

## 末梢性免疫寛容を目指した Cyclosporin/抗 LFA-1 抗体併用療法の有用性

濱 耕一郎<sup>1)</sup> 高田 栄子<sup>2)</sup> 松野 直徒<sup>1)</sup>  
葦澤 龍人<sup>1)</sup> 長尾 桓<sup>1)</sup> 水口 純一郎<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 東京医科大学外科学第五講座

<sup>2)</sup> 東京医科大学免疫学講座

**【要旨】** 現在、臓器移植後の拒絶反応の抑制において主役を担っているのは非特異的免疫抑制薬による薬物療法である。一方、動物実験では、モノクローナル抗体や合成蛋白分子を用いて副シグナルをブロックすることにより、ドナー特異的な免疫抑制が、さらには末梢性免疫寛容の誘導が報告されている<sup>1)</sup>。しかし、非特異的免疫抑制薬と副シグナルブロック因子の併用効果を検討した報告は見られてない。**【方法】** 本研究では、C57BL/6 (B6; H-2<sup>b</sup>) マウスをドナー、BALB/c (BALB/c; H-2<sup>d</sup>) マウスをレシピエントとして同種異系全層皮膚移植を行い、既存の免疫抑制薬であるシクロスポリン (Cyclosporin : 以下 Cs) 単独投与群と抗マウス lymphocyte function-associated antigen-1 モノクローナル抗体 (以下抗 LFA-1 抗体) 単独投与群の評価を行った後に、両薬剤を併用投与し、免疫抑制機序の異なる 2 剤の併用効果について検討した。**【結果】** ラット IgG2a 投与群 (対照群 (n=5)) の平均生着日数 (mean graft survival days 以下 MSD) は  $9.8 \pm 1.30$  日であるのに対し、移植前日より術後 7 日目までの 9 日間 0.5 mg/kg, 5.0 mg/kg, 15 mg/kg, 30 mg/kg の各投与量で連続皮下投与した Cs 投与群では、いずれの投与群でも生着期間の延長は認められなかった。また投与量の違いによる生着期間の差もみられず、むしろ過量投与群では体重減少などの重篤な薬物副作用が見られた。一方、抗 LFA-1 抗体 (40 mg/kg) を術前日より術後 7 日目までの 9 日間連続投与した群の生着期間は 80% のマウスにおいて 28 日以上長期生着を示し、機能発現として発毛も見られた。次に 2 種の薬剤の併用効果を検討した。抗 LFA-1 抗体 (40 mg/kg) と Cs (15 mg/kg) との併用群 (MSD:  $18.25 \pm 6.44$  日) では対照群より平均生着期間の延長が見られた。しかし、抗 LFA-1 抗体 (40 mg/kg) を単独投与した群との比較では、生着延長効果は見られなかった。さらに過量投与の Cs (30 mg/kg) との併用投与群でも、抗 LFA-1 抗体単独投与群に比べ、同様に生着期間の延長は認められなかった。**【結論】** マウスの皮膚移植では、抗 LFA-1 抗体は単独投与で生着延長が認められ、免疫寛容の導入が可能であることが示唆された。しかし、臨床における代表的免疫抑制薬であるカルシニューリン阻害薬 (Cs) との併用では相乗効果はみられなかった。

### はじめに

移植医療は、種々の臓器不全の患者に対する最終的治療法としての地位を確立しつつあるが、移植臓器に対する宿主の生理的な免疫反応である拒絶反応の制御については、まだ多くの問題点が残ってい

る。一般に免疫抑制療法は 1) 非特異的な薬物療法 2) 抗体あるいは特殊蛋白によるシグナル伝達のブロックの 2 種に大別されるが、いずれも拒絶反応の主役である T 細胞を標的としている。前者では副腎皮質ステロイド、アザチオプリン、シクロスポリン、タクロリムス、ミコフェノール酸モフェチルな

平成 21 年 10 月 22 日受付、平成 22 年 1 月 27 日受理

キーワード : anti-LFA-mAb, skin allograft, immunological tolerance, ciclosporin

(別冊請求先 : 〒193-0998 東京都八王子市館町1163 東京医科大学八王子医療センター 濱 耕一郎)

