

学 位 論 文 題 名

Dimeric but not monomeric soluble CD40 prolongs
allograft survival and generates regulatory T cells
that inhibit CTL function.

（単量体ではなく 2 量体の可溶化 C D 40 が移植片を生着延長させ、
C T L 機能を阻害する制御性 T 細胞を誘導する）

学位論文内容の要旨

臓器移植での急性拒絶反応において T 細胞は中心的役割を担っている。T 細胞を完全に活性化するには TCR を介した刺激に加え、補助シグナルが必要であるという理論のもと、これまで、マウス、ラットおよびサルを用いた移植実験において様々な補助シグナル遮断効果が検討されてきた。そのなかでも CD154-CD40 経路の遮断は最も有効な効果が認められる。我々はこれまで、種々のラット移植モデルにおいてアデノウィルスベクター介在性 CD40Ig を用いた遺伝子治療が移植臓器（心臓、肝臓および下肢）の長期生着延長を導くことを明らかにしてきたが、そのメカニズムについては明らかになっていない。CD154 は TNF family に属し、TCR 刺激を受けた活性化早期の T 細胞表面に発現される。CD154 が APC に発現しており TNFR family に属する CD40 と結合することにより、APC に刺激を与える。CD40 を介した刺激は APC に B7-1 および B7-2 の発現を増強させることにより naïve T 細胞を priming するとともに、IL-4 (Bcell) または IL-12 (Mφ) といったサイトカインの産生亢進を引き起こすことにより免疫応答を調節しており、これらの阻害が CD154-CD40 経路の遮断による移植片生着延長効果に関与していると考えられる。しかしながら、今回行った ACI から LEW への異所性心移植において AdCD40Ig ($1 \sim 2 \times 10^9$ pfu) 処置ラットの 8/12 例で >300 日の長期生着延長が認められたにもかかわらず、AdLacZ 処置ラット（対照群）において移植後 5 日で認められる移植心内への T 細胞浸潤が AdCD40Ig 処置ラットにおいて全く抑えられていなかった。このことは、別のメカニズムが存在することを強く示唆している。我々は今回、ラット心移植において行った AdCD40Ig の遺伝子治療が効果を示すには血中に高濃度の CD40Ig が存在する必要がある（移植後 5 日目から 6 週目まで 2mg/mL を超える）ことに着目し検討を行った。

高濃度の CD40Ig が allogeneic な抗原に対し抑制効果を示すか否かを検討する目的で、ACI から LEW への in vitro MLC を行った。精製した CD40Ig は MLC に対しては $500 \mu\text{g/mL}$ でも増殖反応を抑制しなかった。一方、サイトカイン産生に関しては、IFN- γ では明らかな差は認められなかったものの、IL-2 の産生では高濃度の CD40Ig により劇的な産生亢進が認められた。細胞内サイトカインの検討からこの IL-2 産生細胞は CD4 T 細胞であった。IL-2KO マウスを recipient として用いた移植実験では graft 浸潤細胞の AICD が誘導されず、

移植心は拒絶されることが報告されている。従って、高濃度 CD40Ig が引き起こす IL-2 の産生増加は AICD の誘導を引き起こす可能性が考えられる。そこで、MLC 中の T 細胞の apoptosis を検討したところ、CD40Ig 添加群および非添加群の間に明らかな違いは認められなかった。一方、IL-2R α 鎖である CD4⁺CD25⁺ T 細胞は self tolerance を regulate していることが知られている。MLC 中の CD4⁺T 細胞を CD25 で染色し、FACS 解析したところ、高濃度 CD40Ig の添加により CD25 high の CD4⁺T 細胞が著増していた。この CD4⁺CD25⁺ T 細胞が免疫を regulate する能力を有しているか否かについて判断するために、CD4⁺T 細胞に対する効果として MLC による T 細胞増殖 assay、CD8⁺T 細胞に対する効果として CTL assay を用い、MLC 中に増加した CD4⁺CD25⁺ T 細胞の作用について検討した。CD4⁺CD25⁺ T 細胞は MLC による増殖には影響を与えず、添加した CD4⁺CD25⁺ T 細胞数に依存して CTL 活性を donor 特異的に抑制した。

CD40Ig はマウス CD40 の細胞外領域とヒト IgG の融合蛋白であり、抗体様の 2 量体構造をとっている。従って、CD40Ig が CD154 へ結合すると、クロスリンクにより CD154 からシグナルを導入する可能性がある。In vitro で認められた高濃度 CD40Ig の効果が、CD40 を介するシグナルの遮断によるものか CD154 を介するシグナルの導入によるものかを明らかにするために、マウス CD40 の細胞外領域に Myc/His の tag を結合させた 1 量体構造の CD40/Myc/His を作製し検討を行った。CD40/Myc/His は CD154 との結合能は有しており、CD40 のシグナルは阻害するが、Fc がいないためクロスリンク出来ず、CD154 からのシグナルは導入しない。CD40/Myc/His は MLC において CD40 阻害に基づくと考えられる IL-12 の産生は阻害したが、IL-2 の産生は増強しなかった。一方、CD4⁺CD25⁺ T 細胞の誘導は認められたものの、それらの細胞には CTL 活性の抑制能はなかった。これらの結果は CD40 シグナルの阻害により CD4⁺CD25⁺ T 細胞を誘導することが出来るが、CTL 阻害活性を有する機能的な CD4⁺CD25⁺ T 細胞には、CD154 からのシグナルにより CD4⁺T 細胞から産生される IL-2 が必要であることが示唆された。更に、CD154 からのシグナルが移植臓器の生着延長に必要な否かを明らかにするために、可溶化 CD40Ig および CD40/Myc/His のラット心移植モデルに対する効果を検討した。可溶化蛋白の投与は 8mg/body を週 3 回で 2 週間投与した。CD40Ig 処置は 30 日以上有意な生着延長効果を示したが、CD40/Myc/His 処置は対照群と同じ 7 日以内で移植片が拒絶された。クロスリンクのシグナル導入に加えて、Fc の重要な生理的作用として補体の活性化や食作用を介した細胞除去がある。Monk らは抗 CD154 抗体の Fc 部位が活性化 T 細胞の選択的除去のために重要であること報告した。しかしながら、我々の検討では AdCD40Ig 処置したラットの移植片および CD40Ig を添加した MLC において apoptosis を誘導された T 細胞の増加は認められていないことから、CD40Ig による移植片生着延長効果には CD154 を介した “reverse signaling” が重要であることが強く示唆された。

