

論文の内容の要旨

論文題目：移植医療における iNOS の関与

氏名：千田 昇

1. 研究背景

移植医療において、急性拒絶は強力な免疫抑制剤によりコントロール可能になり、1年程度の短期間の生存・生着率は高くなってきたが、長期間の生存・生着率は、まだ低く、unmet medical needs となっている。

移植患者の長期生存・生着を妨げる大きな要因は、慢性拒絶である。慢性拒絶は、移植臓器の機能が徐々に低下し、最終的に移植臓器の廃絶につながる不可逆性の病態である。

慢性拒絶に影響を与える因子は、非免疫学的要因と免疫学的要因とに大きく2つに分けられる。免疫抑制剤ではコントロール出来ない非免疫学的要因のひとつとして、虚血再灌流傷害による、周術期の移植臓器の機能不全が挙げられ、長期予後不良因子となっている。また、慢性拒絶の病態において、移植臓器の機能不全に繋がる血管(心臓、腎臓)、気管(肺)、胆管(肝臓)の閉塞がみとめられる。上記の虚血再灌流傷害、および各臓器の管腔閉塞において、Nitric Oxide(NO)の関与が示唆されている。

Nitric Oxide(NO)は、多くの生理学的反応の制御に関わると共に、多くの病態形成にも関わる。NOは、L-arginine から3つの isoform からなる酵素である nitric oxide synthase(NOS)により生成される。これらの3つの isoform のうち、2つは恒常的に発現し、主として血管内皮に発現する endothelial NOS(eNOS)、中枢神経系に発現する neuronal NOS(nNOS)とに分類される。正常な生理的条件下で、これらの NOS は少量かつ一過性の NO を、細胞内カルシウム濃度の上昇に反応して生成し、血圧、血小板凝集、神経伝達を制御するにはたらく。一方、inducible NOS(iNOS)は、endotoxin やサイトカインにより発現が誘導され、多量かつ持続的に NO を生成する。これ

ら iNOS により生成する NO および NO 由来の代謝物により、細胞毒性および組織傷害を引き起こし、ヒトの多くの疾患の病態形成に寄与すると考えられている。

非選択的な NO 産生阻害は、恒常性維持に関与する NO も抑制することから、副作用を発現し得ると考えられる。その一方、iNOS を選択的に阻害することが出来れば、iNOS 由来の NO が寄与すると考えられる病態に対して、副作用を発現することなく、安全に予防・治療し得ると考えられる。

2.研究目的

- ①病態における iNOS の関与を検討するために、iNOS を選択的に阻害する薬剤を創出する。
- ②虚血再灌流傷害による臓器機能不全、および移植後の血管内腔狭窄に対する iNOS 選択的阻害剤の作用を検討し、各病態への iNOS 由来の NO の寄与を明確化する。

3.研究成果

①iNOS 選択的阻害剤の創出

マウス macrophage 系 cell line である RAW264.7 cell における LPS+IFN γ の共刺激により産生される iNOS 由来の NO 産生に対する抑制作用を指標として iNOS 阻害剤を探索し、さらに、経口吸収性、代謝安定性等の最適化により FR260330 を得た。FR260330 は、ラット脾細胞における LPS 刺激による iNOS 由来の NO 産生およびヒト結腸癌細胞におけるサイトカイン刺激による iNOS 由来の NO 産生を濃度依存的に抑制した。その一方、FR260330 は、ラット脾細胞における concanavalin A(ConA)刺激による TNF α および IFN γ の産生には影響を与えなかった。

FR260330 は、L-nitro arginine(L-NA)や L-nitro iminoethyl lysine(L-NIL)とは異なり、直接的な iNOS 酵素阻害作用は示さなかった。また、RAW264.7 cell を LPS+IFN γ の共刺激することにより誘導される iNOS タンパクの発現に対して影響を与えなかった。その際、FR260330 存在下で LPS+IFN γ の共刺激をして得られた iNOS タンパクの NOS 活性を測定したところ、NOS 活性がほぼ完全に消失したことから、FR260330 は、iNOS の活性化に関わる dimer 化を抑制することにより、iNOS 活性を抑制すると考えられた。

ラットに LPS を静脈内投与することにより、末梢血での NOx 濃度が上昇するが、LPS を静脈内に投与する前に FR260330 を経口投与することにより、末梢血での NOx 濃度の上昇が FR260330 の投与用量依存的に抑制された(IC₅₀ 1.6mg/kg(p.o.))。その一方、ラットに FR260330 100mg/kg(p.o.) を投与することにより、平均血圧はほとんど変動せず、eNOS を阻害した際に生じる明らかな昇圧作用はみとめられなかった。

