

平成10年度
厚生科学研究費補助金

免疫・アレルギー等研究事業
(臓器移植部門)

研究報告書

1999. 3

「免疫・アレルギー等研究事業」臓器移植部門研究報告

【野本班】移植の免疫寛容に関する研究

総括報告	主任研究者	……野本亀久雄	九州大学生体防御医学 研究所長・免疫部門教授	1
〔テーマ1〕免疫寛容のヒトへの応用				
1-1	ハイテクノロジーの活用による免疫寛容のヒトへの応用に関する研究	……野本亀久雄	九州大学生体防御医学 研究所長・免疫部門教授	6
〔テーマ2〕動物モデルからヒトへの応用				
2-1	骨髄幹細胞移植による免疫寛容の誘導と維持	……小野江和則	北海道大学免疫科学研究 所病理部門教授	9
2-2	単クローン抗体を含む遺伝子工学の活用に関する研究	……磯部 光章	信州大学医学部 第一内科助教授	15
2-3	大型動物（イヌ）による免疫寛容モデルに関する研究	……渡部 浩二	北里大学医学部 免疫学助教授	20
2-4	肺、気管、大動脈移植における免疫寛容の特性に関する研究	……安元 公正	産業医科大学 第二外科教授	25
〔テーマ3〕ヒト臓器移植における免疫寛容の活用				
3-1	CTLA4Igを用いたグラフト特異的免疫抑制療法の開発に関する研究	……藤 堂 省	北海道大学医学部 第一外科教授	32
3-2	生体肝移植における免疫寛容の研究	……田中 紘一	京都大学大学院医学研究 科移植免疫学講座教授	34
3-3	胸腺内ドナー細胞移入による免疫寛容の特性に関する研究	……里 見 進	東北大学医学部 第二外科教授	35
	②免疫抑制薬の投与時刻を考慮した使い方			
	③移植免疫寛容と臓器移植に伴うマイクロキスムに関する基礎的研究			
3-4	ドナー骨髄細胞分割投与及びflt 3 ligandによるmicrochimerismの成立、維持と免疫寛容の心移植への応用に関する研究	……川合 明彦	東京女子医科大学 循環器外科講師	48
3-5	臓器移植におけるサイトメガロウイルス（CMV）感染症の診断・治療と免疫寛容の関わり	……南嶋 洋一	宮崎医科大学副学長・ 微生物教室教授	50

平成10年度免疫・アレルギー等研究事業（臓器移植部門）体制図

感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業

アレルギー部門

移植の免疫寛容に関する研究
主任研究者 野本 龜久 雄
(九州大学生体防御医学研究所教授)

- テーマ1, 免疫寛容のヒトへの応用
- 1-1 骨髄幹細胞移植による免疫寛容の誘導と維持
- 1-2 ヒトへの応用に関する研究
- 野本 龜久 雄 (九州大学生体防御医学研究所 免疫学部門教授)

- テーマ2, 動物モデルからヒトへの応用
- 2-1 骨髄幹細胞移植による免疫寛容の誘導と維持
- 小野江和則 (北海道大学免疫学研究所 病理学部門教授)
- 2-2 単クローン抗体を含む遺伝子工学の活用
- 磯部光章 (信州大学第一内科助教授)
- 2-3 大型動物 (イヌ) による免疫寛容モデルに関する研究
- 渡部浩二 (北里大学免疫学助教授)
- 2-4 肺、気管、大動脈移植における免疫寛容の特性に関する研究
- 安元公正 (産業医科大学第二外科教授)

- テーマ3, ヒト臓器移植における免疫寛容の活用
- 3-1 CTLA-4を用いたガングリド特異的免疫抑制療法の開発
- 高堂 省 (北海道大学第一外科教授)
- 3-2 生体肝移植における免疫寛容の研究
- 田中敏一 (京都大学大学院医学研究科 移植免疫学教授)
- 3-3 胸臓内ドナー細胞移植による免疫寛容の特性に関する研究
- 里見 進 (東北大学第二外科教授)
- 3-4 ドナー骨髄細胞分割投与及びfit-3 ligantによるmicrochimerismの成立、維持と免疫寛容の心移植への応用
- 川合明彦 (東京女子医科大学循環器外科講師)
- 3-5 臓器移植におけるCMV感染症の診断・治療と免疫寛容の関わり
- 岡崎洋一 (宮崎医科大学微生物学教授)

臓器移植部門

臓器移植の基礎整備に関する臨床的研究
主任研究者 長 澤 俊 彦
(香林大学学長、第一内科教授)

- テーマ1, 臓器機能を維持した臓器提供プロセスに関する研究
- 1-1 臓器提供施設における諸問題に関する研究
- 島崎修次 (香林大学救急医学教授)
- 1-2 移植施設・提供施設の院内感染防止対策と施設管理システムに関する研究
- 鈴木運夫 (社) 北里研究所北里医療環境センター長)

- テーマ2, 臓器移植の生着率向上に関する研究
- 2-1 長期移植の生着率向上に関する研究
- 大島伸一 (名古屋大学泌尿器科教授)
- 2-2 臓器提供の立場から見た保存条件に関する研究
- 門田守人 (大阪大学第二外科教授)

- テーマ3, 臓器機能から見たドナー、レシピエントの適切な組み合わせ
- 3-1 レシピエント心の原表態からみたドナー選択
- 松田 暉 (大阪大学第一外科教授)
- 3-2 生体肝、脳死提供肝の移植におけるドナー、レシピエントの組み合わせ
- 葛内雅敏 (東京大学第二外科教授)
- 3-3 腎移植におけるドナー、レシピエントの年齢差の問題点
- 高橋公太 (新潟大学泌尿器科教授)

- テーマ4, レシピエントの術前、術後の管理
- 4-1 移植レシピエントの管理に関する研究
- 小原政男 (東京大学第二内科教授)
- 4-2 心移植レシピエントの管理に関する研究
- 堀 正二 (大阪大学第一内科教授)
- 4-3 腎移植レシピエントの管理に関する研究
- 長澤俊彦 (香林大学学長、第一内科教授)

造血細胞移植と免疫応答に関する研究
主任研究者 小 寺 良 尚
(名古屋第一赤十字病院臓器移植センター長)

- テーマ1, 造血細胞移植の供給率の向上
- 1-1 造血細胞移植の供給率と成績の向上に関する研究
- 小寺良尚 (名古屋第一赤十字病院 骨髄移植センター長)
- 1-2 異人種間骨髄移植の整備と成績向上に関する研究
- 池田康夫 (慶応義塾大学血液内科学教授)

- テーマ2, 移植抗原群のDNAタイピングと免疫応答
- 2-1 HLAのDNAタイピングの普及に関する研究
- 笹月健彦 (九州大学生体防御医学研究所 遺伝学部門教授)
- 2-2 HLA抗原以外のヒトアロ抗原に関する研究
- 十字猛夫 (日本赤十字社中央血液センター長)
- 2-3 移植抗原とGVHD, GVLに関する研究
- 森島泰雄 (愛知県がんセンター一病棟 血液化学療法部部長)

- テーマ3, 臓器移植
- 3-1 臓器移植に関する基礎的並びに臨床的研究
- 加藤俊一 (東海大学小児科助教授)
- 3-2 臓器血バンクの整備に関する研究
- 西平浩一 (神奈川県立こども医療センター 母子保健室長)
- 3-3 臓器移植におけるHLA適合性に関する研究
- 原 宏 (兵庫医科大学輸血部助教授)
- 3-4 造血細胞のex vivo増幅に関する研究
- 中畑龍後 (東京大学医学研究所 癌病態学研究所教授)

