移植の免疫寛容に関する研究

「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

総合研究報告 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

総括研究報告 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 5

分担研究報告

〔テーマ1〕免疫寛容のヒトへの応用

1-1 ﾊﾞｲｵﾃｸﾉﾛｼﾞ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 9

〔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に関する研究 ……小野江和則 北海道大学免疫科学研究所病理部門教授 12

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－移植心の慢性拒絶反応の分子機構の解明と遺伝子治療－ ……磯部 光章 東京医科歯科大学循環器内科助教授 17

2-3 大型動物（ｲﾇ）による免疫寛容ﾓﾃﾞﾙに関する研究 ……渡部 浩二 北里大学医学部免疫学助教授 22

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 27

〔テーマ3〕ヒト臓器移植における免疫寛容の活用

3-1 遺伝子治療を用いたドナー特異的免疫抑制療法の開発 ……藤 堂 省 北海道大学医学部第一外科教授 32

3-2 生体肝移植後、免疫抑制剤離脱症例における免疫機構の解析 ……田中 紘一 京都大学医学部移植外科教授 37

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 42

3-4 Flt 3 ligantと骨髄移植併用による慢性拒絶反応の予防に関する研究 ……川合 明彦 東京女子医科大学循環器外科講師 47

3-5 臓器移植におけるｻｲﾄﾒｶﾞﾛｳｨﾙｽ（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 52

平成11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

臓器移植部門

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・教授)

テーマ1，免疫寛容のヒトの応用
1-1ﾊﾞｲｵﾃｸﾉﾛｼﾞ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 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（北海道大学免疫科学研究所 病理部門教授）
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（東京医科歯科大学第三内科助教授）
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遺伝子治療を用いたﾄﾞﾅｰ特異的免疫抑制療法の開発
藤堂　省（北海道大学第一外科教授）
3-2生体肝移植症例後 免疫抑制離脱症例における免疫機構の解明
田中紘一（京都大学大学院医学研究科 移植免疫医学教授）
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（東北大学第二外科教授）
3-4ﾄﾞ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（東京女子医大循環器外科講師）
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
南嶋洋一（宮崎医科大学微生物教室教授）

臓器移植の基盤整備に関する臨床的研究
主任研究者　長澤俊彦
(杏林大学学長,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（杏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
鈴木達夫（（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長期移植腎の生着向上に関する研究
大島伸一（名古屋大学泌尿器科教授）
2-2臓器搬送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レシピエント心の脳疾患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
幕内雅敏（東京大学器官病態外科学（肝胆膵・人工臓器移植外科）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，レシピエントの選択，術後の管理
4-1肝移植レシピエントの管理に関する研究
小俣政男（東京大学器官病態内科学（消化器内科学）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（杏林大学学長，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骨髄移植センター長)

テーマ1，造血細胞移植の供給率の向上に関する研究
1-1非血縁者間骨髄移植の成績向上並びに対象疾患、対象年齢等の整備に関する研究
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海外骨髄ﾊﾞﾝｸﾄﾞﾅｰを用いた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
2-1ＨＬＡ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）
2-2ＨＬＡ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病院 血液化学療法部部長）

テーマ3，HLA不適合移植
3-1造血幹細胞移植における免疫応答の制御法に関する研究
浅野茂隆（東京大学医科学研究所内科教授）
3-2HLA不適合移植並びに自家造血幹細胞移植の評価と適合に関する研究
小川啓恭（大阪大学分子病態内科学助教授）

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の確立と普及に関する研究
原田実根（岡山大学第二内科教授）
4-2同種末梢血幹細胞移植の成績向上のための要因に関する
堀田知光（東海大学血液ﾘｳﾏﾁ内科教授）

テーマ5，精製造血幹細胞を用いた移植
5-1造血幹細胞のex vivo増幅と臨床応用に関する研究
中畑龍俊（京都大学大学院医学研究科教授）
5-2精製造血幹細胞移植の確立と普及に関する研究
河　敬世（大阪府立母子保健総合医療ｾﾝﾀｰ 小児内科部長）

臍帯血移植に関する基礎的・臨床的研究
主任研究者　斎藤英彦
(名古屋大学医学部第一内科教授)

テーマ1，臍帯血の生物学的・免疫学的特性と幹細胞
1-1臍帯血の免疫学的特性に関する研究
奥村　康（順天堂大学免疫学教授）
1-2臍帯血の生物学的特性に関する研究
高橋恒夫（東京大学医科学研究所 細胞ﾌﾟﾛｾｯｼﾝｸﾞ部門教授）
1-3成人臍帯血移植と幹細胞増幅に関する研究
原　宏（兵庫医科大学輸血部教授）

テーマ2，臍帯血移植における免疫応答及び免疫回復
2-1移植後免疫不全に関する研究並びに研究総括
斎藤英彦（名古屋大学第一内科教授）
2-2臍帯血移植とHLAに関する研究
猪子英俊（東海大学分子生命科学系 遺伝情報部門教授）
2-3移植後免疫学的再編成に関する研究
直江知樹（名古屋大学難治感染症部 助教授）

テーマ3，臍帯血移植の臨床研究
3-1小児臍帯血移植の成績向上のための要因に関する研究
加藤剛二（名古屋第一赤十字病院 小児科副部長）
3-2小児臍帯血移植の臨床評価と適応に関する研究
加藤俊一（東海大学小児科助教授）
3-3 臍帯血ﾊﾞﾝｸの在り方に関する研究
西平浩一（神奈川県大和保健所長）

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
(埼玉県立大学 学長)

テーマ1，臓器移植ネットワークに関する研究
1-1献腎に於けるｺｰﾃﾞｨﾈｰﾀｰの活動促進に関する研究
大島伸一（名古屋大学泌尿器科教授）
1-2臓器・組織を含む汎移植ｺｰﾃﾞｨﾈｰｼｮﾝに関する研究
寺岡　慧（東京女子医科大学第三外科教授）
1-3ＨＬＡ検査と臓器移植ﾈｯﾄﾜｰｸのあり方に関する研究
柏原英彦（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移植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海外渡航移植の追跡に関する研究
小柳　仁（東京女子医科大学附属 日本心臓血圧研究所所長）

テーマ4，組織移植に関する研究
4-1角膜移植ﾈｯﾄﾜｰｸ に関する研究
真鍋禮三（（財）日本眼球銀行協会理事長）
4-2組織移植ﾈｯﾄﾜｰｸに関する研究
北村惣一郎（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（上智大学法学部長・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（埼玉県立大学学長）

厚生科学研究費補助金（免疫・アレルギー等研究事業）

総合研究報告書

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　ヒト臓器移植に免疫寛容を積極的に応用することを主たる目的とし、さらにリンパ系への傷害が少ないマイルドな免疫抑制の方法や慢性拒絶反応回避の方法を開発することを目的とした。研究組織全体の目標は、移植医療の質の向上におかれるが、３年間で成果を得るため、共同研究遂行の戦略を練りつつ研究を進めることとした。当初の目標を上回る成果が期限内に有られたと確信している。

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	東京医科歯科大学第三内科助教授
渡部浩二	北里大学医学部免疫学助教授
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	東北大学大学院外科病態学講座教授
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

A.研究目的

我国において臓器移植とくに脳死からの提供による臓器移植を一般的医療の一部として定着、普及させるためには、長期成績を生着期間の延長のみならず質の高い一般生活が送れるように治療としてのレベルを向上させることが必須と考えられる。臓器移植の最終的な姿は免疫寛容の活用にあり、移植後一定期間の治療をうければ、その後は治療にしばられることなく、健全な一般生活を送れることに理想がおかれる。したがって、本研究組織の主たる目的は、免疫寛容の多くのモデル系のなかから、安全性、信頼性ともにすぐれ、ヒトへ応用可能なものを選択し、小動物モデル（マウス、ラット）から、大動物（サル、イヌ）を経て、ヒトへの応用に踏み込むことにおかれる。さらに、免疫寛容がひろく活用されるまでの移行期の対策として、また免疫寛容の活用が困難な症例の対策として、リンパ系への傷害の少ない免疫抑制法（剤）の開発を目指した。リンパ系への傷害の強い免疫抑制法では、拒絶反応の回避に長期間使用すると癌発生などさまざまな問題が生じるのみならず、免疫寛容導入法としても長期予後にも問題が生じるので、マイルドな免疫抑制法の開発、確立が望まれている。さらに、急性拒絶反応をのりこえ、長期生着、長期生存に至った例においては、慢性拒絶反応が克服困難な問題として立ちふさがることも少なくない。慢性拒絶反応に伴う、移植心の冠動脈硬化は、心移植のかかえる最大の難問となっている。この慢性拒絶反応の回避にはきわめてマイルドな方法が求められるので、遺伝子操作を軸に検討した。

