

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目： 新規スフィンゴシン 1 リン酸受容体アゴニストによる拒絶反応の制御

指導教官： 岩中 督 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名： 藤代 準

免疫抑制剤の進歩、特にカルシニューリン阻害剤であるシクロスポリン A とタクロリムスの臨床応用以降、移植医療は飛躍的な進歩・発展を遂げ、これらの免疫抑制剤は臓器移植の成績向上、特に急性拒絶反応の制御に大きく貢献している。その一方で、移植後血管病変と線維化を主な特徴とする慢性拒絶反応は、移植後遠隔期の移植臓器不全の主な原因であり、その制御・予防は現在も未解決の問題として残されている。しかも、カルシニューリン阻害剤の長期投与は腎毒性や高血圧・高脂血症といった副作用を有し、更には免疫抑制状態による易感染性・腫瘍の発生、カルシニューリン阻害剤自身が慢性拒絶反応・移植後血管病変を促進する危険性を有することなどからも、現在も新たな免疫抑制療剤・免疫抑制療法が模索されている。

近年、スフィンゴシン 1 リン酸受容体アゴニスト(S1P 受容体アゴニスト)という従来の免疫抑制剤とは異なる作用機序を有する薬剤が登場した。その 1 つで現在臨床試験が行われている FTY720 は、カルシニューリン阻害剤に代表される従来の免疫抑制剤が移植臓器などの「非自己」に反応したリンパ球の増殖・活性化の過程を抑制するのとは異なり、リンパ球をリンパ臓器に留め末梢血中のリンパ球減少を生じ、標的臓器に到達しない状態にすることで免疫反応を制御すると考えられている。その一方でリンパ球の活性化・増殖などの機能には治療濃度で影響を与えず、従来の免疫抑制剤との併用投与により副作用を増悪せ

ずに免疫抑制効果を強化できる可能性があり注目されている。FTY720 は腎移植症例で臨床試験が行われその有効性が報告されているが、同時に導入期の高頻度での徐脈の発生などが副作用として報告されている。FTY720 はスフィンゴシン 1 リン酸受容体のサブタイプ 1, 3, 4, 5 に対するアゴニストで、受容体のサブタイプ 1 (S1P₁)とサブタイプ 3 (S1P₃)がそれぞれリンパ球のホーミング改変と FTY720 による徐脈の発生に関与することが報告されている。

共同研究者の小林らは、新規スフィンゴシン 1 リン酸受容体アゴニスト KRP-203 が、FTY720 と同様に末梢血中のリンパ球減少を生じ、ラット心移植・皮膚移植モデルにおいて移植片生着延長効果を有することを報告した。著者は、この KRP-203 が S1P₁ 受容体に高い選択性を有し S1P₃ 受容体には親和性が極めて低い選択的 S1P 受容体アゴニストであり、小動物での徐脈の誘発能が FTY720 に比べ低いことに注目した。S1P 受容体のサブタイプに対する親和性の違いから、KRP-203 は FTY720 と同様の免疫制御能を有しつつ徐脈等 FTY720 で観察される副作用を回避できる新規免疫抑制剤としての可能性を持ち、その臨床応用が免疫抑制療法の発展に寄与すると期待される。

本研究では、この新規 S1P 受容体アゴニストの臓器移植への応用の可能性を検討するため、以下のような検討を行った。

まず、低用量のシクロスポリン A と KRP-203 の併用投与による免疫抑制効果・移植片保護効果を検討した。ラット皮膚移植では、KRP-203 (0.03mg/kg/day)・シクロスポリン A (10mg/kg/day)の単剤投与群では皮膚移植片の生着期間延長効果が認められない。しかし、KRP-203 (0.003, 0.01, 0.03mg/kg/day)とシクロスポリン A (10mg/kg/day)の併用投与は著明な移植片の生着期間延長効果を示した(p<0.01)。この皮膚移植の系では、KRP-203 とシクロスポリン A の相乗効果は KRP-203 の用量依存的で、FTY720 との相乗効果と比べ有意に高かった(p<0.01)。

更に、皮膚移植と異なり拒絶のモニタリングだけでなく移植臓器の機能がレシピエント個体の生命維持に必須であるラット腎移植モデルを用い、MHC が異なり拒絶反応が強く生じる組み合わせで移植を行いシクロスポリンと KRP-203 の相乗効果を検討した。KRP-203 (3mg/kg/day)・低用量のシクロスポリン A (1mg/kg/day)の単剤投与はレシピエントの生存期間を延長しないが、シクロスポリン A と KRP-203 (0.3mg/kg/day)の併用投与は著明に生存期間を延長した(p<0.05)。中等量のシクロスポリン A (3mg/kg/day)の単剤投与、および KRP-203 (0.03, 0.3, 3mg/kg/day)との併用投与では顕著な生存期間延長効果を認めた(p<0.05)。シクロスポリン A 単剤投与・KRP-203 併用投与群ともに多数のレシピエントが観察期間終了まで生存し、生存期間には有意差を認めなかった。し