(小括)直接的な iNOS 酵素阻害作用を有さず、また、iNOS タンパク発現に対する直接的な影響も示さず、iNOS タンパクの活性化に関わる dimer 化を阻害することにより、iNOS 活性を抑制すると考えられる FR260330 を創出した。その一方、FR260330 は、ラット脾臓細胞におけるサイトカイン産生には影響を与えなかった。また、FR260330 は、in vivo において iNOS 由来の NO 産生を抑制する投与用量と比較して、数 10 倍高用量の投与でも eNOS 阻害作用に基づく昇圧作用を示さないことから、iNOS の活性を選択的に抑制すると考えられた。以上のことから、FR260330 は、各病態における iNOS 由来の NO の寄与を考察するための、有用なツールとなると考えられた。さらに、臨床においても、iNOS が関与すると考えられる病態への治療薬となる可能性が示

唆された。

②-1 ; 虚血再灌流傷害による iNOS の寄与検討

ラットの腎臓に虚血再灌流傷害を与えることで血中クレアチニン値が上昇(腎機能低下)するが、iNOS 選択的阻害剤である FR260330 を虚血前および再灌流後の連日投与することにより、虚血再灌流傷害による血中クレアチニン値上昇が投与用量依存的に抑制された。また、サルにおいても、ラットと同様に、FR260330 を虚血前および再灌流後に連日投与することにより、虚血再灌流傷害による血中クレアチニン値上昇が抑制された。

さらに、40 時間冷保存したラットの肝臓を同系統のラットの移植した際、移植後のラットの生存率が 20%となるが、FR260330 を移植前および移植後 3 日間投与することにより、移植後の生存率が 80%となった。また、その際、FR260330 の投与により、移植 6 時間後における血中 NOx 値、および移植 6 および 24 時間後の GOT/GPT の上昇、移植 6 時間後の移植片への ED-1/CD3 陽性細胞の浸潤、移植片でのサイトカイン/ケモカインの発現が抑制され、さらに、移植片での TUNEL 陽性細胞数、Bax/Bcl-2 も低下し、抗 apoptosis 作用の発現が示唆された。

(小括)FR260330 は、ラットおよびサルの腎臓の虚血再灌流傷害による腎機能低下に対して明確な保護効果を有し、さらに、冷保存したラットの肝臓を同系統のラットに移植した際の虚血再灌流傷害による肝機能低下に起因すると考えられる、移植後の生存率の低下を抑制することから、虚血再灌流傷害による移植周術期における腎臓および肝臓の機能低下における iNOS 由来の NO の関与が示唆された。

②-2 ; 移植後の血管内腔狭窄に対する iNOS の寄与検討

ラットにおいて異系統間の大動脈移植を実施し、移植 90 日後の血管内腔の狭窄への影響を検討したところ、FR260330 を移植日より連日投与することにより、移植後の血管内腔の狭窄が投与用量依存的に抑制された。また、FR260330 を免疫抑制剤である FK506 と併用投与することにより、FK506 を単独投与した際と比較して、移植後の血管内腔の狭窄がより強く抑制された。

(小括)慢性拒絶における典型的な病態のひとつである、移植後の血管内腔の狭窄に対して FR260330 が明確な抑制効果を示したことから、心臓、および腎臓移植患者における移植後の血管内腔の狭窄への iNOS 由来の NO の関与が示唆された。

4.総括

①直接的な iNOS 酵素阻害作用は有さず、また、iNOS タンパク発現に対する直接的な影響も示さず、iiNOS 活性の発現に必要な iNOS の dimer 化を阻害するといった、ユニークなメカニズムにより、iNOS の活性を強力かつ選択的に抑制する FR260330 を見出した。

②ラットおよびサルの腎臓の虚血再灌流傷害による機能不全、およびラットの肝臓の虚血再灌流傷害による機能低下に起因すると考えられる生存率低下を FR260330 が抑制したことから、虚血再灌流傷害による移植周術期における腎臓および肝臓の機能低下における iNOS の関与が示唆された。

③異系統間のラット大動脈移植後の血管内腔狭窄を、FR260330 が抑制したことから、心臓、および腎臓移植患者における移植後の血管内腔の狭窄への iNOS の関与が示唆された。

④以上の検討により、移植医療において、虚血再灌流傷害による周術期の移植臓器の機能不全、および移植後の臓器の血管内腔の狭窄に iNOS が関与していると考えられることから、iNOS 選択的な阻害剤である FR260330 が移植周術期の機能不全を抑制し、移植後の臓器の血管内腔の狭窄を共に抑制することにより、移植臓器の長期生着をもたらすことが期待されると考えられた。