- テーマ4, 同種末梢血幹細胞移植
- 4-1 同種末梢血幹細胞移植に関する基礎的研究
- 浅野茂茂 (東京大学医学研究所付属病院長)
- 4-2 同種末梢血幹細胞移植に関する臨床的研究
- 原田実根 (岡山大学第二内科教授)

臓器移植の社会資源整備に向けての研究
主任研究者 北 川 定 謙
((財) 食品薬品安全センター理事長)

- テーマ1, 臓器移植ネットワークに関する研究
- 1-1 コーディネーターの教育、育成に関する研究
- 平賀聖悟 (社会保険三島病院長)
- 1-2 多臓器移植ネットワークへの対応に関する研究
- 寺岡 薫 (東京女子医科大学第三外科教授)
- 1-3 HLA検査と臓器移植ネットワークのあり方に関する研究
- 相原英彦 (国立佐倉病院副院長)

- テーマ2, 移植の普及に関する研究
- 2-1 意思決定カードの普及に関する研究
- 雨宮 浩 (国立小児病院小児医療センター長)
- テーマ3, 移植の評価に関する研究
- 3-1 臓器移植後の追跡、評価の情報システムに関する研究
- 太田和夫 (太田医学研究所長)
- 3-2 臓器移植の追跡、評価の情報システムに関する研究
- 小柳 仁 (東京女子医科大学附属 日本心臓血圧研究所教授)

- テーマ4, 組織移植に関する研究
- 4-1 角質移植ネットワークに関する研究
- 真鍋禮三 ((財) 日本眼病協会の理事長)
- 4-2 組織移植ネットワークに関する研究
- 北村慧一郎 (国立循環器センター 副院長)

- テーマ5, 臓器移植の法的事項に関する研究
- 町野 朔 (上智大学法学部教授)

- テーマ6, 移植医療の社会的効果に関する研究
- 北川定謙 ((財) 食品薬品安全センター理事長)

移植の免疫寛容に関する研究

移植の免疫寛容に関する研究

主任研究者 野本亀久雄 九州大学生体防御医学研究所所長

研究要旨 臓器移植において、免疫寛容と移植臓器の長期管理を目指して、
1) 生体部分肝移植患者における免疫抑制剤からの計画的完全離脱、2) 人間への応用可能なマイルドな免疫寛容導入法の動物モデルでの開発、3) 慢性拒絶反応に伴う移植心冠動脈内膜肥厚の細胞周期調節遺伝子の遺伝子導入によるコントロールに重点をおき、有用な成果を得た。

研究組織

分担研究者

野本亀久雄 九州大学生体防御医学研究所
所長
小野江和則 北海道大学免疫科学研究所
病理部門教授
磯部光章 信州大学医学部第一内科教授
渡部浩二 北里大学医学部免疫学教授
安元公正 産業医科大学第二外科教授
藤堂 省 北海道大学医学部第二外科
教授
田中紘一 京都大学大学院医学研究科
移植免疫学教授
里見 進 東北大学医学部第二外科教授
川合明彦 東京女子医科大学循環器外科
講師
南嶋洋一 宮崎医科大学副学長

となって以来、骨髄抑制に伴う敗血症は問題とならなくなったが、拒絶反応の回避のためシクロスポリンやタクロリムスを投与している経過中に微生物が存在すれば、その微生物に対する感染防御力も低下することになる。存在する微生物が、それに対する感染防御の主軸としてT細胞が働いているタイプのウイルスや細菌である場合、治療に手をやく日和見感染症が発症することになる。この不安をとり除くことが、臓器移植を一般的治療として定着、普及させるためのカギと考えられる。本研究では、近年マウス、ラット系小動物モデルにおいて導入可能となってきた新しい免疫寛容導入法を人間に応用する道を模索する。研究開始後2年目にあたる本年においては、分担研究者、研究協力者の共同研究体制を強化し、動物モデルから人間への橋渡しに焦点をおいた共同研究の中心を、1) 従来行われてきた生体部分肝移植や腎移植の症例を解析し、免疫寛容状態と推定される症例の生体反応の特徴を把握し、積極的な免疫寛容導入のいとぐちを掴む、2) 小動物モデルを中心に、レシピエントのリンパ系、骨髄系への障害作用が少ない新しい免疫寛容導入法を、人間への応用の具体的方法を検討しつつ確立する、3) 免疫寛容導入に抵抗する症例が将来も存在すると推定されるので、免疫抑制剤による長期投与中に生じる慢性拒絶反応への対応を、とくに心移植後の冠

A.研究目的

心停止後の腎提供のみならず、脳死からの心、肝、肺、膵、腎の提供が可能になったが、国民レベルの臓器移植の普及に関する支持はなお強力とはいえないものがある。その背景の1つには脳死の理解とくに感覚としての理解の難しさがあるが、他の1つとして臓器移植後のレシピエントの健康度への不安があげられる。アザシオプリン系薬剤が免疫抑制の中心であった時代には骨髄抑制に伴う敗血症が大問題であったが、ミクロスポリンやタクロリムスが中心

動脈内膜肥厚の防止を対象に、まずモデル動物系で確立する、においた。

B.研究方法

技術的な面では、急性拒絶反応、慢性拒絶反応の発生や進展にかかわる遺伝子、アンチセンス遺伝子の導入が用いられた。理論的検討では、T細胞レセプターやCostimulatory分子からのシグナル伝達をそのプロセスに関与するさまざまな分子レベルで解析し、免疫寛容の導入、維持に関する基本的な機序の把握を行った。心移植、骨髄移植、皮膚移植に用いられるドナー、レシピエントのマウス、ラット、イヌなどの実験動物については、各施設の動物実験関係の倫理委員会の規則に従うのみならず、その規準以上に実験動物への苦痛を軽減する努力を行った。生体部分肝移植の患者において、免疫抑制剤の計画的減量を行う場合、家族あるいは本人の十分なインフォームドコンセントを得て開始し、わずかでも拒絶反応の危険性があらわれた場合、ただちに通常の免疫抑制プロトコールに復帰することとした。

C.研究成果

1.生体部分肝移植、腎移植における免疫寛容の検討。生体部分肝移植患者の免疫抑制剤としてはタクロリムスとステロイドが用いられるが、ステロイドは移植後計画的に減量し、6ヶ月までに中止することを方針とし、72%離脱した。移植後三年を経過し、最近一年間で拒絶反応があらわれなかった28例に計画的減量を試み、15例が完全離脱に成功した。完全離脱とレシピエント体内のマイクロキメリズムの関連性については、有意なデータが得られなかった(田中、他)。腎移植患者についてもステロイドの離脱を10例に試み4例で完全離脱が可能であった。拒絶反応があらわれ、離脱できな

かった症例では、タクロリムスのTrough levelが低いことが示された(里見、他)。さらに人間へ適用可能なモデル系を確立するため、イヌ腎移植で免疫寛容導入法を試みている(渡部、他)。

