

Group	No. of Grafts	No. of Arteries	Luminal Occlusion (%)	TUNEL	Bcl-x	Bax	ICAM-1	VCAM-1
No ODN	8	33	59.1 ± 9.9	1.2 ± 0.4	2.3 ± 0.8	1.3 ± 0.8	2.3 ± 0.8	1.8 ± 0.4
Sense ODN	8	32	58.3 ± 31.8	1.2 ± 0.4	2.1 ± 0.9	1.2 ± 0.7	2.3 ± 0.7	1.9 ± 0.3
Antisense ODN	9	37	*28.9 ± 12.0	*2.0 ± 0.9	*1.2 ± 0.4	1.2 ± 0.4	*0.7 ± 0.4	*1.2 ± 0.4

表1 Pathological Findings of Murine Cardiac Allografts

All data are expressed mean + SD. Scoring of the intensity was as follows: 0, no visible staining;

1, few cells with faint staining; 2, moderate staining; and 3, intense diffuse staining. *P < 0.05 vs. No ODN

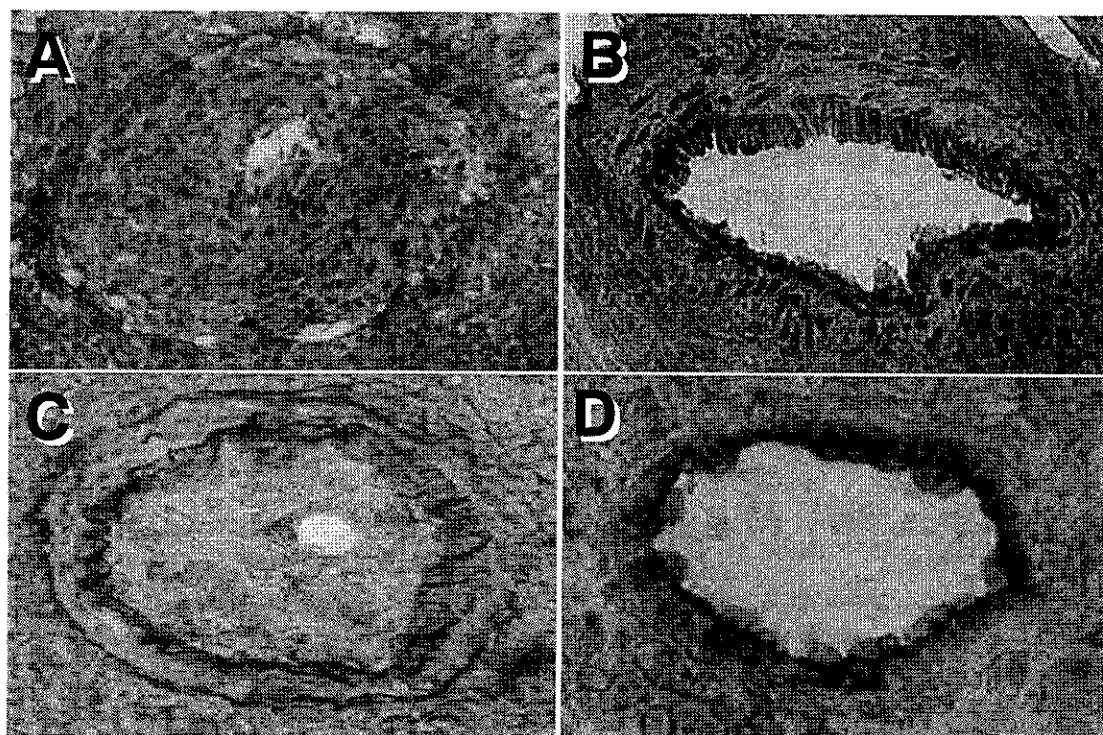


図1 アンチセンス bcl-x 遺伝子導入による移植心内膜肥厚の抑制とアポトーシスの誘導
A 無治療コントロールマウスの移植心冠動脈 (Elastica van Gieson 染色)、 B アンチセンス bcl-x 遺伝子導入マウスの冠動脈 (Elastica van Gieson 染色)、 C 無治療コントロールマウス冠動脈における TUNEL 法陽性細胞、 D アンチセンス bcl-x 遺伝子導入マウスの冠動脈における TUNEL 法陽性細胞。)

で囲まれた面積。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。PDGF-B, cdk2 and cdc2 kinase mRNA 発現は RT-PCR にて検出した。発現の強さはスコア化 (score 0-3) して、半定量的に評価した。

アポトーシスは TUNEL 法により検出し、養成細胞を半定量的に評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いた研究であり、倫理面での問題はない。動物実験に関しては、動物保護の観点から施設の基準にそって行った。

C. 研究結果

1. E2F デコイ

E2F デコイ投与はデコイ投与群、コントロール遺伝子導入群とも4匹ずつ、それぞれ24血管について検討を行った。無導入群 (内弾性板内占拠率 $60 \pm 23\%$) では冠動脈内膜肥厚を認めたのに対し、E2F デコイ導入群 ($15 \pm 9\%$, $p < 0.01$) ではその進展は著明に抑制されていた。

同様に血管内膜での ICAM-1 の発現は無導入群 (2.3 ± 0.8) で著しく、E2F デコイ導入群 (0.7 ± 0.5 , $p < 0.01$) では抑制されていた。VCAM-1 の発現も同様であった (1.8 ± 0.4 vs 1.0 ± 0.2 , $p < 0.01$)。また PDGF-B mRNA の発現も E2F デコイ群で抑制されていた (1.6 ± 1.0 vs 1.0 ± 0.2 , $p < 0.01$)。cdk2 and cdc2 kinase mRNA の発現も同様に有意差をもって抑制されていた。一方病理学的に検討した拒絶反応の程度については各群で差を認めなかった。

2. アンチセンス bcl-x

図1、表1に示す如く、アンチセンス ODN 導入群では内膜肥厚の抑制が認められ、TUNEL 陽性細胞が増加していた。また血管内皮における ICAM-1、VCAM-1 の発現も抑制されていた。

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。これまでの

我々の一連の研究結果から、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らかとなっている。

すでに我々は細胞周期調節遺伝子である、cdk2 kinase や cdc2 kinase のアンチセンス遺伝子導入によりマウス移植心における冠動脈内膜肥厚が抑制されることを示してきた。しかしこれまでの検討は、4週までの観察期間を置いていたのみで、より長期間の効果については検討が必要であった。

今回の検討で、E2F デコイ遺伝子導入でも内膜肥厚の進展が認められず、治療効果が認められている。E2F が複数の細胞周期調節遺伝子の転写に関わる転写因子であることと、導入した遺伝子が二本鎖 DNA であり、アンチセンスよりも、安定性が高いことから、cdk2 kinase よりも、より長期に効果がある可能性が考えられる。この点については今後検討する予定である。

一方、今回の実験で移植心冠動脈肥厚に平滑筋のアポトーシスが関与していることが初めて示された。今後 bcl-x、bax によるアポトーシスが本疾患に果たしている役割についてはさらに検討を重ねる必要があるが、治療の標的として有用であることが示された。

また今回の検討では、免疫抑制剤を使用しておらず、その免疫抑制剤の影響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、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。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 NF κ B、血管新生に関わる VEGF、HGF などが検討されている。導入ベクターについても様々なものが開発されている。臨床応用に関しては、大動物での安全性と効果についての検討が必要であり、現在 E2F デコイを用いてサル の移植心における検討を始めている。