TEL : 042-665-5611 FAX : 042-665-1796

どが用いられ、これらの薬物の併用療法が、現在の臨床免疫抑制療法の主役を担っている。副腎皮質ホルモンであるステロイドはT細胞の増殖を抑制する。またTh1細胞のTGF- $\beta$ やIFN- $\gamma$ の産生を抑制して、移植片に対するマクロファージの作用を阻害する。アザチオプリンはDNA合成阻害によりT細胞の増殖を抑制する。シクロスポリン、タクロリムスなどカルシニューリン阻害薬は抗原刺激を受けたT細胞でのカルシニューリンの脱リン酸化反応を阻害して、IL-2の産生を抑制し、細胞障害性T細胞の分化を阻止する事により免疫抑制を發揮する。しかし、これらの薬物の過量投与は免疫不全を引き起こし、免疫能の低下から、日和見感染、菌交代現象などの2次感染等の重篤な病態を惹起する。また、少量投与では、免疫抑制作用が不十分となり、移植臓器が拒絶される危険性は増加する。一方、細胞表面の様々な付属分子に焦点をあてたモノクローナル抗体療法は、種々の組織移植や臓器移植モデルにおいて同種移植片生着期間の延長に有効に用いられている。これらのレセプターには2種の接着分子ファミリーが存在する。インテグリンファミリーと免疫グロブリン・スーパーファミリーである。 $\beta$ -2インテグリンの1つであるLFA-1は3種のリガンド(ICAM-1, 2, 3)が知られており、それらは免疫グロブリン・スーパーファミリーの仲間である。LFA-1に焦点をあてたモノクローナル抗体療法は、様々な動物モデル実験に用いられているが、カルシニューリン阻害薬との併用に関しての記述は少ない。また、免疫寛容は、抗原提示細胞によるMHC-TCR (Major histocompatibility complex-T cell receptor) 系の主シグナル伝達、あるいはB7-CD28系や接着分子の副シグナル伝達によるT細胞の活性化を抑制することによって誘導される。T細胞が移植片上の非自己アロ抗原(MHC)あるいは抗原提示細胞上の非自己抗原を認識し活性化するという主シグナルにおける阻害では、非特異的免疫不全が誘導されるが、副シグナルの阻害では、より選択的に移植抗原に特異的な免疫寛容が得られると考えられている<sup>1)2)</sup>。この副シグナルの阻害により得られる状態は、T細胞の機能的応答(anergy)と称され、T細胞における免疫寛容の機序として注目されている。しかし、B7-CD28のシグナルを阻害するCTLA4-Igや接着分子に対する抗体などのように、副シグナルの阻害に用いられる異種動物蛋白の大量投与はアレルギー

反応などを誘導する危険性もある。免疫抑制薬と副シグナル阻害因子の併用により、免疫抑制作用の相乗効果が期待されるのならば、両者の使用量の減量が可能となり、結果として各々の副作用の軽減につながると考えられる。今回、筆者らは免疫抑制を誘導するとされるCsと、抗LFA-1抗体を副シグナルブロック因子として用い、マウスの皮膚移植モデルにおける両者の併用療法の有用性について検討した。

## 研究材料および方法

### I. 実験マウス

8~10週齢、体重約20~25g、雌のマウスを用いC57BL/6 (B6: H-2<sup>b</sup>, オリエンタル酵母、東京) をドナー、BALB/c (BALB/c: H-2<sup>d</sup>, オリエンタル酵母、東京) をレシピエントとして使用した。なお、本研究は、東京医科大学動物実験委員会の承認を得ており、東京医科大学動物実験規定に沿っている。

### II. 薬剤及び抗体

Csはノバルティスファーマ社より市販されている250mg/5mlの溶液を用いた。抗マウスLFA-1ラットIgG2aモノクローナル抗体はクローンM17/4.4.11.9 (ATCC, Manassas, USA)  $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$  cells/body をスキッドマウスの腹腔内に投与後、十分な腹水の貯留を待ってから順次腹水を採取し、硫酸塩法にてIgGを分画し蛋白濃度測定した。

### III. 皮膚移植方法

ネンブータル(アストラゼネカ社、東京) 150  $\mu$ g/body を腹腔内投与し、麻酔効果を確認の後、ドナーマウスは背部ほぼ全域を剃毛した。レシピエントマウスは両耳下部より肩甲骨下1cm程度まで剃毛し直径1.5cmの円形のマーキングを行った。ドナーマウスの背部皮膚からマーキングよりやや大きめに皮膚を全層採取し、冷生理食塩水に浸漬した。移植片のトリミングを行った後、皮下の脂肪組織、毛細血管を完全に除去し、再度冷生理食塩水に浸漬して保存した。レシピエントマウスはマーキング部より皮膚をやや小さめに切除し同部に皮膚移植片を移植した。方法としては、移植片下の空気と乾燥に注意して圧着させ、ダーマボンド®(ジョンソン&ジョンソン社、東京)で辺縁を固定した。移植片はソフラチュール®(アベンティスファーマ社、東京)で被覆をした上でガーゼ保護の後にtie-overとした。