このような目的、目標を達成するため、分担研究者10名の他に、特殊な研究技術を持つすぐれた若手研究者に研究協力者として参加を求め、共同研究のシステムを構成した。3年間の年次計画は、3年目の終了時にはヒトへの応用に近付いたことを明示できるように組み立てられた。一年次

では、ヒトへの応用可能なように、各自の持つモデル系の安定性、信頼性、安全性を各自確定するよう要請した。二年次の初めに、全構成員の成果をヒトへの応用が可能かという視点で評価し、可能性を持つ系を選択して、優先テーマとして、全構成員の共同研究の対象とした。三年目にはさらに優先テーマをしぼり込み、ヒトへの応用へ一歩でも近づくことを目標として、計画的研究が進められた。

B.研究方法

対象としては、小動物（マウス、ラット）、大動物（サル、イヌ）、さらにヒトとくに移植後患者がとりあげられた。研究の具体的な共通点として、免疫抑制または免疫寛容の導入すなわち治療としての移植の技術的検討に主目的がおかれたが、さらに免疫抑制の成功、免疫寛容の導入、維持の成功をにぎるカギを知るための免疫学的解析にも重点がおかれた。これらの目的を達成するための研究方法としては、個体レベル（移植臓器の生着）、細胞レベル（ドナー由来の細胞のキメリズム）、分子レベル（拒絶反応のプロセスに関与する多くの機能分子や遺伝子の操作）が活用された。

この課題の性格上、多くの実験動物の使用が避けられないが、実験動物への負荷を最低限に抑えるよう全構成員に強く要請した。また、有意義かつ実施せざるを得ない実験に限定して、実験動物の犠牲を求めるようにするため、実験系の検討を十分に行い、各研究施設における動物実験倫理委員会等の承認を得ることを求めた。ヒトとくに移植後患者の研究への参加を求める際には、一般的に行われているインフォームドコンセントよりも数段くわしい内容説明を行い、十分な納得を得ることを求めた。また、わずかでも協力患者に不利が生じる可能性が推定された時には、ただちに研究プロトコールを中止し、安全性を確保することを第一義におくこととした。

C.研究成果

第一年次：分担研究者、研究協力者の各自が検討してきたモデル系あるいは臨床症例の特性を、各個的に検討を深めることに重点をおいた。各モデル系の特徴を確定的なものにすることから、ヒトへの応用可能な安定性、信頼性、安全性の高い系が選択されるという判断からこの方式が選ばれた。一年次の目的をいくつかにもとめ、各グループ内の情報交換を活発に行った。１）小動物モデル系における免疫寛容モデル系の検討（野本：サイクロフォスファミドとドナー骨髄細胞の移入、小野江：X線照射とドナー骨髄細胞の移入、磯部：拒絶反応のプロセスに関与する機能分子群に対する単クローン抗体や遺伝子操作、藤堂：CTLA4Igの活用によるマイルドな免疫抑制法、川合：ドナー骨髄細胞刺激因子であるFit3-ligandによる骨髄由来細胞のキメリズムの増強、安元：気管移植の成績向上のための保存条件と免疫抑制法の検討）、２）大動物モデル（渡部：イヌ腎移植の長期生着例の検討による免疫寛容の機序の解析）、３）ヒト移植患者からの情報（田中：小児生体肝移植例の解析による免疫寛容への道筋の推定、里見：腎移植長期生着症例のドナー細胞キメリズムの検討による免疫寛容への手がかりの模索、南嶋：移植患者サイトメガロウイルス感染の把握による移植長期生着症例の免疫学的特性の把握）、に目的、目標を大別した。１０名の研究協力者は分担研究者のそれぞれを研究協力の相手として指定し、各グループの研究推進に参画した。第一年次の各個的研究の進め方は、幅広い対象からすぐれた系を選択する方式の第一歩としての役割を十分はたしたと判断している。

第二年次：第一年度の終わりから第二年次の初めにかけて、一年次の個別的研究の成果の検討、評価が活発に行われ、共通して検討するべき免疫学的項目（それぞれのモデル系や臨床症例におけるドナー細胞キメリズムとくにミクロキメリズムの意義）、ヒトへパスを通すために研究組織全体として残すべきテーマの設定（小児生体肝移植症例中から偶発的免疫寛容状態の選び出しとその免疫学的特性の検討、CTLA4Igを代表とする新しい素材によるマイルドな免疫抑制法の開発、慢性拒絶反応回避に役立つ遺伝子操作の開発）が行われた。二年次ではすべての構成員には、一年次にはじめられた各個研究を維持すると同時に、共同課題への積極的参画が要求された。二年度にはヒトに残すべきテーマは、急速に

みがきあげられ、三年次での具体的成果を予測させるものであったが、免疫学的特性の検討対象として選択したミクロキメリズムと免疫寛容の導入、維持とのかかわりについては、系によって異なる結果が得られ、ヒトでの免疫寛容のマーカーとなるか否かの推定は出来なかった。継続的な共通検討事項として三年次に持ち越すこととした。

三年次：共通テーマとして設定したものが以下のように具体的な姿を現してきた。共通テーマ１：生体肝移植における免疫寛容の計画的導入。二年度の解析によって、小児生体肝移植後に感染症が発症し、感染症に打ち勝つための対応として免疫抑制剤（シクロスポリン、タクロリムス）およびステロイドの減量あるいは打切りを行った症例が浮かび上がり、そのなかには完全打切り後も拒絶反応が出現しない症例が１０例以上把握された。三年度には、免疫抑制剤およびステロイドの計画的減量から完全離脱へと進めるプロトコールを実施した。数年間拒絶反応のエピソードがみられない症例からインフォームドコンセントのもとで症例を選択した。ステロイドの減量につづいて、免疫抑制剤の減量へと進め、完全離脱に成功し、完全離脱後も拒絶反応がみられず、免疫寛容となったと判断される症例が6例得られた。これらの症例では、ドナー抗原刺激によるIFN-γの産生が低値であり、寛容状態にあると判断された。また、拒絶反応のエピソードのため、計画的減量を中止し、通常の免疫抑制法に復帰した症例では、その後の拒絶反応は回避され、不幸な転帰をたどる症例はみられなかった。

共通テーマ２：マイルドな免疫抑制法の開発、多くの候補のうちから、新規免疫抑制剤FTY720(リンパ球動態を修飾することによって、拒絶反応を軽減させると推定される)、CTLA4IgとCD40Ig（いずれも細胞傷害性Tリンパ球へと有効なシグナルが伝達されるプロセスを中断）が選択された。ラットの心移植、肝移植、ビーグル犬の腎移植、肝移植がモデル系として用いられた。シクロスポリンまたはタクロリムスにFTY720を追加したプロトコールでは、相乗効果が得られ、シクロスポリンやタクロリムスの投与量を減少させる役割をFTY720が持ち得ることが示された。アデノウイルスベクターを用い、CTLA4IgまたはCD40Igを遺伝子導入する系では、ラット肝移植において免疫寛容を誘導することができた。マイルドな免疫抑制法の開発へと大きく前進した成果と判断している。

共通テーマ３：慢性拒絶反応の遺伝子導入による抑制と移植心の冠動脈硬化の回避。移植心の冠動脈硬化の原因が血管壁細胞の増殖にあることから、細胞周期調節遺伝子の抑制を目標として、細胞増殖の調節にかかわるcdk2 kinase　に対するアンチセンス遺伝子の導入によって冠動脈肥厚が抑制された。さらに転写因子であるE2FとNF-κBに対応するデコイまたはデコイ遺伝子を導入し、冠動脈壁肥厚の抑制を試みた。マウスモデル系では、NF-κBデコイをサルモデル系ではE2Fデコイ遺伝子の導入を用いたが、いずれの系でも冠動脈壁の肥厚が軽減した。慢性拒絶反応に伴う難問をのりこえる有効な方法と判断された。