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効果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E2Fデコイ遺伝子の導入およびアンチセンス bcl-xオリゴはその進展予防に効果がある。臨床応用に向けてさらに検討を重ねることが必要である。

F. 研究発表

1) 国内

論文発表

1. 鈴木淳一、磯部光章、森下竜一、金田安史、川内基裕、天野純：遺伝子導入による移植心慢性拒絶の抑制。日本臨床免疫学会誌、印刷中
2. 町田水穂、鈴木淳一、高橋済、天野純、磯部光章：マウス移植心冠動脈における単球遊走因子の発現。信州医学雑誌 47：401-404、1999

学会発表

1. Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Ogihara T, Sekiguchi M: "Prevention of cardiac allograft arteriosclerosis with single intraluminal delivery of decoy to transcription factor E2F", 第62回日本循環器学会学術集会総会, 東京, 1998
2. 磯部光章, 「移植心冠動脈硬化の遺伝子治療」, 第5回Vascular Remodeling研究会、東京、1998年
3. Suzuki J, Isobe M, Izawa A, Morishita R, Sawa Y, Kaneda Y, Ogihara T, Amano J, Sekiguchi M: E2F decoy prevents arteriosclerosis and suppresses adhesion molecule expression in murine heart allografts. 第34回日本移植学会総会、東京、1998年
4. 高橋済、伊沢淳、山崎諭、鈴木淳一、磯部光章、関口守衛：移植心の急性拒絶におけるAminoguanidineの効果。第17回日本心臓移植研究会、東京、1999年

2) 海外

論文発表

1. Suzuki J, *Isobe M, Morishita R, Aoki M, Horie S, Okubo Y, Kaneda Y, Sawa Y, Matsuda H, Ogihara T, Sekiguchi M: Prevention of graft arteriopathy by

antisense cdk2 kinase oligonucleotide. *Nature Med*, 3: 900-903, 1997

2. Isobe M, Suzuki J, Yamazaki S, Horie S, Okubo Y, Maemura K, Yazaki Y, Sekiguchi M: Regulation by differential development of Th1 and Th2 cells in peripheral tolerance to cardiac allograft induced by blocking ICAM-1 and LFA-1. *Circulation*, 96: 2247-2253, 1997
3. Isobe M, Suzuki J, Yamazaki S, Horie S, Okubo Y, Sekiguchi M: Assessment of tolerance induction to cardiac allograft by anti-ICAM-1 and anti-LFA-1 monoclonal antibodies. *J Heart Lung Transplant*, 16: 1149-1156, 1997
4. Yamagami S, Kawashima H, Endo H, Tsuru T, Shibui H, Kagawa Y, Hori J, Yamagami H, Isobe M: Cytokine profile of aqueous humor and graft in orthotopic mouse corneal transplantation. *Transplantation*, 66: 1504-1510, 1998
5. Isobe M, Suzuki J, Morishita R, Kaneda Y, Amano J: Gene Therapy for Heart Transplantation-associated Coronary Arteriosclerosis. *Ann NY Acad Sci*, in press
6. Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Nishikawa T, Amano J, Kaneda Y. Antisense bcl-x oligonucleotide induces apoptosis and prevents arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. *Cardiovasc Res*, 45: 783-787, 2000

学会発表

1. Suzuki J, Isobe M, Sekiguchi M, Aoki M, Morishita R: "Prevention of graft coronary arteriosclerosis by antisense CDK2 kinase oligodeoxynucleotide", 70th American Heart Association Scientific Meeting, Miami, 1997
2. Isobe M, Suzuki J, Morishita R, Aoki M, Kaneda Y, Sawa Y, Matsuda H, Ogihara T, Sekiguchi M: "Effects of antisense cyclin-dependent kinase 2 kinase oligonucleotide on murine cardiac allograft vasculopathy", International Congress on Immunosuppression, Florida, 1997
3. Suzuki J, Isobe M, Amano J, Sekiguchi M: "Prevention of graft arteriosclerosis with single intraluminal delivery of decoy to

transcription factor E2F", 17th World Congress of The Transplantation Society, Montreal, 1998

4. Izawa A, Isobe M, Suzuki J: Tranilast inhibits neointimal formation of coronary arteries in murine cardiac transplantation model. The 6th Basic Sciences Symposium, The Transplantation Society. Monterey, CA, 1999年

7. 知的所有権の出願・取得状況

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

分担研究報告

研究課題 大型動物（イヌ）による免疫寛容モデルに関する研究

分担研究者 渡部浩二 北里大学医学部免疫学助教授

研究協力者 猪股裕紀洋 京都大学大学院医学研究科移植免疫助教授

研究要旨 臨床臓器移植を推進させるためには、より安全な免疫抑制法による成績の向上が望まれている。即ち生体の防御機構を損なわずに従来の免疫抑制剤を出来るかぎり少量用い、移植片に対する反応をのみ抑制する免疫寛容を誘導し維持することである。我々はbeagle成犬を用い術前にrecipient (R) の全身のリンパ組織へ選択的に少量のX線の照射、腎移植(KGT) に腎donor(D)からの骨髄移植(BMT), 術後少量の短期間の免疫抑制剤FK506(FK) の三者併用療法で、目的を達成させる方向性を示した。また移植片を生着維持させる因子を解明するために自家繁殖犬の中でhomozygousなイヌの系統を作製しているが、今後より明確に免疫寛容導入のモデルを提示できるものと確信している。

A. 研究目的

小動物で誘導可能な同種間における免疫寛容(免寛)導入維持法を大動物にそのまま応用できないが、後者での有効な方法は臨床応用に近かつけることは、可能である。我々はbeagle成犬を用い従来の免疫抑制法を出来るだけ効率よく用いとくに移植時前後の比較的短期間に有効な免疫学的処置を実施し、移植片を生着維持させる方策を確立することを目的としている。

B. 研究方法

1) イヌの組織適合性抗原の解析

a. MLR(mixed lymphocyte reaction)およびPCR-SSCP(single strand conformation polymorphism)による解析。

従来、(D),(R)の組み合わせは、家系の明らかな非血縁間で雌雄の異なるMLR高反応(平均S.I.=10)のpairとした。今年度からは、PCR-SSCP法によりmismatchのgradeを検討することができた。

b. Homozygousなイヌの作製および維持
当施設では、実験用イヌの自家繁殖を行

っており、mongrel, beagle犬の自家繁殖犬のfamily studyが可能である。それぞれの一家系から生まれたoffspringからDNAを採取しPCR-SSCP法により、同型を示す雌雄のoffspringを選定し、自然交配によりoffspringを得てそれぞれの遺伝子型を判定しhomozygousな個体を少なくとも3系統(donor, recipient, third-party(T))を作製することを開始した。

2) Recipientの処置

a) (R)の全身のリンパ組織へ4MeVのLina cによる術前選択的照射(FLI) b)腎移植(KGT)時に腎(D)からのPHA無反応BMC(平均: 2×10^7 /kg)の移植、c)術後FK0.08 mg/kg/dの90日間の連日投与方法である。

3) 術後の免疫学的monitoring

a) (D),(R),(T)のそれぞれの末梢血より得たリンパ球を用いて経時的にMLRを行う。b) Lymphocytotoxic testを実施する。c) 骨髄穿刺による骨髄細胞、末梢血を培養してkaryotypingで性染色体(XY, XX)の比率を算定する。d) MLR-blocking反応; 術後に発現される細胞および抗体因子のMLRへの添加試験によって(D)

