

20000429

平成12年度

厚生科学研究費補助金

「ヒトゲノム・再生医療等研究事業」

研究報告書

平成12年度「ヒトゲノム・再生医療等研究事業」研究報告

【磯部班】安全な移植技術の確立に関する研究

総括研究報告	主任研究者 磯部光章	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科器官システム制御学教授	1
分担研究報告			
1. 転写因子、補助シグナルの制御による心拒絶反応の制御	磯部光章	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科器官システム制御学教授	5
2. HGFによる移植臓器の障害防止	中村敏一	大阪大学大学院医学系研究科バネリアイカ教育研究センター分子細胞生物・再生医学教授	9
3. 新規免疫抑制剤と遺伝子導入による拒絶反応の制御に関する研究	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長	14
4. 虚血耐性獲得を応用した移植心臓の機能向上ー長時間保存心におけるNF- κ B decoy導入の有用性に関する研究ー	澤 芳樹	大阪大学大学院医学系研究科機能制御外科講師	19
5. 可溶性補助シグナル分子を用いた拒絶反応制御による移植臓器の長期生着法の検討	上出利光	北海道大学遺伝子病制御研究所病因研究部門分子免疫分野教授	24
6. 遺伝子導入による拒絶反応抑制と移植臓器の機能制御に関する研究	金田安史	大阪大学大学院医学系研究科分子治療学部門遺伝子治療教授	33
7. 膵島移植における拒絶反応機構の解析とその回避に関する研究	井上一知	京都大学再生医科学研究科器官形成応用講座教授	37
8. NK T細胞移入による移植免疫制御	中山俊憲	千葉大学大学院医学研究科免疫学助教授	44

平成12年度ヒトゲノム・再生医療等研究事業

プロジェクトリーダー 野本 隼久雄

(日本移植学会理事専長・(社)日本臓器移植ネットワーク副理事長)

安全な移植技術の確立に関する研究 (H12-再生-016)

主任研究者 磯部 光章

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 器官システム制御学系 呼吸循環病学講座 助教授)

- 転写因子、補助シグナルの制御による心拒絶反応の抑制
磯部光章(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 器官システム制御学系 呼吸循環病学講座 助教授)
- HGFによる移植臓器の障害防止
中村敏一(大阪大学大学院医学系研究科 バイオゲノム教育研究センター 分子細胞生物・再生医学 教授)
- 新規免疫抑制剤と遺伝子導入による拒絶反応の制御
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)
- 虚血耐性獲得を応用した移植心臓の機能向上
澤 芳樹(大阪大学大学院医学系研究科機能制御外科 講師)
- 可溶性補助シグナル分子を用いた拒絶反応制御による移植臓器長期生存法の検討
上出利光(北海道大学免疫科学研究所 免疫病態部門 教授)
- 遺伝子導入による拒絶反応抑制と移植臓器の機能制御
安田安史(大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 教授)
- 脾臓移植における拒絶反応機構の解析とその回避
井上一知(京都大学再生医学研究所 器官形成応用講座 教授)
- NKT細胞移植による移植免疫制御
中山俊憲(千葉大学大学院医学研究科免疫学 助教授)

臓器移植の成績向上と開発に関する研究 (H12-再生-017)

主任研究者 深尾 立

(筑波大学臨床医学系附属病院院長・外科教授)

- 手術式及び围術期管理の研究
深尾 立(筑波大学臨床医学系 外科免疫学 教授)
- 献腎移植における移植可能限界に関する研究
長尾 恒(東京歯科大学八王子医療センター 第5外科 教授)
- 臓器移植長期成績向上に関する研究
田中敏一(京都大学大学院医学研究科移植免疫医学 教授)
- 臓器移植長期予後に及ぼす組織適合性の意義
柏原英彦(国立佐倉病院副院長)
- 臓器移植新領域開発に関する研究
藤堂 省(北海道大学大学院医学研究科移植外科 教授)

臓器移植の社会基盤に向けての研究 (H12-再生-018)

主任研究者 大島 伸一

(名古屋大学医学部泌尿器科 教授)

- 病院開発モデル作成
大島伸一(名古屋大学医学部泌尿器科 教授)
- 腎バンクの病院開発における役割
澤 宏紀(国立健康・栄養研究所 所長)
- 臓器提供施設の意識調査及び臓器提供施設へのアンケート調査
太田宗夫(大阪府立千里救命救命センター 所長)
- コーディネーターの教育プログラムに関する研究
小中節子(日本臓器移植ネットワーク 移植コーディネーター)
- 臓器移植におけるレジピエント登録に関する研究
藤原研司(埼玉医科大学第三内科 教授)
- ドナー家族の心理的ケアに関する文献的研究
堀川直史(東京女子医科大学精神科 教授)
- 臓器の配分ルール(地域別、全国その他)等の国際比較
篠崎尚史(東京医科大学市川総合病院角隈センター センター長)
- 臓器移植に関する救急医の態度、役割、義務に関する国際比較
大和田隆(北里大学医学部救急医学 教授)

