

論文の内容の要旨

論文題目

A Synthetic Retinoid, Am80, Inhibits Acute Rejection and Graft Vasculopathy in Cardiac Transplantation

和訳： 合成レチノイド Am80 による心臓移植後の急性拒絶反応抑制および移植後冠動脈病変形成抑制についての研究

指導教員 永井良三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 小川陽子

背景と目的

心臓移植は世界的に末期重症心不全患者に対する治療法の一つとして選択されている。免疫抑制剤やレシピエント、ドナーの選択、術後管理の改善により移植後 5 年生存率は 70-80%と上昇したが、移植後の合併症は急性拒絶反応、感染、悪性腫瘍、慢性拒絶反応、免疫抑制剤の副作用と多岐にわたる。急性拒絶に対する治療法のさらなる改善が望まれている一方で、移植後急性期の治療成績の改善とともに、慢性期に形成される移植心冠動脈病変が生命予後にかかわる極めて重大な問題となっている。移植後 5 年以内には約半数の移植患者に何らかの血管病変を認め、その罹患率および程度は年々増加するが、今のところ有効な予防法は確立していない。移植心冠動脈病変は、びまん性で遠位部にまで及ぶ病態のため、血管形成術やバイパス手術による治療は困難であり、再移植以外に確実な治療法が存在しないのが現状である。従って、移植心冠動脈病変の予防と治療法の開発は移植医療における極めて重要な課題となっている。ところが、移植心冠動脈病変形成にかかわる分子病理学的機序については、アロ反応性 T 細胞や液性免疫の関与や、各種サイトカイン、PDGF 等の液性因子による血管平滑筋細胞の増殖や細胞外器質の沈着が示唆されているものの、解明は十分に進んでいない。

我々の研究室では、血管病態における血管平滑筋細胞の形質変換や機能制御について研究を行ってきた。成熟した血管平滑筋細胞は収縮に特化した形質を示すが、外的傷害に応じて形質変換をおこし、蛋白合成や増殖・遊走能を持つ「合成型」と呼ばれる形質を示すようになる。合成型平滑筋細胞は、遊走・増殖するだけでなく、各種の増殖因子、コラー

ゲンなどの細胞外基質と基質分解酵素を産出し、血管壁の組織再構築（リモデリング）に主要な役割を果たす。従来の研究によって、移植心冠動脈病変においても、形質変換した平滑筋細胞の増殖が重要であると考えられている。我々は平滑筋形質変換の分子機構に関して遺伝子転写調節機構に着目して研究を行い、転写因子 Krüppel-like factor 5 (KLF5/BTEB2)を同定した。成体の動脈壁においてはKLF5の発現はほとんど認めないが、外的ストレスにて再誘導され、動脈硬化病変や再狭窄病変で強い発現が認められる。我々は KLF5 ヘテロ接合体ノックアウトマウスの解析により、この転写因子が外的傷害による新生内膜増生に必須であること、また心臓線維芽細胞で発現し心肥大・線維化にも関与することを明らかとした。さらに、KLF5 が PDGF-A 遺伝子を直接制御することを示した。我々は KLF5 機能を修飾する化合物を探索し、合成レチノイド Am80 が KLF5 の転写活性化能と発現を抑制することを見いだした。Am80 は平滑筋細胞の増殖を選択的に抑制する。我々は Am80 経口投与によって、大腿動脈カフ傷害モデル及びステント留置モデルにおいて新生内膜増生が抑制されることを明らかとした。Am80 は KLF5 標的遺伝子である PDGF-A の発現も抑制していた。また、Am80 は免疫調節作用を持つことも報告されており、例として、ラット脳炎モデルおよび実験的関節炎モデルにて炎症反応の抑制が確認されている。In Vitro の解析では、Am80 はナイーブ CD4 陽性 T 細胞の分化過程においてタイプ 2 ヘルパー T 細胞 (Th2 細胞) 優位性を促すことが報告されている。また、ある種の合成レチノイドはマウス異所性心臓移植モデルにおいて、グラフト生着を延長させることが示されている。

本研究では、Am80 が (1)平滑筋細胞増殖抑制、(2)KLF5 阻害と形質変換の抑制、(3)PDGF-A の発現抑制、(4)各種血管病態モデルにおける新生内膜増生の抑制、(5)免疫調節の各作用を併せ持つことから、Am80 が心臓移植に対する治療薬として、急性拒絶と、慢性期における移植心冠動脈病変の抑制作用を示す可能性を考えて検討し、さらに Am80 の病態形成機序における分子作用についても検討することを目的とした。

方法

(1) Am80 の急性拒絶反応に対する抑制効果、(2) Am80 の慢性拒絶反応 (移植心血管病変) に対する抑制効果の各々につき、マウス異所性心臓移植モデルを作成して検討した。急性モデルには 7-10 日で移植片拒絶が完成する MHC 非適合の組み合わせを用い、系統差による影響を抑えるために 2 種類の組み合わせを用いた (ドナー: C57BL/6 (H-2b) 又は C3H/He (H-2k)、レシピエント: BALB/c (H-2d))。移植心血管病変の検討のための慢性モデルには、MHC マイナー抗原非適合によって、弱い同種免疫反応にて移植片拒絶に陥らず長期に移植片生着をし、約 1 ヶ月にて移植心血管病変を形成する組み合わせを用いた (ドナー: AKR (H-2k)、レシピエント C3H/He (H-2k))。Am80 はカルボキシメチルセルロース水溶液を担体として 1 日量 1mg/kg を経口投与し、6 日間の投薬後 1 日の休薬期間を置きこれを繰り返した。