2.マイルドな免疫寛容導入法の開発。CD28/B7系からの刺激伝達を阻止する目的でCTLA4 IgG遺伝子のアデノウイルスベクターを介する導入を、ラットを用いて行った。この際導入されたCTLA4 IgG遺伝子の発現期間を人為的にコントロールするため、Cre遺伝子を加えて組み込んだアデノウイルスベクターを導入すると、宿主体内でのCTLA4 Igの産生を人為的にコントロールすることが可能となった。免疫寛容の導入、維持に必要な期間のみ、CTLA4 Igを発現させる新しい方法である(藤堂、他)。マイルドな導入、維持法として、マウスにおいて、骨髄幹細胞の移入を試みたが、マイナー抗原のみ異なる組み合わせでは、慢性型のGVHが発生することが示された(小野江、他)。ラットにおけるマイクロキメリズムを増強するため、ラットの骨髄細胞移植後、骨髄細胞刺激因子flt3 ligandを投与した。移植骨髄の生着、増殖が促進され、高度のマイクロキメリズムが確立された(川合、他)。特殊な組織に対する拒絶反応を軽減する目的で、気管片をプログラムドフリーザー凍結し、抗原刺激量を測定したが、抗原刺激量軽減に直結する成果はなお得られていない(安元、他)。これらの多くの免疫寛容導入、維持の方法の基盤となる機序を把握するため、多くの細胞表面分子(CD45他)や細胞内シグナル伝達分子のノックアウトマウスを用い、同種抗原刺激後のシグナル伝達と形質発現の詳細な検討が進められている(野本、他多くの研究協力者)。

3.慢性拒絶反応の回避や随伴現象の軽減。移植心に対して慢性拒絶反応が生じる系

(DBA/2→B10D2)において、移植心に前もって、cdc2 Kinase遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドをHVJ-リポソームに組み込んだ形で導入した。cdc2 Kinaseは細胞周期調節遺伝子の転写に必要なものである。導入された移植心では、慢性拒絶反応に伴う冠動脈内膜肥厚が抑制され、有用性が示唆された(磯部、他)。移植後長期間にわたってレシピエント(人間)を健全に保つカギは感染防御にある、血中の抗CMV抗体のavidity indexを測定することによって、感染時期の推定、抗CMV免疫能の評価が可能となり、長期管理の新しい方法となることが示唆された(南嶋、他)。

D. 考察

生体部分肝移植レシピエント15例に、ステロイド、タクロリムス両剤の完全離脱が可能であったことは、人間においても免疫寛容の積極的応用が可能であること、人間において免疫寛容の実用化をはかるためには肝移植がまず第一の候補になることを示唆している。完全離脱可能であったレシピエントのミクロキメリズムを検討したが、他のレシピエントとの間に有意の差は認められなかった。免疫系の多くの要素を詳細に解析し、その特徴を把握することが、次の目標となる。

動物モデルを用いて、マイルドな免疫寛容導入法を模索する研究の流れでは、免疫細胞内へシグナルを伝達する機能分子のブロックに関して、見るべき成果が得られている。とくに、CTLA4 Ig遺伝子の発現を他の遺伝子でコントロールする方法は、免疫寛容導入、維持に要求される期間に限定して、発現を抑制することを可能とするものであり、生体防御系全体への負荷を出来る限り軽減するという目的に合致するものである。また、免疫関連細胞内のシグナル伝達系が、免疫寛容にどのようにかわる

かについての詳細な研究成果は、次の研究段階においてさまざまな免疫寛容導入系の個性を明確にするために有用なものと判断され、次年度の研究において、共通の情報、手法として活用される。

移植心の慢性拒絶反応に伴う冠動脈内膜肥厚をcdc2 kinase遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入して抑制できたことは、免疫寛容導入の網からはずれる症例に関しても、長期間の移植心の管理を可能にするものである。人間での実用化への進めは、その有用性は高いと判断される。

E. 結論

出来る限り短い期間内で、人間に免疫寛容が応用できる道を拓くという本研究の大目標に期待した以上のテンポで近づきつつあると判断している。基礎的開発研究で検討され、有用性が示唆され、さらに安全性が保証された方法が、生体部分肝移植における免疫抑制剤の積極的離脱に応用されるようになれば、目標への達成はさらに近づくものと考えられる。脳死・臓器移植の実現を経て、社会からの要請はさらに強くなるものと予測されるが、対応は可能であると確信している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Iwabuchi, C., Iwabuchi, K., Nakagawa, K., Takayama, Y., Nishihori, H., Tone, S., Ogasawara, K., Good, R. A. and Onoe, K.: Intrathymic selection of NK 1.1+ α/β T cell antigen receptor (TCR) + cells in transgenic mice bearing TCR specific for chicken ovalbumin and restricted to I-Ad. Proc. Natl. Acad. USA. 95, 8199-8204, 1998.

2) Isobe, M., Suzuki, J., Morishita, R.,

Amano, J., Kaneda, Y., Sawa, Y., Matsuda, H., Ogihara, T., Horie, S., Okubo, Y., and Sekiguchi, M.: Down-regulation of endothelin-1 expression in allograft coronary arteries after gene therapy targeting cdk2 kinase. *Transplant Proc.*, 30 : 1007-1008, 1998.

3) Suzuki, J., Izawa, A., Morishita, R., Kaneda, Y., Sawa, Y., Okubo, Y., Ogihara, T., Sekiguchi, M., and Isobe, M.: Prevention of cardiac allograft arteriopathy by antisense cdc2 kinase oligonucleotide. *Transplant Proc.*, 31 : 867-868, 1999.

4) Nakanishi, R., Hashimoto, M., Muranaka, H., Umesue, M., Kohno, H., and Yasumoto, K. : Maximal Period of Cryopreservation Using Bisell R for Rat Tracheal Isografts. *J. Thorac Cardiovasc Surg* (in press).

5) Yasuda, K., Nemoto, T., Ohashi, Y., Satomi, S., Murata, K., Ishii, N., Takeshita, T., and Sugamura, K. : Prolongation of allograft survival by administration of mAb specific for the three subunits of IL-2 receptor, *International Immunology* 10(5) : 561-567, 1998

6) Mizuta, K., et al. : Dose-dependent reduction of bile secretion in cyclosporine treated rats, *Transplantation* 65 : 758-759, 1998.

7) Suzuki, K., Yan H, Li X. K., Amemiya H., Suzuki, S., and Kimura, H. : Prevention of experimentally induced autoimmune type I diabetes in rats by new immunosuppressive reagent FTY720, *Transplant Proc.* 60 : 1044, 1998.

8) Watanabe, K., Masaki, Y., Maruyama, S., Endo, T., Koshida, K., Sato, K., and Kakita, A. : Prolongation effect of FK506 on the survival of 3-day

preserved kidney allografts in dogs, *Transplant Proc.* 30(7) : 3603-3605, 1998.

9) 田中紘一 : 小児生体肝移植の長期予後, 肝胆膵37(6)1998.
2.学会発表

1) 綿野敬子、岩淵和也、藤井聡、石森直樹、小笠原一誠、小野江和則 : マウス allograft inflammatory factor-1(AIF-1) cDNAのクローニングおよび、組織分布の解析. 第28回日本免疫学会総会・学術集会, 1998. (神戸)

2) 鈴木純一、磯部光章、天野淳、森下竜一、澤芳樹、伊沢淳、高橋済、関口守衛、荻原俊男、松田暉 : アンチセンス遺伝子導入による移植心冠動脈硬化の予防. 第16回日本心臓移植研究会, 1998. (東京)

3) 中西良一、小山倫浩、大崎敏弘、安元公正 : 凍結保存気管移植における死体気管の有用性 -温虚血時間の限界-. 第50回日本気管・食道科学会総会, 1998. (神戸)

4) 山下健一郎、野村克、大村孝志、竹原めぐみ、柳田尚之、小西勝人、鈴木友巳、嶋村剛、岸田明博、古川博之、藤堂省 : FTY720のラット心及び肝移植における免疫抑制効果. 第99回日本外科学会, 1999. (福岡)

5) 竹原めぐみ、村上正晃、中川泉、小西勝人、野村克、柳田尚之、大村孝志、古川博之、岸田明博、鐘ヶ江裕美、斉藤泉、上出利光、藤堂省 : CTLA4IgG発現アデノウイルスベクターのCre/loxPによる発現制御. 第99回日本外科学会総会, 1999. (福岡)

6) 浅倉毅、大河内信弘、織井崇、平野拓司、里見進 : 生体肝移植における移植早期の肝増殖関与サイトカインの変動. 第52回日本消化器外科学会, 1998.