安全な移植技術の確立に 関する研究

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

安全な移植技術の開発に関する研究

主任研究者 磯部 光章 東京医科歯科大学循環制御学 教授

研究要旨 慢性拒絶反応の予防、免疫寛容の導入、臓器虚血耐性の獲得、細胞移植、及びそれを可能とする遺伝子導入技術の開発について基礎的検討を行った。基礎実験のレベルを中心に検討を行い、小動物での効果等について期待通りの成果が得られた。次年度以降は、この成果をさらに発展させて、一部は大動物での実験に進む予定である。慢性拒絶については、細胞周期調節遺伝子の制御およびHGFの補充療法の有効性が示された。免疫寛容については、T細胞の活性化に関わるICOS、HVEM、CTLA4に対するIgとの融合蛋白を作成して今後の実験に供することを可能とした。NFκBの抑制が移植心の虚血耐性を飛躍的に向上させることを確認した。NKT細胞の移入により膵島細胞の拒絶が軽減することを確認した。また免疫隔離膜を利用した膵島移植治療を開発し、糖尿病動物の血糖値の長期正常化に有効であることを確認した。この成果を踏まえて今後臨床応用を目指して、大動物での実験などを進める予定である。

研究組織

分担研究者

磯部 光章 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科循環制御学 教授
中村 敏一 大阪大学大学院バイオメディカル教育研究センター分子細胞生物学・再生医学 教授
鈴木 盛一 国立小児医療病院小児医療研究センター実験外科生体工学部 部長
澤 芳樹 大阪大学大学院医学系研究科機能制御外科 講師
上出 利光 北海道大学遺伝子病制御研究所免疫学 教授
金田 安史 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学領域 教授
井上 一知 京都大学再生医科学研究所器官形成応用講座 教授
中山 俊憲 千葉大学大学院医学研究院免疫発生学 教授

ルシニューリンフリーの免疫抑制剤の臨床応用、T細胞活性化副刺激を抑制する遺伝子導入の臨床応用を目指す。また、慢性拒絶反応の発症に関する要因を明らかにし、予防法を確立する。具体的には、細胞周期調節遺伝子や転写調節因子に対するデコイ遺伝子導入、HGF遺伝子導入の効果を動物の実験で確認し臨床応用を目指す。さらに画期的な遺伝子工学的手法の開発と移植医療への応用技術を確立する。HVJリボソームの特性を生かし、移植臓器への使用に適した形への改良を加え、安全性と効率の検討を行った上で遺伝子療法に供す。また、臓器移植を再生医療の一環として捉える立場から、拒絶反応を伴う組織移植において、免疫回避を可能とする画期的技術の開発を行い、臨床応用へ直結する成果をあげ、再生医療への発展に寄与する。NKT細胞移植による寛容誘導、免疫隔離システムによる免疫回避技術を確立して膵島移植での安全性と効果を検討した上で、臨床応用を目指す。

A. 研究目的

世界をリードする画期的な移植医療技術を生み出し、現在の移植医療がもつ医学的問題点を解決することにより、臓器移植の成績を向上させることを主目的とする。まず急性拒絶反応を予防するために、より緩和で確実な免疫抑制療法を確立し、さらには免疫寛容を誘導する技術を開発する。具体的には力

B. 研究方法

磯部らは天野らと協同して心移植のモデルを用いて、移植心へのE2FやNFκBなどに対するデコイ遺伝子やegr-1アンチセンス導入を行い、急性および慢性拒絶への効果を検討した。またミニブタで移植を行い、6ヶ月の観察期間でE2Fデコイの効果と遺伝子の導入効率と安全性の検討を行う。伊藤らと協同してアデノウイルスを用いた心臓への遺伝子導入に関する検討を行う。また場集田らと協同して、サ

ルを用いた寛容誘導実験を行う。レシピエントのT細胞と放射線照射したドナーの脾細胞を抗CD80/CD86抗体、抗CD154抗体の存在下に2週間培養し、サイクロフォスファミドで前処置したレシピエントに培養リンパ球を戻し、移植腎への寛容誘導を検討する。

中村はラット腎移植モデルで、レシピエントの大腿筋にHGFを強発現させ遺伝子の効果を腎機能検査と病理組織学的評価によって経時的に調べる。虚血再灌流障害についてはアポトーシスに注目して評価を行う。免疫寛容の誘導については免疫細胞の浸潤度を調べるとともに、慢性拒絶反応に対する効果を検討する。小動物の成果を元に大動物の系で検討を行う。

鈴木らはFTY720ならびに抗ICOS抗体の免疫抑制効果、寛容誘導能をラットで確認する。Nef、RCAS1等のラット肝臓での遺伝子の導入を進める。アデノウイルスベクターを用い、より安全な遺伝子導入を目指して、摘出臓器での導入法を確立する。また死体臓器移植を想定した研究では、臓器摘出直前のドナーへの投与により目的臓器に発現させる手技を開発する。

澤らはNF κ B デコイ導入保存心における心機能保持を検討する目的で心機能の検討を行う。さらにブタ心臓を心筋保護液注入後に摘出し、後冠静脈洞に挿入したカテーテルよりNF κ B デコイを投与する。10時間保存後、同所移植する。再灌流後、経時的にCPK-MBと心機能を評価する。

