

論文内容の要旨

論文題目 新規 histone deacetylase 阻害剤 FR276457 の移植臓器拒絶抑制効果に関する研究

氏名 衣笠 文貴

はじめに

臓器移植は末期機能不全の臓器を、他者（ドナー）の臓器と置換することで生命を維持し、クオリティ・オブ・ライフ（QOL）の向上を目指す根本的治療法である。移植臓器は移植を受けた患者（レシピエント）からは「他人」と判断され、そのままでは強い拒絶反応（免疫反応）により拒絶に至る。この拒絶反応抑制が臓器の生着に必須であり、免疫抑制剤がその役割を担ってきた。1980年代以降、カルシニューリン阻害剤（Calcineurin inhibitors; CNIs）である cyclosporin A や tacrolimus (FK506) といった優れた免疫抑制剤が登場し、生着率は著しく向上した。しかし、CNIs には腎毒性等の副作用が報告されており、その使用は制限される。したがって、CNIs と同等の強い免疫抑制効果を有しかつ副作用がない、新しい基礎治療薬が移植医療現場で望まれている。さらに、アンメットメディカルニーズの一つとして、慢性拒絶の抑制が挙げられる。例えば腎移植では、慢性拒絶とは、間質の線維化、尿細管萎縮、血管内膜肥厚などに代表される病理像を伴いながら腎機能が失われていく拒絶反応で、移植後数ヶ月から数年後にかけて緩やかに起こることが知られている。しかし、CNIs も慢性拒絶には有効性を示さず、むしろ CNIs が有する腎毒性が慢性拒絶を引き起こしていると考えられている。そこで、CNIs と同等な強い免疫抑制効果を示し、かつ慢性拒絶を抑制する新規化合物の探索を行った。その標的として、histone deacetylase (HDAC) を選択した。

HDAC は遺伝子の転写を調節する酵素として知られている。その調節メカニズムとしては、DNA が巻き付いたヒストンのアセチル化レベルを調節することにより、クロマチン構造を変化させ、転

写因子と DNA のプロモーターの結合を変化させることが考えられている。実際にヒストン蛋白質のアセチル化状態が細胞の機能、増殖、分化に影響を与えることが報告されており、HDAC 阻害により、拒絶反応に関与する細胞の活性化を抑制できると考えた。これまでに HDAC 阻害剤と免疫抑制効果に関する報告はあるが、移植医療に応用可能な HDAC 阻害剤は未だ報告はされていない。本研究では強力な HDAC 阻害作用を有する FR276457 を見出し、その移植臓器拒絶抑制効果について明らかにした。

FR276457 の in vitro における免疫抑制効果

ヒトにおいて、classical HDAC は少なくとも 11 種類報告されており、系統発生的に class I HDAC (HDAC1, 2, 3, 8, 11) と class II HDAC (HDAC4, 5, 6, 7, 9, 10) に分類されている。今回、そのうちの 6 種類の HDAC 酵素 (HDAC 1, 2, 3, 4, 6, 8) の活性に対する FR276457 の阻害活性を検討した。その結果、FR276457 はいずれのアイソザイムに対しても同等の阻害作用を有しており、pan-HDAC 阻害剤と考えられた。また、T 細胞増殖因子 IL-2 産生に必要な転写因子の一つ NF- κ B の活性化阻害作用を有することが明らかになった。本阻害作用は本薬剤の T 細胞増殖抑制効果を期待させるものであった。次に、in vitro において T 細胞マイトジェンであるコンカナバリン A で刺激したラット脾臓細胞の増殖を tacrolimus と同様に抑制した。さらに、ヒト T 細胞株 Jurkat 細胞の増殖も抑制し、ヒトにおいて免疫抑制効果を発揮することが期待された。

FR276457 はラット異所性心移植モデルで移植心の生着を延長する

移植臓器に対する免疫抑制効果を明らかにするため、ラット異所性心移植モデルで FR276457 の評価を行った。Vehicle 投与群では、移植された心臓は 1 週間以内に全例拒絶され、拍動が停止した。それに対し、FR276457 20mg/kg あるいは 40mg/kg 投与群 (投与期間 14 日間、1 日 1 回投与) では、移植された心臓の生着日数の中央値 (MST) はそれぞれ 17、21 日となり、FR276457 は有意に移植心の生着日数を延長した。さらに単剤では十分な有効性を示さない用量の tacrolimus 0.032 mg/kg (MST = 16 日) と併用することにより、FR276457 は単剤では効果がない 10 mg/kg (MST = 6 日) 以上の用量から有意に移植心の生着日数を延長し、顕著な併用効果を示した (MST = >28 日)。FR276457 が現在移植治療剤として最も使用されている tacrolimus と併用効果を示すことは、臨床応用を考えた場合、大変意味のある結果であった。さらに臨床において強い有効性ととも懸念されている毒性を有する tacrolimus を減量できることは、臨床的に意義があると考えられる。