特異的抑制性の反応の有無を解明する。即ち、術前に保存した (LN2, -180°C) リンパ球に対する (D) および (T) の細胞の反応に、術後の (R) の末梢リンパ球、上腕骨骨頭穿刺により得た BMC, 膝窩リンパ細胞を採取して上記の MLR に添加して、各々の抑制因子の有無を検索する。e) 皮膚移植による monitoring; 術後 (D) および (T) からの全層 SGT を行い、その生着の動態を検索する。f) 移植 BMC の生着は、karyotyping による性染色体の割合を算定する。

(倫理面への配慮)

実験動物は、本学の自家繁殖犬および研究用に繁殖している colony から購入している。腎移植、骨髄穿刺、皮膚移植などは、ネブタール静注麻酔、ケタラル筋注を用い、術後は、ホリゾンなどの鎮静剤を投与する。処分の際はネブタールの過剰投与により安楽死させている。また、年度初めに実験計画書を提出し、実験動物委員会の審査が終了しなければ、実験の開始が許可されない規定がある。

C. 研究結果

Protocol I-III は既に報告した。要旨を述べる。P-1 は、FLI, 150rad/d, 10 日間、腎 (D) からの BMT, FK, 0.08mg/kg/d の 90 日間投与方法で FLI と FK でも 113.4 ± 8.2 日 (N=8), さらに (D) の BMT 併用で 112.1 ± 19.1 日 (N=12) と生着延長するが、前者では FK を中止すると全例、103 日から 249 日以内に拒絶された。一方、BMT を加えると 9 例 4 例に chimerism が持続し、その中、3 例に SGT を行うと腎 (D) からの SG は完全に生着し、(T) からの SG は対照と同等に拒絶された。P-II は FLI を 10 日から 3 日間に短縮し、術後の FK の量を増加させた群である。P-III は、4 °C 下で単純冷却保存した腎の移植成績である。

P-II では、BMT の効果は殆ど発現せず、(6/6), FL と FK 併用群では 2/6 例で腎および腎 (D) からの SG が長期生着した。

P-III は保存腎移植であり、血管吻合時に腎を冷却し続けることにより、無処置で 8.3 ± 0.6 日 (N=3), 非保存腎の対照と同等の成績であった。FK との併用では、 56.5 ± 26.8 日 (N=6) であり、非保存腎の 81.6 ± 17.9 日 (n=5) と比較して有意の差は無かった。保存腎移植でも非保存腎移植と同等の成績であり、3 日間の術前処置が可能となる裏づけとなった。

Chimera 導入に関し、その発現が術後の FK の投与量に左右されることが判明したため、P-IV に示すごとく FK の量を 0.08mg/kg/d, 90 日間法に設定したところ、Table 1 に示すごとく FLI と FK の併用で、平均 53.2 日 (N=8), さらに BMT を併用すると、平均 178.8 日 (N=13) と生着延長した。従って FK の量は低量でも BMT との併用効果は、増大することが判明した。後者の 13 例の中、8 例に長期生着が得られ (>100 日), chimera が検索できた 8 例についてみると、chimera が持続した 5/8 例では、>100 日生着し、その中 1 例は、Table 2 に示すごとく (D) SG のみが再現性良く長期生着した。他の 4 例は、103-125 日で合併症 (肺炎 2 例、自己腎摘出後の肺炎 2 例で死亡、3/4 例では腎機能は良好) のため SGT は施行できなかった。雌雄が同じ pairs では 3 例中 2 例に腎の長期生着 (431, 248 日) が得られ、SGT では骨髄 (D) の SG のみが長期生着した。

MLR-blocking では、P-4, の 5 群において (D) BMC が生着、chimerism が持続した場合の良好機能腎をもつ (R) では、末梢血骨髄、リンパ節に移植した (D) BMCs が移住し、再生されてきたと考えられる免疫調節細胞が (R) anti (D) MLR 反応を特異的に抑制したと考えている。

一方、骨髄chimerismが一時的に生着したが消失した例では、前記の細胞を加えても抑制効果は見られず、(R)anti(D)、または(T)MLRも増強した。

適合度に関しては、Figure-1に示す如く retrospective ではあるが、PCR-SSCPではP-IVの4,5群それぞれ2,7例で、5群の1例を除き全て2mismatchであった。組織不適合であっても本法によって生着延長効果が得ることができた。

つぎに、寛容誘導因子を明確にするためにDR遺伝子型をPCR-SSCP法を用いて、2家系(beagle 1, mongrel 1)のoffsprings同型同志を自然交配して、それぞれ mongrel(2; male, 2; female), beagle(2; male, 3; female)を得ることができた(birth, Feb 18, 2000, and Feb 16, 2000)。発育を待ってPCR-SSCP法を用いてhomozygousの有無を確認する計画である(Fig. 2, 3)。

D. 考察

本法、即ちFLI, BMT, FKの組み合わせにより長期生着を得、骨髄chimerismが導入され持続した場合、FK投与を中止後も安定した生着を続けた。同時に(R)の術後の(R)のリンパ節、骨髄、末梢血などから(R)anti(D)-MLRを特異的に抑制する細胞が検出されたが、骨髄chimeraとなった骨髄から産生される細胞によって寛容が維持されていると考えられる。

寛容誘導因子をより明確にするために、現在、homozygousな個体を少なくとも3系統作るべく検討を重ねている。

本法は、3日間の保存腎移植にも応用できるが、術前3日間の処置に代わる方策が、次の検討課題である。動物実験では長期の経過観察が難しいため、慢性期の病態の解析には注意を要する。慢性期の拒絶反応の有無、その対策は次の課題である。

E. 結論

本法は、現時点では侵襲の少ない寛容誘導法と考えられる。Homozygousな個体を用いてこれまで得られた結果の(D)特異性をより明確にしていく計画である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Koji Watanabe, Kyoko Ito, Fumio Otani, Takehisa Kaneko, Zhang Fengyuan: Donor bone marrow (DBMC)-infusion is effective in inducing tolerance in dogs treated with fractionated lymphoid irradiation (FLI) and FK506. Transplant. Proc. in press.

2. 学会発表

1) Koji Watanabe, Fumio Otani, Takehisa Kaneko, Midori Okubo: Factors in influencing operational tolerance in dogs treated with fractionated lymphoid irradiation (FLI), donor bone marrow (DBMC)-infusion and FK506. Proc. Jap. Soci. Immunol. 29:47, 1999.

2) Koji Watanabe, Kyoko Ito, Fumio Otani, Takehisa Kaneko, Zhang Fengyuan: Donor bone marrow cell (DBMC)-infusion is effective in inducing tolerance in dogs treated with fractionated lymphoid irradiation (FLI) and FK506. 6th congress of the Asian Soc. of Transplantation. Abstract Book, p316. Sept. 24 1999, Singapore.