上出らは免疫寛容導入法を確立するため、補助シグナルの阻害分子、即ちCTLA4IgG、CD40IgG、ICOSIgG、HVEM Igを作成して、ウイルスベクターにこれらの遺伝子を組み込みin vivoおよび ex vivoで遺伝子導入を行う。小腸、肝臓、ラ島、気管支（慢性拒絶）移植への効果を検討する。可溶性補助シグナル分子による単独療法、およびそれらの併用療法、さらにFTY720など他の免疫抑制剤との併用を検討する。急性拒絶への寛容誘導能および慢性拒絶に対する有効性を確認し、さらにビーグル犬を用いた検討を行う。

金田らはHVJベクターを移植臓器に使用するために必要な改良を加える。細胞表面抗原に対する抗体を付加させた標的融合ベクター、カテーテルなどのデバイス、EB virusのoriPとEBNA-1を用いてエピソームに遺伝子を維持し必要に応じて発現を誘発する系、などである。これらの系を用いて、HSP70やHGFの遺伝子導入を移植心臓、腎臓の系で行う。臨床応用に必要な凍結保存、凍結乾燥品を作成する。ベクターの供与を通じて磯部ら、中村ら

の大動物実験を共同して行う。

井上らは砂村と共同して、既に開発した免疫隔離システムを用いて糖尿病ラットでの血管新生誘導を確認し、前臨床段階モデルとしての脾全摘出作製糖尿病犬を用いて、免疫隔離デバイスによる腹腔内及び皮下への同種移植を施行して長期生着を目指す。ヒト型インスリン分泌細胞株の樹立して、脾全摘犬への移植に供す。

中山らは岸原と協同して研究を行う。NKT細胞の産生する抑制性のサイトカインを同定して、マウスの脾臓組織移植系を用い、細胞移入実験により免疫寛容を再現する。またNKT細胞のないマウスに正常NKT細胞を移入することで寛容誘導に必要な移入条件を確立する。ヒトのNKT細胞の細胞移入の条件などを検討する。

（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) 慢性拒絶の病態と予防：マウス移植心を用いた実験モデルでドナー臓器への遺伝子導入による慢性拒絶反応予防効果について検討した。細胞周期調節遺伝子のPCNAに対するアンチセンス遺伝子、その転写因子であるE2F、炎症の発症に関わるNF κ Bに対するデコイ遺伝子の導入、血管平滑筋細胞の増殖に関わるegr-1、抗アポトーシス因子のbcl-Xに対するアンチセンス遺伝子をHVJ-リポソーム法で移植心に導入したところ、いずれも冠動脈の新生内膜の増生が予防された。サル移植心に対するE2Fデコイ遺伝子も同様に冠動脈硬化の予防に有効であり、かつ遺伝子産物の全身播種を認めなかった。（磯部、天野）。

(2) 免疫寛容の導入：カニクイサル間で腎臓移植を行う。リンパ球をCD80/CD86抗体を添加し混合培養する。誘導された低応答性のリンパ球をレシピエントに移入した。一例は移植後70日目、もう一例は移植後40日目で共に生存中である。血清クレアチニンも共に2 mg/dl以下で安定している。移植後ドナーの抗原特異的に反応性が低下していることが確かめられた（磯部、場集田）。CTLA4IgG、CD40IgG、ICOSIgG、HVEVIgG等の可溶性補助シグナル分子を大量に作成する系を構築した。CD40IgGは樹状細胞をもちいた donor-specific transfusionと併用することによりラット移植腎の

長期生着を得ることができた。CTLA4IgGとCD40IgGを組み込み遺伝子治療用ベクターを併用することにより、移植したラット四肢移植片の長期生着を得た。CTLA4IgGを組み込み遺伝子治療用ベクターをもちいることによりマウスラ氏島移植に対する拒絶反応を抑制し、移植片の長期生着を得ることができた(上出)。抗ラットICOS抗体の免疫抑制効果をラット肝臓移植のモデルで検討した。抗ICOS抗体はin vitroのリンパ球反応を抑制するとともに、肝臓移植において著明な生着延長効果を発揮した(鈴木)。donor-specific transfusionによる皮膚移植片に対する免疫寛容の誘導において、ドナー側のFasLの発現とレシピエント側のFasの発現が必須であること、B細胞上に発現するFasLがとくに重要であることを明らかにした(中山、岸原)。

(3) 虚血耐性の増強と移植組織保護：心冠動脈結紮ラットモデルでHGFのリコンビナント蛋白を補充した結果、心筋アポトーシスが抑制され、梗塞巣の抑制と心機能の改善が見られた(澤、中村)。移植後の腎虚血再灌流傷害の発症はHGFの投与によって抑制され、腎臓移植片は免疫抑制剤を投与しなくても36週間以上生着し、良好に機能し続けた(中村)。

(4) 細胞移植：膵島細胞カプセル化による免疫隔離膜を利用した膵島移植治療を開発し、糖尿病動物の血糖値の長期正常化に有効であることを確認した。またアガローススペースの三層チューブにラット膵島を封入し、糖尿病マウスの皮下に移植したところ、移植に先立ち移植部位に血管誘導処理をした場合に生着期間の大幅な延長が認められた(井上)。NKT細胞ノックアウトマウスを用いた移植実験でゼノ及びアロのラ氏島の免疫寛容の維持(慢性拒絶の回避)には、NKT細胞の存在が必須であることが分かった(中山)。

