

研究成果報告書

ドナー由来調節性 T 細胞系門脈的移入による膵島移植におけるドナー特異的免疫寛容誘導の解析

**Induction of donor-specific tolerance in mouse islet transplantation model with stimulatory portal infusion of donor derived CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tcell**

2007 年度 海外リサーチフェローシップ (No 2007-5033)

池本哲也<sup>1,2</sup>

1、 消化器・移植外科、徳島大学 徳島県徳島市蔵本町 3-18-15、〒770-8503  
Department of Digestive and Transplant surgery, Tokushima University  
3-18-15, kuramoto-cho, Tokushima city, Tokushima, 770-8503, Japan  
Tel: 088-633-9276  
Fax: 088-631-9698

2、 Surgical Institute for Immunology Research, University of Alberta, Edmonton, Canada  
2000 Collage Plaza 8215-112 St Edmonton, AB, T6G2C8, Canada  
Tel: 780-407-8348  
Fax: 780-407-6933

派遣期間 2007 年 4 月 20 日～2008 年 3 月 31 日  
April 20, 2007-March 31, 2008

研究機関 Surgical Institute for Immunology Research, Clinical Islet transplant  
Program, University of Alberta, 2000 Collage Plaza 8215-112 St Edmonton,  
AB, T6G2C8, Canada  
Tel: 780-407-8348  
Fax: 780-407-6933

研究指導者 Professor James AM Shapiro

## **Abstract**

**Background.** Donor-specific transfusion is one alternative to induce donor-specific tolerance in transplantation, however, its mechanism is still unknown. We have already reported that donor-derived CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tcell induced donor-specific tolerance, thus here we show that can be induced in MHC full mismatch model and investigate in vitro and in vivo assay.

**Material and Method.** Islet and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tcells were isolated from Balb/c. Islet cells only (as control group) and these cells stimulatory (as regT group) were transplanted into streptozotocin-induced diabetic C57bl6 mice via portal vein. Mixed lymphocytes reaction was undergone with Balb/c derived CFSE stained CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tcells as stimulator and with naïve C57bl6 splenocytes as responder. FACS analysis was investigated for these cells after 24, 48 and 72 hours culture.

**Result.** Graft survivals of regT group were significantly prolonged (Log rank test,P<0.01). The population of CFSE positive cells were decreased in time dependent manner. There was significant high responding cell population around 220nm in Balb/c derived CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tcells and naïve C57bl6 splenocytes co-culture.

**Conclusions.** Islet graft survival was prolonged by donor-derived CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tcells simultaneously transplantation via portal vein in high responder model. This prolongation was not due to in vivo expansion of transferred donor-derived CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tcells. It is required to identify the population which increased among recipient lymphocytes against donor-derived CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tcells.

## 背景

膵島移植は次世代の組織移植医療として注目されており、実際に欧米では1型糖尿病の治療法として臨床応用されている。しかしながら、他の臓器移植と同様に免疫抑制療法が不可欠であり、レシピエントは拒絶の恐怖のみならず感染、発癌のリスクにさらされる。ドナー特異的免疫寛容誘導は未だ達成されておらず、その誘導・機序解明は膵島移植のみならず移植医療を飛躍的に発展させると考えられる。これまでに我々はドナー脾細胞門脈内移入が免疫寛容を誘導することを報告してきた (*Transplantation* 1998)。移植前ドナー血輸血 (Donor-specific transfusion, DST) は特に腎移植の分野でしばしば行われてきた。当方法では、ドナー血輸血を受けたレシピエントは約15%がドナー特異的抗体を産生し移植が不可能となるが、残りの85%の患者の移植成功率は95%に及ぶ。免疫抑制剤の台頭によりその効果については次第に着目されぬようになったものの、ドナー特異的免疫寛容誘導の手段としてはいまだに極めて効率的である。しかし、一方でDSTは臨床的・経験的手段でありその機序は不明である。