G. 知的所有権

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

Methods Experimental Protocol

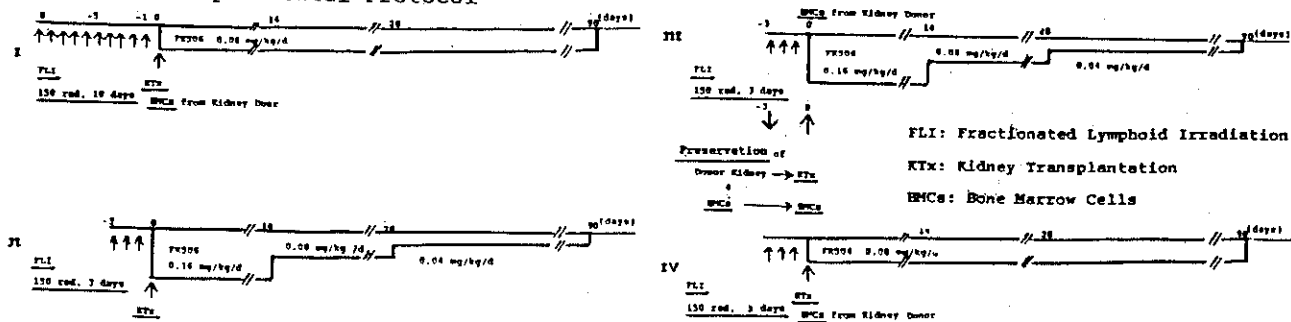


Table 1 Protocol IV
Kidney Allograft Survival

Group	Treatment	No. of Dogs	Graft Survival(days)	Mean(days)
1	None	9	16, 15, 12(x2), 11, 9, 8(x3)	11.0
2	FK506	6	20, 15(x3), 14, 11	15.0
3	FLI, DEMC	3	8, 7(x2)	7.3
4	FLI, FK506	8	118 ^S , 77, 61, 54, 39, 30, 25, 22 ^S	53.2
5	FLI, DEMC, FK506	13	706 [⊗] , 431 [⊗] , 248 [⊗] , 137 ^S , # 125 ^{d-1} ⊗ 113 ^{d-2} , 111 ^{d-3} , 103 ^{d-4} , 70, 70, 56, 36, 28	p<0.01* 178.8

d-1; died of pancreatitis, d-2; died of abdominal wall infection with viable KG.
 d-3, died of pneumonia with viable KG. d-4; died of pancreatitis after Nx his own kidney.
 ⊗ ; SGs from kidney and bone marrow donor were survived.
 S ; SGs were rejected, as the same as control.
 ⊕ ; Chimerism persisted. # ; Chimerism temporarily occurred.
 @ ; died of infection due to hydronephrosis. underlined ; sex-mismatched recipients
 Abbreviation, FLI; fractionated lymphoid irradiation, 1.5Gy/d for 3 days(4.5 Gy total),
 DEMC; PHA-P nonresponding donor bone marrow cell-infusion(mean of 2x10⁶ cell/kg,) FK506; 0.08mg/kg/d intramuscularly for 90 days. * Mann Whitenny Analysis

Table 2 Protocol IV

Skin Allograft Survival in Recipients treated with FLI, with/without DEMC-infusion and FK506

a) Treated with FLI, DEMC and FK506 (chimerism persisted)

Donor	Recipient	Date of SGT after KGT	Kidney Graft Survival (days)	Skin Graft Survival (days)
397M [#] 332M [#]	398F	120	(706 [@])	(>583) 21
397M 332M	398F	200		(>506) 9
397M 332M	398F	422		(>280) 9

@; died of hydronephrosis due to obstruction of ureteroneostomy.

b) Treated with FLI, DEMC and FK506(chimerism temporarily occurred)

Donor	Recipient	Date of SGT	Kidney Graft Survival	Skin Graft Survival
420M [#] 332M [#]	423F	126	137(rejected)	6 7

c) Treated with FLI, and FK506 (DEMC(-))

Donor	Recipient	Date of SGT	Kidney Graft Survival	Skin Graft Survival
422M [#] 332M [#]	417F	104	118(rejected)	7 8

(>); Grafts still survived.

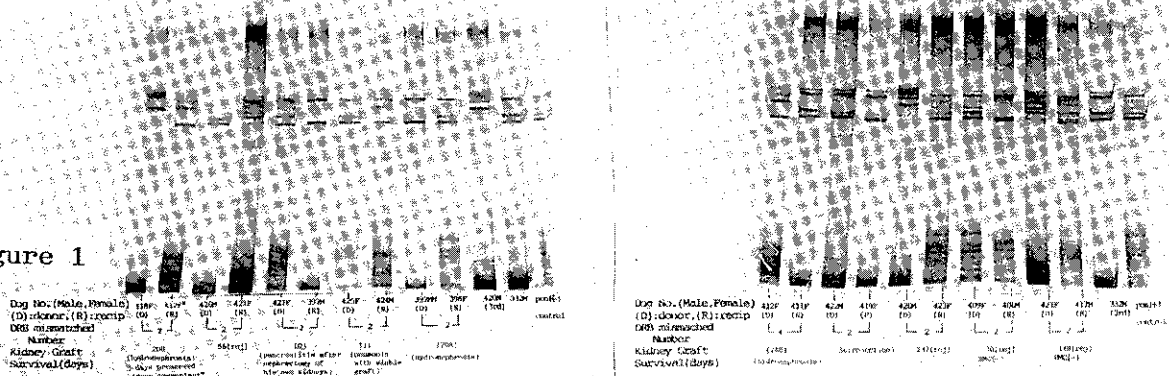
; Kidney Donor
##; Fixed Third Party Donor

Protocol IV

PCR-SSCP in group 5 (FLI, BMC, and FK506)

SSCP (35-36°C, 40mA 90min)
formamid treated

Figure 1



分担研究報告

研究課題 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

分担研究者 安元公正 産業医科大学第2外科 教授
研究協力者 中西良一 産業医科大学第2外科 講師
江藤正俊 九州大学医学部泌尿器科

研究要旨 凍結保存による同種気管移植の免疫寛容のメカニズムを検討し、非免疫抑制下における長期生着の可能性について検討を加えた。Second graft rejectionの検討により、新鮮移植後のSecond allograftは特異的に不良な形態を示したのに対し、凍結移植後の場合は激的な反応を示さず、3ヶ月凍結保存による特異的な抗原性の低下が認められた。同種気管移植後6ヶ月目において、新鮮移植片は非免疫抑制下でその形態を維持できなかったのに対し、3ヶ月凍結保存同種移植片は、主に軟骨の抗原性の低下により、その形態を維持することが可能であった。

A. 研究目的

肺・気管・大動脈移植における免疫寛容の導入に関する検討のなかで、凍結保存による同種気管移植の免疫寛容について、そのメカニズムを検討する。

B. 研究方法

1. 腹壁皮下へのラット異所性気管移植モデルを用いて、Second graft rejectionの検討を行った。まずrecipientのBrown Norway (以下、BN) に対して、新鮮BN、新鮮Lewis (以下、Lew)、凍結保存LewをFirst graftとして移植。その2週間後に、それぞれのラットの腹壁皮下の違う部位に新鮮なBN、Lew、Wistar Furth (以下、WF) を移植し、その4週間後に移植片の検討を行った (各n=5)。
2. 凍結保存による非免疫抑制下での移植片長期生着を調べるために、異所性同種気管移植モデル (Lew×BN) を用いた。donorとして新鮮Lewと凍結保存Lew (各n=6) をrecipientのBNに移植して6ヶ月後の生着の有無を検討した。

尚、凍結保存はRPMI-1640に20%FCS, 10%DMSOを加えたものを保存液として用い、プログラムフリーザーを使わない簡便なシステムにより、-80℃まで急速凍結を行った後に、液体窒素の気層に3ヶ月間の保存を行った。

