

	くらさき とり
氏名	倉崎 桃里
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第252号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Cyclosporin A と Tacrolimus の T 細胞サイトカイン産生に対する抑制効果の in vitro 解析
論文審査委員	主査 教授 相澤 義房 副査 教授 安保 徹 副査 教授 内藤 眞

#### 博士論文の要旨

【背景】 カルシニューリン阻害薬 (calcineurin inhibitor : CNI) である Cyclosporin A (CsA) と Tacrolimus (FK506) は、臓器移植に対する拒絶予防や同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT) 後の graft-versus-host disease (GVHD) に対する予防・治療における薬剤として重要な役割を果たしており、その免疫抑制効果は、主に T 細胞のサイトカイン産生を阻害することで発揮される。近年、特に臓器移植の分野においては、CNI の薬物体内動態の研究が進展し、薬効の指標の解析、さらにそれら指標に基づく個別化された免疫抑制法の確立に向けた研究が進んできた。しかし、allo-HSCT の分野においては、CNI の使用が標準化しているものの、その投与方法には施設間の多様性が認められ、いまだ最適な投与方法が確立されていない。今回我々は、CsA, FK506 それぞれの薬剤の allo-HSCT における至適投与方法を考案する上で重要なサイトカイン産生抑制効果の特性を明らかにするために、フローサイトメトリーを用いて細胞内サイトカイン陽性細胞を検出する方法を用いて、in vitro におけるそれぞれの薬剤のサイトカイン産生抑制効果について検討した。

【方法】 健常人末梢血単核球 (MNC) を分離し、Phorbol 12-Myristate 13-Acetate、ionomycin、brefeldin A 存在下に 37℃、4 時間共培養後、MNC の表面抗原 (CD4、CD8) を染色し、固定・膜透過処理を行った後、細胞内サイトカイン (IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4) の染色を行い、フローサイトメトリーを用いて、CD4・CD8 リンパ球分画による細胞内サイトカイン陽性 T 細胞の割合を測定・解析した。この方法を用いて CNI 暴露とサイトカイン陽性 T 細胞の割合、CNI 暴露解除後のサイトカイン陽性 T 細胞の回復、また CD3 / CD28 beads 刺激により誘導した活性化 T 細胞を用いて、CNI が活性化 T 細胞へ及ぼす影響について検討した。

【結果】 CNI 暴露後の健常人末梢血 MNC におけるサイトカイン陽性 T 細胞の非暴露 T 細胞との相対的割合は、CsA では 1-100ng/ml の濃度において濃度依存的に減少するが、FK506 では 1-10ng/ml と CsA に比し、より低い濃度かつ狭い濃度域で急激に減少した。活性化 T 細胞における CNI のサイトカイン産生抑制効果の検討では、CsA の活性化 T 細胞におけるサイトカイン産生抑制効果は、resting T 細胞における効果よりも減弱されることが確認された。一方 FK506 では、活性化 T 細胞と resting T 細胞とで抑制効果に差を認めなかつ

た。また CNI 暴露を解除した後のサイトカイン産生抑制の回復の検討では、CsA 暴露解除後の IL-2 産生は、暴露濃度が低い場合には回復が有意であるが、高濃度の CsA や FK506 では少なくとも 4 時間後までは抑制効果が持続することが in vitro で確認された。

【結語】 今回得られた CsA や FK506 それぞれの免疫抑制の特性をふまえ、allo-HSCT 臨床における GVHD 予防における CNI 使用法を考察すると、CsA を用いる際は、一時的に高濃度(ピーク)を作る投与方法が CsA の特性を生かした投与方法ではないかと考えられた。一方 FK506 は、毒性との兼ね合いから 24 時間持続点滴による投与方法は許容される投与方法であることが示唆された。

#### (論文審査の要旨)

カルニューリン阻害薬である Cyclosporin A(CsA)や Tacrolimus(FK506)は、同種造血幹細胞移植(allo-HSCT)後の graft-versus-host disease(GVHD)の治療において重要な役割を果たしている。両者は主に T 細胞のサイトカイン産生を阻害することでその免疫抑制効果が発揮するが、移植患者での最適な投与方法は確立されていない。

申請者は allo-HSCT において、2 つ薬剤の至適投与方法を考案する指標として、サイトカインの産生抑制効果について in vitro で検討した。

健常人末梢血単核球(MNC)を分離し、PMA, ionomycin, brefeldin A 存在下で 4 時間共培養した。表面抗原(CD4, CD8)を染色後、細胞内サイトカイン(IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4)を染色し、フローサイトメトリーを用いてこれらのサイトカイン陽性 T 細胞の割合への作用を 2 つの薬剤で比較した。また CD3/CD28 ビーズ刺激により誘導した活性化 T 細胞でも同様に検討した。

FK506 暴露後のサイトカイン陽性 T 細胞の割合は、CsA 暴露後に比して、より低い濃度でかつ狭い濃度域で急激に減少した。CsA の活性化 T 細胞におけるサイトカイン産生抑制効果は resting T 細胞における効果よりも減弱された。また CsA 暴露解除後の IL-2 産生は暴露濃度が低い場合には有意に回復を認めた。一方 FK506 では活性化 T 細胞と resting T 細胞とで抑制効果に差を認めなかった。

以上、造血幹細胞移植後の免疫抑制療法における薬剤作用の特性を明らかにした点に学位論文としての価値を認める。