Am80 投与による急性拒絶反応に対する抑制効果について、Am80 投与群におけるグラフト生着率をカプランマイヤー生存曲線およびログランクテストにより評価し、その背景となる免疫学的機序につき、RT-PCR によるグラフト中のサイトカイン発現の評価、混合リンパ球反応、組織学的検討を行った。急性拒絶反応における移植片拒絶は日ごとの経皮的な拍動の確認の上で、開腹にて拍動の停止を確認した時点を移植片の廃絶（拒絶）とした。Am80 投与による慢性拒絶反応（移植心血管病変）に対する抑制効果について、移植後一ヶ月の時点でグラフトを摘出して移植心血管病変の形成を各群で計測し、血管径を一因子として統計処理を行い、さらに各群について組織学的に検討を行った。

結果

マウス異所性心臓移植モデルの作成において、総手術時間は 90~120 分、虚血時間は 30~60 分、成功率は 80-90%であり、すべてのモデルにおいて、経皮的に良好なグラフト拍動が確認された。

急性モデルにおいて、コントロール (Am80 非投与) 群では心グラフトは 8.3 ± 0.3 日 (ドナー: C57BL/6 マウス [n=6]) および 8.0 ± 0.4 日 (C3H/HeN マウス [n=8]) で完全に拒絶された。Am80 投与群のグラフト生着期間は、C57BL/6 マウスは 14.8 ± 2.4 日 (n=6、P=0.011 対同系統コントロール群)、C3H/HeN マウスは 19.5 ± 1.8 days (n=8、P=0.000) と生着期間の延長が認められた。移植片拒絶の時点で病理学的に両群ともに国際心肺移植学会によるグレード 3B-4 の著明なリンパ球浸潤と心筋細胞傷害を認めた。移植片拒絶時点における心グラフトに発現する IFN- γ (Th1 サイトカイン) および IL-6 は mRNA レベルで共に Am80 群で有意に低下していた。また、Th2 サイトカインは有意差はないものの Am80 群で増加しており、in vivo においても Am80 が Th2 優位性を誘導することが示唆された。なお、CD40 や副刺激分子 B7-2 の発現は Am80 投与群にてやや増加していた。混合リンパ球反応にて、Am80 添加によりアロ反応性リンパ球増殖は濃度依存的に抑制された。これらの結果により、Am80 は免疫学的機序を介してアロ反応性を低下させ、急性拒絶反応を抑制することが示唆された。

慢性モデルの移植心の心筋内には著明な繊維化が認められ、免疫組織学的に新生内膜に CD4、CD8 陽性細胞をまばらに認めるものの、大多数の細胞はこれらに陰性であった。新生内膜には α SMA 陽性細胞を多数認め、このモデルが移植後冠動脈病変の研究に妥当であることが示された。心筋内冠動脈を解析したところ (各々 91、101 動脈断面)、新生内膜増殖による血管狭窄率は、Am80 投与群細動脈でコントロール群に比して有意に低下していた。しかし、全血管径を含めた解析では Am80 投与群およびコントロール群の狭窄率に有意差は認めなかった。

考察

マウス異所性心臓移植モデルにおいて、合成レチノイド Am80 は単剤投与により、急性

拒絶反応を抑制し移植片生着期間を延長した。心臓移植における急性拒絶反応は、細胞性免疫の寄与が主体とされる。免疫寛容モデルやサイトカインノックアウトマウスの解析から、特に Th1 サイトカインが急性拒絶反応の惹起に重要であると考えられてきた。他のグループの研究では Am80 がナイーブ CD4 陽性 T 細胞に対し Th2 優位の分化誘導を引き起こすとされているが、本研究における心臓移植モデルにおいても、Am80 群において、Th2 優位性が誘導されていることが示された。Th1 細胞は急性拒絶反応において主要な役割を担うとされている。Am80 群の移植片生着期間の延長に対しても、Th2 優位性がその機序のひとつであると考えられる。炎症性サイトカインに関しては、他の免疫学的動物モデルで Am80 によって IL-6 の発現が抑制することが報告されているが、本モデルでも同様に IL-6 の著明な抑制が認められた。また、抗原提示細胞上に発現する副刺激分子 B7-2 や B 細胞および樹状細胞の一部に発現する CD40 の発現にも変化を認めた。Am80 は心臓移植急性期に、ナイーブ T 細胞からの分化、抗原提示と T 細胞の活性化など、複数の作用を持つ可能性があり、今後、T 細胞、抗原提示細胞を含めた各種細胞分画を用いた検討が重要と考えられる。

慢性期移植心冠状動脈病変の形成に対する Am80 の効果は細動脈に限られており、より大きな血管において有意差は認められなかった。これは細動脈とより大きな冠状動脈における新生内膜形成機序が異なることを反映しているのかもしれない。我々は従来の検討で、血管傷害モデルでは平滑筋形質変換の抑制が Am80 の作用機序として重要であることを明らかとしているが、今後、各サイズの冠動脈における平滑筋細胞形質や増殖の役割について検討することによって、Am80 の移植心冠状動脈病変抑制作用の分子機構を明らかとすることが重要である。心臓移植における Am80 の免疫細胞及び血管壁細胞に対する作用を明らかとすることにより、従来の免疫抑制剤と組み合わせて予後を改善する治療法が開発できる可能性がある。