結論

本研究において、我々は CD154-CD40 経路遮断による移植片拒絶抑制の新たなメカニズムとして、CD40Ig が以下の 2 方向の作用を有することを明らかにした。

1. CD154 からシグナルを導入することにより CD4⁺T 細胞の IL-2 産生を増強する。
 2. CD40 を介したシグナルを阻害することにより CD4⁺CD25⁺ T 細胞の誘導を促進する。
- この 2 つの作用が協調して、ドナー特異的に CTL 活性を抑制する機能的な CD4⁺CD25⁺ T 細胞の誘導を導くことにより移植片拒絶反応を抑制すると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則
副 査 教 授 藤 堂 省
副 査 教 授 野々村 克 也
副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

Dimeric but not monomeric soluble CD40 prolongs allograft survival and generates regulatory T cells that inhibit CTL function.

(単量体ではなく 2 量体の可溶化 CD40 が移植片を生着延長させ、
CTL 機能を阻害する制御性 T 細胞を誘導する)

本研究では ACI から LEW ラットへの異所性心移植モデルを用いて、CD40 と CD40 リガンド (CD40L) の結合によって伝達される補助シグナル阻害の移植片生着に対する効果およびその作用機序を検討した。ヒト免疫グロブリンの Fc 部分と補助シグナル分子 CD40 の細胞外ドメインからなる可溶性分子 (CD40Ig) の遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込み (AdCD40Ig)、静脈内投与することにより血中の CD40Ig が長期間にわたって高濃度に維持され、移植片の長期生着延長が認められた。しかしながら、これまでの免疫抑制剤や他の補助シグナル分子阻害剤である CTLA4Ig とは全く異なり、移植心内への T 細胞浸潤は全く抑えられず、CD40Ig による移植片生着延長効果には新たなメカニズムが存在することを示唆するものであった。そこで、ACI と LEW ラット脾細胞を用いてリンパ球混合培養 (MLC) に対する CD40Ig の影響を検討した。CTLA4Ig が MLC における T 細胞増殖反応を抑制するのに対し、CD40Ig は抑制作用を示さず、CD4 T 細胞から IL-2 の産生を顕著に亢進した。一方抗原提示細胞からの IL-12 の産生は抑制した。しかも、高濃度 CD40Ig 添加では MLC 中に制御性 T 細胞として知られている $CD4^+CD25^+$ T 細胞が増加していることを見出した。この $CD4^+CD25^+$ T 細胞は CD4 T 細胞の増殖には影響を与えなかったが、CD8 T 細胞による細胞障害活性 (CTL) 活性をドナー特異的に抑制した。これらの効果が、CD40 を介するシグナルの遮断によるものか CD40L (CD154) を介するシグナルの導入によるものかを明らかにするために、CD40/Myc/His を作製した。これは CD40Ig が 2 量体であるのに対し、1 量体構造をとる。CD40/Myc/His は MLC において CD40 阻害に基づくと考えられる抗原提示細

胞からの IL-12 の産生は抑制したが、CD154 を介する CD4T 細胞からの IL-2 の産生は増強しなかった。CD4⁺CD25⁺ T 細胞の誘導は認められたものの、それらの細胞には CTL 活性の抑制能はなかった。当然 ラット心移植モデルに対して生着延長効果は示さなかった。したがって、本研究では、CD40Ig による移植片拒絶抑制のメカニズムとして、CD154 からシグナルを導入することにより CD4⁺T 細胞の IL-2 産生を増強し、CD40 を介したシグナルを阻害することにより CD4⁺CD25⁺ T 細胞を誘導する。この 2 つの作用が協調して、ドナー特異的に CTL 活性を抑制する機能的な CD4⁺CD25⁺ T 細胞の誘導を導くことにより移植片拒絶反応を抑制することを明らかにした。

副査の野々村教授からは、サルにおいて有効性が確認されている CD154 抗体と CD40Ig ではメカニズムが異なると考えているのか？ カルシニューリン阻害剤と併用すると、どのような効果が考えられるか？等の質問、また、副査の藤堂教授からは、CD40Ig により IL-2 が産生されるメカニズムについて何か解っているか？等の質問、主査の小野江教授からは、制御性 T 細胞が CD4 には作用せず、CTL のみ抑制しているが、そのような報告は他にあるのか？等の質問、また副査の上出教授からは、臨床応用を考えると、移植片の炎症細胞浸潤を抑制できないことによる不都合は無いのか？等の質問があった。その他、フロアーからも幾つかの質問がなされたが、いずれの質問に対しても、申請者は自己の実験結果や、文献的考察をもとに概ね適切な解答をなした。

この論文は、可溶性補助シグナル分子 CD40Ig が、ドナー特異的に CTL 活性を抑制する機能的な CD4⁺CD25⁺ T 細胞を誘導することにより、移植片拒絶反応を抑制しているというこれまでに知られていなかったメカニズムを明らかにしたものであり、高く評価される。臓器移植拒絶反応の抑制剤としての可能性を示唆する研究であり今後の発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。