

新しい免疫抑制剤の作用形式の検討

近畿大学医学部泌尿器科学教室主任：栗田 孝教授

松浦 健，禰宜田正志，池上 雅久，今西 正昭

西岡 伯，石井 徳味，植村 匡志，国方 聖司

神田 英憲，秋山 隆弘，栗田 孝

EXPERIMENTAL STUDIES ON THE MODE OF ACTION OF CYCLOSPORINE AND FK 506 ASSESSED BY PROLIFERATION RESPONSE OF HUMAN CLONED T LYMPHOCYTES

Takeshi Matsuura, Masashi Negita, Masahisa Ikegami,
Masaaki Imanishi, Tsukasa Nishioka, Tokumi Ishii,
Tadashi Uemura, Seiji Kunikata, Hidenori Kanda,
Takahiro Akiyama and Takashi Kurita

From the Department of Urology, Kinki University School of Medicine

We applied cloned human T lymphocytes established in our laboratory to evaluate the mode of action of Cyclosporine (CsA) and FK506. Phenotypic and functional analysis led us to conclude that HTL403 was a helper T cell clone and HTL805 a cytotoxic one. Susceptibility of HTL-403 to the immunosuppressants demonstrated that alloantigen-driven proliferative response can recover to the rIL2-driven level by the addition of rIL2 at higher concentration of the agents. Although full recovery was not observed in FK506, this finding indicated that FK506 as well as CsA inhibit IL2 secretion from HTL403. FK506 showed remarkable suppressive effect on the proliferative response of HTL-805 even at a considerably low concentration, while CsA suppressed such a response dose-dependently. We concluded that FK506 can be used to reverse ongoing acute rejection as well as to prevent acute rejection.

(Acta Urol. Jpn. 37: 1141-1145, 1991)

Key words: Human cloned T cell, FK506, Cyclosporin

緒 言

腎移植は慢性腎不全の根治的療法としてその地位を確立し，わが国においても多くの泌尿器科医により積極的に取り組まれている．cyclosporine (CsA) は臨床導入後，その強力な免疫抑制作用から腎移植成績が向上した反面，副作用のために種々の投与方法が検討され，いまだ理想的な免疫抑制法は得られていない．

一方，最近次々と新しい免疫抑制剤が開発され，臨床使用に関しての知見が得られつつある．腎移植臨床に携わる者にとって，免疫抑制剤の選択肢が増えることは，より適切な免疫抑制を行う上で歓迎すべきことであるが，各免疫抑制剤の作用機序を知り，最適な使用法に熟識しなければならない．われわれは，移植免疫反応を詳細に検討する目的で，ヒトT細胞株の樹立

を試みてきたが，本論文では FK506 の作用形式を，クローン化T細胞を用いて CsA と比較しながら検討した結果を報告する．

方 法

1. リンパ球

使用したリンパ球はヒト末梢血より Ficoll-Paque (Pharmacia Fine Chemicals) を用いて分離し，培養液 (RPMI 1640) で十分洗浄した．刺激細胞は mitomycin C (MMC) で37°C, 20分間処理後洗浄して使用した．

2. クローン化T細胞

リンパ球混合培養 (MLC) は先ず $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ の反応細胞と，同数の刺激細胞を炭酸ガス培養器 (5% CO₂) 中で DMEM (Dulbecco's modified eagle

medium; 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 10% FCS, L-glutamine, penicillin/streptomycin を含む) を用いて培養した。10日後にアロ細胞で再刺激し、さらに2日後より recombinant interleukin 2 (rIL2) 1 u/ml を含む培養液中で細胞を2~3週間増殖させた。クローニングは限界希釈法で行った。すなわち 1.0×10^5 /well のフィーダー細胞を含む microtest plate 中に、増殖させたリンパ球が0.5~1個/well となるように分注し、rIL2 を含む培養液中で培養した。7~10日後に増殖を示すクローンをさらに大きな well へうつし、良好に増殖するクローンのうち2種 (HTL-403, HTL805) の性質を検討した。