研究成績は、肉眼的にグラフトの開存率を求め、また組織学的には上皮の形態スコア、軟骨の有核細胞率および位置異常スコア、単核球浸潤スコアによって評価された。開存率は移植前に比べての割合として求められた。0: 上皮(-), 1: 単層性無線毛上皮, 2: 多層性無線毛上皮, 3: 正常な粘膜線毛上皮、の形態スコアの占める割合の総和として求められた。軟骨の有核細胞率は、1切片中の全軟骨細胞数に対するviableな核を有する軟骨細胞の割合として求められた。軟骨の位置異常は、その頻度により0: (-); 1: 30%以下, 2: 30~70%, 3: 70%以上、のスコアとして求められた。単核球浸潤は、0: (-), 1: 30%以下, 2: 30~70%, 3: 70%以上、の浸潤スコアとして求められた。

統計学的検定はStudent's *t* testに

より行い、 $p < 0.05$ を有意差判定基準とした。

(倫理面への配慮)

実験動物への配慮は、1985年 NIHから発表された実験動物の使用と治療に関するガイドを参考にして行った。

C. 研究結果

1. 新鮮移植後のSecond allograftは形態的にきわめて悪く、Third partyと比較しても特異的に不良であったのに対し、凍結移植後のSecond allograftは、コントロールの時のSecond allograftと同程度の免疫反応しか示さなかった。組織学的には、新鮮移植後のSecond allograftの場合、細胞浸潤による軟骨破壊によって、軟骨の有核細胞率の低下と位置異常が認められ、graftの開存を保持できなかった。一方、凍結移植後のSecond allograftはコントロールやThird partyのSecond allograftと比べ、軟骨の有核細胞率、位置異常、上皮、細胞浸潤、開存率のすべてにおいてほぼ同等の成績を示した。(Fig. 1) によって、3ヶ月の凍結保存により気管は特異的にその抗原性を低下させる可能性があると考えられた。

2. 移植後6ヶ月目の評価において、新鮮移植片はその形態をとどめてはいなかったが、凍結移植片では良好な管腔が保持されていた。(Fig. 2) 組織学的には、新鮮移植片の場合、軟骨の有核細胞率は高いが位置異常が著しくそのため開存率が低くなった傾向が認められ、反対に凍結移植片の場合は有核細胞率が低いのに対し、位置異常がほとんど認められな

かった。(Fig. 3) また細胞浸潤も新鮮移植片で有意に多く認められた。よって、凍結保存が長期間にわたって、免疫反応を抑え、寛容状態を創っていることが判明した。

D. 考察

以上の結果により、凍結保存は気管組織に多大なダメージを与えるが、特に軟骨に対する影響によりこの組織の抗原性を低下させ、寛容状態を誘導する可能性が示唆された。少なくとも同種移植においては、凍結保存を組み合わせることにより、免疫抑制剤を使わずに長期的な移植片の管理が可能であることから、癌などの疾患も適応にいれることが可能となり、今すぐにも臨床応用が可能と考えられた。

気管に関しては同種移植の免疫寛容について、凍結保存を利用することにより臨床的に可能ならしめることができ、計画した目的が十分達成されたと考えられる。しかし、大血管・肺についてはその目的を達成することができなかった。その最大の問題は、簡便な移植モデルの作成ができなかったことによると考えられる。

今後、同種気管移植に関しては臨床的に始めても良いと考えられるが、大血管や肺については簡便な実験モデルの作成を急ぎ、特に肺移植においては慢性拒絶反応のコントロールについて検討を加えるべきであると考えられる。

E. 結論

同種気管移植において、3ヶ月の凍結保存により特異的に免疫反応は抑えられ、6ヶ月もの間、免疫抑制剤を使わずに移植片を良好に維持することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nakanishi R, Hashimoto M, Muranaka H, Umesue M, Kohno H, Yasumoto K. Maximal period of cryopreservation using Bicell biofreezing vessel for rat tracheal isografts. J Thorac Cardiovasc Surg 1999;117:1070-6.

Umesue M, Mayumi H, Kong YY, Omoto K, Muranaka H, Nakanishi R, Kohno H, Yasumoto K, Kishihara K, Nomoto K. rejection of discordant skin xenografts by CD4- CD8- TCR $\alpha\beta$ + cells in CD4- and CD8- deficient mice. Transplant Proc 1999;31:890-891.

Hashimoto M, Nakanishi R, Muranaka H, Umesue M, Eifuku R, Yasumoto K. Short-course of immunosuppression using FK506 for rat tracheal allografts. J Cardiovasc Surg (in press).

Nakanishi R, Umesue M, Hashimoto M, Muranaka H, Hachida M, Yasumoto K. Limit of warm ischemia time before cryopreservation in rat tracheal isografts. Ann Thorac Surg (in contribution).

Hashimoto M, Nakanishi R, Umesue M, Muranaka H, Hachida M, Yasumoto K. Feasibility of Cryopreserved

Tracheal Xenotransplants Using Short-course Immunosuppression. J Thorac Cardiovasc Surg (in contribution).

2. 学会発表

中西良一, 八田光弘, 安元公正. 臨床応用に向けた気管移植の検討. 第100回日本外科学会総会(東京); 2000年4月発表.