D.考察

三年間の達成目標を越えたと判断している。出発点から模索しつづけ、ついに解答を得られなかったのはミクロキメリズムの免疫寛容の導入、維持における意義である。安定した免疫寛容状態にも複数のことなるシステムがあるのか、さらに測定の感度をあげれば、確定的データが得られるのかは、今後の研究にゆだねられた。ヒトへの免疫寛容の積極的応用の第一歩として、小児生体肝移植例から、計画的減量、完全離脱を経て、免疫寛容となった症例が積み重ねられていることは大きな意味を持つと判断している。

E. 結論

移植症例の50％以上に適用できることを次の目標においているが、三年間の成果としては成功と判断している。マイルドな、免疫抑制法の開発、慢性拒絶反応に伴う移植心冠動脈硬化の回避も、小動物モデル系からサルでの安全性、有効性の判断に移りつつある。ヒトへの応用への道がひらかれたと判断している。また今回の共通テーマに選択されなかった系を扱っている分担研究者、研究協力者の研究の進展も各個的には見るべきものがあり、次の段階の

新しい共通テーマとなるに値するものが多くうみだされている。

F. 研究発表

1.論文発表

1.Uchida, T., Tomita, Y., Anzai, K., Zhang, Q.W. Kishihara, K., Nomoto, K. and Yasui, H.: Role of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in discordant skin xenograft erejection. *Transplantation*.68(11):1721-1727,1999

2.Yoshikawa, M., Tomita, Y., Uchida, T., Zhang, Q.W. and Nomoto, K.: Lack of pluri potent stem cell engraftment in cyclophosphamid-induced tolerance. *Transplant, Proc.*, 31(1-2):897-899,1999.

3.Ito, D., ogasawara, K., Iwabuchi, K., Inuyama, Y. and Onoe, K.: Iduction of CTL responses by simulraneous administration of liposomal peptide vaccine with anti-CD40 and anti-CTLA-4 mAb. *J. Immunol.*164:1230-1235,2000.

4. Suzuki, J., Isobe,M., Morishita, R., Aoki, M., Horie, S., Okubo, Y., Kaneda, Y., Sawa, Y., Matsuda, H., Ogihara, T. and Sekiguchi , M.: Preventions of graft arteriopathy by antisense cdk2 kinase oligonucleotide. *Nature Med.* 3:900-903, 1997.

5. Yamaguchi, S., Kawashima, H., Endo, H., Tsuru, T., Shibui, H., Kagawa, Y., Hori, J., Yamagami, H. and Isobe, M.: Cytokine profile of adueous humor and graft in prthotopic mouse corncal treansplantation. Transplantation.66 : 1504-1510,1998.

6. Umesue, M., Mayumi, H., Kong, Y. Y., Omoto, K., Muranaka, H., Nakanishi, R., Kohno, H., Yasumoto, K., Kishihara, K. and Nomoto, K. :Rejection of discordant skin xenografts by CD4- CD8- TCRαβ + cells in CD4- and CD8- deficiet mice. *Transplant, Proc.* 31:890-891,1999.

7. Furukawa, H., Suzuki, T., Jin MB, Taniguchi, M., Magata, S., Ishikawa, H., Ogata, K., Masuko, H., Shimamura, T., Fukai, M., Hayashi, T., Fujita, M., Nagashima, K., Omura, T., Kishida, A. and Todo, S.: Prolongation of canine liver allograft survival by a novel immunosuppressant, FTY720. *Transplantaion.* 69:1-7,2000.

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

2.学会発表

1. Onoe, K. : Special Guest Lecture " A new member of immunocompetent cells", The Eleanor Naylor Dana Charitable Trust Lecture, South Florida University (St. Petersdurg).

2. Isobe, M., Suzuki, J., Morishita, R., Aoki, M., Kaneda, Y., Sawa, Y., Matsuda, H., Ogihara, T. and Sekiguchi, M. : "Effects of antisense cyclin-depedent kinase 2 kinase oligonuclcotide on murine cardiac allograft vasculopathy". International Congress on Immunosuppression, Florida, 1997.

3. Yamashita, K., Nomura, M., Takehara, M., Omura, T., Yanagida, N., Suzuki., T., Shimamura, T., Kishida, A., Furukawa, H. and Todo, S. : Effects of novel immunosuppressant, FTY720, on heart andliver transplantation . 18th Annual Meeting of the American Society of Transplantation.

G.知的所有権の取得状況

1.特許取得

1. Induction o ntolerance by modified immunogens. (US Patent No.5,885,570) (issued March 23, 1999) (米国) .

2.実用新案登録　　なし

3.その他　　なし

厚生科学研究費補助金（免疫・アレルギー等研究事業）

総括研究報告書

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　ヒト臓器移植への免疫寛容の積極的応用の道をさぐることを主な目的とし、全構成員のエネルギーを1)小児生体肝移植における計画的免疫寛容導入、2)リンパ系への障害の少ない免疫抑制法の確立と免疫寛容導入への応用、3)慢性拒絶反応の回避とくに遺伝子操作による回避の確立に努めた。1)については成功例が得られはじめ、2) 3)については小動物モデルで成功しサルでの安全性や有用性のチェックに入っている。

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	東京医科歯科大学第三内科助教授
渡部浩二	北里大学医学部免疫学助教授
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	東北大学大学院外科病態学講座教授
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

A.研究目的

臓器移植の本格的な定着、普及の時期を迎え、一方では長期にわたる医療的管理から離脱できるよう、移植医療の質向上が求められている。この社会的および医学上の要請に対応するため、本年度は３つのテーマにしぼり込んで、全構成員が協力体制を組んだ。テーマ１）小児生体部分肝移植における免疫抑制剤の計画的減量、完全離脱による免疫寛容の積極的導入、２）リンパ系への傷害が少ないタイプの免疫抑制剤の開発とくに小動物モデルでの機序の解析からサルでの安全性、有用性の検討、３）慢性拒絶反応の回避のための方法とくに遺伝子操作による回避方法の小動物モデルでの確定から、サルでの安全性、有用性の検討にしぼり込んで共同研究が活発に行われた。各分担研究者、研究協力者が従来確立してきた実験系や臨床解析は、当然個々の研究者によって活発に実施され、多くの成果が得られ、次の大型プロジェクトの基盤となることも求めている。

B.研究方法

対象となる生命体としては、ヒト、サル、イヌ、ラット、マウスが含まれる。多様な生命体を研究対象とするため、同一の攻め方からも異なる成果が得られることも少なくなく、ヒトまで結びつく流れを正しく把握することは容易ではない。しかし、危険性のある免疫抑制法や免疫寛容導入法をただちにヒトへ応用することはできないので、多くの生命体から得られた情報を十二分に解析し、一歩一歩ヒトへ近付ける道を選択するという手段を取らざるを得なかった。一方、多様な生命体からの情報を適格に把握し、解析すると、ヒトへたどりつく信頼度の高い道も見出せると判断された。移植手法では、ヒト、サル、イヌでは、肝移植、腎移植が主な解析対象となり、マウス、ラットでは皮膚、肝、心の移植がモデル系として利用された。免疫抑制法や免疫寛容導入法にしては、リンパ系へ傷害を与え、ドナー骨髄移植によってリンパ系の回復をはかるもの（サイクロフォスファミドやアザシオプリン）、拒絶反応に伴う免疫反応の抑制を主な目的とするもの（ステロイド）、リンパ球自身には傷害を与えず、抗原提

示細胞からTリンパ球への刺激の伝達を阻害して免疫抑制効果を引き出すもの（CTLA4Igなど)、リンパ球の生体内移動を変動させて、免疫抑制効果を引き出すもの（FTY720）、慢性拒絶反応の最も重要な表現形である移植心の冠動脈肥厚を回避するための遺伝子操作などが用いられた。移植臓器や移植患者（レシピエント）の免疫系を軸とする生体内の動きについては、生検による各種染色検査法、マーカー抗原に対する単クローン抗体とFACSによる細胞動態の解析などが幅広く活用された。