6) 川合明彦 : 新しい骨髄細胞刺激因子の心移植への応用. 第51回日本胸部外科学会総会, 日本胸部外科学会雑誌46 ;

61 : 1998.

7) 渡部浩二、金子剛久、大谷文雄、遠藤忠雄、佐藤公史、真崎義彦：死体腎移植へ応用可能な成犬をモデルにした免疫寛容の導入法．第34回日本移植学会総会臨時号，66 : 161,1998.

8) 田中紘一：生体肝移植後の免疫抑制剤減量、離脱の試み，第34回日本移植学会，1998. (東京)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

H.研究協力者

本研究組織においては、各分担研究者が各自指名して協力を求める協力者の他に、10名の中堅、若手研究者を研究組織としての研究協力者として共同研究への参加を要請した。

研究協力者

鈴木盛一	国立小児病院小児医療研究センター 実験外科生体工学部部長
大村孝志	北海道大学医学部第一外科医員
馬集田壽	順天堂大学医学部免疫学助手
猪股裕紀洋	京都大学大学院医学研究科移植免疫学 助教授
江藤正俊	九州大学医学部泌尿器科助手
林 衆治	名古屋大学医学部第二外科助手
小林英司	自治医科大学臨床薬理学助教授
木村廣光	国立小児病院小児医療研究センター生体工学研究室室長
中山俊憲	千葉大学大学院医学研究科免疫発生学教室 助教授
金田安史	大阪大学細胞工学センター細胞生体工学 助教授

分担研究者 野本亀久雄 九州大学生体防御医学研究所教授

研究要旨 従来の薬剤誘導性免疫寛容の導入法を改善し、骨髄細胞レベルでの安定なキメリズムの成立とMHC不一致の組合せにおけるマウス同種皮膚移植の永久生着を実現した。また、ラット同所性肝移植における従来法の有効性とマウス同所性肝移植での自然生着におけるFas/Fasリガンドの重要性等が明らかになった。

A. 研究目的

ヒト臓器移植における今後の最大の問題の一つが、ドナー不足である。そこで、安全性と確実性の高い免疫寛容のヒト臓器移植への活用が緊急の問題として要求されている。しかしながら、現在、数多くの免疫寛容誘導法が試みられているのにもかかわらず、ヒトに応用可能な免疫寛容誘導法はまだ確立していない。我々は、MHC不一致である組合せでのマウス同種皮膚移植における移植片の永久生着を実現する目的で、我々がこれまで開発・研究してきた薬剤誘導性免疫寛容系を改善した。また、肝移植における薬剤誘導性免疫寛容の導入法の有効性を検討するために、ラット同所性肝移植において、従来の薬剤誘導性免疫寛容の導入法を試みた。さらに、マウス同所性同種肝移植における自然生着のメカニズムを明らかにする目的で、FasまたはFasリガンド (FasL) に変異をもつマウスを用いて、免疫寛容の誘導におけるFas/FasLの役割を検討した。

B. 研究方法

(1) マウス同種皮膚移植における薬剤誘導性免疫寛容の導入法の改善: B10マウス(H-2^b)にB10.D2(H-2^d)の脾細胞 1×10^8 を静注し、その2日後に、cyclophosphamide (CP, 200 mg/kg)とbusulphan (BU, 25 or 50 mg/kg)を同時に腹腔内に投与した。

さらに、その翌日、B10D2由来のT細胞除去骨髄細胞を静注し、その14日後にB10.D2由来の皮膚片を移植した。本法の改善点は、骨髄抑制作用を持つBUの投与と骨髄細胞の移入であり、骨髄細胞レベルの高いキメリズムが達成されることが期待できる。

(2) ラット同所性肝移植における薬剤誘導性免疫寛容の誘導法 (従来法): Lewisラット(RT-1^l)にDAラット(RT-1^a)の脾細胞(1×10^8)および骨髄細胞(5×10^7)を静注し、その2日後に、CP (100 mg/kg)を腹腔内に投与した。その25~35日後に、DAラット由来の肝臓の同所性移植を施行した。

(3) マウス同所性肝移植: C57BL/6 (B6 +/+ , *lpr/lpr*)マウスをドナーに、MRL/MpJ (MRL +/+ , *lpr/lpr*, *gld/gld*)マウスをレシピエントとして、同所性肝移植を施行した。

C. 結果

(1) 骨髄抑制作用の強いBUと骨髄細胞の静注を併用することによって、従来のCP誘導性免疫寛容導入法で不可能であった、MHC不一致の同種の組合せにおける皮膚移植片の永久生着に成功した。この方法により、骨髄幹細胞レベルでの混合キメラ状態が誘導されるとともに、末梢リンパ球におけるドナー由来の細胞の割合が、80%を越えた。それ

と同時に、ドナー反応性T細胞のクローン破壊も観察された。

(2) ラット同所性肝移植における平均生存日数は、無処理群で13.8日、ドナー細胞のみ移入した群で16.8日、CPのみを投与した群で39日、ドナー細胞移入・CP投与を併用した群で>115日であった。移植後8日目の血清T.bil値は、併用群では他の群よりも有意に低かった。移植後8日目のドナー肝における病理組織学的検討では、全群において、急性拒絶の像が認められた。また、術後40日目のCPのみを投与した群では、門脈浸潤域の著明な繊維化を伴う急性拒絶が認められたが、術後115日目の併用群では、細胞浸潤はなく、軽度の繊維化を認めるのみであった。

(3) Fas遺伝子の変異をもつ*lpr/lpr*マウスとFasL遺伝子に変異をもつ*gld/gld*マウスを用いて、MRLおよびB6の同種間での肝移植を検討した結果、レシピエントにおけるFasの発現と、ドナーにおけるFasLの発現が、マウス同所性同種肝移植における自然生着に重要であることが示唆された。また、自然生着する場合は、術後5~10日目の肝内浸潤細胞にドナー特異的細胞障害活性が認められたが、術後15日目ではその細胞障害活性は著明に低下した。そのエフェクター細胞は、CD8陽性細胞であり、標的細胞としてB6+/+および*lpr/lpr*マウス由来の細胞を用いた時に、その細胞障害活性に有意差は認められなかった。

D. 考察

(1) BU投与によって、骨髄にドナー由来の造血幹細胞を定着させる十分な空間ができたことが、安定かつより高いキメリズムの達成に至った要因であると考えられる。また、その安定した高いキメリズムによって、MHC不一致の同種間での拒絶反応の抑制(すなわち、免疫寛容の誘導)と皮

膚移植片の永久生着が成立するに至ったことが示唆される。

(2) ラット同所性肝移植では、CPを用いた従来法で、十分に同種肝の(永久)長期生着が実現した。したがって、肝移植においては、従来法でも十分に有効であることが示唆される。

(3) ラットやヒトと異なって、マウスでは、同種(fully allogeneic)間での肝移植において、高頻度で同種ドナー肝の自然生着が誘導される。本研究において、レシピエントにおけるFasとドナーにおけるFasLの相互作用が、この自然生着に重要であることが示唆される。したがって、マウスにおいては、ドナー肝細胞によって、レシピエントのドナー特異的T細胞において、効率よくアポトーシスが誘導・除去されている可能性が考えられる。

E. 結論

我々の開発した薬剤(CP)誘導性免疫寛容導入の従来法の改善によって、MHC不一致の同種組合せ間でのマウス皮膚移植において、移植片の永久生着を実現した。また、従来法が、ラット同所性肝移植に有効であることを証明した。さらに、マウス同所性肝移植における自然生着に、Fas/FasL間の相互作用が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshikawa M, Tomita Y, Uchida T, Zhang QW, and Nomoto K: Lack of pluripotent stem cell engraftment in cyclophosphamide-induced tolerance. *Transplant. Proc.* 31: 898-899, 1999.