(5) 移植に用いる遺伝子導入ベクターの開発：HVJ-liposomeベクターの改良により、標的臓器への遺伝子導入の検討を行った。腎臓メサンジウム特異的抗体を結合させる融合リポソームことにより、腎臓への標的導入が可能であった。Epstein-Barr virusのoriPを治療用遺伝子に付加し、EBNA-1の強発現プラスミドと共導入する系により、染色体外に遺伝子を維持し必要に応じて発現を誘発する系を開発した。RNAを用い、その発現を高めるために、合成RNAを細胞内に導入しSFVのRNA replicaseを用いてRNAを増幅できる系を開発した(金田)。リンパ球への遺伝子治療を行うためにアデノウイルスレセプターの遺伝子導入マウスを樹立した(中山)。

D. 考察

3年間の研究計画はヒトでの移植技術の質的向上に結びつく画期的成果をあげ、臨床応用に結びつけることにある。本年度はその初年度に当たり、各領域で一定の成果をあげたと言える。計画は慢性拒絶、免疫寛容、虚血耐性、膵島細胞移植の四領域とその基盤技術である遺伝子導入法の開発を設定して行われている。

慢性拒絶反応の予防については、HGFの効果が小動物で確認されており、精製蛋白による補充療法の道が開かれたと言える。細胞周期調節遺伝子の抑制を目指す遺伝子治療も小動物から大動物実験に至る過程にあり、次年度以降につながる成果が得られた。免疫寛容については、副刺激の抑制による寛容誘導の臨床応用が期待されているが、本年度では小動物レベルでの効果を確認すべく必要な導入ベクターと遺伝子産物の作成に成功している。今後これらを実験に供することで、臨床応用に結びつく成果をあげうる可能性が生じたと言えよう。特にこの領域は世界的に研究が行われ、競争の激しい分野であるが、本研究班における成果はその最先端をいくものである。遺伝子導入ベクターの開発においても大きな成果が得られている。臓器に親和性を持つベクターは移植のみならず、多領域で必要とされる基盤技術であり、今後様々な遺伝子治療に用いられる可能性をもつ技術が本研究班で開発されている。安全で確実性の高い膵島細胞移植を目指す、免疫隔離膜の開発、NKT細胞の活用についても、臨床応用に向けて小動物レベルで着実な成果が得られており、今後大動物での実験、安全性の確認等の過程を経て活用をしていくことが可能な状況となっている。

E. 結論

慢性拒絶、免疫寛容、虚血耐性、膵島細胞移植の各領域で実験が進められた。3年計画の初年度として期待された成果をあげたと考えられる。次年度以降、所期の目的を達成するためにさらに実験を重ね、画期的な移植技術の開発を目指す必要がある。

F. 研究発表

- 1) Kawauchi M, Amano J, Kaneda Y, Isobe M, et al: Gene therapy for attenuating cardiac allograft arteriopathy using ex vivo E2F decoy transfection by HVJ-AVE-liposome method in mice and nonhuman primates. *Circ Res*, 87; 1063-1068, 2000
- 2) Nakamura T, Sawa Y, et al: Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury

- by endogenous and exogenous HGF. J Clin Invest 106: 1511-1519, 2000
- 3) Ikehara Y, Nakayama T, et al: CD4+ Va14 NKT cells are essential for acceptance of intrahepatic rat islet xenografts in mice treated with anti-CD4 antibody. J Clin Invest 105:1761-1767, 2000
 - 4) Yamashita M, Nakayama T, et al: TCR-induced calcineurin activation regulates Th2 cell development by modifying the IL-4 receptor signaling complex. J Exp Med 191:1869-1879, 2000
 - 5) Li X-K, Suzuki S, et al: Fulminant Hepatitis by Fas-Ligand Expression in MRL-lpr/lpr Mice Grafted with Fas-Positive Livers and Wild-Type Mice with Fas-Mutant Livers. Transplantation (in press)
 - 6) Takahashi T, Uede T, et al: Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing CTLA-4. J Exp Med. 17;192:303-10. 2000
 - 7) Nagata N, Inoue K, et al: Evaluation of Insulin Secretion of Isolated Rat Islets Cultured in Extracellular Matrix. Cell transplantation (in press)
 - 8) Takehara M, Uede T, et al: Long-term acceptance of allografts by in vivo gene transfer of regulatable adenovirus vector containing CTLA4IgG and Lox P. Hum Gene ther. In press

7. 知的所有権の出願・取得状況

- 1) 岩田博夫、井上一知、筏 義人；生体内に毛細血管が豊富な組織を作成するのに用いる新生血管床形成用具。特許第3080299；特許権者：京都府京都市左京区吉田本町36の1番地 京都大学長
- 2) 他に2件申請中

分担研究報告

転写因子、補助シグナルの制御による心拒絶反応の制御

主任研究者	磯部 光章	東京医科歯科大学循環器内科 教授
研究協力者	天野 純	信州大学医学部第二外科 教授
研究協力者	伊藤 宏	東京医科歯科大学循環器内科 助手
研究協力者	場集田 寿	順天堂大学医学部免疫 助手

