

論文題目 マウス心臓移植モデルにおける選択的PAI-1

阻害剤の影響

氏名 小川 真仁

要旨

背景

心臓移植は拡張型心筋症および拡張相肥大型心筋症、虚血性心筋疾患、心筋の障害が強い弁膜症や、外科手術が困難な先天性の心臓病など、これまでの治療法では救命を期待できない重い心臓病の患者が適用となる。心臓移植後の患者の生命予後は移植片の急性拒絶および慢性拒絶により制御を受けており、心臓移植手術後から10年後には半数の患者の移植心は停止してしまう。移植後1年以内の死因としては感染や急性拒絶によるものが多く、長期的の死亡原因としては慢性拒絶によるものが多い。慢性拒絶は免疫抑制剤では抑えきれないような慢性的な炎症が移植片に影響を与え、移植片の機能廃絶が起るものである。この病態の特徴として移植冠動脈病変 [graft arterial disease (GAD)]が多く見られ冠動脈に重度の血管狭窄がみられる。移植から8年後では50%の罹患率を有することが知られているが、この慢性拒絶による病態機序は複雑でまだ詳しく分っていない。1982年から現在までの間に大きな死亡率の改善がなされておらず有効な治療法はまだ見つかっていない。従ってこれらの病態に対する病態機序の解明や新たな治療法の確立が必要となる。慢性拒絶の進展には炎症が重要な役割があると我々は考えている。いままでの研究では血管周囲に存在する炎症性細胞、特にT細胞がGADの形成に重要だということを証明した。またこれまでの報告により炎症性細胞や炎症性の因子が慢性拒絶時のGADの形成に深く関わっていることが知られており、これらの抑制は心臓移植後の予後に大きく貢献すると考えられる。

Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1はserine proteinaseの一つで線溶系に関わるurokinase-type plasminogen activator (uPA)やtissue-type PA (tPA)の抑制作用をもつ因子である。血中PAI-1濃度の上昇は、心筋梗塞などの血栓症の発症に関わることが知られており、近年では分化した脂肪細胞から産生されることが知られ、肥満による血栓症を引き起こす因子として考えられている。腎臓移植において慢性拒絶反応による組織傷害とともにPAI-1の上昇がみられ、このことによりPAI-1の上昇は慢性拒絶による機能不

全の予測因子としての可能性が報告されている。PAI-1には多型が存在することが報告されておりレシピエントにおけるPAI-1多型だけでなくドナーにおけるPAI-1多型の有無によっても心臓および腎臓移植の長期生着に影響を与えることが知られている。慢性拒絶では組織の線維化が多く見られる。慢性拒絶された組織から採取した線維芽細胞にはPAI-1の発現が上昇おり、PAI-1上昇により線維芽細胞の遊走や接着が誘導されたことが予測される。これらの報告により慢性拒絶の進展とPAI-1は深い関わりがあることが示唆される。

PAI-1阻害剤は抗血栓作用だけでなく抗炎症や抗線維化、内皮細胞の保護作用があると考えられ、心臓移植後の拒絶や多くの心血管病に対して有効な薬剤になると考えられるが、PAI-1に対する効果的な阻害薬はまだない。新たに開発されたPAI-1阻害剤であるIMD-1622はPAI-1の触媒作用部位に結合することにより直接作用する。我々はすでに血管傷害モデルや自己免疫性の心筋炎モデルにおいてPAI-1阻害剤の有効性について報告しており効率的にPAI-1を阻害する薬剤であることが確認されている。しかしながら慢性拒絶に対するPAI-1阻害剤の影響についてはまだわかっておらず、本研究ではIMD-1622のPAI-1阻害効果が急性および慢性拒絶に対してどのような効果を示すかを検討している。

方法

薬剤

選択的PAI-1阻害剤(IMD-1622)はバーチャルスクリーニング法により作製され、直接PAI-1分子の触媒作用部位に結合することで活性を抑制する薬剤である。薬剤は分子医薬設計研究所から入手した。

心臓移植

ドナーマウスの心臓をレシピエントマウスの腹部へ移植する異所性の心臓移植を行った。ドナー心は下大静脈から冷へパリン生理食塩水を灌流させ上行大動脈および肺動脈を切離した。6-0縫合糸にてその他の肺静脈と組織を一度に結紮し心臓を摘出した。心臓は冷えた生理食塩水で保存した。レシピエントマウスは腹部大動脈と下大静脈を露出させ、血流を遮断し、腹部大動脈と静脈側に吻合口を作り、10-0ナイロン縫合糸にてレシピエント側の動脈にある吻合口と移植心の動脈を縫合した。下大静脈と移植心側の肺動脈も同様に血管縫合し血流を再開させ、移植心の拍動が確認後、6-0縫合糸にて腹部を縫合する。急性拒絶モデルはBALB/cA (ハプロタイプ: H2^d)マウスをド

ナー、C57BL/6 (H2^b)マウスをレシピエントとし、慢性拒絶モデルはC57BL/6 (H2^{bm12})マウスをドナー、C57BL/6マウスをレシピエントとして作製した。