2) Umetsue M, Mayumi H, Kong YY, Omoto K, Muranaka H, Nakanishi R, Kohno H, Yasumoto K, Kishihara K, and Nomoto K:

Rejection of discordant skin xenografts by CD4⁻ CD8⁻ TCR $\alpha\beta$ ⁺ cells in CD4⁻ and CD8 deficient mice. Transplant. Proc. 31:890-891, 1999.

3) Uchiyama H, Kong YY, Kishihara K, Sugimachi K, and Nomoto K: Approach to withdrawal from tacrolimus in a fully allogeneic murine skin graft, Immunology (accepted).

2. 学会発表

1) anti-T cell receptor α/β monoclonal antibody, low dose irradiation、および骨髄移植を用いた免疫寛容誘導期におけるB細胞の変動：岡野慎士，野本健一，内山秀昭，野本亀久雄，日本免疫学会総会・学術集会記録 28巻:370, 4-C1-465, 1998.

2) タクロリムス状態からの免疫寛容誘導：内山秀昭，岸原健二，野本亀久雄，日本免疫学会総会・学術集会記録 28巻:371, 4-C1-466, 1998.

3) Cyclophosphamide(CP)誘導性免疫寛容 I：MHC不一致の組み合わせにおける皮膚片移植免疫寛容と混合キメラ状態の誘導：吉川正博，富田幸裕，内田孝之，張啓偉，野本亀久雄，日本免疫学会総会・学術集会記録 28巻:371, 4-C1-467, 1998.

4) Cyclophosphamide(CP)誘導性免疫寛容：薬剤誘導性免疫寛容系における初めてのMHC抗原不一致の寛容誘導系の確立：吉川正博，富田幸裕，内田孝之，張啓偉，岡野慎士，野本亀久雄，日本移植学会雑誌 33巻:123, S2-1, 1998.

5) Cyclophosphamide(CP)誘導性免疫寛容 I：MHC不一致の組み合わせにおける皮膚片移植免疫寛容と混合キメラ状態の誘導：吉川正博，富田幸裕，内田孝之，張啓偉，野本亀久雄，日本移植学会雑誌 33巻:160, 38, 1998.

6) 肝移植におけるサイクロフォスファ

ミド誘導性免疫寛容：岡野慎士，江藤正俊，皆川亮介，大田隆司，橋本宏治，池上徹，内山秀昭，野本健一，西崎隆，野本亀久雄，杉町圭蔵，日本外科学会総会 P-697, 1999.

G 知的所有権の取得状況

1.特許取得

なし。

2.実用新案登録

なし。

3.その他

なし。

研究課題 骨髄幹細胞移植による免疫寛容の誘導と維持

分担研究者 小野江和則 (北海道大学免疫科学研究所教授)
研究協力者 大村 孝志 (北海道大学医学部第一外科)

研究要旨 臓器移植における拒絶を抑制するには、免疫抑制剤による方法が一般に採られている。しかし、患者のQOLを考慮すればこの方法には易感染性などの問題点が残る。我々はリスクの少ない移植臓器抗原特異的免疫寛容の誘導を究極の目的として、骨髄幹細胞移植による寛容誘導を試み、移植後の急性GVHRによって寛容誘導の破綻が生ずることを明らかにしてきた。今年度では慢性期においても宿主抗原反応性細胞が産生されることを明らかにした。また、T細胞の副刺激系路をブロックする移植免疫抑制法の応用技術を開発した。

A. 研究目的

致死線量照射ホストに異系ドナーマウスの骨髄幹細胞を移植し、骨髄キメラマウスを樹立すると、ドナー由来T細胞はドナー、ホスト両抗原に対して寛容となる。この寛容はホスト胸腺における負の選択による。しかし、同じ組み合わせで急性のマイナーGVHRを誘導した骨髄移植キメラでは、ある種の宿主抗原に反応性のドナーT細胞が負の選択を受けず、末梢に出現することを明らかにしている。本年度は、この寛容誘導の破綻が、骨髄再建後慢性期にどのようなコースをたどるか、また、移植免疫反応をT細胞の副刺激系ブロックによって抑制する方法を確立することを目的とした。即ち、我々はこれまでCTLA-4-IgGを持つAdex1CACTLA-4-IgG(AxCT)を作製し、マウス生体内においてAxCT由来のCTLA-4-IgGが血中に大量に長期間存在すること、同時投与によりアデノウイルスベクター、Adex1CalacZ(AxlacZ)の長期発現と二次投与が可能となることを示した。しかし、ヒトへの臨床応用を考えるとCTLA-4-IgGの血中での存在は感染症等の危険性を増すので、人為的にAxCT由来のCTLA-4-IgG発現を制御することが必要と考えられた。今年度で

は、Cre/loxPシステムを用いてCTLA-4-IgG分子の発現を人為的に停止できるAdex1Caloxp-CTLA-4-IgG(AxloxPCT)を作製して発現を解析した。

B. 研究方法

1) 骨髄キメラ：致死線量(11Gy)放射線照射AKR/J(Mls-1^a,Thy1.1)、B10.BR(Mls-1^b,Thy1.2)マウスに、B10.A(Mls-1^b,Thy1.2)、B10.BRマウスの骨髄細胞(1×10⁷/マウス)をT細胞除去後、移植、再建した(コントロールキメラ)。またマイナーGVHRを誘導するために、1×10⁵個の脾T細胞を骨髄細胞と共に移植した(GVHRキメラ)。移植後経時的に胸腺、リンパ節、脾細胞を採取し、キメリズムを調べると共に、Mls-1^a反応性Vβ6⁺T細胞の割合をフローサイトメーターで解析した。

2) MLR：アロ反応性を解析するために、キメラT細胞と、マイトマイシン処理した各種脾細胞(抗原提示細胞(APC))を用い、MLRを行った。

3) AxloxPCTの作製と発現：AxloxPCTはCTLA-4-IgG cDNAをloxP配列の間に入れ、発現単位をpAdex1cwに導入した後、定法に従って作製した。

4) CTLA-4-IgG 分子の発現制御の解析：
マウスに AxloxpcCT および AxCre を投与し、血清中の CTLA-4-IgG 分子を ELISA 法にて定量した。

C. 研究結果

1) 骨髄移植慢性期の Vβ6⁺T 細胞産生

コントロールキメラでは骨髄移植 2-3 週で、Vβ6⁺T 細胞がクローン消去されるが、マイナーな急性 GVHR キメラでは移植後 5 週目にも Vβ6⁺T 細胞が認められる。これらはドナー骨髄前駆細胞から新たにホスト胸腺内で産生されたものであることは既に報告している。今回さらに骨髄移植後 8 週目以降も Vβ6⁺T 細胞が存在することを明らかにした。さらに、この負の選択の破綻は H-2 適合キメラでも生ずることが判明した。また、GVHR [B10.BR→AKR] キメラではホストのみならずドナーに対する MLR も陽性で、GVHR 慢性期には自己寛容誘導が一般的に機能しないことが示唆された。

