

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 千田 昇

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(一酸化窒素、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。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、神経伝達の制御因子として働く。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、副作用を発現し易いと考えられる。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。そこで本研究は、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、の2点を主な目的とした。

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 タンパク質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 タンパク質の 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 NO x 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 NO x 濃度の上昇が FR260330 の用量依存的に抑制された。その一方、ラットの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認められなかった。以上のことから、FR260330 は、各病態における iNOS 由来の NO の寄与を解析するための、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。

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時に、FR260330 を移植前および移植後 3 日間投与することにより、移植後の生存率が対照群の4倍の 80%となった。FR260330 の投与により、移植後の血中 NO x 値、GOT/GPT の上昇、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 作用が示唆された。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は iNOS 由来の NO が関与することが示唆された。

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 を単独投与した場合と比較して、移植後の血管内腔の狭窄がより強く抑制された。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。

本研究により、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 が関与していることが示唆され、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が明らかになった。移植臓器の長期生着に寄与する研究成果であり、博士(薬学)の授与に値すると判断した。