研究要旨 心移植における冠動脈硬化は慢性拒絶と言われ、臨床的に深刻な問題となっている。血管内膜の新生に関わる転写因子に着目してその制御による遺伝子治療を検討した。マウス移植心に手術時にE2Fデコイ、NF κ Bデコイ遺伝子を導入すると、28日目の移植心では慢性拒絶が著明に抑制されていた。egr-1に対するアンチセンス遺伝子の導入でも同様の効果を認められた。この方法は移植時の遺伝子導入を行うため、レシピエントの負担も軽く、遺伝子治療に伴う問題点を回避できるものと考えられる。今後大動物での実験で安全性と効果に関する検討を行う必要がある。

A. 研究目的

心移植において慢性拒絶とされる冠動脈硬化は、現在患者の予後を最も強く規定する合併症である。血管平滑筋の増殖による内膜の肥厚が主な所見であるが、その進展機序や免疫機構については不明な点が多い。臨床的な重要性が高く、病態と治療法の解明が急務とされる。本研究の目的は、

①本冠動脈硬化におけるサイトカイン、接着分子、増殖因子、細胞周期調節遺伝子等の転写発現の解析を行うこと、②小動物（マウス）において転写因子を標的とした遺伝子治療の可能性を検討すること③大動物における遺伝子治療の基礎データを収集すること、にある。

これらの知見をもとに、臨床応用可能な遺伝子治療のプロトコールを作成する。本研究は研究協力者天野、伊藤と共同して行う。本年度は特に細胞レベル、小動物レベルでの検討を行う。

平滑筋細胞のフェノタイプ変換に関わる主要な転写因子であるEarly Growth Response Factor 1 (Egr-1) 遺伝子、およびE2F、さらに炎症に関わる転写因子であるNF κ Bの病態に果たす役割を遺伝子学的手法を用いて検討し、Egr-1アンチセンスオリゴヌクレオチド、E2Fデコイ、NF κ Bデコイの効果を確認し、臨床応用へ向けた基礎データを得る。ミニプタを用いた実験に関する基礎的な検討も行う。また、アデノウィルスベクターの移植心筋への導入などの遺伝子導入に関する基礎的研究も行う。

さらに、マウスを用いた系でレシピエントのリン

パ球をドナーの抗原と共に抗CD80/CD86抗体の存在下に一週間培養した細胞をホストに戻すことにより、免疫寛容状態が誘導することを見出している。この寛容の機序解明とサルでの腎移植実験で、その効果を検討する。

B. 研究方法

マウス心移植と慢性拒絶の作製とその病理学的検索、免疫寛容の作製、免疫染色、遺伝子発現の検索、HVJ-liposome法による移植心への遺伝子導入、大動物を用いた同所性および異所性心移植とその拒絶反応の解析、等は、信州大学と東京医科歯科大学の設備とスタッフで施行する。このことを踏まえて本年度は以下の実験を行う。

① これまでの遺伝子導入実験でHVJ-liposome法でマウス移植心臓への導入効果とantisense CDK2kinaseの有効性を示してきたが、この実験モデルを用いて、E2Fに対する「おとり遺伝子（デコイ）」またはNF κ Bに対するデコイ遺伝子を移植心に導入する。30日目の動脈硬化所見を検討する。同時に、各種サイトカイン、接着分子、増殖因子などの発現を検討する。

②マウス心移植の系を用い、ex vivoでHVJ-リポソーム法を用いEgr-1アンチセンスオリゴを導入する。冠動脈硬化症の進展の組織学的検討で評価する。

③ ミニプタ移植心への遺伝子導入の予備実験を行う。ミニプタで移植を行い、サイクロスポリンにより免疫抑制を行い、6ヶ月の観察期間で慢性拒絶反

応の出現するモデルを確立する。

④ 移植心への遺伝子導入の基礎データを得る目的で、細胞周期の制御因子を核へ移行させるトランスポータ遺伝子を心筋細胞にアデノウィルスを用いて導入する。ラットなどの小動物で基礎実験を行う。

⑤ マウス及びサルを用いた抑制T細胞移入による寛容誘導実験を行う。レシピエントのT細胞と放射線照射したドナーの脾細胞を抗CD80/CD86抗体、抗CD154抗体の存在下に2週間培養し、サイクロフォスファミドで前処置したレシピエントに培養リンパ球を戻し、移植腎への寛容誘導を検討する。マウスでの基礎データを得て、サルの腎移植モデルで検討する。

(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 デコイ遺伝子導入

E2Fデコイ遺伝子及びNF κ Bデコイ導入によりマウス移植心の冠動脈内膜肥厚が著明に抑制された。表1および表2に結果を示す。E2Fデコイの効果既に報告したとおりであるが、cdk2kinaseに対するアンチセンスODNの導入では48日目に内膜肥厚が進展するのに対して、E2Fデコイ遺伝子は48日目の肥厚も有意に抑制されていた。また内膜肥厚が抑制されていた、デコイ遺伝子導入マウス移植心の冠動脈ではICAM-1、VCAM-1などの接着分子、増殖因子であるPDGF、細胞周期調節遺伝子のcdk2kinaseなどの発現も著明に抑制されていた。