G. 知的所有権の取得状況

なし。

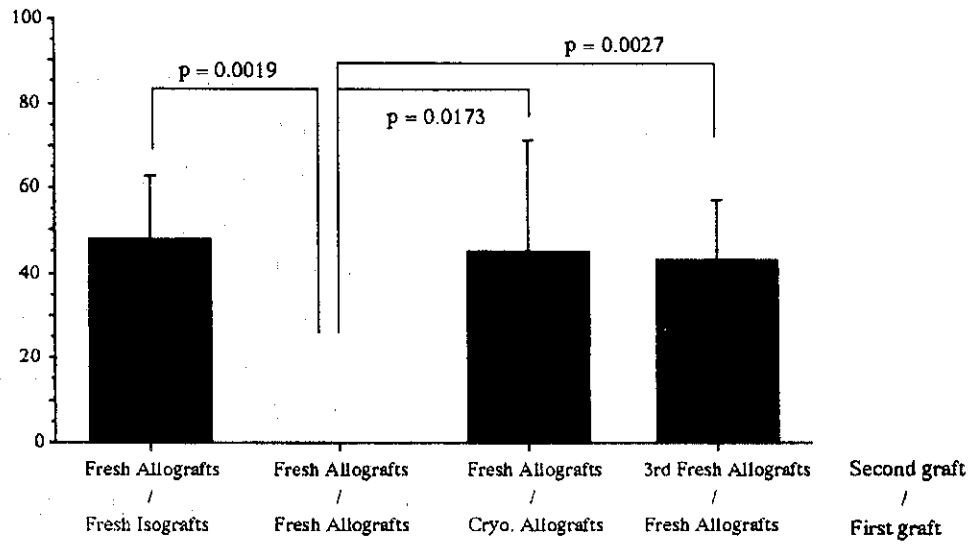


Fig. 1 Percent Patency of Second Allografts

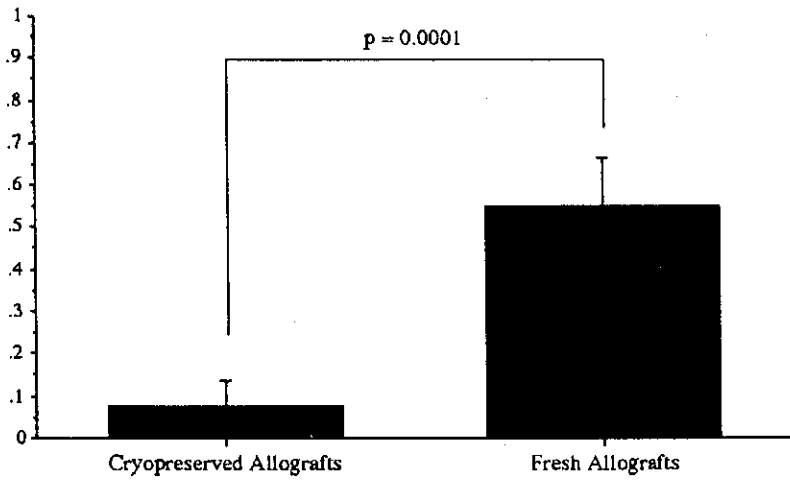


Fig. 3A Viable Chondrocyte Ratio of Allografts

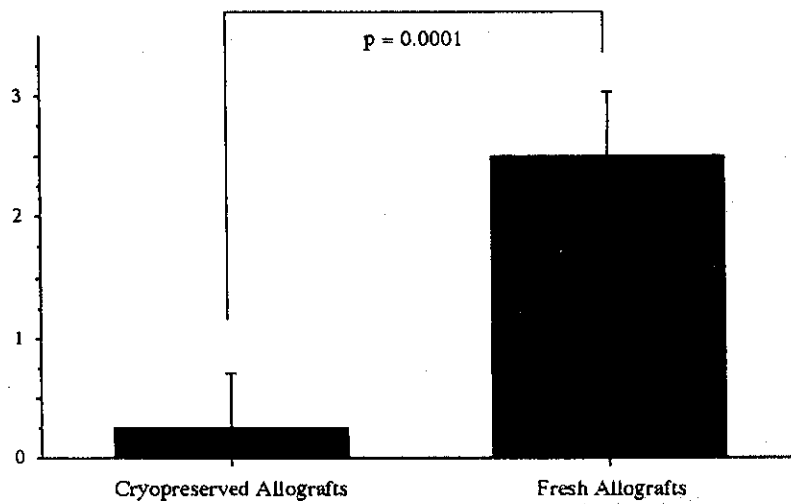


Fig. 3B Cartilage Dislocation Score of Allografts

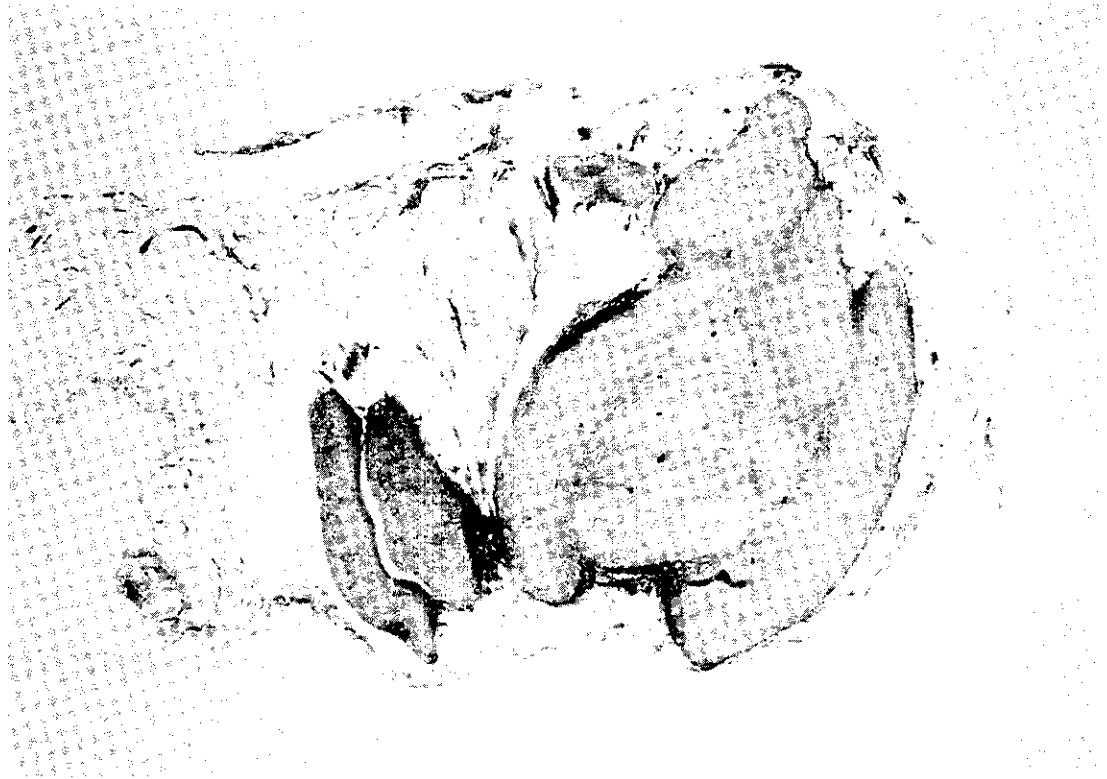


Fig. 2A Fresh Allografts without Immunosuppression 6 Months after Transplantation

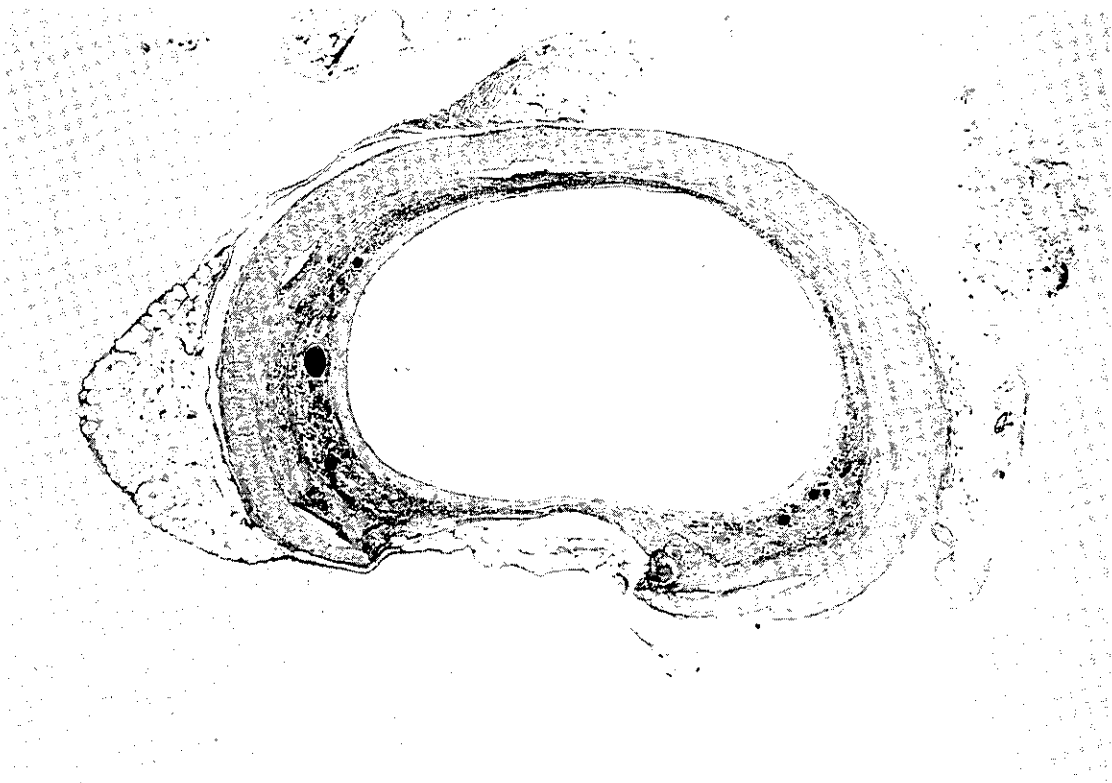


Fig. 2B Cryopreserved Allografts without Immunosuppression 6 Months after Transplantation