FR276457 は抗原特異的な細胞傷害活性を抑制する

移植後 5 日時点の vehicle 投与群、FR276457 40 mg/kg 投与群と FR276457 10 mg/kg の tacrolimus 併用群の移植した心臓の病理像を比較した。その結果、vehicle 投与群では、炎症性細胞の浸潤並びに心筋構造の破壊が観察された。Tacrolimus と FR276457 の併用群では、炎症性細胞の浸潤が抑

制され、心筋構造が保持されていた。一方で、FR276457 投与群では心筋構造が保持されていたが、vehicle 投与群と比較して抑制されているものの炎症性細胞の浸潤が観察された。さらに免疫染色を行った結果、FR276457 投与群では vehicle 投与群と比較してマクロファージの浸潤は抑制されていたが、T 細胞の浸潤は抑制されていなかった。そこで、vehicle 投与群、FR276457 投与群から移植心に浸潤した細胞を回収し、それぞれの細胞傷害活性を検討した。その結果、vehicle 投与群由来の浸潤細胞は、自己抗原や third party 抗原に対しては細胞傷害活性を示さずに、アロ抗原に対してのみ強い細胞傷害活性作用を示し、抗原特異性を有していた。一方、FR276457 投与群由来の移植心浸潤細胞の細胞傷害活性は強く抑制されていた。さらに、浸潤細胞を CD8 陽性 T 細胞、CD8 陰性 T 細胞に分離し、それぞれの画分の性質を検討した。その結果、FR276457 投与群由来の CD8 陽性 T 細胞の傷害活性は、vehicle 投与群のそれと比較して細胞傷害活性が抑制されていた。FR276457 投与群由来 CD8 陰性 T 細胞による細胞傷害活性抑制効果は認められなかった。以上の結果から、FR276457 は抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞の分化抑制により拒絶を抑制していると考えられた。さらに、vehicle 投与群由来 CD8 陽性 T 細胞の細胞傷害活性を FR276457 の in vitro 添加により抑制したことから、傷害活性を有する細胞に直接作用し、抑制している可能性も考えられた。

FR276457 はイヌ腎移植モデルで移植腎の生着を延長する

FR276457 の臨床での効果の予測性を高めるため、イヌ腎臓移植モデルにおける効果を検討した。その結果、無処置群では移植腎は移植後 2 週間以内に拒絶されたが、FR276457 投与群では腎機能が改善され、MST が 29 日となった。次に、単剤では効果を示さない tacrolimus 0.04 mg/kg (MST = 15.5 日) との併用効果について検討を行ったところ、FR276457 は併用効果を示し、長期間移植腎が生着した (FR276457 5 mg/kg との併用投与群の MST = >88 日)。HDAC 阻害剤が大動物の移植モデルで有効性を示した報告はなく、本研究により初めて HDAC 阻害剤の移植薬として有効性を示した。

FR276457 はラット尿管片側結紮障害モデルにおいて線維化を抑制する

ラット片側尿管結紮障害モデル (UO モデル) を用いて FR276457 の線維化に対する作用を評価した。病理組織学的解析により、vehicle 投与群に比べて、FR276457 20 mg/kg あるいは 40 mg/kg 投与により、間質の線維化面積は減少した。また、線維化の指標となるヒドロキシプロリンの産生、TGF- β 1 や collagen type 1 α 1 の mRNA の発現なども抑制されていた。これらは、転写因子 NF- κ B 阻害作用に基づくケモカインの 1 つ MCP-1 の産生抑制により、線維化を引き起こすマクロファージの浸潤が抑制されたためと考えられた。以上の結果から、FR276457 は慢性拒絶の特徴の一つである間質の線維化を抑制することが明らかになった。

総括・まとめ

本研究において、HDAC 阻害剤 FR276457 がラット異所性心移植モデル、イヌ腎移植モデルにおいて、単剤並びに tacrolimus と併用することにより急性拒絶を強く抑制することを示した。本結果は、臨床において tacrolimus の減量の可能性を示し、現在問題となっている tacrolimus の毒性を軽減できる可能性を示した。また、これら拒絶抑制効果は、抗原特異的な細胞傷害活性を抑制することにより発揮されていることが考えられた。ラット UUO モデルの結果から、未だ治療薬のない慢性拒絶の特徴の一つ腎の間質の線維化に対しても FR276457 は抑制効果を有する可能性を示した。以上の結果より、HDAC 阻害剤 FR276457 は既存の薬剤とは全く異なるメカニズムを有する、急性拒絶だけでなく慢性拒絶をも抑制しうる新しい治療薬になる可能性が示唆された。