サル腎移植における低侵襲性前処置による mixed chimerism と免疫寛容の導入

河合 達郎・星野 智昭・藤岡 繁^{3*}・清水 憲次^{3*}
田邊 一成^{1*}・大川 智彦^{2*}・太田 和夫
A.B. Cosimi^{4*}・David H. Sachs^{4*}

Jpn. J. Clin. Immun., 18 (6) : 670~674, 1995.

腎移植はいまや腎不全に対する確立された治療手段として広く受け入れられているが、その長期的な成績となるとサイクロスポリンを使用した生体腎移植の成績でさえ10年で50%台と決して満足のものではない(全国統計)。さらに、年6%のペースで移植腎は脱落しており、15年、20年先の成績となると悲観的にならざるをえない。この移植腎の脱落は主に慢性拒絶反応が原因と考えられるが、免疫抑制療法を主体とした現在の治療体系ではこれを完全に制御できる見通しは立っていない。また、長期的な免疫抑制による悪性腫瘍の発生、糖尿病をはじめとするさまざまな副作用、小児レシピエントにおける成長障害なども大きな問題となっており、現在の薬剤を中心とした免疫抑制法を用いる臓器移植を再考する時期にきている。そこで、こういった問題を根本的に解決するために、免疫寛容を臨床で実現することが移植外科における最も重要な課題となってきたのである。

近年、免疫学の進歩により、生体がいかに自己に対して免疫寛容を獲得するかは機序が解明されてきた。それとともに、人為的に免疫寛容を誘導する数多くの手法も開発されてきたが、骨髄移植によるmixed chimerismは、そのなかで最も重要な免疫寛容誘導法と考えられている。理論的には以下のような胸腺におけるclonal deletionで説明されている。正常な状態では成熟過程にあるT細胞のなかの自己反応性のクローンは胸腺において自己の樹状突起細胞などのMHC抗原と反応することにより除去(clonal dele-

tion)されている(図1A)。もしここでドナーの骨髄細胞や脾細胞を移植することにより、ドナー由来の樹状突起細胞を胸腺に移住させることができるなら、ドナーに反応するクローンは除去されることになる(図1B)。このためには、致死量の放射線照射や化学療法により成熟T細胞を完全に除去してから、ドナーの骨髄あるいは脾細胞を移植し、chimerismを誘導することが必要と考えられてきた。ところが、そのような致死的な前処置は通常の臓器移植において行うのは危険性が高く、致死的前処置と骨髄移植を組み合わせた大動物の実験でも、前処置の毒性とGVHDによる死亡が多く、臨床応用に結びつく結果は出されていなかった^{1,2)}。

1988年、David H. Sachsらはマウスの皮膚移植において、低線量の全身照射(300 rad)、胸腺の局所照射(700 rad)と抗T cell monoclonal抗体を組み合わせることによって、比較的侵襲の低い前処置により免疫寛容を誘導することに成功した³⁾。理論的にはドナー骨髄細胞のengraftmentに必要な物理的スペースを作るための最低限の全身照射(300 rad)、レシピエントの成熟T細胞を除去するための抗リンパ球抗体の投与、さらに700 radの胸腺照射を加えることによってmixed chimerismを誘導し、主に胸腺におけるclonal deletionにより免疫寛容を導入するというものである⁴⁾。胸腺照射の必要な理由として、マウスにおいては、全身照射と抗T cell monoclonal抗体による前処置後、末梢のT cellはほぼ完全に除去できるが、胸腺にだけはT cellが残存するためと考えられている。さらに、われわれは、臨床応用を目的として、この低侵襲性のプロトコルをサルの腎移植モデルに用

東京女子医科大学第3外科 ^{1*}同 泌尿器科 ^{2*}同
放射線科 ^{3*}富士バイオメディクス ^{4*}Massachusetts General Hospital

いて研究を進めてきた。その結果、この低侵襲性の前処置に1カ月の cyclosporine 投与を加えることにより mixed chimerism の誘導と免疫寛容の導入に成功した⁵⁾。このサルにおいて成功した低侵襲性の前処置は、移植前5日と6日の低線量の全身照射 (150 rad×2)、移植前日における 700 rad の胸腺照射および移植前3日間の Anti-Thymocyte Globulin (50

mg/kg/day) から構成され、腎移植と同日にドナーの骨髄を移植し、さらに術後1カ月のみ cyclosporine を投与するというものである (図2)。マウスにおいて必要でなかった cyclosporine が大動物において必要であった理由は、マウスにおいては mono-