分担研究報告

研究課題 遺伝子治療を用いたドナー特異的免疫抑制療法の開発

分担研究者 藤堂 省 北海道大学医学部第一外科教授
研究協力者 上出利光 北海道大学医学部免疫科学研究所免疫病態部門教授
古川博之 北海道大学医学部第一外科講師
大村孝志 北海道大学医学部第一外科助手

研究要旨：アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入によるドナー特異的免疫寛容誘導について検討した。co-stimulatory pathway をブロックする CTLA4Ig 及び CD40Ig の遺伝子導入によりラット同種肝移植において、免疫寛容を誘導することが出来た。また、Cre/Loxp システムによって導入した遺伝子の発現をコントロールすることが可能であった。

A. 研究目的

臓器移植における現在の免疫抑制療法は宿主の免疫能を非特異的に抑制するものであり、感染症や悪性腫瘍の危険性の高まりを避けられない。移植免疫学の進歩に伴い拒絶反応のメカニズムの解明が進み、移植された臓器に対する反応のみを特異的に抑制する方法が理論的に可能と考えられるようになってきた。すなわち ICAM-1/LFA-1、CD28/B7、CD40/CD40ligand 系などの T 細胞の抗原認識に必要な costimulatory signal を抗接着分子抗体でブロックすることにより、抗原特異的な麻痺を誘導しようとする試みがなされ、一定の成果を上げている。

一方、特定の遺伝子をウイルスベクターなどを用いて臓器、組織に導入し機能を発現させたり形質を改変しようとするアプローチは先天性代謝異常、悪性腫瘍などの治療法として研究されており、臓器移植における免疫抑制法への応用が期待される。ベクターとしてはレトロウイルス、アデノウイルス、リポゾームなどが用いられているが、このなかでアデノウイルスベクターは非分裂細胞を含む幅広い細胞への遺伝子導入が可能であり、また遺伝子導入効率が高いな

どの点から広く用いられてきた。

本研究は、新規免疫抑制剤 FTY720 の有用性を検討すると共に、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入によって CD28/B7 系、あるいは CD40/CD40ligand 系をブロックし、ドナー特異的寛容誘導を図ろうとするものである。また、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入において Cre/loxP システムによる遺伝子産物の発現コントロールを試みた。

B. 研究方法

1) FTY720: ACI-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 を用いた遺伝子治療: それぞれの遺伝子をアデノウイルスベクター (AV) に組み込み、上記ラット肝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。

3) Cre 酵素を組み込んだ AxCre の働きにより CTLA4IgG の産生が停止する AxLCTL を作成し、cos7 細胞を用いた *in vitro* 及び B6 マウスを用いた *in vivo* で CTLA4IgG 発現をフローサイトメトリー、ELISA で検討した。

倫理面への配慮：本研究は北海道大学動物実験施設実験指針及び大学等における組換え DNA 実験指針（平成10年文部省）に沿って行われた。

C. 研究結果

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 の範囲で容量依存性にグラフト生着延長効果を示した。移植前後3日間の短期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。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生着期間が延長した。

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。発現期間は3~5週であった。肝移植では CTLA4Ig で 5×10^8 pfu 以上で、CD40Ig では 1×10^9 pfu で100日以上長期生着が得られ、免疫寛容の誘導が確認された。

3) AxLCTL は正常な CTLA4IgG を産生した。*in vivo* では AxLCTL 静注後2ヶ月以上血清 CTLA4IgG の発現を認め、*in vitro*、*in vivo* で AxCre 投与後 CTLA4IgG 産生は有意に減少した。

D. 考察

臨床臓器移植において移植後の成績は FK506 の開発により飛躍的な向上が見られた。しかしながら、また個々の薬剤の副作用が問題であり、また、感染症、悪性腫瘍の危険が解決されていない。FTY720 は広い投与量範囲において重篤な副作用がみられず、併用療法の1薬剤として臨床的有用性が期待される。一方、CTLA4Ig、CD40Ig は costimulatory signal を伝達する代表的な系である CD28/B7 系、CD40/cd40ligand 系をブロックする事により免疫学的寛容を誘導する事が可能と報告されている。本研究で、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入によって、血中での発現が認められ、さらに、移植肝の長期生着、ドナー特異的免疫寛容導入が得られたことは、本法の臨床応用の可能性を示す極めて有望な結果である。また、Cre/loxP システムにより CTLA4IgG 産生が有意に減少したことは、導入した遺伝子産物の発現の人為的なコントロールができることを示しており、臨床応用に向けて極めて有用と考えられる。ドナー特異的免疫寛容の導入、維持は、臓器移植における免疫抑制療法の最終目標であるが、本研究で得られた成果は臓器移植における遺伝子治療の有用性を強く示すものであり、近い将来の臨床応用へ向けて、大動物実験、新たなベクターの開発、制御システムの開発を精力的に行う予定である。

E. 結論

1) FTY720 は、単独で中等度の免疫抑制作用を有し、シクロスポリンやタクロリムスと相加効果を示した。また、induction 療法においても効果的であった。

2) アデノウイルスベクターを用いた CTLA4Ig 及び CD40Ig の遺伝子導入によりラット同種肝移植において、免疫寛容を誘導することが出来た。

3) Cre/Loxp システムによって導入した遺伝子の発現をコントロールすることが可能であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamashita K, Nomura M, Omura T, Takehara M, Suzuki T, Shimamura T, Kishida A, Furukawa H, Murakami M, Uede T, Todo S. Effect of a novel immunosuppressant, FTY720, on heart and liver transplantations in rats. Transplantation Proceedings. 31(1-2):1178-9, 1999.

2) Suzuki T, Shimamura T, Jin MB, Yokota R, Fukai M, Iida J, Taniguchi M, Magata S, Horiuchi H, Yamashita K, Nomura M, Omura T, Kishida A, Furukawa H, Todo S. Dose-dependent study of a novel immunosuppressant, FTY720, with the canine renal allograft transplantation model. Transplantation Proceedings. 31(1-2):1208-9, 1999.

3) Omura T, Suzuki T, Shimamura T, Jin MB, Yokota R, Fukai M, Iida J, Taniguchi M, Magata S, Horiuchi H, Yamashita K, Nomura M, Kishida A, Matsushita M, Furukawa H, Todo S. A short-course therapy with FTY720 prolongs allograft survival after canine kidney transplantation. Transplantation Proceedings. 31: 2783-2784, 1999.

4) 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, Todo S. Prolongation of canine liver allograft survival by a novel immunosuppressant, FTY720. Transplantation. 69: 1-7, 2000.