#### IV. 抗体・薬剤投与方法

##### 1) Cs 投与群 (Cs 群)

Cs 投与群は投与量の違いにより4グループ(各  $n=5$ )を作成した。対照群は移植後薬物非投与群( $n=10$ )とした。

Group I : 0.5 mg/kg/day

Group II : 5.0 mg/kg/day

Group III : 15.0 mg/kg/day

Group IV : 30.0 mg/kg/day

投与期間は移植前日から開始し術後7日目まで9日間連続皮下投与とした。

##### 2) 抗 LFA-1 抗体投与群 (LFA-1 群)

抗 LFA-1 抗体投与群は投与量により次の3グループ(各  $n=5$ )を作成した。抗 LFA-1 抗体のアイソタイプコントロールとしてラット IgG2a を投与した群を作成し、ネガティブコントロール群とした。

Group A : ラット IgG<sub>2a</sub> 40 mg/kg/day

Group B : 抗 LFA-1 抗体 20 mg/kg/day

Group C : 抗 LFA-1 抗体 40 mg/kg/day

として投与期間は移植前日から開始し術後7日目までの9日間連続皮下投与とした。

##### 3) 抗 LFA-1 抗体・Cs 併用投与群 (併用投与群)

以下の2グループを(各  $n=5$ )で作成した。対照群は移植後薬物および抗体の非投与群とした。

Group 1 :

Cs 15 mg/kg/day+抗 LFA-1 抗体 40 mg/kg/day

Group 2 :

Cs 30 mg/kg/day+抗 LFA-1 抗体 40 mg/kg/day

投与期間は移植前日から開始し術後7日目までの9日間連続皮下投与とした。

#### V. 拒絶反応の診断基準

術後7日目に移植片を被覆していたソフラチュールとガーゼを除去して開放とし、1日1回移植皮膚片の生着の状態を観察した。移植片が100%痂皮化した時をもって拒絶と判定し、移植後拒絶までの日数を生着日数とした。マウスの体重変化と活動性の評価を行い、毛並みの観察を施行、移植後にマウスを、1日1回体重測定をして、術前と比較した。

#### VI. サイトカイン測定法

術後14日目に、移植片の生着群マウスにおいてネンプタール麻酔後、腹部正中切開で開腹し、下部大静脈より採血を行った。37°C、30分間静置した後、4°Cにて24時間放置した。その後3,000 rpmで15分間遠心分離により血清を分離した。血清は

5倍希釈した後、Cytometric Beads Array System (CBA; 日本ベクトン・デッキンソン社、東京)を用いてIL-2, IL-4, IL-5, IL-10, INF- $\gamma$ , TGF- $\alpha$ の測定を行い、同社のCBA解析ソフトにより解析を行った。

#### VII. 統計学的検討

実験結果は平均日数±標準偏差の記載とした。優位差検定には unpaired t-test を用い、危険率0.05%未満を有意とした。

### 結 果

#### 1. Cs 投与量と皮膚移植片の生着期間に関する検討

B57BL/6の皮膚をBALB/cに移植すると、MSD;  $9.8 \pm 1.30$ 日で移植片は拒絶された(対照群)。これに対し、Cs投与群は

Group I (0.5 mg/kg) で MSD:  $10.60 \pm 0.55$  日

Group II (5.0 mg/kg) で MSD:  $11.80 \pm 1.10$  日

Group III (15.0 mg/kg) で MSD:  $10.20 \pm 0.45$  日

Group IV (30.0 mg/kg) で MSD:  $10.00 \pm 1.58$  日であり、いずれの投与量においても対照群に比較して、生着期間の延長は見られなかった。また投与量の違いによる生着期間の差も認められなかった。なお、Group IVでは7日後の体重減少、毛並の荒れと活動性の低下が観察され、うち1匹は術後8日目に死亡した。死因は全身衰弱によるものと考えられた (Fig. 1)。

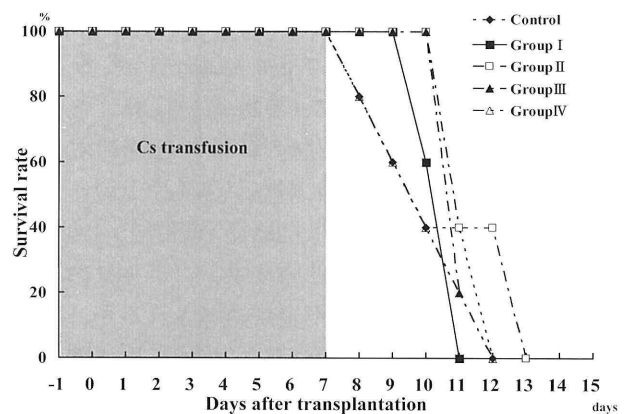


Fig. 1 Survival days of graft of each level Cs treatment group (Group I : 0.5 mg/kg/day, Group II : 5.0 mg/kg/day, Group III : 15.0 mg/kg/day, Group IV : 30.0 mg/kg/day) in a mouse skin transplantation model.