倫理面への配慮としては、サル、イヌ、ラット、マウスにかかる負荷が最低限にとどまるよう、実験手技、飼育、管理の工夫に努めた。短期的苦痛のみならず長期的苦痛を最低限にとどめるよう、全構成員に強く要請した。また、実験を行う際、各施設にもうけられている動物実験に関する審査委員会でプロトコールを　　とくにモデル動物に無用の負荷がかからないか否かをチェックされ、許可を得ることを求めた。

小児生体部分肝移植例において、免疫抑制剤の計画的減量を行う場合は、有義や成果とともに拒絶反応の再発の可能性を十分に説明し、わずかでも拒絶反応の危険性が見えた場合にはただちに免疫抑制剤のプロトコールへ復帰し、危険を回避することを説明し、納得を得た後に実施している。一般的な治療におけるインフォームドコンセントよりも、より詳細な説明を行い、レシピエントに不利な状況が生じないよう万全に注意をもって実施した。

C.研究成果

リンパ系への傷害が少ないマイルドな免疫抑制剤の開発とヒトへの応用の道作りは、藤堂（北海道大学）他、多くの研究者の協力によって進められた。目的と方法は以下の通りである。新規免疫抑制剤FTY720とCTLA4Ig及びCD40Igを組み込んだアデノウィルスベクターを用いてその免疫抑制効果と副作用を検討した。1）FTY720:ACL-Lewisラットの組み合わせで腹腔内心移植及び同所性肝移植を行った。また、Beagle(F1)Beagleの組み合わせで腎移植及び同所性肝移植を行った。FTY720は0.01～30mg/kg/日で単独療法、最小有効量とシクロスポリン(5mg/kg/日)またはタクロリムス(0.5mg/kg/日)との併用療法、さらに至適投与量を用いたinduction therapyの効果を検討した。2)CTLA4Ig及びCD40Igを用いた遺伝子療法：それぞれの遺伝子をアデノウィルスベクター(AV)に組み込み、上記ラット肝移植モデル及びBrown Norway-Lewisラットを用いた小腸移植モデルで、免疫抑制効果を検討した。AVは移植直後レシピエントに静注投与した。結果として1)FTY720:ラット心、肝移植において、移植後14日間の単独経口投与により、0.05～10mg/kg/dayの範囲で用量依存性にグラフト生着延長効果を示した。移植前後3日間の短気投与でも有意に生着期間の延長が得られた。サイクロスポリン、タクロリムスとの併用投与で相乗効果が得られた。投与量30mg/kg/dayでは全例が投薬期間中に死亡し、明らかな毒性を示した。イヌ肝、腎移植では0.1mg/kgがグラフト生着延長効果における至適投与量であり、肝ではサイクロスポリンと、腎ではタクロリムスとの併用投与で単独投与よりも正着期間が延長した。2)CTLA4Ig及びCD40Igを用いた遺伝子治療:AVを用いた遺伝子導入ではCTLA4Ig、CD40Ig共に用量依存性に高い血中濃度が得られ、術後4～7日目にピークとなった。肝移植ではCTLA4Igで5×10^{8}pfu以上で、CD40Igでは1×10^{9}pfuで免疫寛容が誘導された。小腸移植ではCTLA4Ig $1\sim4\times10^{9}$pfuで生着期間の延長が得られた。

生体肝移植後の小児レシピエントに免疫抑制剤の計画的減量、計画的離脱による免疫寛容の積極的応用の試みは、主として田中（京都大学大学院）らによって行われた。生体肝移植後、主に感染症のため免疫抑制剤を中止せざるを得なかったにもかかわらず良好な肝機能を維持している症例が相当数存在する。（非計画的離脱症例：n=17）。また、その経験を基に移植後長期を経過し、拒絶反応の既往が少ない症例を選択して計画的な免疫抑制剤の減量・中止プロトコールを確立し、現在6例の計画的離脱例を経験している。今回、これらの症例における免疫機構を解明すべく、以下の検討を行った。対象：生体肝移植後免疫抑制剤完全離脱例23例（計画的離脱

6例、非計画的離脱17例）。方法：1）リンパ球混合反応試験(MLR)によるin vitroでのドナーへの反応性の検討。2)Real-time RT-PCRによる肝針生検組織内のサイトカインgene発現の定量。結果：MLRにおいて、ドナーへの反応を3rd pertyに対する比（抗ドナーcpm/抗3rd party cpm）での術前の症例（n=13）と比較したところ、離脱症例（n=13）で有意にドナーに対する反応性が低下していた（1.421±0.6215 vs 0.835±0.762、p<0.05）。さらに培養上正清中のサイトカイン（INF-γ、IL-10）を測定したところ、離脱症例において対ドナー培養上生清中のINF-γは対3rd party のそれに比し有意に低値（11.049±6.590 pg/ml vs 82.123±91.345 pg/ml、p<0.05）であり、IL-10の有意差は認めなかった。つまり、TH1サイトカインのdown regulation が、ドナーに対するリンパ球増殖活性低下の原因である可能性が示唆された。

肝組織内のサイトカインgene の発現に関しては、TH1(IL-2、INF-γ)、TH2(IL-4、IL-10)ともに対照（ドナー開腹時の生検組織）と比較して有意差は認めなかった。その他のサイトカイン（IL-1、IL-5、IL-8、IL-12、IL-15、TNFα）についても同様であった。

慢性拒絶反応の回避については、磯部（東京医科歯科大学）他、多くの研究協力者によって、強力な共同研究が進められた。目的：心拒絶反応は移植後患者の予後を決定する重要な要素である。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慢性拒絶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抑制されており、慢性心拒絶に遺伝子治療が有効である。今回より長期的な効果が得られる遺伝子治療の標的として、転写因子であるE2F とNF-κB に着目して、デコイ遺伝子による発現抑制が慢性及び急性心拒絶反応を抑制する効果について、マウスとサルの心移植モデルを用いて検討した。対象と方法：マウスおよびサルの異所性心移植は既報の方法の通り、腹部血管への血管縫合を用いて行った。マウスではNF-κB デコイを、サルではE2F デコイ遺伝子を導入した。デコイ遺伝子は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。ドナーへの免疫抑制等の治療は行わなかった。マウスは、major mismatch、minor mismatchの二通りの組み合わせで検討した。移植心は28日目に採取した。結果：マウス（major mismatch）：移植心の生着はコントロールで、平均8日に対し、NF-κBデコイ導入群では平均15日と有意に延長した。マウス（minor mismatch）：NF-κBデコイ遺伝子導入群では、新生内膜の血管内腔占拠率が22±14%とコントロール群（53±12%）に比して減少した。血管壁におけるVCAM-1の発現も低下していた。サル：E2F デコイ導入により内腔占拠率は平均18±10%とコントロールの49±12%より有意に減少した。サルの肝臓、脳、腎、精巣のいずれにもHVJのF蛋白は検出されなかった。考察：NF-κBデコイ、E2F デコイ遺伝子が慢性拒絶反応の抑制に有効であることが小動物のみならず大動物においても示された。NF-κBは急性拒絶反応の抑制にも有効であったが、治療によりICAM-1 や MHC クラスⅠ抗原の発現も低下しており、虚血再灌流傷害による炎症の抑制により、抗原提示が低下したことが関係していると考えられた。

D.考察

3年間の研究計画は一年毎の成果を評価し、ヒトでの移植医療の質的向上に結びつく成果を残して共同研究体制を強化するという方針であった。初年度の出発点において主な目標として設定した課題はいずれも達成目標値を越えられたと判断している。マイルドな免疫抑制法の開発や慢性拒絶反応の回避法の確立については、小動物レベルで有用性、安全性ともに確定的なものとしたが、平成11年度研究報告会や本研究報告書の作成時期には、サルを用いた安全性、有用性の検討がすでに着手されており、ヒトへの応用の可能性を示唆する成果が得られている。また、ヒトで免疫寛容を積極的に応用する第一陣として期待し、十二分な注意を払いつつ着手した小児肝移植症例の免疫抑制剤計画的減量、完全離脱のプロトコールから、すでに6例の免疫寛容例が得られ、安定した免疫寛容状態が得られている。免疫寛

容が積極的に応用できる症例には免疫寛容を活用し、免疫寛容導入が困難な症例にはマイルドな免疫抑制剤の使用や慢性拒絶反応の回避によって、質の高い医療として移植を位置付ける事が可能と判断している。

E. 結論

初年度に設定した達成目標は、3年間で達成したものと判断している。次のステップの研究プロジェクトにおいて、ヒトへの応用が可能になると確信している。

F. 研究発表

1.論文発表

1.Uchida, T., Tomita, Y., Anzai, K., Zhang, Q.W. Kishihara, K., Nomoto, K. and Yasui, H.: Role of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in discordant skin xenograft erejection. *Transplantation*.68(11):1721-1727,1999

2.Yoshikawa, M., Tomita, Y., Uchida, T., Zhang, Q.W. and Nomoto, K.: Lack of pluri potent stem cell engraftment in cyclophosphamid-induced tolerance. *Transplant, Proc.*, 31(1-2):897-899,1999.