3. クローン化T細胞の性質

クローン化T細胞の表面抗原は、OKT 4,8 (Ortho Diagnostic System Inc.), Leu 8,15 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) と家兔補体を用いた細胞障害試験で検討した。

アロ細胞, rIL2 刺激による反応性は、クローン化T細胞を MMC 処理アロ細胞あるいは rIL2 で48時間刺激して検討した。培養終了18時間前に $1 \mu\text{Ci}$ /

well の methyl- ^3H -thymidine (^3H -TdR: New England Nuclear) を添加し、 ^3H -TdR 取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。実験は quadruplication で行った。

また、細胞障害能は、3日間 Con A 刺激後 ^{51}Cr (Du Pont Co. Biotechnology Systems) で標識した標的細胞とクローン化T細胞を4時間反応させ (E/T = 5/1) 培養上清中の ^{51}Cr を測定した。

クローン化T細胞の IL2 産生能は、アロ抗原刺激時の培養上清中 IL2 濃度を経時的に RIA2 抗体法で測定した。

4. クローン化T細胞の免疫抑制剤感受性

クローン化T細胞をアロ細胞, rIL2 あるいは両者で刺激し、種々の濃度の免疫抑制剤 (CsA, FK506) に対する感受性を、48時間培養後の ^3H -TdR 取り込みを指標として検討した。

結 果

1. クローン化T細胞の性質

検討を加えた性質のうち、細胞障害試験と IL2 産

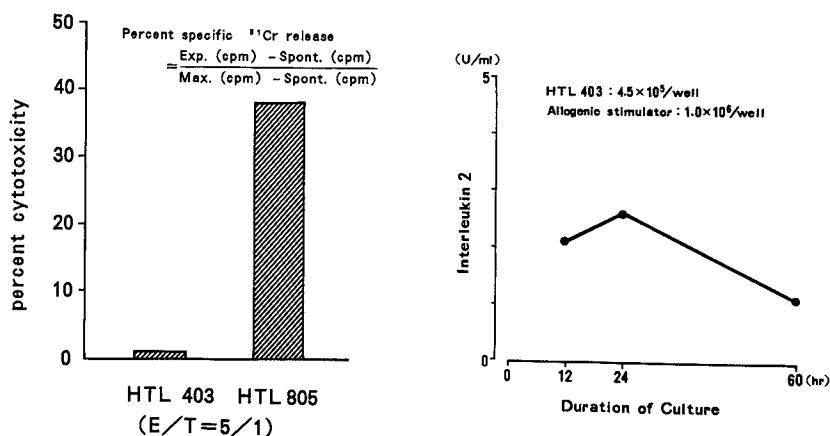


Fig. 1. 左: クローン化T細胞のアロ細胞障害能. 右: HTL 403 の IL2 産生能.

生能の結果を Fig. 1 に示す。

HTL403 は細胞障害能を示さず、HTL805 はアロ細胞に対して 38.1% の細胞障害能を認めた。HTL403 をアロ刺激した時の培養上清中の IL2 濃度は24時間後に最高値 (2.6 u/ml) を示し、HTL403 は IL2 を分泌することが確かめられた。

その他の性質も含めた HTL403, HTL 805 の諸性質を Table 1 に示す。

アロ刺激に対して両クローンとも増殖反応を示すが、HTL403 が良く反応した。HTL403 の増殖には

Table 1. クローン化 T細胞の諸性質

	HTL 403	HTL 805
Phenotype	OKT4 ⁺ 8 ⁻ Leu8 ⁻ 15 ⁻	OKT4 ⁺ 8 ⁺ Leu8 ⁻ 15 ⁻
Cytotoxicity	(-)	(+)
Proliferative response to alloantigen	(+)	(+)
Requirement of exogenous TCGF for proliferative response	(-)	(+)
Production of IL2 in response to alloantigen	(+)	NT