さて、調節性T細胞は移植免疫、自己免疫疾患、感染防御、腫瘍免疫等に関与する、T細胞に対し強力な抑制能を持つCD25を発現するCD4<sup>+</sup>T細胞集団であるが、これまでに、我々はこの調節性T細胞がドナー特異的免疫寛容に関与する可能性を報告してきた (*J Med Invest* 2004)。以上を踏まえ、DST (ドナー特異的調節性T細胞) がレシピエントの免疫系に及ぼす影響・機序を精査・解明することは、ドナー特異的免疫寛容誘導の糸口になると考えられる。

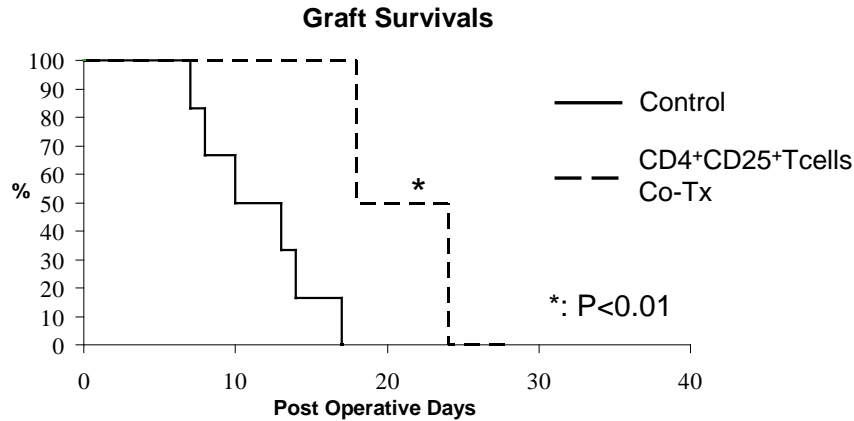
## 方法

MHC full mismatch な mouse combination (donor, Balb/c; recipient, C57/bl6; 6-8 週齢雄性) を用いて、donor specific splenocyte 及び Magnetic Cell Sorting (MACS) で分離した donor derived CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tcell (10<sup>5</sup>) を予め CFSE で染色し、これを stimulator とし、C57/bl6 の splenocytes を responder とし、Mixed Lymphocyte Reaction を行い、24 時間、48 時間、72 時間後の cell profile を精査した。

現在までに報告した如く、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tcell の門脈内投与は少なくともマウス膵島移植 (経門脈的肝内移植) の系において、ドナー特異的免疫寛容を誘導出来ると考えられる。そこで、MHC full mismatch な mouse combination の上記の系で、同様の実験を施行し (700IEQ の Balb/c の膵島を分離し、MACS で分離した naïve Balb/c の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tcell 10<sup>5</sup> を同時性経門脈的に薬剤誘導糖尿病 C57/bl6 に移植する)、graft survival を観察した。Recipient は naïve C57/bl6 に 180mg/Kg の Streptozotocine を腹腔内投与した後 5 日目以降で空腹時血糖が 24mmol/L を上回ったものとした。拒絶の criteria は空腹時血糖を週 3 回測定し、連続して 18mmol/L を上回った時もしくは 24mmol/L を上回った時とした。

## 結果

In vitro の結果としては CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tcell 同時投与群はコントロールに比して有意に移植片の生着延長が見られた (Mean graft survival, Control: 11.5 ± 3.8 日, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tcell 同時投与群: 19.8 ± 9.6 日, Log-rank test, P < 0.01, figure 1)。しかし全例 30 日以内には拒絶され、永久的な移植片生着は得られなかった。



CSFE 陽性細胞の FACS 解析では 24 時間 (8.2 ± 0.7%)、48 時間 (2.6 ± 0.9%) と経時的に population を減じ、72 時間でほぼ検出出来なくなった。また、donor-derived CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tcell を混合した時のみ (Balb/c whole splenocytes および recipient derived CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tcell を混合した時と比較)、波長 220nm 近傍に強く反応する cell population を認めた。

## 結語

High responder model においても CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tcell 同時投与によって膝移植モデルの膝生着延長効果が得られた。この機序は移入した CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tcell の in vivo expansion によるものではなかった。220nm の細胞集団は allo の調節性 T 細胞に反応して増殖する細胞集団と考えられ、今後の研究により recipient 体内の allo-reactive cell の分離、同定を行うことで効果的免疫寛容状態誘導が可能になると考えられる。