② アンチセンスegr-1遺伝子導入

egr-1は慢性拒絶心の冠動脈内膜で発現増強が見られた。egr-1に対するアンチセンス遺伝子導入では

28日目に対照群に比して新生内膜が有意に減少していた。

③ ミニブタの移植心実験系

家ブタを用いて心移植の手技と慢性実験モデルを確立した。現在さらにミニブタを用いて、長期的にサイクロスポリンの投与で急性拒絶の回避によって、慢性拒絶が出現するか否かの検討を行っている。

④ 遺伝子導入

細胞周期の制御因子のサイクリンD1遺伝子にトランスポータシグナル遺伝子を組み合わせたアデノウィルスベクターを作製し、培養心筋細胞に導入した。その結果、サイクリンD1単独導入を行った場合に比べ明らかな同遺伝子の核内移行が認められた。さらにそれらの細胞で心筋細胞の増殖が認められた。

⑤ 抑制性T細胞

カニクイサル間で腎臓移植を行う。リンパ球をCD80/CD86抗体を添加し混合培養する。誘導された低応答性のリンパ球をレシピエントに移入した。一例は移植後70日目、もう一例は移植後40日目と共に生存中である。血清クレアチニンも共に2mg/dl以下で安定している。移植後ドナーの抗原特異的に反応性が低下していることが確かめられた

D. 考察

慢性拒絶の予防についてこれまで得られた結果と今回の検討結果をまとめると、細胞周期調節遺伝子のPCNAに対するアンチセンス遺伝子、その転写因子であるE2F、炎症の発症に関わるNF κ Bに対するデコイ遺伝子の導入、血管平滑筋細胞の増殖に関わるegr-1、抗アポトーシス因子のbcl-Xに対するアンチセンス遺伝子をHVJ-リポソーム法で移植心に導入により、いずれも冠動脈の新生内膜の増生が予防されることが明らかになった。サルの移植心に対するE2Fデコイ遺伝子も同様に冠動脈硬化の予防に有効であり、かつ遺伝子産物の全身播種がないこと



図 NF κ Bデコイ遺伝子導入の効果 (28日目の冠動脈病理所見、HE染色)

- 1 デコイ遺伝子非導入マウス移植心の冠動脈
- 2 スクランブルデコイ遺伝子導入マウス移植心
- 3 NF κ Bデコイ遺伝子導入マウス

Table I Pathological Findings of Murine Allografts.

Group	Days after Transplant	No. of Grafts	No. of Arteries	Luminal Occlusion (%)	---Immunohistochemistry ---			----- in situ RT-PCR -----		Myocardial Rejection
					ICAM-1	VCAM-1	PDGF-B	cdk2	cdc2	
No ODN	28	4	24	60.0 ± 22.8	2.3 ± 0.8	1.8 ± 0.4	1.6 ± 1.0	1.7 ± 1.0	1.7 ± 0.9	1.5 ± 0.5
AS cdk2 ODN	28	4	24	*25.4 ± 16.9	*1.2 ± 0.6	*1.2 ± 0.4	*1.0 ± 0.6	*1.2 ± 0.7	*1.2 ± 0.7	1.5 ± 0.4
E2F decoy	28	4	24	*15.0 ± 9.3	*0.7 ± 0.5	*1.0 ± 0.2	*1.0 ± 0.6	*1.0 ± 1.0	*1.1 ± 0.7	1.2 ± 0.5
No ODN	56	8	48	79.8 ± 19.2	0.7 ± 0.7	1.9 ± 0.3	2.4 ± 1.0	2.4 ± 1.0	2.2 ± 0.9	2.5 ± 0.6
AS cdk2 ODN	56	8	48	*50.6 ± 31.5	*1.8 ± 1.0	*1.5 ± 0.5	*1.6 ± 0.7	*1.8 ± 0.7	*1.8 ± 0.7	2.1 ± 0.6
E2F decoy	56	8	48	*15.4 ± 17.3	*0.9 ± 0.5	*1.0 ± 0.2	*1.0 ± 0.8	*1.0 ± 1.0	*1.2 ± 0.7	2.3 ± 0.5

*P < 0.01 vs. No ODN group, #P < 0.01 between AS cdk2 ODN and E2F decoy group of the same post transplantation days.

Table II Degree of intimal thickening and expression scores in the allograft arteries.