かし、シクロスポリンAの単剤投与と比較して、KRP-203 とシクロスポリンAの併用投与では移植腎の腎機能は良好に維持され($p<0.05$)、この移植腎機能の差を反映して全身状態の指標となるレシピエントの体重増加にも著明な違いが認められた($p<0.05$)。移植 100 日後の病理組織所見では、シクロスポリン A 単剤投与群では急性拒絶反応の像を呈したのに対し、KRP-203 併用投与群では細胞浸潤・急性拒絶反応が抑制され($p<0.05$)、間質の線維化と尿細管の萎縮も軽微であった。

この結果は、シクロスポリンAと新規 S1P 受容体アゴニスト KRP-203 の併用療法の臓器移植時の免疫抑制療法としての有効性を示し、また、S1P 受容体アゴニストの使用により臓器移植後の免疫抑制療法においてカルシニューリン阻害剤を減量しうることを示唆している。

次に、移植後にカルシニューリン阻害剤がその腎毒性により中止・減量を余儀なくされた際の代替治療としての S1P 受容体アゴニストの可能性を検討した。現在、腎障害時のカルシニューリン阻害剤の代替療法としては、ミコフェノール酸のプロドラッグであるミコフェノール酸モフェチル主体の治療が多く報告されているが、その拒絶反応抑制効果については一定の見解が得られていない。そのため、シクロスポリン腎症下の代替治療としての KRP-203 とミコフェノール酸(MPA)の併用投与が移植片と腎障害にもたらす影響を、大動脈移植・移植後シクロスポリン腎症モデルにて検討した。

MHC が異なり拒絶反応が強く現れる組み合わせ(DA to Lewis)の大動脈移植後、2週間高用量のシクロスポリン A (15mg/kg/day) を投与し腎障害を誘発し、全観察期間継続投与すると腎障害は更に悪化した。免疫抑制剤をシクロスポリン A からミコフェノール酸 (10mg/kg/day)、KRP-203 (1mg/kg/day)及びその併用投与へ変更すると、腎機能が正常化し、シクロスポリン腎症の組織学的特徴である輸入細動脈の硝子化や、腎組織での TGF- β 1 の発現増強が抑制され、シクロスポリン腎症からの回復が認められた。

大動脈移植片では、慢性拒絶反応の特徴的所見の 1 つである動脈の内膜肥厚を S1P 受容体アゴニスト(FTY720, KRP-203)単剤投与が有意に抑制した($p<0.05$)。シクロスポリン A からミコフェノール酸、KRP-203、及びその併用投与に変更した際の移植後血管病変に対する評価では、2 週間のシクロスポリン A 投与の後に薬剤投与を中止した群(CsA→Vehicle 群)で高度の内膜肥厚を認め、薬剤投与を受けないコントロール群 (Vehicle 群)と同等であった。シクロスポリン A を全観察期間継続投与した群(CsA→CsA 群)では内膜肥厚を認めなかった($p<0.05$)。シクロスポリン A からミコフェノール酸、KRP-203 単剤投与に変更した群 (CsA→MPA 群、CsA→KRP 群)ではコントロール群・CsA→Vehicle 群

と比較して内膜肥厚は若干抑制された ($p<0.05$, CsA→KRP 群 vs Vehicle 群・CsA→Vehicle 群)。ミコフェノール酸と KRP-203 の併用投与に変更した群 (CsA→MPA+KRP 群) では内膜肥厚は著明に抑制され、その程度は高用量のシクロスポリン A 継続投与群と同程度であった。

コントロール群、並びにシクロスポリン A を 2 週間で投与終了した群では大動脈移植片に著明な細胞浸潤が観察された。この細胞浸潤はシクロスポリン A の継続投与により抑制された ($p<0.05$)。シクロスポリン A からミコフェノール酸へ変更した群 (CsA→MPA 群) では細胞浸潤はわずかに抑えられる傾向があり、KRP-203 単剤投与に変更した群 (CsA→KRP 群) では細胞浸潤の抑制は有意ではあるが ($p<0.05$) 軽度であった。ミコフェノール酸と KRP-203 の併用投与に変更により細胞浸潤がより強く抑制された。免疫組織染色による検討では、KRP-203 単剤投与・及びミコフェノール酸との併用投与で浸潤が抑制されたのは主に T 細胞で、マクロファージの浸潤には明らかな違いは認めなかった。

これらの結果は、臓器移植後のシクロスポリン腎症時における代替治療としてのミコフェノール酸と KRP-203 の併用投与の腎障害改善・移植後血管病変予防に対する有効性を示しており、ミコフェノール酸モフェチル主体の治療に S1P 受容体アゴニスト追加投与することで免疫抑制を強化できることを示唆している。

以上本研究では、新規 S1P 受容体アゴニスト KRP-203 の移植領域での免疫抑制剤としての可能性を 2 つの実験で示した。本剤は現在臨床研究が進んでいる S1P 受容体アゴニストの FTY720 とは S1P 受容体サブタイプに対する活性化能が異なることから、S1P 受容体アゴニストの持つ免疫抑制効果を保ちつつ副作用を軽減できる可能性を有し、大動物における研究や、更には臨床での有効性が期待される。