2. 抗 LFA-1 抗体と皮膚移植片の生着期間に関する検討

Group A (ネガティブコントロール群) では MSD:  $10.25 \pm 0.84$  日であったが、Group B では MSD:  $19.20 \pm 3.03$  日、最長生着日数 28 日以上もあり Group A に比して有意に生着期間の延長を認めた。さらに Group C では 5 例中 4 例が 28 日以上の長期生着を示すとともに移植皮膚片からドナー由来と考えられる黒色毛の発毛が見られた。死亡例は見られなかった (Fig. 2)。

3. Cs と抗 LFA-1 抗体の併用療法による皮膚移植片の生着期間の延長に関する検討

Cs と抗-LFA-1 抗体 (40 mg/kg) の併用群における移植片の生着日数は、Group 1 において MSD:  $18.25 \pm 6.44$  日、Group 2 において MSD:  $20.00 \pm 2.40$  日と、両群とも対照群に比べて延長していた。Cs 投与量の違いによる生着期間の有意な差はみられなかった。また抗 LFA-1 抗体単独投与群 (Group B, Group C) との比較では、併用群の方で生着期間がむしろ短縮する傾向を示した。また、併用における臨床的影響は見られなかった (Fig. 3)。

4. 各群の血清サイトカインの変化に関する検討

T 細胞の活性化や分化には IL-2 以外に Th1 細胞が産生する INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$  などのサイトカインが関与している。また、Th2 細胞が産生する IL-4, IL-5 などのサイトカインが Th1 細胞に対して抑制的に作用することが分かってきた。従って移植片の生着には Th1 と Th2 とのバランスが重要となる。二者のバランスに関しては、サイトカインの濃度から推測することが出来る。今回は、対照群、Cs 30 mg/kg 投与群、Cs 30 mg/kg+抗 LFA-1 抗体 40 mg/kg 併用投与群の移植片生着例に関して、術後 14 日目に血中サイトカインの測定を行った。INF- $\gamma$  (約 2.5 倍) と TNF- $\alpha$  (約 5 倍) の増加が、併用投与群で認められた。しかし、INF- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  の上昇は、生着期間の延長が見られなかった Cs 単独投与群でも見られており、両者の間に有意な差は認められなかった。IL-5 と IL-4 は対照群に比して Cs 単独投与群、併用投与群共に約 2 倍の増加を認めるが、Cs 単独投与群と併用投与群では有意差を認めなかった (Fig. 4)。

考 察

今回、抗体療法を薬物療法と併用する事により、

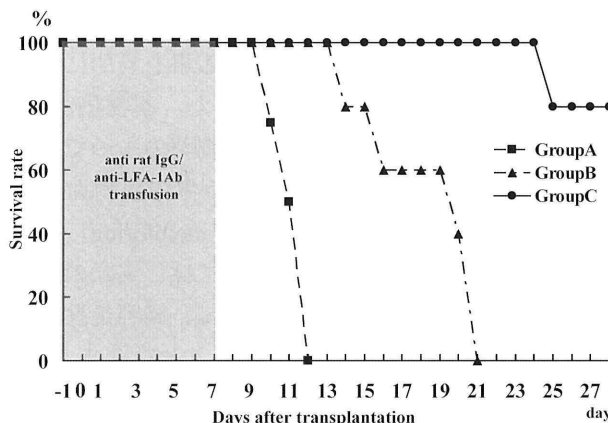


Fig. 2 Survival days of graft of each level anti-LFA-1Ab treatment group (Group A : rat IgG<sub>2a</sub> 40 mg/kg/day, Group B : anti-LFA-1Ab 20 mg/kg/day Group C : anti-LFA-1Ab 40 mg/kg/day) in a skin transplantation model.