IMD-1622 は移植後から評価する日まで連日 1 日 2 回腹腔内投与により与えた (10mg/kg)。移植片の生着は腹部触診を行い、毎日の心臓の拍動を確認した。急性拒絶では移植後 7 日目に移植片を摘出し、慢性拒絶では 60 日目に摘出した。

移植片は病理学的解析のためパラフィン包埋後に病理切片にし、HE 染色、Mallory 染色 Elastica-van-Gieson 染色を行った。CD4、CD8、CD11b、ICAM-1、fibrinogen、PCNA の発現を確認するために凍結切片およびパラフィン切片をそれぞれの因子に対する抗体を用いて同定した。

組織からタンパクと total RNA を抽出し、ザイモグラフィーにて MMP の活性を、定量 RT-PCR にて IFN-gamma、TNF-alpha、IL-2、IL-6、IL-10、IP-10、MCP-1、MIP-1alpha、MIP-1beta の転写量を確認した。

In vitro の解析において、心臓移植後 7 日目のマウスから脾臓とリンパ節を摘出し、単核球を単離した。同様にドナーと同種のマウスからも単核球を単離した後、マイトマイシン処理を行った後に 96 穴培養皿に二群の細胞を等量で混ぜ合わせ混合培養を行った。IMD-1622 は濃度の異なる群を 3 つ用意し、混合する直前に細胞に滴下した。培養後 3 日目に Cell-counting Kit を用いて細胞数を調べた。さらに培養上清を回収し、そこから ELISA を行い IFN-gamma の発現量を確認した。

すべての動物実験は大学の研究ガイドラインに沿って行われた。

結果：

急性拒絶モデルにおいて心臓移植後の移植心は平均 7.2 日(n=6)、最長 8 日で拍動が停止した。IMD-1622 投与群ではその心臓移植の生着は平均 13.7 日(n=6)、最長 23 日まで生着が延長することが確認された(P<0.05)。移植後 7 日目における移植片の病理学的所見では無治療群では炎症性細胞の浸潤が広範囲に認められたが、PAI-1 阻害剤は浸潤細胞の範囲を減少させた。

免疫反応への影響を調べるためにリンパ球混合試験を行った。刺激細胞との混合により著しいリンパ球の細胞増殖が認められたが、IMD-1622 を投与した群では薬剤の用量に依存して細胞増殖の抑制が認められた。この培養から培養液を回収し、IFN-gamma の発現量を ELISA で調べたところ IMD-1622 投与により有意な減少が認められた。この結果から IMD-1622 は T 細胞の増殖とサイトカインの発現を抑制することが確認された。

慢性拒絶モデルにおいて移植後 60 日の心臓では炎症性細胞の浸潤や線維化が広範囲に認められた。また CD4(ヘルパー T 細胞)、CD8 (細胞傷害性 T 細胞)、CD11b(顆粒球および単球細胞)陽性細胞が広範囲に存在し、接着分子の一つである ICAM-1 の発現も認められた。IMD-1622 投与は細胞浸潤や線維化を抑制し、同時にこれらの炎症に関わる因子の減少を示した。

慢性拒絶において GAD の形成は移植片の長期生着に対して重要な役割を持っている。無治療群において慢性拒絶モデルは移植片の冠動脈に 30% 近くの血管の狭窄を生じた。新生内膜では平滑筋様細胞の増殖が見られ、cyclin の一つである PCNA を染色したところ新生内膜に多く発現することがわかった。また新生内膜部に fibrinogen が発現することが確認できた。IMD-1622 治療は GAD の形成、PCNA の発現を抑制し、さらに fibrinogen の形成を抑えた。Fibrinogen の形成の抑制から IMD-1622 は PAI-1 経路を抑制することが確認でき、また PAI-1 阻害による抗炎症作用が慢性拒絶の進展を抑制すると示唆された。

さらに詳しく PAI-1 と炎症因子との関係を調べるために MMP の活性を調べた。MMP は間質の細胞外基質の溶解を行う因子である。それにより浸潤細胞が心筋内に容易に入り込むことができ細胞浸潤を助長される役割を持っている。また内在性の MMP-9 は細胞の遊走に関わっており、炎症に深く関わる因子である。慢性拒絶モデルの移植片からザイモグラフィを行った結果、無治療群の移植片では MMP-9 の活性の上昇が見られることが確認されたが、IMD-1622 投与群ではその活性は抑制されていた。炎症性サイトカインとケモカインの発現を調べたところ移植片における IFN-gamma、IL-2、TNF-alpha、IL-6、MCP-1、MIP-1alpha、MIP-1beta、IP-10 の著しい発現は、IMD-1622 治療群で抑制されていた。興味深いことに Th2 サイトカインである IL-10 は無治療および治療群ともに高値を示していた。この結果により IMD-1622 は MMP-9 の活性の抑制、また Th1 系の炎症系サイトカインや Th1、単球に関わるケモカインの抑制効果を示すことが確認された。

結語：PAI-1 阻害である IMD-1622 は炎症性因子を抑制することにより移植後の急性および慢性拒絶を抑制した。これにより PAI-1 阻害薬は心臓移植において有効な治療法としての可能性を示唆した。