2. 学会発表

1) 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(福岡) 1999年3月26日

2) 野村克, 鈴木友巳, 真方紳一郎, 嶋村剛, 陳孟鳳, 横田良一, 谷口雅彦, 飯田潤一, 堀内彦之, 緒方賢司, 山下健一郎, 大村孝志, 岸田明博, 古川博之, 藤堂省. イヌ腎移植における FTY720 の Cyclosporin, FK506 との併用療法. 第99回日本外科学会(福岡) 1999年3月26日

3) 嶋村剛, 野村克, 山下健一郎, 大村孝志, 鈴木友巳, 横田良一, 真方紳一郎, 谷口雅彦, 飯田潤一, 堀内彦之, 緒方賢司, 陳孟鳳, 岸田明博, 古川博之, 藤堂省. FTY720 の移植前後短期投与における効果の検討. 第99回日本外科学会(福岡) 1999年3月26日

4) 鈴木友巳, 嶋村剛, 陳孟鳳, 横田良一, 深井原, 谷口雅彦, 飯田潤一, 真方紳一郎, 堀内彦之, 緒方賢司, 山下健一郎, 野村克, 大村孝志, 岸田明博, 古川博之, 藤堂省. イヌ腎移植における FTY720 単剤投与の効果. 第99回日本外科学会総会(福岡) 1999年3月26日

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, 鐘江裕美, 齊藤泉, 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(福岡) 1999年3月26日

6) 北河徳彦, 野村克, 大村孝志, 岸田明博, 古川博之, 藤堂省, 今井章介, 高田賢蔵. アデノウイルスベクターによる移植肝への viral IL-10 の導入と発現. 第99回日本外科学会総会(福岡)

1999年3月25日

7) 竹原めぐみ, 村上正晃, 野村克, 山下健一郎, 越前谷勇人, 柳田尚之, 小西勝人, 大村孝志, 岸田明博, 古川博之, 鐘江裕美, 齊藤泉, 上出利光, 藤堂省. Cre/loxP システムを用いた CTLA4IgG 発現アデノウイルスベクターの発現制御. 第35回日本移植学会総会 (筑波) 1999年9月16日

8) 小西勝人, 村上正晃, 野村克, 山下健一郎, 柳田尚之, 越前谷勇人, 竹原めぐみ, 大村孝志, 古川博之, 岸田明博, 藤堂省, 上出利光. CTLA4Ig 及び FTY720 の慢性拒絶反応の抑制効果. 第35回日本移植学会総会 (筑波) 1999年9月17日

9) 野村克, 竹原めぐみ, 山下健一郎, 越前谷勇人, 柳田尚之, 小西勝人, 大村孝志, 古川博之, 岸田明博, 村上正晃, 上出利光, 藤堂省. AdexCTLA4IgG を用いた遺伝子導入による免疫抑制法一適投与良の検討一. 第35回日本移植学会総会 (筑波) 1999年9月17日

10) 鈴木友己, 陳孟鳳, 谷口雅彦, 眞方紳一郎, 益子博幸, 石川博人, 堀内彦之, 飯田潤一, 横田良一, 嶋村剛, 大村孝志, 岸田明博, 古川博之, 藤堂省. イヌ腎、肝移植における Cyclosporin 及び FK506 に対する FTY720 の併用剤としての効果. 第35回日本移植学会総会 (筑波)

1999年9月17日

11) 鈴木友己, 谷口雅彦, 陳孟鳳, 嶋村剛, 眞方紳一郎, 堀内彦之, 緒方賢司, 石川博人, 飯田潤一, 横田良一, 益子博幸, 大村孝志, 岸田明博, 古川博之, 藤堂省. イヌ腎、肝移植モデルにおける FTY720 の免疫抑制効果. 第35回日本移植学会総会 (筑波) 1999年9月17日

12) Omura T, Suzuki T, Shimamura T, Yamashita K, Nomura M, Kishida A, Matsushita M, Furukawa H, Todo S. Effect of FTY720 peri-operative

administration in canine kidney transplantation. 7th Alexis Carrel Conference. (October 20-23, 1998. Kyoto, Japan)

13) Furukawa H, Suzuki T, Jin MB, Taniguchi M, Magata S, Masuko H, Ishikawa H, Shimamura T, Yamashita K, Nomura M, Omura T, Kishida A, Todo S. Canine orthotopic liver transplantation treated with a novel immunosuppressant, FTY720, and subtherapeutic doses of conventional drugs. 25th Annual Meeting of the American Society of Transplant Surgeons. (May 19-21, 1999. Chicago, USA)

14) Konishi K, Murakami M, Yamada A, Takiguchi M, Morikawa M, Omura T, Todo S, Uede T. Combination of CTLA4IgG and FTY720 suppresses development of obliterative bronchiolitis and respiratory epithelial injury in a murine heterotopic airway model. 25th Annual Meeting of the American Society of Transplant Surgeons. (May 19-21, 1999. Chicago, USA)

15) Suzuki T, Shimamura T, Jin MB, Taniguchi M, Magata S, Yamashita K, Omura T, Kishida A, Furukawa H, Todo S. Effect of a novel immunosuppressant, FTY720, on canine renal allograft. 25th Annual Meeting of the American Society of Transplant Surgeons. (May 19-21, 1999. Chicago, USA)

16) Yamashita K, Nomura M, Takehara M, Omura T, Yanagida N, Suzuki T, Shimamura T, Kishida A, Furukawa H, Todo S. Effects of novel immunosuppressant, FTY720, on heart and liver transplantation. 18th Annual Meeting of the American Society of Transplantation. (May 15-19, 1999.

Chicago, USA)

17) Kishida A. FTY720 in experimental transplantation. Annual Meeting of the Australia and New Zealand Transplantation Society. (April 14, 1999. Canberra, Australia)

7. 知的所有権の取得状況

特許取得、実用新案登録

なし

分担研究報告

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

分担研究者 田中紘一 京都大学医学部移植外科教授

研究協力者 猪股裕紀洋 京都大学医学部移植外科助教授

研究協力者 上本伸二 京都大学医学部臓器移植診療部助教授

研究要旨

当施設では、様々な理由により、生体肝移植後に免疫抑制剤を完全に離脱した症例が相当数存在する。これら症例の免疫寛容の機構を解明するため、リンパ球混合反応試験 (mixed lymphocyte reaction, MLR) による対ドナーへの反応性、real-time RT-PCR による肝組織内サイトカインの定量を試みた。離脱症例においては、対ドナー特異的低反応となっており、肝組織内のサイトカインは未移植の正常肝と同様のパターンを示していた。今後症例を集積することにより、免疫寛容導入のためのさらなる糸口が解明されることが期待される。

A.研究目的

当施設では、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、いわゆる非計画的離脱症例が相当数存在する。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・中止のプロトコルを確立し、現在6例の計画的離脱例を経験している。これらの症例における免疫機構を解明することは、移植医療の最終目標の一つである免疫寛容導入の足掛かりとして重要である。

B.研究方法

対象：生体肝移植後の経過中、FK506の減量・離脱を試みた62例（非計画的減量・離脱症例37例、計画的減量・離脱症例25例）

方法：1) 減量方法としては、計画的減量症例については・移植後2年以上経過・肝機能正常で安定・過去1年以内に拒絶なし、の条件を満たす症例に対し、1日2回投与→1回/1日→4回/1週→

3回/1週→2回/1週→1回/1週→

2回/1月→1回/1月とそれぞれ3～6ヶ月の間隔で段階的に減量し、最終的に中止することとした。合併症を契機に減量を試みた症例に関しては、それぞれの臨床経過により投与量を調節した。特にPTLDのような即生命を左右する合併症に対しては、即刻中止することとした。

2) 臨床経過の検討及び、完全離脱症例と、減量・離脱開始後拒絶を生じた症例との間の、各種パラメータの比較・検討 (ABO血液型適合性、HLA適合性、ステロイド離脱時期)

3) 離脱症例における、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およびELISAによる培養上清中のサイトカイン検出

4) 離脱症例における、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

尚、3) 4) における検体採取 (血液、肝組織) に関しては、利益 (社会的貢献、将来的な医療費削減の可能性等)、不利益 (針生検による合併症等) を十分に説明し、文書化している。