3.Ito, D., ogasawara, K., Iwabuchi, K., Inuyama, Y. and Onoe, K.: Iduction of CTL responses by simulraneous administration of liposomal peptide vaccine with anti-CD40 and anti-CTLA-4 mAb. *J. Immunol*.164:1230-1235,2000.

4. Suzuki, J., Isobe,M., Morishita, R., Aoki, M., Horie, S., Okubo, Y., Kaneda, Y., Sawa, Y., Matsuda, H., Ogihara, T. and Sekiguchi , M.: Preventions of graft arteriopathy by antisense cdk2 kinase oligonucleotide. *Nature Med.* 3:900-903, 1997.

5. Yamaguchi, S., Kawashima, H., Endo, H., Tsuru, T., Shibui, H., Kagawa, Y., Hori, J., Yamagami, H. and Isobe, M.: Cytokine profile of adueous humor and graft in prthotopic mouse corncal treansplantation. Transplantation.66 : 1504-1510,1998.

6. Umesue, M., Mayumi, H., Kong, Y. Y., Omoto, K., Muranaka, H., Nakanishi, R., Kohno, H., Yasumoto, K., Kishihara, K. and Nomoto, K. :Rejection of discordant skin xenografts by CD4- CD8- TCRαβ + cells in CD4- and CD8- deficiet mice. *Transplant, Proc.* 31:890-891,1999.

7. Furukawa, H., Suzuki, T., Jin MB, Taniguchi, M., Magata, S., Ishikawa, H., Ogata, K., Masuko, H., Shimamura, T., Fukai, M., Hayashi, T., Fujita, M., Nagashima, K., Omura, T., Kishida, A. and Todo, S.: Prolongation of canine liver allograft survival by a novel immunosuppressant, FTY720. *Transplantaion.* 69:1-7,2000.

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

2.学会発表

1. Onoe, K. : Special Guest Lecture " A new member of immunocompetent cells", The Eleanor Naylor Dana Charitable Trust Lecture, South Florida University (St. Petersdurg).

2. Isobe, M., Suzuki, J., Morishita, R., Aoki, M., Kaneda, Y., Sawa, Y., Matsuda, H., Ogihara, T. and Sekiguchi, M. : "Effects of antisense cyclin-depedent kinase 2 kinase oligonuclcotide on murine cardiac allograft vasculopathy". International Congress on Immunosuppression, Florida, 1997.

3. Yamashita, K., Nomura, M., Takehara, M., Omura, T., Yanagida, N., Suzuki., T., Shimamura, T., Kishida, A., Furukawa, H. and Todo, S. : Effects of novel immunosuppressant, FTY720, on heart andliver transplantation . 18th Annual Meeting of the American Society of Transplantation.

G.知的所有権の取得状況

1.特許取得

1. Induction o ntolerance by modified immunogens. (US Patent No.5,885,570) (issued March 23, 1999) (米国) .

2.実用新案登録　　なし

3.その他　　なし

分担研究報告

バイオ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

主任研究者：九州大学生体防御医学研究所免疫学部門
野本　亀久雄

研究要旨：　本年度の研究において、薬剤誘導寛容法を改善し、マウス同種皮膚移植において恒久生着を可能とすることができた。また、種々の変異マウスやノックアウトマウスを用いた研究により、免疫寛容の誘導におけるFas/FasLシステムの関与や同種・異種移植片の拒絶におけるCD4/CD8陽性T細胞の異なる関与が明確となった。

A．研究目的

免疫抑制剤が開発されて以来、ヒト臓器移植は目覚ましく発展した。しかしながら、ドナー不足は非常に深刻な状況であり、また、免疫抑制剤の長期服用による副作用やQOLが問題となってきた。ヒト臓器移植への免疫寛容の応用は安全性と確実性が高く、この問題を解決することができる有望な方法であると考えられる。しかしながら、現在、小動物において種々の免疫寛容誘導法が試みられているが、ヒトに応用できる段階までには至っていない。そこで、我々は、免疫抑制剤からの離脱とMHC不一致の同種移植片の恒久定着を目的として、マウス及びラットの免疫寛容誘導系の確立を試みた。また、免疫系機能分子のノックアウトマウスを用いて、同種・異種移植における免疫寛容及び拒絶の分子機構解析を行った。

B．研究方法

（1）マウス同種皮膚移植における薬剤誘導免疫寛容法の確立：B10マウス(H-2^b)をレシピエントに、B10D2マウス(H-2^d)をドナーとして、我々が研究・開発してきたSCCP法（皮膚移植の前に、ドナー脾細胞＋シクロホスファミド(CP)＋ブスルファン(BU)を投与して、ドナー反応性T細胞を排除する免疫寛容誘導法）を施行し、その１４日後にB10D2の皮膚片を移植した。皮膚移植片の生着日数、末梢血におけるリンパ球・好中球のキメラ状態、ドナーに対する細胞傷害リンパ球(CTL)活性等を調べた。

（2）ラット同所性肝移植における薬剤誘導免疫寛容法の応用：Lewisラット(RT-1^l)をレシピエントに、DAラット(RT-1^a)をドナーとして、従来のSCCP法を施行し、その25~35日後にDAラット由来の肝臓片を同所性移植した。レシピエントマウスの生存日数、肝移植片における組織病理、ドナーに対するドナーに対するCTL活性等を調べた。

（3）免疫抑制剤依存状態からの離脱を目的とした免疫寛容誘導の試み：AKR(H-2^k)→B6(H-2^b)の同種皮膚移植を施行し、タクロリムスを連日投与した。１ヶ月後にタクロリムス投与を中止し、抗T細胞レセプター(TCR)αβ抗体を投与した。その１週間後に抗CD3抗体投与、放射線照射、ドナー骨髄細胞移入(BMT)を行った。皮膚移植片の生着日数、ドナーに対するCTL活性等を調べた。

（4）同種皮膚移植での免疫寛容誘導におけるB細胞の役割：抗TCRαβ抗体、放射線低線量照射、BMTを組み合わせた新しい免疫寛容誘導法(ARBMT法)を開発した。レシピエントにC57BL/6マウス(B6, H-2^b)を、ドナーとしてAKRマウス(H-2^k)を用い、ARBMTを施行した後、ドナー皮膚片を移植した。興味深いことに、ARBMTによるAKRに対する免疫寛容の誘導に伴い、末梢のB細胞が減少することを明らかにした。そこで、ARBMTにおいて、B細胞の移入及び抗ドナー抗体を含む血清の投与を行い、免疫寛容におけるB細胞の役割を検討した。皮膚移植片の生着日数、末梢血におけるキメラ状態、ドナーに対するMLR・CTL活性を思食べた。

（５）マウス同所性肝移植におけるFas/FasLの役割：マウスにおいては、同種間の肝移植は無処理でも長期・恒久生着することが知られている。そこで、この免疫寛容メカニズムを解明する目的で、Fas/FasL系の関与を検討した。MRL/MpJ系統マウス(MRL+/+, *lpr/lpr*, *gld/gld*)をレシピエントに、C57BL/6系統マウス(B6+/+, *lpr/lpr*, *gld/gld*)をドナーとして、同所性肝移植を施行した(*lpr/lpr*：Fas遺伝子の変異；*gld/gld*：FasL遺伝子の変異)。レシピエントマウスの生存日数、血清ALT値、肝移植片能祖氏気病理、肝浸潤細胞のドナーに対するCTL活性等を調べた。