図 1A 正常における自己反応性クローンの除去

骨髄から胸腺に到達したT細胞の前駆細胞は、その成熟過程で同じく骨髄から胸腺に移住してきた樹状突起細胞上の自己MHCと反応することにより、自己反応性のクローンを失う。

図 1B ドナー骨髄移植後における免疫寛容
ドナーであるBの骨髄幹細胞が移植されると、この中から分化したドナーの樹状突起細胞 (dendritic cell) は胸腺に移住する。レシピエントであるAの未熟T細胞は、その成熟過程でドナーとレシピエント両方のMHCと反応し、自己とドナーに対して反応するクローンを失う。

図 2 低侵襲性プロトコール

TBI: Total Body irradiation

DBM: Donor Bone Marrow

TI: Thymic Irradiation

CyA: cyclosporine A

ATG: Anti-Thymocyte Globulin

図 3 骨移植後約1年の皮膚移植

移植した腎臓のドナーからの皮膚（凍結保存）のみが生着した。コントロールの皮膚（freshと凍結保存してあった third party の皮膚）はともに移植後10日目までに拒絶された。

clonal 抗体 (anti CD 4 と anti CD 8) によりリンパ節など組織におけるリンパ球を含めてほぼ完全なリンパ球除去が可能であるのに対して、大動物ではこれを完全に除去することができなかったからである。このプロトコールにより現在までに6頭（全身照射 300 rad 施行した3頭中1頭および全身照射 150 rad 2回分割照射した5頭中5頭）において mixed chimerism と免疫寛容を誘導することに成功し、最長生着日数は880日を超えている。また、この免疫寛容の安定性とドナー特異性は術後1年に行った皮膚移植においてドナーからの皮膚のみが特異的に生着したことから証明されている（図3）。コントロールとして、非放射線照射（n=2, Regimen B）、サイクロスポリン非投与（n=2, regimen A）、非骨髄移植（n=2, Regimen F）では、全例において chimerism は誘導されず、移植腎も早期に拒絶されている。さらに現在、TBIの線量をさらに減量したプロトコールを検討しているが、TBIを150 radまで減量すると（Regimen C）まったく chimerism を誘導することはできなかった。また、TBI 230 rad、胸腺照射なし（Regimen D）では chimerism を誘導することは可能であるものの、移植腎は cyclosporine 中止後ただちに拒絶された。さらに、TBI 230 rad に胸腺照射 700 rad

を移植6日前に同時に行う Regimen E では、chimerism は誘導でき、移植腎も cyclosporine を中止した後、ただちに拒絶されてしまうことはないものの、移植腎機能は安定せず、移植後100日前後に拒絶された（表1）。現在さらに、オリジナルなプロトコールと同様の移植1日前に胸腺照射を行うプロトコールを検討中である。

まだ最終的な結論を出すには遠く及ばないが、これまでの研究の結果、以下のような結論を得ている。1) chimerism の誘導は免疫寛容を得るための必要条件ではあるが、それだけでは十分でない。2) 胸腺照射はこのプロトコールにおいて必須。3) 当初、TBIの目的はドナー骨髄細胞を定着させるための物理的スペースを作ることにあると考えていたが、chimerism が得られる230 radのTBIが寛容を誘導できなかったことから、免疫抑制としての意味も再考する必要性が生じてきた。これについては、とくに300 rad 1回照射や150 rad 2回照射では、術後10日目まで末梢血のリンパ球数が0~5%までに抑制されていたのに対して、230 rad 1回照射では、術後5日目には20%以上までに回復していたという結果に注目して、今後は組織におけるリンパ球の kinetics も含めてさらに詳細に検討していく予定である。

