討した。続いて (B) GalT-KO ドナーからヒヒへの異種間 Thymokidney 移植を行い、導入期 T 細胞除去方法として anti-CD3 rIT を投与した 2 例 (Group2)、LoCD2 を投与した 2 例 (Group3) の 2 群に分け異種移植後腎機能と T 細胞除去効果を比較・検討した。

## 【結果】

(A) Group1 では anti-CD3 rIT 投与後1週間でこれまでの ATG 投与群に匹敵する T細胞除去が得られ、特に CD3 陽性 T細胞の特異的除去効果が認められた。(B) Group2 では、移植腎の細胞性拒絶は抑えられ十分な異種移植腎機能を呈したものの、術後 15、23 日目にそれぞれ肺炎、心不全で死亡した。加えて経過中に anti-CD3 rIT による肝機能障害が認められた。Group3 では移植腎はそれぞれ術後 13、14 日目に細胞性・液性異種拒絶反応で拒絶された。

T細胞除去療法後の T細胞数は、Group2 において、術後 14 日間で CD3 陽性 T細胞数が 150-250 細胞/ul に維持されたが、Group3 では CD3 陽性 T細胞数が術後 7 日目までに 300 細胞/ul 以上に回復するのが確認された。

## 【結論及び考察】

先に報告した Thymokidney 異種移植腎機能が平均 50 日以上（最長 83 日）の正常腎機能を呈し、導入期 T細胞除去療法に ATG を利用した 5 例（ATG 投与群）では導入期 CD3 陽性 T細胞数は 50-150 細胞/ul に維持されていた。反面、T細胞除去療法後 CD3 陽性 T細胞数が 50 細胞/ul 以下の状態が遷延した症例では、サイトメガロウイルス感染症が発症していた。一方、Group2、Group3 の結果から導入期 CD3 陽性 T細胞数が 250 細胞/ul 以上の場合、移植胸腺が宿主 T細胞を再教育する以前に胸腺とともに腎臓も拒絶されることが確認された。以上の結果から導入期での CD3 陽性 T細胞数が重要な予後規定因子となり、至適 CD3 陽性 T細胞数は 50-150 細胞/ul と診断された。

anti-CD3 rIT は有効な T細胞除去効果を有し特に CD3 陽性 T細胞を特異的に除去しえる monoclonal 抗体であったが、実際に異種移植に用いるためには投与濃度や投与期間の更なる検討が必要であることが確認された。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 202 号	学位申請者	西村 博昭
審査委員	主査	小賤 健一郎	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	夏越 祥次	副査 堂地 勉
	副査	松藤 凡	副査 井本 浩

**First experience with the use of a recombinant CD3 immunotoxin as induction therapy in pig-to-primate xenotransplantation: the effect of T-cell depletion on outcome**

(ブタ・霊長類間異種腎移植導入期における Recombinant CD3 Immunotoxin の初期使用経験 —導入期 T 細胞除去が Thymokidney 異種腎移植の予後に及ぼす影響—)

ブタ細胞が発現する  $\alpha 1,3$ -galactose (Gal)糖鎖抗原をノックアウトした GalT-KO ブタを Donor として、山田らが考案・確立した Thymokidney (胸腺腎; ドナー胸腺血管移植法) の異種移植症例では、異種間超急性拒絶反応および細胞性拒絶反応を示さず、長期間(平均 50 日以上、最長 83 日)正常腎機能が維持されることを報告している(山田ら、Nature Med 2005、Am J Transplant 2009)。この実験系では Thymokidney が宿主 T 細胞の再教育をおこなうことによって、免疫寛容が誘導されている。この免疫制御能発揮のためには、移植導入期(移植後 2-3 週間)に移植胸腺を Recipient の T 細胞による拒絶反応から回避するために、同時期に T 細胞を一過性に除去する必要がある。

そこで学位申請者らは(1)異種腎移植を行うことなくヒヒ 2 例(Group1)に anti-CD3 recombinant immunotoxin (anti-CD3rIT)を投与し、T 細胞除去効果を確認検討し、続いて(2)異種 Thymokidney 移植(Donor:GalT-KO ブタ、Recipient:ヒヒ)を行い、導入期 T 細胞除去方法はそれぞれ anti-CD3 rIT を投与した 2 例(Group2)、anti-human CD2 antibody (LoCD2) を投与した 2 例(Group3)の 2 群に分け、異種移植後腎機能と T 細胞除去効果をそれぞれの群およびこれまでの ATG 主体導入療法群(AJT 2010)と比較・検討し、その結果以下のことが判明した。(1) Group1 では anti-CD3 rIT 投与後 1 週間で、ATG 主体導入療法群に匹敵する T 細胞除去が得られ、特に CD3 陽性 T 細胞の特異的除去効果が認められた。