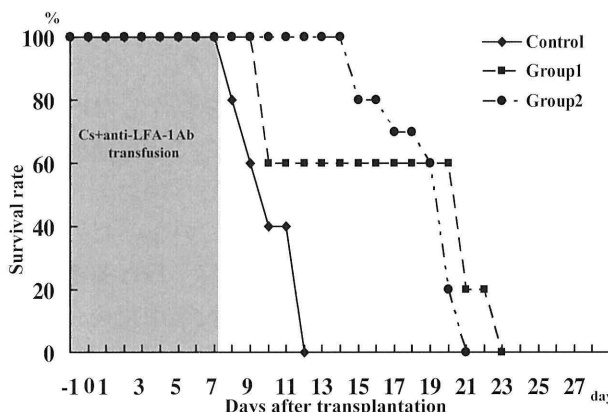


Fig. 3 Survival days of graft of each level (Group 1 : Cs 15 mg/kg/day+anti-LFA-1Ab 40mg/kg/day, Group 2 : Cs 30 mg/kg/day +anti-LFA-1Ab 40 mg/kg/day, Control is rat IgG<sub>2a</sub> 40 mg/kg/day) combined medication in a mouse skin transplantation model.

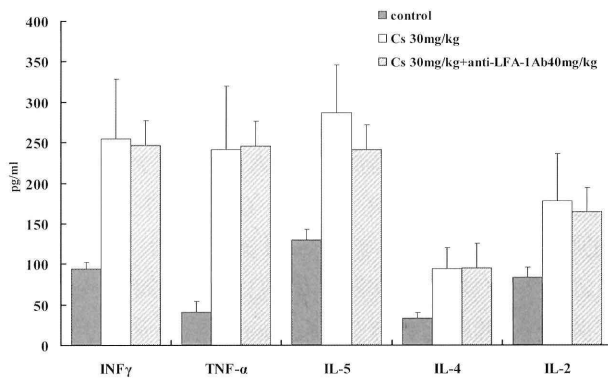


Fig. 4 blood cytokine value (INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5) of Cs transfusion group and Cs and anti-LFA-1Ab combination group in mouse skin transplantation model. Control is non-treatment group.

非特異的免疫抑制力を持つ薬物の減量、もしくは抗体療法のみでの免疫寛容が得られる事を目的にマウス皮膚移植モデルを用いて検討した。薬物療法は、現在用いられている主たる免疫抑制薬の1つであるCsを用いた。また、臨床現場での体内薬物血行動態評価にはTDM (therapeutic drug monitoring) が導入されており、薬剤投与量に関しては、実際の臨床現場では移植後の経過時期に応じて、高容量投与から低容量投与へと移行させていることを踏まえた。実際は、一般的な初回量として、8~12 mg/kg の経口投与であり、静注投与の場合は3分の1量の持続投与である。維持量としては4~6 mg/kg が標準となっている。さらに、最近ではカルシニューリン製剤の副作用減少のため、初期導入量も、6~8 mg/kg へと変化してきている<sup>17)</sup>。今回の実験でもこれに基づき、一般投与量の上・下限グループと考えられるGroup 2, 3 を製作し、更に低容量グループであるGroup 1 と高容量であるGroup 4 を製作したが、いずれの濃度においても単独投与のみでは生着期間の延長をみることは出来なかった。投与中および投与後のCs血中濃度の推移を測定していないため明らかではないが、免疫抑制薬の投与終了後は薬物代謝により血中濃度が減少するため、投与中止後、時間経過に比例して免疫抑制効果が減少したと考える。従って非特異的な免疫抑制薬であるCs単独投与の皮膚移植モデルでは、継続投与により血中濃度を維持する以外にグラフト片を生着させる事は難しいと考えられた。これは臨床現場でも同様である。

一方で、T細胞における免疫寛容の誘導に関与する細胞表面分子の研究により、そのメカニズムや周辺領域の理解が進んできた。一般にT細胞の機能分化には主シグナルである抗原刺激によるT細胞レセプターからの刺激と副シグナル (Co-stimulation molecules) の両シグナルの存在が必要であり、この副シグナルの受容体/リガントペアとしてCD2/LFA、LFA-1/ICAM-1、CD28/B7-1、CD40/CD154などがあげられる<sup>3)</sup>。T細胞レセプターを介した主シグナルのみがT細胞に与えられ、副シグナルが欠如したときにはclonal anergyの状態となり、IL-2が十分に産生されず、T細胞は有効な分裂増殖に至らない<sup>2)4)</sup>。また、一度このような状態に陥ると主および副シグナルの再刺激を与えてもIL-2遺伝子の転写が起こらず、T細胞は増殖しないと考えられており、末梢T細胞における免疫寛容