（６）同種・異種皮膚移植におけるCD4陽性及びCD8陽性T細胞の役割：CD4及びCD8ノックアウトマウス(いずれもH-2^b background)をレシピエントに、同種ドナーとしてBALB/cマウス(H-2^d)を、異種ドナーとしてヒト・ラット・モルモット・ウサギを用いて、皮膚移植を施行した。皮膚移植片の生着日数、皮膚移植部の組織病理、ドナーに対するMLR・CTL活性覚を調べた。＊以上の実験は、九州大学医学部附属動物実験施設の定める動物取扱いの規定に準拠し、研究の承認を得て実施された。

C．研究結果

（１）BU投与によるSCCP法の改善により、従来よりも高く安定な造血幹細胞レベルでの混合キメラ状態が誘導された。混合キメラ状態では、ドナー由来リンパ球系細胞の割合が、80%を越え、その割合は、BUの用量依存的に上昇した。それと同時に、ドナー反応性T細胞の排除も認められた。さらに、キメラ状態の向上にともない、MHC不一致の同種皮膚移植片の生着が、従来よりもはるかに延長し、恒久生着するマウスも高頻度で出現した。

（２）従来のSCCP法を用いて、同種間でのラット同所性肝移植に成功した。移植後8日目で急性拒絶の病理像が認められるものの、移植後115日目では肝内への細胞浸潤はなく、軽度の繊維化を認めるのみであった。したがって、肝移植においては、従来法で十分に免疫寛容が誘導できることが明らかになった。

（３）抗TCRαβ抗体投与、放射線照射、BMTを行うことにより、タクロリムス依存状態からのドナー特異的免疫寛容誘導が可能であった。また、タクロリムス投与中止後の抗CD3抗体の投与は末梢リンパ球を活性化させ、移植片の早期拒絶の原因となった。

（４）B細胞非投与群では、末梢のキメリズムの成立、ドナーに対するT細胞の反応性は消失していた。しかしながら、B細胞投与及び抗ドナー血清投与により同種皮膚移植片の生着が有意に低下し、末梢のキメリズムが消失していた。

（５）MRL+/+マウスにB6+/+マウス由来の肝臓片移植した場合を基準にすると、B6*gld/gld*マウスをドナーにした場合およびMRL*lpr/lpr*マウスをレシピエントにした場合においてレシピエントマウスの生存日数が有意に短縮した。また、移植後７日の血中ALT値、肝内へのレシピエント由来の細胞の浸潤程度、肝内浸潤細胞のドナーに対するCTL活性は、レシピエントマウスの生存日数と逆相関した。

（６）CD4及びCD8ノックアウト(KO)マウスのいずれも同種・異種移植片を拒絶した。同種皮膚移植片は、CD4KOマウス、CD8KOマウス、B6マウスにいずれにおいても同様に移植後10日前後で拒絶された。ヒト移植片の生着日数は、CD4KOマウス(約19日)の方が、CD8KOマウス(約14日)よりも有意に長かった。CD4KOマウスに移植された皮膚片にはCD8陽性T細胞の浸潤が認められた。さらに、CD4KOマウスに抗CD8抗体を投与した場合、移植片の生着日数はさらに延長した。また、CD4KOマウスにおける種々の同種・異種皮膚移植における移植片の生着日数は、同種マウス＜ラット＜モルモット＜ウサギの順で延長した。

D．考察

（１）BUの骨髄抑制作用によって、ドナー由来の造血幹細胞の定着を可能にするスペースができたことが、安定した高い混合キメラ状態の成立を可能にした主因と考えられる。放射線照射や抗体投与をせずに、薬剤投与のみで同種間のバリアーを乗り越えたことは、非常に意義深いと考えられる。とくに、皮膚移

植のような拒絶が最も敏感に起きる系において達成されたことは特筆すべきことであろう。今後、薬剤の投与量などの条件を改善することによって、ヒトへの応用も可能になるかもしれない。

（２）皮膚に比べて肝臓は、移植において比較的生着しやすい臓器だと言われている。MHC不一致の同種皮膚移植では、従来のSCCP法では、長期生着は可能ではなかったが、肝移植では従来法でも十分に免疫寛容を誘導することができた。ただし、ヒトへの応用を考えれ際は、CPの用量をより減らす必要があり、今後の課題と言える。

（３）この研究において、抗体の選択が免疫寛容誘導の可否に関わることが示唆される。したがって、ヒト同種移植に抗体を用いる免疫寛容誘導を用いる際は、使用する抗体の性格を十分に考慮する必要があろう。

（４）本研究のARBMT法による免疫寛容の誘導の系において、Ｂ細胞の減少が必須であることが示唆される。今後、Ｂ細胞の抗原提示能、サイトカイン産生能、抗体産生能などいずれの機能が関与しているのか明らかにする予定である。

（５）リシピエントにおけるFasの発現とドナーにおけるFasLの発現がマウス同種肝移植における自然性着に重要であることが明らかになった。つまり、レシピエント由来のドナー反応性Ｔ細胞が、Fas-FasLの相互作用で排除されることが、マウス同種肝移植における自然生着（免疫寛容の誘導）の初期段階に重要であることが示唆される。

（６）ヒト移植片の拒絶には、CD4陽性Ｔ細胞が重要であること、CD8陽性Ｔ細胞もヒト移植片の拒絶にエフェクターとして関与していることが明らかとなった。また、ドナーとレシピエントの系統発生においてよりかけ離れているほど拒絶におけるCD4陽性細胞の役割の比重が重いことも示唆された。

Ｅ．結論

本研究において、MHC不一致の同種皮膚移植片の長期・恒久性着させることが可能な薬剤誘導性免疫寛容法をマウスにおいて開発することができた。また、種々のシグナル伝達分子(Fas, FasL, CD4, CD8など)のノックアウトマウスの解析により、免疫寛容の誘導・拒絶に関与する重要なエフェクター分子・細胞の役割をより明確にすることができた。

Ｆ．研究発表

１．論文発表

(1) Uchiyama H, Kong, Y.-Y., Kishihara, K., Sugimachi K. and Nomoto, K.: Approach to withdrawal from tavrolimus in a fully allogeneic murine skin graft model. *Immunology* 97(2):294- 300, 1999.

(2) Uchida, T., Tomita, Y., Anzai, K., Zhang, Q.W., Kishihara, K., Nomoto, K. and Yasui, H.: Roles of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in discordant skin xenograft rejection. *Transplantation* 68(11): 1721-1727, 1999.

(3) Yoshikawa, M., Tomita, Y., Uchida, T., Zhang, Q.W., and Nomoto, K.: Lack of pluri potent stem cell engraftment in cyclo-phosphamide-induced tolerance. *Transpant, Proc.* 31(1-2):897- 899, 1999.

(4) Umesue, M., Mayumi, H., Kong, Y.-Y., Omoto, K., Muranaka, H., Nakanishi, R., Kohno, H., Yasumoto, K., Kishihara, K. and Nomoto, K.: Rejction of discordant skin xenografts by $CD4^-$ $CD8^-$ $TCR\alpha\beta^+$ cells in CD4- and CD8-deficient mice. *Transpant. Proc.* 31(1-2):890-891, 1999.

２．学会発表

（Ｈ１１年度年度第29回日本免疫学会・京都）

岡野慎士、野本健一、皆川亮介、野本亀久雄：抗TCR-αβ抗体、放射線低線量照射、および骨髄移植を用いた免疫寛容誘導におけるＢ細胞の役割

７．知的所有権の出願・取得状況

なし

分担研究報告

骨髄幹細胞移植による免疫寛容の誘導と維持に関する研究

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　ドナー骨髄幹細胞移植によって特異的寛容を誘導し、その後臓器移植を行う方法は、拒絶を抑制するには理想的手段と考えられる。しかし、寛容誘導・維持機構は、GVHR 等の生体修飾により、様々な影響を受ける。本研究では、マイナーGVHR による寛容破綻のメカニズム解明と、骨髄移植後のミックスキメリズムを応用した動脈硬化治療モデル作製を目的として、研究を行った。その結果、GVHR による寛容破綻が、二つのメカニズムによることを明らかにし、ミックス骨髄移植によって動脈硬化自然発症モデルマウスの治療に成功した。