2) AxloxpcCT 投与マウス血中の CTLA-4Ig の消長

AxloxpcCT と AxCre を 1:50 および 1:100 の比率にてマウスに感染させると 3 週間以内に血中には CTLA-4-IgG 分子が認められなくなることが判明した。

D. 考察

骨髄幹細胞移植による寛容誘導は、ドナー抗原特異的である点で、患者の QOL には有利である。しかし、少数混在する成熟免疫細胞によるマイナー GVHR が、たとえ臨床的には明確でなくともその後の自己免疫につながる危険性が示唆された。特に MHC ではなくマイナー抗原単独ミスマッチでも、このような GVHR の影響が認められたことは、ヒト HLA のマッチング以外に今後問題となると考えられる。

また、AxloxpcCT と AxlacZ の同時投与後、AxCreにて血中 CTLA-4-IgG を除去した後も、AxlacZ の長期発現と二次投与が可能となる

か否かを検討できるシステムができ、ラット、マウスを用いた移植のシステムで CD28/CTLA-4-B7 信号伝達系の役割を検討できるシステムができたことは、今後の免疫抑制療法にとって、有用と考えられる。

E. 結論

骨髄幹細胞移植後のマイナーGVHRは、T細胞の負の選択を障害し、慢性GVHRの原因となることが判明した。また、生体内にて目的遺伝子の発現を人為的に停止できるアデノウイルスベクターのシステムを考案し、CTLA-4-IgGの発現システムに応用した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Namba, K., Ogasawara, K., Kitaichi, N., Matsuki, N., Takahashi, A., Sasamoto, Y., Kotake, S., Matsuda, H., Iwabuchi, K., Ohno, S. and Onoé, K.: Identification of a peptide inducing experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in H-2A^k carrying mice. *Clin. Exp. Immunol.* 111, 442-449, 1998.
- 2) Kizaki, T., Ookawara, T., Oh-ishi, S., Itoh, Y., Iwabuchi, K., Onoé, K., Day, N.K., Good, R.A. and Ohno, H.: An increase in basal glucocorticoid concentration with age induced suppressor macrophages with high density FcγRII/III. *Immunology*, 93, 409-414, 1998.
- 3) Takahashi, A., Ogasawara, K., Matsuki, N., Fujinaga, K., Nakaya, T., Ikuta, K., Auwanit, W., Honda, M., Fukui, Y., Sasazuki, T., Iwabuchi, K. and Onoé, K.: Development of peptide vaccines inducing production of neutralizing antibodies against HIV-1 viruses in HLA-DQ6 mice. *Vaccine*, 16(16), 1537-1543, 1998.
- 4) Iwabuchi, C., Iwabuchi, K., Nakagawa, K., Takayanagi, T., Nishihori, H., Tone, S., Ogasawara, K., Good, R.A. and Onoé, K.: Intrathymic selection of NK1.1⁺α/β T cell antigen receptor (TCR)⁺ cells in transgenic mice bearing TCR specific for chicken ovalbumin and restricted to I-A^d. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 8199-8204, 1998.
- 5) Koujyo, T., Hatakeyama, S., Yamada, H., Iwabuchi, K., Kajino, K., Ogasawara, K., Onoé, K. and Fujimoto, S.: Induction of endometriosis and adenomyosis by transvaginal pituitary transplantation in mice with and without natural killer cell activity. *Ame. J. Reprod. Immunol.* 40(6), 441-446, 1998.
- 6) Takahashi, A., Iwabuchi, K., Suzuki, M., Ogasawara, K., Nishihira, J. and Onoé, K.: Antisense macrophage migration inhibitory factor (MIF) prevents anti-IgM mediated growth arrest and apoptosis of a murine B cell line by regulating cell cycle progression. *Microbiol. Immunol.* 43(1), 61-67, 1999.
- 7) Matsuki, N., Ogasawara, K., Takami, K., Namba, K., Takahashi, A., Fukui, Y., Sasazuki, T., Iwabuchi, K., Good, R.A. and Onoé, K.: Prevention of infection of influenza virus in DQ6 mice, a human model, by a peptide vaccine prepared according to the cassette theory. *Vaccines* (in press)
- 8) Kitaichi, N., Kotake, S., Sasamoto, Y., Namba, K., Matsuda, A., Ogasawara, K., Onoé, K., Matsuda, H. and Nishihira, J.: Prominent increase of macrophage migration inhibitory factor in the sera of patients with Uveitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 40, 247-250, 1999
- 9) Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Nakayama, K., Shirane, M., Matsumoto, M., Hattori,

- K., Higashi, H., Nakano, H., Okumura, K., Onoé, K., Good, R.A. and Nakayama, K.: Ubiquitin-dependent degradation of I κ B is mediated by a novel ubiquitin ligase SCF^{FWD1}. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (in press)
- 10) 小野江和則, 菊地浩吉: 胸腺の学校. 「周回道免疫学」菊地浩吉編, メディカルレビュー社, 大阪, 14-30, 1998.
 - 11) 阿戸学, 岩渕和也, 小野江和則: マクロファージの分化と遺伝子発現. 病理と臨床, 16 (9), 1062-1069, 1998.
 - 12) 小野江和則: (特集) NK-T細胞とは. アレルギー科, 6 (1), 1-8, 1998.
 - 13) 小野江和則: アグレートープ. 生化学辞典, 東京化学同人, 東京, 11, 1998.
 - 14) 岩渕和也, 阿戸学, 岩渕千雅子, 水本昇克, Enkh-Amar Dondg, 小笠原一誠, 小野江和則: MCAF/MCP-1 トランスジェニックマウスにおけるマクロファージ機能異常. 日本リンパ網内系学会誌. 38(4), 219-225, 1998.
- ## 2. 学会発表
- 1) 岩渕和也, 阿戸学, 小笠原一誠, 小野江和則: TCR トランスジェニックマウス (Tgm) を用いた胸腺内 NK1.1⁺ T細胞の分化・選択の研究. 第87回日本病理学会総会, 1998. (於 広島)
 - 2) 小笠原一誠, 岩渕和也, 阿戸学, 梶原昌治, 小野江和則: ペプチドワクチン投与による DQ6 マウスでのインフルエンザ感染抑制. 第87回日本病理学会総会, 1998. (於 広島)
 - 3) 阿戸学, 岩渕和也, 小笠原一誠, 梶原昌治, 石倉浩, 小野江和則: ヒト単球走化活性化因子 (MCAF/MCP-1) トランスジェニックマウスにおける肝内肉芽腫反応の遷延化. 第87回日本病理学会総会, 1998. (於 広島)
 - 4) 阿戸学, 岩渕和也, 小笠原一誠, 梶原昌治, 石倉浩, 向田直史, 松島綱治, 小野江和則: 炎症惹起物質投与時のヒト単球走化活性化因子 (MCAF/MCP-1) トランスジェニックマウスにおける血中 MCAF/MCP-1 産生に及ぼす影響. 第38回日本リンパ網内系学会総会, 1998. (於 熊本)
 - 5) Iwabuchi, K., Ato, M., Ishimori, N., Watano, K., Fujii, S., Iwabuchi, C., Ogasawara, K., Kitabatake, A., and Onoé, K.: Altered macrophage functions in a murine cell line, J774A.1, over-expressing rat CSK. 第7回国際マクロファージ分子細胞生物学シンポジウム, 1998. (於 山形)
 - 6) Ishimori, N., Iwabuchi, K., Fujii, S., Watano, K., Ato, M., Ogasawara, K., Kitabatake, A., and Onoé, K.: Bone marrow-derived cells are involved in the development of atherosclerotic lesions. 第7回国際マクロファージ分子細胞生物学シンポジウム, 1998. (於 山形)
 - 7) 井筒ゆみ, 柄内新, 小野江和則: *Xenopus* 成体が産生する幼生表皮細胞を特異的に認識する抗体. 日本発生物学会, 1998. (於 熊本)
 - 8) Kitaichi, N., Kotake, S., Nishihira, J., Onoé, K., and Matsuda, H.: Prominent increase of macrophage migration inhibitory factor in sera of patients with Behcet's disease. 8th International Congress on Behcet's Disease. 1998. (於 Reggio Emilia, Italy)
 - 9) Kitaichi, N., Namba, K., Kotake, S., Sasamoto, Y., Ogasawara, K., Matsuda, A., Matsuda, H., Nishihira, J., and Onoé, K.: Regulation of T cell activation and experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) with anti-macrophage migration