(2) Group2 では、移植腎の細胞性拒絶は抑えられ、ATG 主体療法群に匹敵する十分な異種移植腎機能を呈したものの、術後 15、23 日目にそれぞれ肺炎、心不全で死亡した。また経過中に anti-CD3 rIT 投与後の肝機能障害が認められた。(3) Group3 では移植腎は術後 13、14 日目に細胞性・液性異種拒絶反応で拒絶された。(4) T 細胞除去療法後の T 細胞数は、Group2 において、術後 14 日間で CD3 陽性 T 細胞数が 150-250 細胞/ul に維持されたが、Group3 では CD3 陽性 T 細胞数が術後 7 日目までに 300 細胞/ul 以上に回復するのが確認された。更に、以上の結果と、先に報告した導入期 T 細胞除去療法に ATG を利用した ATG 主体療法群の異種移植腎機能正常維持群 5 例(正常腎機能平均 50 日以上、最長 83 日)との結果比較から、導入期での CD3 陽性 T 細胞数が、移植後腎機能の重要な予後規定因子となり、至適 CD3 陽性 T 細胞数は 50-150 細胞/ul と示唆された。anti-CD3 rIT は有効な T 細胞除去効果を有し、特に CD3 陽性 T 細胞を特異的に除去しえる monoclonal 抗体であるが、臨床応用に向け、その親和性ならびに投与期間の更なる検討が必要であることが確認された。

本研究は、異種移植腎の臨床応用にむけ導入免疫療法を組み立てる上で、移植胸腺を導入期に拒絶から保護するために導入期に適切な T 細胞除去を行うこと、効果的かつ副作用のない T 細胞除去 monoclonal 抗体の開発が必要であることを明らかにした点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判断した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 202 号		学位申請者	西村 博昭
審査委員	主査	小賤 健一郎	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	夏越 祥次	副査	堂地 勉
	副査	松藤 凡	副査	井本 浩

主査および副査の5名は、平成24年5月30日、学位申請者 西村 博昭 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 本研究においてT細胞除去抗体としてanti-CD3recombinant immunotoxin (anti-CD3rIT)を選択した理由は何であったか。

回答) 指導教官山田教授は、ブタ・霊長類間でのCD4+あるいはCD8+T細胞反応は、同種移植間T細胞反応と同等かそれ以上であることを1995年のJournal of Immunologyに報告している。このin vitro実験結果から、異種移植のレシピエントCD4+細胞、CD8+細胞をともに移植導入期に除去する目的で、anti-CD3rITをT細胞除去抗体に選択した。

質問2) 異種移植においてCD3以外に最近の知見で拒絶反応に関与が判明しているものがあるか。

回答) 最近の知見では拒絶においてメモリーT細胞の関与が指摘されている。

質問3) Thymokidneyの胸腺移植において、リンパ球homingで判明していることはあるか。

回答) 長期着生が得られた症例では、Thymokidney内ブタ胸腺でのヒヒT細胞分化が確認できた。

質問4) anti-CD3rIT使用の際、肝機能悪化が問題となるが、どのような原因が考えられるか。

回答) 病理学検討はその原因究明において非常に重要であるが、本実験ではAST ALT上昇時の肝生検は行っていないため、その明らかな原因は判明していない。

質問5) anti-CD3rIT使用の際の肝機能障害出現時、ビリルビンの上昇はなかったのか。

回答) わずかな上昇はみられたが、移植手術を行うのに支障となるほどではなかった。

質問6) anti-CD3rIT使用例は感染で失っている。何か感染対策を行っているか。

回答) 異種移植においても一般的な抗生剤やガンシクロビル投与で感染予防を行い、肺炎や腸炎の臨床徴候があるときには抗生剤の変更を行っている。これは臨床の移植、特に強い免疫抑制下にあるような移植患者様と同様である。

質問7) 本実験において肺炎で死亡したのは何例か。

回答) anti-CD3rIT使用2例中2例が肺炎で死亡した。

質問8) 異種移植のDonorはブタが最もふさわしいのか。

回答) 臓器の大きさ、生理学的類似性、繁殖性、倫理面から最もブタがDonorとしてふさわしいといえる。

質問9) Donorとしてヒヒを用いて臨床異種移植を行った例はあるか。

回答) サルを腎臓Donorとして異種腎移植をヒトへ行った報告がある。霊長類をドナーとして用いた場合は免疫学的に異種間の強い既存自然抗体が存在しないため超急性拒絶反応は生じなかったが、数ヶ月後に感染症で亡くなっている。