A. 研究目的

移植における拒絶反応を抑えるには、ドナー移植抗原に対する特異的寛容誘導が、免疫抑制剤療法と較べて、患者 QOL 向上には有利である。これまでマウスの実験系で、骨髄移植による寛容誘導メカニズムを明らかにしてきた。また、骨髄移植後の急性 GVHR に引き続き、慢性 GVHR が誘導されること、この慢性 GVHR は骨髄幹細胞が成熟型 T 細胞に分化する過程における negative selection の破綻によることを示した。本研究は、最終的にこの慢性 GVHR 誘導に関与する、胸腺内選択機構異常の細胞・分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。また、ミックスキメリズムを応用し、apoE-/-マウスの動脈硬化治療モデルを確立することを目的とする研究も行った。

B. 研究方法

マウスの実験的骨髄移植は、H-2 不一致、H-2 一部不一致、マイナー抗原不一致など、種々の組み合わせで行った。GVHR を誘導するために 1-3×10^5個の T 細胞を骨髄幹細胞とともに移植した。移植後、GVHR 症状と、T細胞の反応性、T細胞レパートリーの構成を解析した。

動脈硬化モデル実験では、apoE-/-マウスに、動脈硬化抵抗性 SJL、または感受性 B10.S マウスの骨髄細胞と同系（apoE-/-）マウスの骨髄細胞を混合して移植した。

上記の動物実験は、本研究所動物実験委員会において、「本研究所動物実験に関する指針」に沿った研究内容であることを審査され、認可を受けた。

C. 研究結果

1）致死量放射線照射マウスに異系マウス骨髄細胞を移植し、完全ドナーキメリズムを確立した。その後、ホスト脾内にドナーマウス肝細胞を移植し、生着に成功した。また、ドナー抗原に対する寛容の誘導が、クローン消去、アナジー、抑制細胞（veto cell）などによる複雑なシステムであることを明らかにした。最終年度では、これまで急性 GVHR による影響が認められなかった、H-2 適合の組み合わせでも慢性 GVHR が観察され、胸腺内の negative selection 異常が生じることを明らかにし、ドナーまたはホスト抗原に反応性を示す T 細胞レパートリーを同定した（表）。即ち、骨髄移植 8 週後の GVHR〔B10.BR→AKR〕キメラにおい

て、ドナー、およびホスト抗原反応性 Vβ6、Vβ5、Vβ11 陽性 T 細胞が消去されず認められた。

Deletion of self-reactive T cell repertoire				
	chimerism	Vβ6	Vβ5	Vβ11
B10.BR		−	+	+
B10.AQR		−	+	+
AKR		+	+	+
BR→AKR(4w)	97%	+	+	+
GVH BR→AKR(4w)	98	+	+	+
GVH BR→AKR(8w)	100	−	−	−
AQR→AKR(4w)	98	+	+	+
GVH AQR→AKR(4w)	100	−	+	+

また、GVHR による寛容誘導破綻は、ホストキメリズムの消失と、ホスト胸腺機能異常の二つのメカニズムによることを解明した（表）。

Abrogation of negative selection under the influence of GVHR

1. Lack of the tolerogen-producing cells
2. Injured thymic system involved in clonal elimination

2）apoE-/-マウスに SJL、または B10.S 骨髄細胞を移植して、ミックスキメリズムを確立することにより、ドナー、ホスト両抗原に寛容を誘導し、動脈硬化を治療することに成功した。治療効果は、動脈硬化抵抗性の SJL マウスの骨髄細胞移植が、B10.S のものより高いことが判明した。この治療効果は、血中コレステロール値とは相関しなかった（表）。

上記の研究より、寛容誘導におけるマイクロキメリズムの重要性が判明した。また、GVHR を誘導せずに骨髄移植を行い、ミックスキメリズムを確立させることにより、動脈硬化以外の種々の遺伝子治療に応用できることが示された。

D. 考察

GVHR による寛容誘導破綻メカニズムについて、ホスト造血系細胞残存によるミクロキメリズムの重要性を示すことが出来たが、胸腺機能異常の分子メカニズムについては、完全に解明することが出来なかった。これは、骨髄キメラマウスの維持面で問題が生じ、多数の実験材料が揃わなかったことによる。この点は、今後の課題として残った。

アロ骨髄幹細胞移植後に、ドナーと同系の肝細胞を移植し、生着することを我々は既に報告している。この手法を用いれば、多くのアロ臓器移植が拒絶なしの状態で行えるようになる。しかし、骨髄移植後に GVHR が誘導されれば、一定期間後に、ドナー及びホスト抗原に対する寛容が破綻することが判明した。このことは、移植臓器の慢性拒絶反応に繋がる。以上の結果は、今後脳死臓器が他人より提供され、アロ移植症例数が増加すると考えられる我が国の移植医療にとって、拒絶反応をいかに抑えるかを考慮する上で貴重な基盤となる。

最後に、ミックスキメリズムが、ホストの免疫系再建、寛容誘導で重要な利点を持

Effect of Allogeneic Chimerism on Serum Cholesterol and Triglyceride Concentrations

Mice	Serum				
	n	T-Cho	HDL-Cho	non HDL-Cho	TG
		mg/dl			
apoE$^{-/-}$, NT	4	410±20	24±1	389±21	100± 1
[SJL+apoE$^{-/-}$→apoE$^{-/-}$]	9	151±14	42±2	109±15	133±18
[B10.S+apoE$^{-/-}$→apoE$^{-/-}$]	10	85± 6	44±2	42± 5	97± 8

つことが判明した。今後よりマイルドな方法で、ミックスキメリズムを成立することが出来れば、移植臓器拒絶反応を臓器ドナー特異的寛容誘導によって、制御することが可能となると考えられる。

E. 結論

骨髄幹細胞移植による寛容誘導のメカニズムを解明した。またGVHRによる寛容誘導破綻が、二つのメカニズムによる自己抗原反応性T細胞クローンの消去不全によることを示した。

次に、ドナーとホスト骨髄幹細胞を同時に移植して、ミックスキメリズムを成立させることにより、動脈硬化高発症系（apoE-/-）マウスの動脈硬化を治療することに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.
2) 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 17, 1161-1168, 1999.
3) 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.
4) 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 IκBα is mediated by a ubiquitin ligase Skp1/Cul 1/F-box protein FWD1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 3859-3863, 1999.
5) Kitaichi, N., Ogasawara, K., Iwabuchi, K., Nishihira, J., Namba, K., Onoé, Kazuy., Konishi, J., Kotake, S., Matsuda, H., and Onoé, Kazun.: Different influence of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in signal transduction pathway of various T cell subsets. Immunobiol. 201, 356-367, 1999.
6) Ato, M., Iwabuchi, K., Matsuki, N., Mukaida, N., Iwabuchi, C., Takahashi, A., Takayanagi, T., Dondog, E-A., Hatakeyama, S., Ishikura, H., Kato, M., Negishi, I., Nishihori, H., Ogasawara, K., Matsushima, K., and Onoé, K.: Delayd clearance of zymosan-induced granuloma and depressed phagocytosis of macrophages with concomitant up-regulated kinase activities of src-family in a human monocyte chemoattractant protein-1 transgenic mouse. Immunobiol. 201, 432-449, 1999.
7) Kitaichi, N., Matsuda, A., Kotake, S., Namba, K., Tagawa, Y., Sasamoto, Y., Ogasawara, K., Iwabuchi, K., Onoé, K., Matsuda, H., and Nishihira, J.: Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis with anti-macrophage migration inhibitory factor antibodies. Current Eye Research 20(2), 109-114, 2000.
8) Ito, D., Ogasawara, K., Iwabuchi, K., Inuyama, Y., and Onoé, K.: Induction of

CTL responses by simultaneous administration of liposomal peptide vaccine with anti-CD40 and anti-CTLA-4 mAb. J. Immunol. 164, 1230-1235, 2000.

9) Ito, D., Ogasawara, K., Matsushima, K., Morohashi, T., Namba, K., Matsuki, N., Kitaichi, N., Inuyama, Y., Hosokawa, M., Nakayama, E., Iwabuchi, K., and Onoé, K.: Effective priming of cytotoxic T lymphocyte precursors by subcutaneous administration of peptide antigens in liposomes accompanied with anti-CD40 and anti-CTLA-4 antibodies. Immunobiology. (in press)

10) Izutsu, Y., Tochinai S., and Onoé, K.: Loss of reactivity to pan-cadherin antibody in epidermal cells as a marker for metamorphic alteration of *Xenopus* skin. Dev. Growth. Diff. (in press).