TCGF: T cell growth factor, IL2: Interleukin 2, NT: not tested

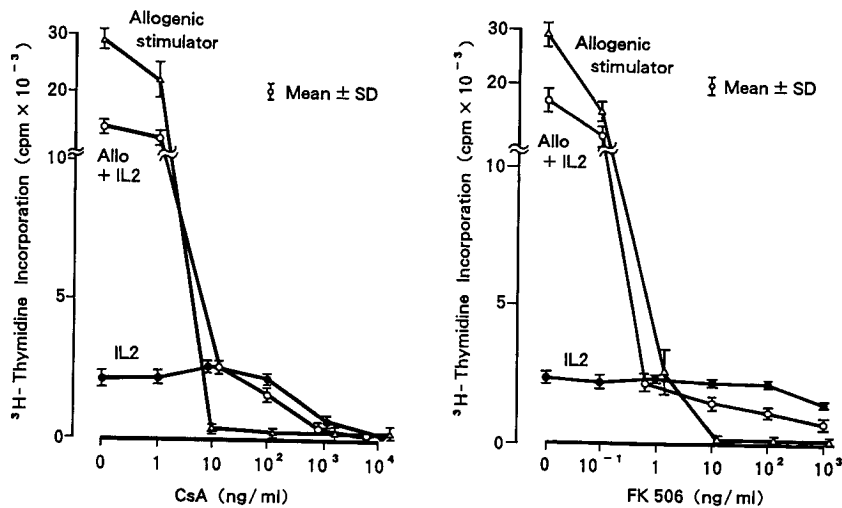


Fig. 2. HTL403 の CsA (左), FK506 (右) に対する感受性. HTL403; 5×10^4 cells/well, 刺激: アロ細胞; 5×10^5 cells/well (Δ), アロ細胞; 1×10^5 cells/well+rIL2; 1 u/ml ($\circ$), γ IL2; 1 u/ml ($\bullet$)

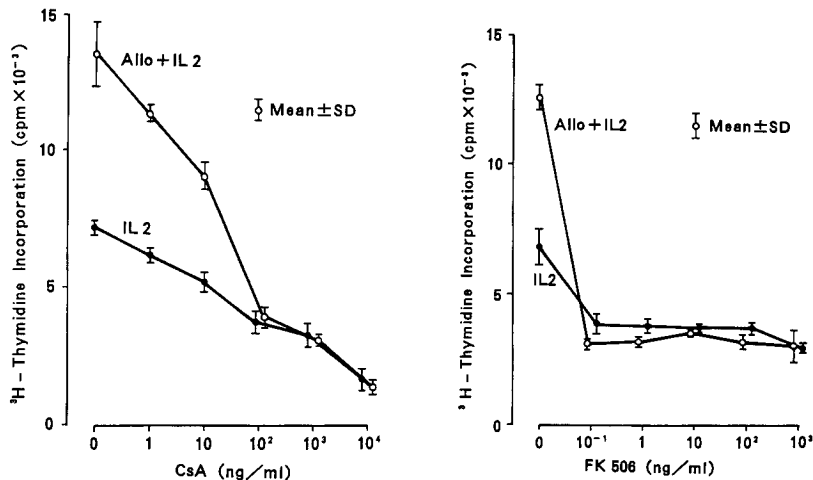


Fig. 3. HTL805 の CsA (左), FK506 (右) に対する感受性. HTL805; 1.4×10^4 cells/well, 刺激: アロ細胞; 2×10^5 cells/well+rIL2; 1 u/ml ($\circ$), rIL2; 1 u/ml ($\bullet$)

必ずしも rIL2 を必要とせず, 定期的なアロ細胞刺激のみでも維持可能であった. HTL 805 はアロ刺激あるいは rIL2 のみでは長期間維持できず, 2 次 MLC 上清を必要とした.

2. クローン化 T 細胞の免疫抑制剤感受性

HTL403 はアロ刺激によりよく反応するが, CsA で容易に抑制された. rIL2 刺激に対しては CsA 高濃度でのみ抑制された. アロ, rIL2 同時刺激では, CsA 10 ng/ml 以上で rIL2 単独刺激と同程度の反応を示した (Fig. 2).