Treatment of Allograft	No. of Grafts	No. of Arteries	Intimal Thickening	----- Immunohistochemistry -----			----- In situ RT-PCR -----		
				ICAM-1	VCAM-1	NFκB	PDGF-B	cdk2 kinase	cdc2 kinase
No ODN	8	24	60.0 ± 22.8	2.3 ± 0.8	1.8 ± 0.4	2.2 ± 1.1	2.3 ± 0.8	2.3 ± 0.8	2.3 ± 0.8
Scrambled Decoy	8	24	50.6 ± 31.8	2.2 ± 0.8	1.8 ± 0.4	2.0 ± 1.0	2.2 ± 0.8	2.0 ± 0.9	2.0 ± 0.8
NFκB Decoy	8	24	*20.8 ± 17.5	*0.7 ± 0.8	*1.2 ± 0.4	*0.3 ± 0.8	*1.2 ± 0.4	*1.2 ± 0.4	*1.2 ± 0.4

*P < 0.05 vs. NFκB decoy group

を確認している。この結果を踏まえて臨床応用を目指して、さらにミニプタによる実験を行う。問題点としては、遺伝子療法の安全性に加えて、移植時にドナー心に一回行う遺伝子治療で長期にわたる効果が得られるかという点が挙げられる。今後の検討が必要である。

心筋細胞への遺伝子導入についての検討では、心筋細胞が増殖をしない原因として同細胞において細胞周期制御因子の核内移行が何らかの理由で阻害されていることが示唆された。またトランスポートシグナル遺伝子を用いることにより、非分裂細胞である心筋細胞を増殖に導くことが出来る可能性が示された。現在ラットを用いたin vivo 実験が進行中である。

抑制性T細胞の寛容誘導能に関する結果は興味深いものであるが、なお少数例に留まっており、今後さらに数を加え、かつその機序抑制性T細胞の本態、機能についての詳細な検討を行う必要がある。

E. 結論

3年計画の初年度として心慢性拒絶反応における諸転写因子の役割の解明を行ってきた。egr-1、E2Fなどの細胞周期調節遺伝子や炎症に関わるNF κ Bなどが重要な働きをしており、その抑制が慢性拒絶の予防につながる可能性が示された。今後の臨床応用への道が開かれたと考える。さらなる基礎的検討と大動物における実験が期待される。

F. 研究発表

- 1) Suzuki J, Isobe M, Kawauchi M, Endoh M, Amano J, Takamoto S: Altered expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in acutely rejected myocardium and coronary arteriosclerosis in cardiac allografts of nonhuman primates. *Transplant Immunol*, 13: 106-113, 2000
- 2) 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
- 3) Isobe M, Suzuki J, Morishita R, Kaneda Y, Amano J: Gene Therapy for Heart Transplantation-associated Coronary Arteriosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 902 :

77-83, 2000

- 4) Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Nishikawa T, Amano J, Kaneda Y: Prevention of cardiac allograft arteriosclerosis using antisense proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotide. *Transplantation*, 70: 398-400, 2000.
- 5) Kawauchi M, Suzuki J, Morishita R, Wada Y, Izawa A, Tomita N, Amano J, Kaneda Y, Ogihara T, Takamoto S, Isobe M: Gene therapy for attenuating cardiac allograft arteriopathy using ex vivo E2F decoy transfection by HVJ-AVE-liposome method in mice and nonhuman primates. *Circ Res*, 87: 1063-1068, 2000
- 6) Suzuki J, Morishita R, Amano J, Kaneda Y, Isobe M: Decoy against nuclear factor-kappa B attenuates myocardial cell infiltration and arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. *Gene Therapy*, 7: 1847-1852, 2000
- 7) Tsukioka K, Suzuki J, Kawauchi M, Wada Y, Zhang T, Nishio A, Koide N, Endoh M, Takayama K, Takamoto S, Isobe M, Amano J: Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in coronary vessels of allotransplanted primate hearts. *J Heart Lung Transplant* 19: 1193-1198, 2000
- 8) Wada Y, Suzuki J, Kawauchi M, Kurabayashi M, Tsukioka K, Zhang T, Endoh M, Takayama K, Nagai R, Takamoto S, Isobe M, Amano J: Early growth response factor-1 and basic transcriptional element binding protein2 expression in cardiac allografts. *J Heart Lung Transplant*, 20: 590-593, 2001
- 9) Izawa A, Suzuki J, Takahashi W, Amano J, Isobe M: Tranilast inhibits cardiac allograft vasculopathy in association with PCNA suppression and p21waf1/cip1 induction on neointimal cells in a murine cardiac transplantation model. *J Arterio Vasc Biol*, in press.

G. 知的所有権の出願・取得状況

なし

分担研究報告

HGFによる移植臓器の障害防止

分担研究者 中村敏一 大阪大学大学院医学系研究科バイオメディカル
教育研究センター教授

研究要旨

安全な臓器移植を遂行するにあたって、移植後の急性期での虚血再灌流傷害の阻止、慢性期での組織線維化の予防、免疫寛容の誘導が大きな課題であった。肝再生因子として見出されたHGFは様々な実質臓器において組織の修復を司る一方、実質細胞の生存と機能を促進する臓器保護因子としても機能する。今回、虚血再灌流後の臓器傷害はHGFによって回避できることを心筋梗塞のモデルを用いて明らかにした。さらにHGFは慢性期での組織線維化を阻止するとともに免疫寛容を誘導し得る可能性があることを慢性腎拒絶反応のモデルを用いて立証した。以上の結果は、HGFが臓器移植の様々な局面に対して有効な治療薬として利用できる可能性を意味している。今後の移植医療においてHGF(またはその遺伝子)を活用できる体制の整備が急務と考えられた。