11) Izutsu, Y., Tochinai, S., Iwabuchi, K., and Onoé, K.: Larval antigen moleucles recognized by adult immune cells of inbred *Xenopus* laevis; two pathways for recognition by adult splenic T cells. Dev. Biol. (in press).

12) 小野江和則，荒波利昌：（特集）NKT細胞の分化と胸腺環境．臨床免疫，31(1), 7-13, 1999.

13) 小野江和則：（総説）NKT細胞の分化と胸腺．臨床免疫，32(2), 215-221, 1999.

14) 小野江和則：移植免疫の基礎．北海道医報「生涯教育シリーズXII移植医療」，934, 10-14, 1999.

15) 岩渕和也，岩渕千雅子，根岸　泉，刀祢さおり，小笠原一誠，小野江和則：ZAPノックアウトマウスにおけるT細胞、NKT細胞分化．アレルギー科，8(3), 227-237, 1999.

16) 小野江和則：「運動生理・生化学辞典」大野秀樹他編，大修館書店，東京，（印刷中）

17) 小野江和則：免疫寛容．「肝臓移植の実際」藤堂　省編，日本医学館，東京，（印刷中）

18) 小野江和則，諸橋大樹：（解説）キラーT細胞活性化における骨髄由来抗原提示細胞の役割（Cross-presentation）．臨床免疫，（印刷中）

19) 伊藤大祐，小野江和則：抗CD40及び抗CTLA-4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細胞傷害性T細胞誘導．臨床免疫，（印刷中）

２．学会発表

1) 小野江和則：特別講演　NK-T細胞の分化と機能．　第18回日本胸腺研究会，1999.　（於　仙台）

2) 岩渕和也，小笠原一誠，阿戸　学，小野江和則：ZAP-70ノックアウトマウスを用いたNK1.1陽性T細胞分化の研究．第88回日本病理学会総会　1999.（於東京）

3) 阿戸　学，岩渕和也，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LPS感受性亢進のメカニズム．　第88回日本病理学会総会，1999.（於　東京）

4) 阿戸　学，岩渕和也，小野江和則：マウスアログラフト炎症因子（AIF)に対する単クローン抗体作製と組織分布の検索．第39回日本リンパ網内系学会総会，1999.（於　名古屋）

5) Iwabuchi, K.: Development of NK1.1$^+$ T cells in ZAP-70 knockout mice. In Thymus Workshop -T Lymphocyte Development and Function- Kerkrade 1999. (於　Netherlands)

6) Mizumoto, N., Iwabuchi, K., Nakamura, H., Shibaki, A., Kawashima, T., Kobayashi, H.,

Iwabuchi, C., Ogasawara, K., Ohkawara, A., and Onoé, K.: Analysis of Contact Hypersensitivity Response in Human Monocyte Chemoattractant Protein-1 Transgenic Mice. The 60th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology 1999. (於 Chicago)

7) Kitaichi, N., Namba, K., Ogasawara, K., Kotake, S., Sasamoto, Y., Matsuda, H., and Onoé, K.: Inhibition of eau by pre-treatment of H-2A^k mice with liposomal peptide. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 1999. (於 Florida)

8) Sasamoto, Y., Kitaichi, N., Kotake, S., Matsuda, A., Nishihira, J., and Onoé, K.: Prominent increase macrophage migration inhibitory factor in the sera of patients with uveitis. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 1999. (於 Florida)

9) 綿野敬子, 藤井 聡, 石森直樹, 北畠 顕, 岩渕和也, 小野江和則：マウス allograftinflammatoryfactor-1(AIF-1cDNA) のクローニングおよび、組織分布の解析. 第63回日本循環器免疫学会総会, 1999. (於 東京)

10) 石森直樹, 葛西瑞穂, 綿野敬子, 藤井 聡, 北畠 顕, 岩渕和也, 永田純一, 小野江和則, 千葉仁志：骨髄由来細胞は動脈硬化病巣進展を規定する～apo E ノックアウト(KO)マウスを用いた検討. 第5回 Circulation Club (心血管病変と生理活性物質), 1999. (於 福岡)

11) 荒浪利昌, 岩渕和也, 小野江和則：NKT 細胞による syngeneic MLR の制御. 第29回日本免疫学会総会・学術集会, 1999. (於 京都)

12) 北市伸義, 小笠原一誠, 岩渕和也, 西平順, 小竹 聡, 小野江和則：T細胞シグナル伝達系路におけるマクロファージ遊走阻止因子(MIF)の作用. 第29回日本免疫学会総会・学術集会, 1999. (於京都)

13) 諸橋大樹, 小笠原一誠, 岩渕和也, 小野江和則：マイナーまたは MHC クラス I 抗原単独で誘導される GVHR. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会, 1999. (於 京都)

14) 刀祢さおり, 岩渕和也, 岩渕千雅子, 根岸 泉, 小野江和則：胸腺器官培養系を用いた 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29回日本免疫学会総会・学術集会, 1999. (於 京都)

15) D. ENKH-AMAR, K. Iwabuchi, K. Onoé: Phagocytosis and acetyl-LDL uptake are downregulated in a murine macrophage cell line, J774A.1, overexpressing rat csk. 第29回日本免疫学会総会・学術集会, 1999. (於 京都)

16) 小野江和之, 岩渕和也, 岩渕千雅子, 小西 純, 小野江和則：ループスモデルマウスにおける NK-T 細胞の減少と NK-T 細胞の補体感受性との関連. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会, 1999. (於京都)

17) 小西 純, 岩渕和也, 阿戸 学, 岩渕千雅子, 小野江和之, 小野江和則：aly マウス胸腺内への正常胸腺髄質上皮細胞移入による NK-T 細胞の誘導. 第29回日本免疫学会総会・学術集会, 1999. (於京都)

G. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告

単クローン抗体を含む遺伝子工学の活用に関する研究
-移植心の慢性拒絶反応の分子機構の解明と遺伝子治療-

分担研究者　　磯部　光章　東京医科歯科大学循環器内科　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E2Fデコイ遺伝子の導入、およびアポトーシスの抑制因子であるbcl-xに対するアンチセンス遺伝子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遺伝子を導入して28日目の冠動脈硬化を評価した。E2Fデコイ、アンチセンスbcl-xとも、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、E2Fデコイの導入はその進展予防効果がある。また血管平滑筋のアポトーシスの誘導により内膜肥厚を抑制することが可能である。

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ついて報告した。それによれば、cdk2 kinaseあるいはcdc2 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。

転写因子であるE2Fは静止期では不活性化されているが、血清などの刺激により活性化され、cyclin Aやcdk2 kinaseと複合体を作ることにより細胞周期調節においてS期進展に必要な細胞周期調節遺伝子群（c-myc、c-myb、cdc2キナーゼ、PCNAなど）を活性化し、細胞増殖を引き起こす。そこでE2F結合配列と同じ配列をもつ2本鎖核酸化合物（デコイ）の導入により、転写因子E2Fの結合を競合的の阻害することが期待される。この抑制は血管平滑筋細胞の増殖をも抑制する。実際バルーン傷害後の血管内膜新生抑制が報告されている。

一方、近年の研究で、動脈硬化におけるアポトーシスの重要性が明らかにされている。アポトーシスはbcl-xなどの抑制因子とbaxなどの促進因子のバランスで制御されていることが示されている。血管内膜肥厚におけるアポトーシスの役割には不明な点が多いが、増殖する血管平滑筋細胞のアポトーシスの誘導により内膜肥厚が抑制される可能性が考えられる。

本研究ではE2Fデコイの強力な内膜新生作用、さらにbcl-xの抑制によるアポトーシスの誘導が移植心冠動脈内膜肥厚抑制に有効であるか否かをマウス心移植のモデルを用いて検討した。

B.　研究方法

DBA/2マウス（オス20-25g）の心臓を摘出して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。HVJ-liposome法による遺伝子導入は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。E2Fデコイとして5'-CTA - GAT - T T C - CCG - CG -3'、3' - TA - AAG - GGC - GCC -TAG-5"を用いた。bcl-xのアンチセンスODNとして用いたのは、5'-GTT-GCT-CTG-AGA-CAT-TTT-3'、センスODNは5'-AAA-ATG-TCT-CAG-AGC-AAC-3"である。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算出した。IEL（内膜弾性板）で囲まれた面積-血管内腔面積/IEL