表 1 Host conditioning and chimerism, kidney allograft survival

Reg.	#monkey	Host Conditioning					chimerism	GST ^f (days)
		Ab ^a	TBI ^b	TI ^c	CyA ^d	DBM ^e (10 ³ /kg)		
A	4392	CD 3	3	7(day-1)	—	0.8	no	11
	4792	ATG & CD 3	3	7(day-1)	—	0.5	no	15
B	4993	ATG	0	0	+	1.5	no	47
	4893	ATG	0	0	+	3.0	no	58
C	3893	ATG	1.5	7(day-1)	+	1.1	yes(ly ^g)	56
D	195	ATG	2.3	0	+	4	yes(multi ^h)	41
	395	ATG	2.3	0	+	1.8	yes(multi)	59
E	595	ATG	2.3	7(day-6)	+	3.6	yes(multi)	97
	1095	ATG	2.3	7(day-6)	+	2.5	yes(multi)	101
F	5893	ATG	1.5×2	7(day-1)	+	0	no	51
	6693	ATG	1.5×2	7(day-1)	+	0	no	52
G	4193	ATG	3	7(day-1)	+	0.6	no	14
	3993	ATG	3	7(day-1)	+	0.9	?	175(CR) ^j
	393	ATG	3	7(day-1)	+	1.0	yes(multi)	>888
H	3093	ATG	1.5×2	7(day-1)	+	0.9	yes(multi)	198(NR) ^j
	3293	ATG	1.5×2	7(day-1)	+	1.5	yes(multi)	196(NR) ^j
	1693	ATG	1.5×2	7(day-1)	+	0.2	yes(multi)	>630
	6793	ATG	1.5×2	7(day-1)	+	0.6	yes(multi)	>517
	594	ATG	1.5×2	7(day-1)	+	4.4	yes(multi)	>489

^aAntibody used for T cell depletion. ^bdose(Gy) of total body irradiation.

^cdose(Gy) of thymic irradiation. ^dCyA for 4 weeks. ^eDonor bone marrow cells (10⁶/kg)

^fgraft survival time. ^gchimerism was detected in only lymphocyte population. ^hmultilineage chimerism

ⁱchronic rejection. ^jno evidence of rejection. died due to ureteral complication.

また、臨床応用にあたって最も懸念される graft versus host disease は、このプロトコルを施した 30 頭以上のサルのどれにもその発症を認めなかった。これについては、まず ATG が血中に長く残存するために (術後 20~30 日目まで)、ドナー骨髄中の成熟 T 細胞の purge が *in vivo* で ATG により完全に行われている可能性が考えられ、事実、術後 20 日までドナーの T 細胞が検知されたことはない。さらに ATG が消失する移植 30 日以後においては、出現するドナー T 細胞が、ほぼ 100% CD 45 RA 陽性であることよ

り、これらの T 細胞はレシピエントの胸腺において分化した naive cell と考えられた。これは同様のプロトコルによるマウスの実験でも明らかに証明されているが⁴⁾、サルにおいてもこのプロトコルにおける graft versus host tolerance はレシピエントの胸腺における clonal deletion によって維持されていることが示唆された⁶⁾。

今後はさらに、TBI の照射線量を検討しつつ、さまざまなコントロールもあわせて行い、安全に臨床応用できるプロトコルの完成を目指していきたい。

文 献

- 1) Smith, C.V., Suzuki, T., Guzzetta, P.C., Nakajima, K., Sundt, III T.M., Mixon, A., Spitzer, T.R., Eckhaus, M.A., Sachs, D.I. : Bone marrow transplantation in miniature swine : IV. Development of myeloablative regimens that allow engraftment across major histocompatibility barriers. Transplantation, 56 : 541, 1993.
- 2) Gottlieb, M., Strober, S., Hoppe, P.T., Grumet, F.C., Kaplan, H.S. : Engraftment of allogeneic bone marrow without graft-versus-host disease in mongrel dogs using total

- lymphoid irradiation. Transplantation, 29 : 487, 1980.
- 3) Sharabi, Y., Sachs, D.H. : Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a nonlethal preparative regimen J. of Exp. Med., 169 : 493, 1989.
- 4) Tomita, Y., Khan, A., Sykes, M. : Role of intrathymic clonal deletion and peripheral anergy in transplantation tolerance induced by bone marrow transplantation in mice conditioned with a non-myeloablative regimen. Journal of Immunology, 153 : 1087~1098, 1994.
- 5) Kawai, T., Cosimi, A.B., Colvin, R.B., Powelson, J., Eason, J., Kozlowski, T., Sykes, M., Monroy, R., Tanaka, M., Sachs, D.H. : Mixed Allogeneic Chimerism and Renal Allograft Tolerance in Cynomolgus Monkeys. Transplantation, 59 : 256~262, 1995.
- 6) Kawai, T., Hoshino, T., Ota, K. : CD 45 RA on chimeric T cell and graft versus host disease in mixed allogeneic chimerism. Transplantation. (in press)
-