HTL403 は FK506 でも同様の反応がみられたが, rIL2 刺激による反応は高濃度の FK506 でも抑制は軽度であった. また, アロ刺激時の FK506 による反応抑制は rIL2 添加により, FK506 高濃度域で回復したが, CsA と異なり rIL2 単独刺激の水準までには回復しなかった (Fig. 2).

HTL805 の CsA に対する感受性を検討すると, rIL2 単独およびアロ, rIL2 同時刺激による反応は CsA により濃度依存性に抑制され, 高濃度での抑制は強かった (Fig. 3).

FK506 は, HTL805 の rIL2 単独およびアロ, rIL2 同時刺激による反応を低濃度から高濃度まで同程度に強く抑制した. とくにアロ抗原, rIL2 同時刺激時の反応抑制率が高かったが, 高濃度域での抑制は CsA が強かった (Fig. 3).

考 察

CsA は臨床使用成績が1978年に発表されて以来¹⁾, 臓器移植には不可欠の薬剤と位置づけられ, 現在は第1選択の免疫抑制剤としてわが国でも広く使用されている. しかし, 長期使用による種々の副作用が問題点として明らかになり, 薬剤投与法に改良が加えられた^{2,3)}. FK506 はわが国で発見, 開発された新しい免疫抑制剤で, 現在一部の施設で腎移植に対する効果が検討されつつあるが, Pittsburgh からは肝移植に対するきわめて良好な成績が報告され, 注目を集めている⁴⁾. 基礎的研究も併行して進められ, CsA と類似した作用機序を持ち, 主作用は IL2 の産生抑制であると報告されている⁵⁾. われわれは, 免疫抑制剤がT細胞サブセットにどのように作用するかを詳細に検討するため, 教室で樹立したヒトクローン化T細胞の免疫抑制剤感受性を ³H-TdR 取り込みにより測定した.

今回使用した2種のクローン化T細胞は, その表面抗原解析および機能分析の結果, HTL 403 はヘルパーT細胞 (Th), HTL805 は細胞障害性T細胞 (CTL) と考えられた.

HTL403 のアロ抗原刺激による反応は, CsA で容易に抑制されるが, CsA 10 ng/ml 以上では rIL2 添加により rIL2 単独刺激と同程度まで反応が回復した. これは CsA が Th の IL2 産生を抑制していることを示し, 本実験系によっても従来通りの知見が確認できた⁶⁾. FK506 でも同様に IL2 添加による反応の回復が認められ, FK506 も IL2 産生を抑制することが確かめられたが, 反応の回復は完全でなく, 作用形式が CsA と同一でないことが示唆された. いずれにせよ, IL2 産生抑制作用を有することから, FK506 は臨床的には急性拒絶反応に対する予防効果が期待でき, CsA と同様な使用法が可能と考えられた.

HTL805 の rIL2 単独およびアロ抗原, rIL2 同時刺激による反応の抑制形式から, CsA は CTL の IL2 反応性を抑制するとともに, IL2 受容体の発現も抑制すると考えられた. しかし, FK506 に対する HTL805 の感受性は CsA と最も異なる点で, FK506 低濃度でも強い抑制効果を示した. FK506 は CTL の誘導を抑制するが, CTL の標的細胞に対する細胞

障害能は抑制しないと報告されている⁷⁻⁹⁾. われわれの HTL805 に対する FK506 の反応抑制形式も考慮すると, FK506 は CTL のクローン増殖あるいは CTL の機能分化を抑制する可能性が示唆され, CsA と異なり, すでに発症しつつある急性拒絶反応にも有効であると思われる. この点は, 動物実験や臨床成績により示されている事実を支持する結果と考えられる^{4,8,10)}.