- inhibitory factor (MIF) antibodies. First Combined International Symposium on Ocular Immunology and Inflammation, 1998. (於 Koepelkerk, Amsterdam, The Netherlands)
- 10) Namba, K., Kotake, S., Sasamoto, Y., Kitaichi, N., Matsuda, H., Ogasawara, K., and Onoé, K.: EAU induced by self peptide derived from IRBP in mouse system. First Combined International Symposium on Ocular Immunology and Inflammation, 1998. (於 Koepelkerk, Amsterdam, The Netherlands)
- 11) 水本昇克, 中村秀樹, 芝木晃彦, 川嶋利瑞, 小林 仁, 大河原 章, 岩渕和也, 中川憲一, 小笠原一誠, 小野江和則: 骨髄移植 aly/aly マウスに生じた GVHD 様皮膚病変の免疫組織化学的解析. 第 334 回日本皮膚科学会北海道地方会, 1998. (於 旭川)
- 12) 刀祢さおり, 岩渕千雅子, 岩渕和也, 荒浪利昌, 根岸 泉, 小笠原一誠, 小野江和則: ZAP-70 遺伝子欠損マウスにおける NK-T 細胞の分化機構の解析. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会, 1998. (於 神戸)
- 13) 南場研一, 諸橋大樹, 小笠原一誠, 北市伸義, 伊藤大祐, 岩渕和也, 小野江和則: EAU 誘導ペプチド含有リポソーム投与によるアナジー誘導と EAU 発症抑制の試み. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会, 1998. (於 神戸)
- 14) 岩渕和也, 岩渕千雅子, 小野江和之, 小西 純, 小笠原一誠, 小野江和則: NK-T 細胞の補体感受性亢進メカニズムの解析. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会, 1998. (於 神戸)
- 15) 北市伸義, 小笠原一誠, 岩渕和也, 西平 順, 小竹 聡, 笹本洋一, 小野江和則: 内因性ぶどう膜炎患者血清中におけるマクロファージ遊走阻止因子の増加. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会, 1998. (於 神戸)
- 16) 小西 純, 岩渕和也, 岩渕千雅子, 小野江和之, 中川憲一, 小笠原一誠, 小野江和則: NK-T 細胞欠損系 aly/aly マウスと β_2m ノックアウトマウス骨髄キメラにおける NK-T 細胞の分化能獲得. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会, 1998. (於 神戸)
- 17) 井筒ゆみ, 柄内 新, 山本友希代, 小野江和則: 近交系 *Xenopus* 成体が産生する抗体により認識される幼生表皮特異抗原の性状と機能. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会, 1998. (於 神戸)
- 18) 水本昇克, 岩渕和也, 阿戸 学, 岩渕千雅子, 小笠原一誠, 小野江和則: ヒト単球走化活性化因子 (MCAF/MCP-1) トランスジェニックマウスにおける接触過敏反応の検討. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会, 1998. (於 神戸)
- 19) 綿野敬子, 岩渕和也, 藤井 聡, 石森直樹, 小笠原一誠, 小野江和則: マウス allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) cDNA のクローニングおよび、組織分布の解析. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会, 1998. (於 神戸)
- 20) 岩渕千雅子, 岩渕和也, 刀祢さおり, 伊藤大祐, 根岸 泉, 小笠原一誠, 小野江和則: ZAP-70 ノックアウトマウスにおける NK および NK-T 細胞の機能解析. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会, 1998. (於 神戸)
- 21) 石森直樹, 岩渕和也, 藤井 聡, 綿野敬子, 阿戸 学, 岩渕千雅子, 小笠原一誠, 小野江和則: 動脈硬化病巣進展における骨髄由来細胞の関与. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会, 1998.

- (於 神戸)
- 22) 木崎節子, 大河原知水, 大石修司, 岩淵和也, 小野江和則, 大野秀樹: 老化に伴うグルココルチコイド濃度の上昇はNF κ B活性の高いIa^dED2^{high}マクロファージを減少する. 第28回日本免疫学会総会・学術集会, 1998. (於 神戸)
- 23) 伊藤大祐, 岩淵和也, 小笠原一誠, 小野江和則: 抗CD40モノクローナル抗体及び抗CTLA4モノクローナル抗体と抗腫瘍ペプチドワクチン同時投与によるCTL誘導. 第28回日本免疫学会総会・学術集会, 1998. (於 神戸)
- 24) 阿戸 学, 岩淵和也, 小笠原一誠, 向田直史, 松島綱治, 石倉 浩, 小野江和則: ヒト単球走化活性化因子(MCAF/MCP-1)トランスジェニックマウスにおけるLPS感受性の解析. 第28回日本免疫学会総会・学術集会, 1998. (於 神戸)
- 25) 北市伸義, 南場研一, 小笠原一誠, 岩淵和也, 小竹 聡, 笹本洋一, 小野江和則: マウスモデルにおけるIRBP由来EAU惹起ペプチドの同定と、Liposome封入抗原前投与によるEAU発症抑制. 第3回北海道免疫談話会・学術集会, 1998. (於 札幌)
- 26) 岩淵千雅子, 岩淵和也, 刀祢さおり, 伊藤大祐, 小笠原一誠, 土佐紀子, 上出利光, 小野江和則: NKおよびNK-T細胞の分化におけるZAP-70の役割. 第3回北海道免疫談話会・学術集会, 1998. (於 札幌)
- 27) 井筒ゆみ, 栃内 新, 山本友希代, 小野江和則: 両生類発生過程におけるアポトーシスに關与する幼生特異的抗原の解析. 第3回北海道免疫談話会・学術集会, 1998. (於 札幌)
- 28) 小笠原一誠, 伊藤大祐, 諸橋大樹, 北市伸義, 小野江和則: ペプチド特異的CTLの活性化. 第2回日本ワクチン学会総会・学術集会, 1998. (於 豊中)
- 29) Ato, M., Iwabuchi, K., Mukaida, N., Ishikura, H., Ogasawara, K., and Onoé, K.: Altered macrophage functions in a human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) transgenic mouse. The 10th International Congress of Immunology, 1998. (於 New Delhi, India)