の1つの機序として想定されている。今回、筆者らは副シグナルの欠如を目的として、副シグナル受容体抗体である抗LFA-1抗体を用いることにより、副シグナルの抑制効果伴う免疫寛容の導入と移植片生着期間の延長を、マウス皮膚移植モデルで確認することが出来た。免疫応答の副シグナルを阻止することによる移植片生着期間の延長はCTLA4-Igによる副シグナルB7-CD28の機能阻害でも認められている<sup>5-8)</sup>。さらにIsobeらは、マウスの心移植モデルで抗ICAM-1抗体を用い、ICAM-1とLFA-1との分子間の反応を阻害することにより免疫寛容状態を誘導したと報告している<sup>1)</sup>。しかし、薬剤併用にあたって、併用効果を容易にしたい意図の上で、一般的投与量の上限である15 mg/kgと過量設定である30 mg/kgを選んだが、モノクローナル抗体を用いて誘導される免疫寛容と、免疫抑制薬との明らかな相乗効果は、今回のマウス皮膚移植モデルを用いた筆者らの研究結果では認められなかった。すなわち、併用投与群とモノクローナル抗体単独投与群との間の生着日数に、明らかな差がみられなかった。これは、Csの投与量に依存するものではなく、0.5 mg/kgとの併用でも同様の結果であると考えられる。この結果は、サル腎移植モデルにおいて、副シグナルのB7/CD28を阻害するCTLA4-Igの単独投与により拒絶反応のない長期間の生着を確認しているKirkらの、特異的免疫抑制や、抗原レセプターに惹起される特異的免疫反応には、T細胞活性シグナルの存在がある事、そして、副シグナルブロックによる免疫寛容の誘導にはT細胞活性シグナルが必要である事、逆に、カルシニューリン阻害薬やステロイドの併用投与を行うと、このT細胞活性シグナルも抑制するために、副シグナルブロックによる免疫寛容誘導効果が減弱してしまうという報告にも類似する<sup>9)</sup>。従って、投与されたCsが有効血中濃度に達していない可能性は否定できないが、副シグナルに拮抗する免疫抑制薬のT細胞活性シグナルの抑制力や、未知の機序が存在する可能性も示唆される。副シグナルのシグナル伝達阻害下においては、アロ反応性T細胞アポトーシスが誘導され免疫抑制に繋がるという考え方がある<sup>13)14)</sup>。またCsなどのカルシニューリン阻害薬は、T細胞増殖を抑制すると共に同濃度でアポトーシスをも抑制することが知られており、Csの血中濃度は重要であると思われる。従って今回の研究結果を考慮すると、前述の



ように副シグナルの阻害と Cs 等のカルシニューリン阻害薬は、カルシニューリン阻害薬の濃度依存的に関わらず、免疫寛容誘導を拮抗するという可能性も否定できない。

今回、筆者らは抗 LFA-1 抗体の投与によって長期の移植片の生着が見られたために、抗体投与量を固定し、併用薬物量を変動させて併用効果を検討したが、逆に、抗 LFA-1 抗体を減量させることにより免疫寛容誘導の拮抗が軽減できる可能性もあるため今後の検討が必要である。

シグナル阻害下での移植免疫寛容誘導のメカニズムを考える上では Th1/Th2 のバランスが重要である<sup>10)</sup>。一般に急性拒絶反応下では、Th1 細胞サイトカインの増加が典型的特徴であり、移植免疫寛容では Th2 細胞サイトカインの発現に関連があるといわれている<sup>18)</sup>。Th2 細胞のサイトカインとして重要な IL-4 のノックアウトマウスでは、副シグナル阻害により免疫寛容の誘導が可能であるが<sup>11)</sup>、Th1 細胞が産生する INF- $\gamma$  のノックアウトマウスでは免疫寛容は誘導されないために<sup>12)</sup>、Th1 細胞が免疫寛容の誘導において、より重要な役割を果たしていると思われる。しかし、一方でサイトカイン自体、移植片の長期生着には関与していないという結果も示され始めている<sup>19)20)</sup>。最近になって、Th1 細胞サイトカインである IFN- $\gamma$  が、移植片の長期生着に必要な事もありうる事も示されている<sup>21)22)</sup>。免疫寛容の機序とサイトカインの関連は、今後も研究の必要がある。

今回の研究結果では、Th1 サイトカインの IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  は、生着期間に関係なく増加しており、ノックアウトマウスの結果とは異なる結果であった。しかし、Th2 細胞サイトカインの IL-4 は生着期間に関係なく増加しているため、移植片の生着に重要な因子ではない可能性が高い。従って、移植免疫寛容の誘導には Th1 /Th2 バランスの他にも複雑な免疫学的メカニズムが関与していると考えられる。また、IL-2 の値を見ると、IL-2 産生を抑制する Cs の効果も 14 日目では明確化されておらず、Cs 自体の効果は薄いことも判明した。