FK506 は CsA と同様 T 細胞活性化過程の早期段階を抑制すると考えられているが, 今回の検討でも示されたように, 一部の作用形式に CsA と差異が認められる. 最近, CsA に対する cyclophilin と同様, FK506 も FK506 結合蛋白 (FKBP) と結合すること, さらにこの蛋白は peptidyl-prolyl isomerase (PPIase) 活性を持っていることが示された¹¹⁾. しかし一方で, FK506 は CsA と異なり PPIase 活性やミトコンドリアからの Ca⁺⁺ 遊離に影響をおよぼさないことなど, 作用の異なる点が報告され¹²⁾, 今後の解明が必要とされる.

今回の検討では述べなかったが, やはり最近日本で開発された deoxyspergualin (DSG) も急性拒絶反応の治療薬として注目されている. DSG の MLC に対する抑制率は, CsA と異なり, DSG を培養開始時に加えても遅れて加えても同様の抑制効果がみられた. さらに, HTL403 に対して抑制効果がみられず, IL1 産生や HLA-DR 抗原, IL2 受容体の発現も抑制しなかったこと, 2次 MLC を抑制しなかったことなどから, DSG は分化しつつある CTL を抑制している可能性が考えられている¹³⁾. これは, 拒絶反応治療薬として DSG の効果発現が緩徐であるという臨床経験に一致する結果と考えられた.

結 語

ヒトクローン化T細胞を用いて各種免疫抑制剤の作用形式を検討することで, 免疫抑制剤の臨床使用に関して有用な知見を得ることができた. 新しい免疫抑制剤の開発は, 臓器移植成績の向上に必要なことであるが, 移植に携わる者にとって, それらの作用形式を知った上で臨床使用経験を積み重ね, 適切な薬剤投与法すなわち最適な免疫抑制法を開発することが重要であると考え.

文 献

- 1) Calne RY, White DJG, Thiru S, et al.: Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 2: 1323

- 1331, 1978
- 2) 細川尚三, 荻野敏弘, 井原英有, ほか: Mizoribine, ciclosporin, methylprednisolone の3剤投与法の経験—他剤群との比較および mizoribine 血中濃度の検討— 移植 24: 21-27, 1989
 - 3) 松浦 健, 池上雅久, 今西正昭, ほか: Cyclosporine を用いた多剤併用による腎移植免疫抑制法の検討. 移植 25: 612-617, 1990
 - 4) Starzl TE, Todo S, Fung J, et al.: FK506 for liver, kidney and pancreas transplantation. Lancet 2: 1000-1004, 1989
 - 5) Kino T, Hatanaka H, Miyata S, et al.: FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK506 in vitro. J Antibiot 40: 1256-1265, 1987
 - 6) Matsuura T, Kunikata S, Kanda H, et al.: Studies on the mode of action of cyclosporine. Transplant Proc 17: 2712-2716, 1985
 - 7) Sawada S, Suzuki G, Kawase Y, et al.: Novel immunosuppressive agent. FK506: In vitro effects on the cloned T cell activation. J Immunol 139: 1797-1803, 1987
 - 8) Thomas J, Matthews C, Carroll R, et al.: The immunosuppressive action of FK506: In vitro induction of allogenic unresponsiveness in human CTL precursors. Transplantation 49: 390-396, 1990
 - 9) Maruyama M, Suzuki H, Yamashita N, et al.: Effect of FK506 treatment on alloantigenic T lymphocyte induction in vivo: Differential effects of FK506 on L3T4⁺ and Ly2⁺ T cells.
 - 10) Murase N, Kim DG, Todo S, et al.: Suppression of allograft rejection with FK506. I. Prolonged cardiac and liver survival in rat following short-course therapy. Transplantation 50: 186-189, 1990
 - 11) Siekierka JJ, Hung SHY, Poe M, et al.: A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. Nature 341: 755-757, 1989
 - 12) Kay JE, Moore AL, Doe SEA, et al.: The mechanism of action of FK506. Transplant Proc 22 (Suppl 1): 96-99, 1990
 - 13) 植村匡志, 禰宜田正志, 池上雅久, ほか: Deoxyspergualin (DSG) による拒絶反応の治療. 第26回日本移植学会総会, 岡山, 1990

(Received on March 1, 1991)
(Accepted on April 22, 1991)