G. 知的所有權の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

単クローン抗体を含む遺伝子工学の活用に関する研究

分担研究者 磯部 光章 信州大学医学部第1内科 助教授
分担研究協力者 場集田 寿 順天堂大学 免疫学教室

研究要旨 慢性拒絶とも呼ばれる移植心冠動脈内膜肥厚は長期予後を決定する重要な要素である。細胞周期調節遺伝子の転写に必要なcdc2kinase遺伝子の導入による内膜肥厚進展予防効果を検討した。マウス移植心のモデルを用いて、非免疫抑制下でHVJ-リポソーム法によりcdc 2 kinaseアンチセンス遺伝子を導入して28日目の冠動脈硬化を評価した。導入群では血管内膜肥厚が抑制されていた。移植心における血管平滑筋増殖には細胞周期調節遺伝子が関与しており、アンチセンスcdc 2 kinase ODNの導入はその進展予防効果がある。

A. 研究目的

慢性拒絶とも呼ばれる移植心冠動脈内膜肥厚は長期予後を決定する重要な要素である。病態には不明な点が多く予防法がない。病理学的には、血管平滑筋細胞の増殖がみられ、胎児型ミオシン (SMemb) の発現増加を伴っていることを報告してきた。本研究班における昨年までの研究で細胞周期調節遺伝子の発現と、アンチセンス遺伝子導入による内膜肥厚進展予防効果について報告した。それによれば、cdk2 kinaseに対するアンチセンス遺伝子の導入により冠動脈肥厚が明らかに低下しており、本疾患に細胞周期調節遺伝子を標的とした遺伝子治療が有効である可能性が示された。遺伝子導入をして冠動脈硬化の軽減が見られた移植心では、冠動脈におけるICAM-1、VCAM-1、エンドセリンなどの発現も著明に低下していた。しかし、この検討では主要組織適合抗原が異なる組み合わせであり、免疫抑制剤としてタクロリムスの投与を行ったため、免疫抑制剤の影響を無視することができなかった。今回の検討では、minor mismatchのマウスの組み合わせで、免疫抑制剤非投与下での検討を行った。また、標的遺伝子としてcdc 2 kinaseを選んで検討を行った。

B. 研究方法

遺伝子の導入効率と残存期間を検討するためDBA/2マウス (オス20-25g) の心臓を摘出してHVJ-liposome法によりFITCラベルしたオリゴヌクレオチド(ODN)を導入しB10D2マウス (オス20-25g) に異所性に移植した。異所性心移植は既報の方法の通り、顕微鏡下で腹部血管への血管縫合を用いて行った。遺伝子導

入はODNをドナー心の大動脈より注入し、4℃で10分間の留置により行った。マウスcdc 2 kinaseのアンチセンスODN (5' GTC-TTC-CAT-AGT-TAC-TAC-TCA-3')、センスODN (5'-TGA-GTA-ACT-ATG-GAA-GAC-3')を作成した。ドナーへの免疫抑制等の治療は行わなかった。

移植心は28日目に採取した。いずれの移植心も凍結薄切病理標本を作製し、Elastica van Gieson染色により冠動脈の肥厚内膜の内弾性板内占拠率を以下のようにスコア化した。score 0: 肥厚内膜なし、score 1: 0-25%閉塞、score 2: 25-50%閉塞、score 3: 50%以上閉塞。免疫染色によりintercellular adhesion molecule (ICAM)-1およびvascular cellular adhesion molecule-1 (VCAM-1)の組織内発現を検討した。染色に用いた抗体は、YN1/1.7 (ICAM-1)、MK/2 (VCAM-1)である。発現の強さはスコア化 (score 0-3) して、半定量的に評価した。

C. 研究結果

FITCラベルしたODNは移植後14日まで移植心内の血管のみならず、心筋細胞の核にも広く発現した。しかし28日目には発現は認められなかった。無導入群、センス群では冠動脈内膜肥厚を認めたのに対し、アンチセンスcdc 2 kinase導入群ではその進展は著明に抑制されていた (表1)。同様に血管内膜でのICAM-1、VCAM-1の発現は無導入群、センス群で著しく、アンチセンスcdc 2 kinase導入群では抑制されていた。いずれもアンチセンス群ではセンス群より有意に抑制されていた。

表1 移植28日目における冠動脈内膜肥厚、VCAM-1、ICAM-1発現の半定量的評価
(**P* < 0.05 vs sense ODN)

Treatment of Allografts	No. of Grafts	No. of Arteries	Luminal Occlusion (0-3)	VCAM-1 Expression (0-3)	ICAM-1 Expression (0-3)
Native heart	2	8	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Isograft	2	8	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Antisense ODN	4	20	*1.0 ± 0.6	*0.9 ± 0.3	*1.0 ± 0.3
Sense ODN	4	20	1.7 ± 0.9	1.8 ± 0.8	1.9 ± 0.8
No ODN	4	20	1.6 ± 0.9	1.6 ± 0.7	1.7 ± 0.7

D. 考察

慢性拒絶とされる冠動脈硬化は、促進性冠動脈硬化とも呼ばれ、病態、予防法、治療法とも不明で、現在心移植後の長期予後を左右する最も深刻な問題となっている。心移植後の生存曲線は2年目以降直線的に低下しているが、これは主として慢性拒絶によるものである。移植後数ヶ月から数年の経過で冠動脈狭窄が進展する。危険因子としては急性拒絶の回数、サイトメガロウイルス感染などが言われており、一般の粥状動脈硬化で知られている危険因子との関連は明らかでない。これまでの我々の一連の研究結果から、この動脈硬化の本態は形質変換をともなった血管平滑筋の増殖であり、諸種の増殖因子、サイトカイン、接着分子、組織適合抗原、細胞周期の関与が明かとなった。

本研究では、HVJ-リポソーム法により導入した遺伝子が、移植心の心筋細胞の核内に2週間以上発現していることが確認された。この方法は、導入効率が高く、非分裂細胞への導入が可能で、またウイルスベクターでみられる抗原性の問題もないことから、移植臓器への導入に有用であると考えられた。

cdc 2 kinaseは細胞周期においてG2/M期への移行に不可欠の分子である。今回の実験でcdc 2 kinaseに対するアンチセンスオリゴを導入したマウスで、冠動脈肥厚が明らかに低下していたことは、移植心冠動脈の内膜肥厚に細胞周期が重要な役割を果たしていることを示している。今回の検討では、免疫抑制剤を使用しておらず、その相互作用について無視

をすることができた。本疾患に細胞周期調節遺伝子を標的とした遺伝子治療が有効である可能性が示された。遺伝子導入をして冠動脈硬化の軽減が見られた移植心では、冠動脈におけるICAM-1、VCAM-1などの発現も著明に低下していた。

この方法については、導入遺伝子、導入方法、安全性、長期効果など、まだ不明の点が多く、今後の研究課題である。特に対象とすべき遺伝子については、さらに検討の必要がある。長期効果に関しては、細胞周期調節遺伝子群のプロモーター領域に存在するE2F結合配列に着目して、デコイの投与の効果が検討されている。別の標的分子として、炎症性サイトカインの転写に必須であるNFκB、血管壁平滑筋細胞のアポトーシスを抑制する因子であるbcl-x、血管新生に関わるVGEF、HGFなどが検討も今後必要であると考えられる。また導入ベクターについても同様の検討が必要であろう。

この方法は手術中に移植心に遺伝子を導入するため、術後に薬剤の全身投与等を必要せず、レシピエントに余分な負担をかけずに冠動脈硬化を予防できることから、臨床的な有用性が高いと期待される。臨床応用に向けて更に詳細な検討を行う必要がある。

E. 結論

非免疫抑制下に生ずる移植心冠動脈硬化における血管平滑筋増殖においても細胞周期調節遺伝子であるcdc 2 kinaseのアンチセンスODNの導入はその進展予防に効果がある。