最近、遺伝子工学の発展により免疫抑制、免疫寛容の分野においても遺伝子治療技術の応用が研究されている。免疫抑制サイトカイン TGF- $\beta$ 、IL-10 の遺伝子導入や ICAM-1 に対する anti sense 遺伝子導入により移植臓器の生着延長が認められ、遺伝子免

疫抑制療法が可能であることが示されている<sup>15)16)</sup>。移植患者の quality of life を考慮すれば、拒絶のコントロールとして、現在の非特異的免疫抑制療法よりも、T 細胞の抗原特異的免疫寛容誘導がはるかに理想的である。今後はモノクローナル抗体を用いて得られる免疫寛容誘導の機序の解明と異種蛋白を用いる事による臨床的問題点の解決に向けて更なる実験と解析を行っていく必要があると思われる。

## 結 論

マウス皮膚移植モデルにおいて抗 LFA-1 抗体で副シグナルを機能的に阻害することにより免疫寛容状態が得られ、移植片の生着期間の延長がみとめられた。しかし、非特異的免疫抑制薬である Cs との相乗効果は明らかでなかった。また Cs 単独投与では生着期間の延長効果は認められなかった。以上の事から、マウスの皮膚移植モデルでは副シグナルのみの抑制で免疫寛容を誘導することが可能であり、移植片の生着延長には有用であった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御助言を頂いた、東京医科大学免疫学教室員の諸先生に感謝いたします。

(本論文の主旨の一部は第 40 回日本移植学会において発表した。)

## 文 献

- 1) Isobe M, Yagita H, Okumura K, Ihara A : Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science* **28** : 255 (5048) : 1125-1127, 1992
- 2) Kaneda R, Iwabuchi K, Kasai M, Murakami M, Uede T, Onoé K : Selective antigen presenting activity of cortical thymic epithelial cells against CD4<sup>+</sup> T cells associated with both lack of co stimulatory molecules and inefficient presentation of MHC-peptide ligands. *Cell Immunol* **181** : 163-171, 1997
- 3) Denton MD, Magee CC, Sayegh MH : Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* **353** : 1083-1091, 1999
- 4) Schwartz RH : Models of T cell anergy : is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* **184** : 1-8, 1996
- 5) Judge TA, Tang A, Spain LM, Deans-Gratiot J, Sayegh MH, Turka LA : The in vivo mechanism of action of CTLA4Ig. *J Immunol* **156** : 2294-2299, 1996

- 6) Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, Russell ME, Carpenter CB, Linsley PS, Turka LA : CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med* **181** : 1869-1874, 1995
- 7) Tarumi K, Murakami M, Yagihashi A, Nakagawa I, Hirata K, Uede T : CTLA4IgG treatment induces long-term acceptance of rat small bowel allografts. *Transplantation* **67** : 520-525, 1999
- 8) Yamada A, Murakami M, Ijima K, Yagita H, Okumura K, Komatsu S, Uede T : Long-term acceptance of major histocompatibility complex-mismatched cardiac allograft induced by a low dose of CTLA4IgM plus FK506. *Microbiol Immunol* **40** : 513-518, 1996
- 9) Kirk AD, Burkly LC, Batty DS, Baumgartner RE, Berning JD, Buchanan K, Fechner JH Jr, Germond RL, Kampen RL, Patterson NB, Swanson SJ, Tadaki DK, TenHoor CN, White L, Knechtle SJ, Harlan DM : Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nature Med* **5** : 686-693, 1999
- 10) Mosmann TR, Coffman RL : TH1 and TH2 cells : different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* **7** : 145-173, 1989
- 11) Lakkis FG, Konieczny BT, Saleem S, Baddoura FK, Linsley PS, Alexander DZ, Lowry RP, Pearson TC, Larsen CP : Blocking the CD28-B7 T cell costimulation pathway induces long term cardiac allograft acceptance in the absence of IL-4. *J Immunol* **158** : 2443-2448, 1997
- 12) Markees TG, Phillips NE, Gordon EJ, Noelle RJ, Shultz LD, Mordes JP, Greiner DL, Rossini AA : 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
- 13) Li Y, Li XC, Zheng XX, Wells AD, Turka LA, Strom TB : Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nature Med* **5** : 1298-1302, 1999
- 14) Blair PJ, Riley JL, Harlan DM, Abe R, Tadaki DK, Hoffmann SC, White L, Francomano T, Perfetto SJ, Kirk AD, June CH : CD40 ligand (CD154) triggers a short-term CD4 (+) T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis. *J Exp Med* **191** : 651-660, 2000
- 15) Serfling E, Avots A, Neumann M : The architecture of the interleukin-2 promoter : a reflection of T lymphocyte activation. *Biochim Biophys Acta* **1263** : 181-200, 1995
- 16) Imbert V, Rupec RA, Livolsi A, Pahl HL, Traenckner EB, Mueller-Dieckmann C, Farahifar D, Rossi B, Auberger P, Baeuerle PA, Peyron JF : Tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$  activates NF- $\kappa$ B without proteolytic degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$ . *Cell* **86** : 787-798, 1996
- 17) 高木 弘 : シクロスポリンの実際。21-24, 国際医学出版, 1996
- 18) Nicolls MR, Coulombe M, Yang H, Bolwerk A, Gill RG : Anti-LFA-1 therapy induces long-term islet allograft acceptance in absence of INF- $\gamma$  or IL-4. *The American Association of Immunologists* **164** : 3627-3634, 2000
- 19) Nickerson P, XX Zheng J, Steiger AW, Steele, W, Steurer, P, Roy-Chaudhury, W, Müller, TB, Strom : Prolonged islet allograft acceptance in the absence of interleukin 4 expression. *Transplant Immunol* **4** : 81-85, 1996
- 20) Lakkis FG, BT Konieczny S, Saleem FK, Baddoura PS, Linsley DZ, Alexander RP, Lowry TC, Pearson CP, Larsen, Blocking : The CD28-B7 T cell costimulation pathway induces long term cardiac allograft acceptance in the absence of IL-4. *J Immunol* **158** : 2443-2455, 1997
- 21) Markees TG, NE Phillips EJ, Gordon RJ, Noelle LD, Shultz JP, Mordes DL, Greiner AA, Rossini : Long-term survival of skin allografts induced by donor splenocytes and anti-CD154 antibody in thymectomized mice requires CD41 T cells, interferon-g, and CTLA4. *J Clin Invest* **101** : 2446-2449, 1998
- 22) Konieczny BT, Z Dai, ET, Elwood S, Saleem PS, Linsley FK, Baddoura CP, Larsen TC, Pearson FG, Lakkis : IFN-g is critical for longterm allograft survival induced by blocking the CD28 and CD40 ligand T cell costimulation pathways. *J Immunol* **160** : 2059-2064, 1998