質問10) 肺炎以外に異種移植における感染症はサイトメガロ感染症(CMV感染症)が多いのか。

回答) 本実験では異種移植レシピエントとしてヒヒを用いているが、残念ながらガンシクロビルはヒヒCMVに効果が少ないという特徴があり、CMV感染症がT細胞除去後の感染症として生じている。

質問11) anti-CD3rITの投与量を変えることにより、ATG投与より効果的になる可能性があるか。

回答) 可能性はある。今後、anti-CD3rIT の T 細胞との親和性が更に高いものが開発されたり、その投与量が減少されるか、または至適投与期間を見出すことでより効果的な結果がでることは期待し得る。

質問 12) ヒトの小児では胸腺は大きく、成長とともに退縮していくが、大人のブタでは胸腺はあるのか、機能しているのか。

回答) 成長とともにブタ胸腺はヒト胸腺と同様に退縮する。これまでの実験結果から、退縮胸腺は若年胸腺より免疫寛容能が劣ることが判明している。その実験結果から、Thymokidney 作製には生後 6-8 週までの若年ブタを用いる。

質問 13) Thymokidney の胸腺は腎臓に対してだけ寛容を誘導するのか、それとも全身的に寛容を誘導するのか。

回答) 山田研究室の異種 Thymokidney 移植長期生着例においては、細胞性傷害性試験の結果で、Donor (ブタ) 特異的免疫無反応が確認されており、異種間における全身的ドナー特異的免疫寛容の可能性が示唆されている。

質問 14) 異種移植では、胸腺同時移植を行えば、他臓器の移植はうまくいくのか。

回答) 可能性は十分にある、ドナー臓器が肝、心の場合は臓器被膜下スペース確保が困難であるため、山田教授が考案された胸腺を直接血管移植する Vascularized Thymic Lobe 移植との同時移植がその戦略と考えている。

質問 15) Fig1 の Group1 B243 の細胞数は preinjection level に戻ったとなっているが、グラフ上は戻っていないようにみえる。

回答) T 細胞数は移植前レベルまでは回復していないものの、60%まで回復し、普通に生活できるレベルに戻ったので、戻ったとしている。

質問 16) Fig2a の B256 の Day0 では血小板数が少ないようであるが、支障はないのか。

回答) 移植手術を行い、支障になることはなかった。

質問 17) B257 の剖検所見で心筋虚血所見があったとのことであるが、冠動脈の病変の変化はなかったのか。

回答) 剖検例では冠動脈の明らかな変化を認めなかった。非常に早期の虚血性変化が考えられる。

質問 18) B257 は高度の蛋白尿があったとのことであるが、これは rejection ではないのか。

回答) 異種移植拒絶反応の病理学的所見として間質ならびに尿細管細胞への細胞浸潤、間質出血ならびに血管炎が代表的なものであるが、これらの拒絶所見がないことは確認されている。山田研究室では、異種腎移植において蛋白尿がいわゆる典型的拒絶とはことなり、何らかの異種間反応で生じる実験結果を有している。世界の他の研究室では移植腎が移植後 1-2 週間の拒絶されるため、その蛋白尿まで指摘していない。山田研究室では、病理学的検討から、蛋白尿の原因として(1) preformed non-Gal antibody により糸球体内皮障害、(2) 異種間不適合性による糸球体 Podocyte の微小変化が生じることに着目し、その機序解明を目指して研究を進めている。

質問 19) CD154 monoclonal antibody の作用機序を述べよ。

回答) Costimulatory Pathway の一つである CD154-CD40 経路において、CD154 分子を阻害し、T 細胞活性化と B 細胞活性化を抑制する。

質問 20) 異種移植における costimulatory blockade の役割はどのようなものであるか。

回答) 同種移植の免疫寛容の機序として Signal 1 (TCR) と Signal 2 (costimulatory pathway) を何らかの方法で遮断することが挙げられている。異種移植においても Signal 2 である、Costimulatory pathway を遮断することは重要な戦略であり、その目的で本実験でも CD154 monoclonal antibody を用いている。Signal 1 に関して、anti-CD3rIT を用いた。

質問 21) 内因性レトロウイルス(PERV)の問題点はどのようになっているか。

回答) ブタ内因性レトロウイルスとして、3種類の PERV が指摘されている。我々の共同研究者の検討で、本実験で用いている MGH GalTKO ブタは、この PERV のヒト細胞への感染がないまたは非常にすくないブタ細胞から樹立されており、感染への対応としている。また、PERV に関しては、国際異種移植学会の見解として、それ自体が異種移植の絶対禁忌要件になっていない。これまでの基礎データならびに 10 年前にスウェーデンで行われた数例の臨床豚島の経過観察でも、PERV による病気が発症した例は皆無であった。このことから、現在、異種移植後患者様の長期経過観察を行うことを条件に、PERV は禁止条件とはなっていない。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。