## Combined use of ciclosporin and anti LFA-1 monoclonal antibody to induce immunological tolerance in mice skin graft

Koichiro HAMA<sup>1)</sup>, Eiko TAKADA<sup>2)</sup>, Naoto MATSUNO<sup>1)</sup>,  
Takeshi NAGAO<sup>1)</sup>, Junichiro MIZUGUCHI<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Fifth Department of Surgery, Tokyo Medical University

<sup>2)</sup> Department of Immunology, Tokyo Medical University

### Abstract

Pharmacotherapy by immunosuppressive agents is a major treatment method for suppressing rejection after transplantation. On the other hand, the possibility of donor-specific immunosuppression blocking sub-signals by using monoclonal antibody and peripheral acquired tolerance derivation have been reported. However, there are a few reports that reviewed combined effects of both regimens. In the present study, an analysis of combined effect of ciclosporin and anti-lymphocyte function-associated antigen-1 mAb (anti-LFA-1mAb), which has a different immunosuppression mechanism, in skin allograft transplantation consistency of the C57BL/6 mouse as donor and the BALB/c mouse as recipient. There is no significant prolongation for survival in ciclosporin group ( $n=5$ ) administrated subcutaneously 0.5, 5.0, 15, and 30 mg/kg respectively for 9 days from the day before transplantation compared with mean graft survival days (MSD; 10.35 days) in the control group ( $n=5$ ). There was no difference in graft survival among Cs groups according to dosage, but the high dosage group developed weight loss as a side effect. On the other hand, 80% of anti-LFA-1 mAb group administrated 40 mg/kg/day for 8 days showed over 28 days MSD of graft survival and growth of hair. Although the combined therapy group with anti-LFA-1 mAb (40 mg/kg) and Cs (15 mg/kg) had a prolonged MSD (18.25 days) compared to the control group, there was no prolongation of MSD between the combined therapy group and anti-LFA-1 mAb group (40 mg/kg). Moreover the combined therapy group with high Cs dosage showed 40% mortality. Therefore the anti-LFA-1 mAb therapy showed a significant prolongation for survival, thus acquired tolerance derivation by the single treatment could be recognized in skin allograft transplantation. However, it was suspected that there seemed to be no synergism of anti-LFA-1 mAb therapy combined with calcineurin inhibitor (Cs).

---

〈Key words〉 : Anti-LFA-mAb, Skin allograft, Immunological tolerance, Cyclosporin

---