A. 研究目的

臓器移植法の施行より3年が経過し、徐々にではあるが脳死移植の普及の兆しが見えつつある。さらに肝臓分割移植にみられる生体移植も年々増加傾向にある。にもかかわらず、虚血再灌流傷害による移植片の生着障害は相変わらず移植医を悩ませる大きな問題であった。移植医療の歴史が比較的深い欧米では移植患者が10年以上生存することも珍しく無くなったが、免疫抑制剤の長期服用による感染症、発癌、腎傷害などの新たな問題も浮上してきた。さらにシクロスポリンは実質臓器に直接作用して組織線維化を促進することも明らかにされている。安全な臓器移植を行う上でこれらの諸問題の解決が待ち望まれていた。

HGFは初代培養した肝細胞のDNA合成を指標に私達の研究室で分離精製、遺伝子クローニングされた細胞増殖因子である。私達はこれまでHGFが肝臓や腎臓、肺などの臓器移植が対象となる様々な実質臓器において組織修復、臓器破壊の予防にHGFが有効であるとともに肝硬変や慢性腎不全、肺線維症などの組織線維化に特徴づけられる臓器不全症の疾患に対して、実質細胞の再生を促すとともに線維化を抑制して臓器固有の機能を回復させる働きがあることを明らかにしてきた。

そこで平成12年度は、臓器移植の外科的手技上で不可避と考えられてきた虚血再灌流傷害の発症に対するHGFの予防効果を代表的な虚血性疾患であり患者数も極めて多いとされている急性心筋梗塞の

ラットモデルを用いて検討した。さらに移植後の慢性期の必然的な反応として懸念されている組織線維化に対するHGFによる阻止効果の可能性を慢性腎拒絶反応のラットモデルを用いて検討した。

B. 研究方法

1) 心筋梗塞モデルを用いたHGFによる虚血再灌流傷害の抑制

代表的な虚血性疾患として心筋梗塞に着目し、動物モデルを作成した。ラットの左側心冠状血管を完全に遮断し、20分後に血行を再開することで虚血再灌流傷害を誘発した。このモデルにおいて血中HGF濃度を経時的に測定するとともに、心筋でのc-Met/HGF受容体の発現動態を調べた。次にHGF/c-Met系の発現亢進の意義を明らかにすべく、HGF中和抗体をこのモデルに投与し、心筋細胞死等を指標にHGF中和の影響を調べた。さらに再灌流傷害に対するHGFの治療因子としての意義を示すべく、リコンビナントHGF (500 µg/匹/12時間)を投与し、心筋の細胞死や機能傷害に対する効果を検討した。

2) 慢性腎拒絶モデルを用いたHGFによる免疫寛容の抑制と線維化阻止

HGFによる急性期での虚血再灌流傷害の阻止が免疫寛容の誘導、組織荒廃の阻止につながる可能性をラットの慢性腎拒絶モデルを用いて検討した。まずMHCを異にするラットの2系統間で腎移植を行った。則ち、ドナーのF344ラットから左腎を摘出、レシピエントのLewisラットに同所性腎移植を施行した。移植腎での腎機能を評価すべく右側の自己腎も摘出、

免疫抑制剤としてシクロスポリンを10日間投与するとともにリコンビナントHGF (100 µg/匹/日)または生食を移植後4週間にだけ投与した。術後5週目からは両群ともに完全休養とし、移植後の経過を32週目まで追跡した。

C. 研究結果

1) 虚血再灌流後の心筋傷害とHGFによる心筋保護効果

ラットの心筋虚血再灌流傷害モデルにおいて、血漿HGF濃度は術後3および24時間目に各々6および12倍に上昇した。一方、HGF受容体であるc-Metは心筋虚血傷害部周辺に強く認められた。正常家兎IgGを投与したブラシーボ群では全例が生存したのに対し、抗HGF家兎IgGを投与した中和群では心筋梗塞巣の拡大、心筋機能不全の増悪に一致して50%の動物が死亡した。次にこのモデルにリコンビナントHGFを投与した結果、アポトーシス抑制分子として知られているBcl-xLの発現が心筋細胞に誘導され、アポトーシスの発症は著しく阻害された。生理食塩水のみを投与した対照群で観察された心筋梗塞の拡大、心筋収縮力の低下はHGFの投与によって著しく改善された。

2) 腎移植におけるHGFによる免疫寛容の誘導と慢性拒絶反応の抑制効果

ラットの慢性腎拒絶モデルに移植後4週間だけリコンビナントHGFを投与した結果、シクロスポリンの投与を行う必要なく、移植腎は32週目まで良好に機能し続けた。則ち、生理食塩水を投与した対照群では移植後4~8週目から腎機能不全

の指標である血漿クレアチニン値が上昇し、蛋白尿も顕著になったのに対し、HGF処置群ではこのような変化は強く抑制されていた。移植後4日目に見られた(虚血再灌流傷害を示す)腎尿細管上皮細胞でのアポトーシスの発症はHGFの投与によって阻害された。また移植後32週目の対照群に観察された尿細管萎縮、蛋白円柱の蓄積、間質線維形成、糸球体硬化症の発症はHGFの投与によってほぼ完全にブロックされることも明らかとなった。組織線維化を誘導するTGF- β ならびに単核細胞浸潤をもたらすMCP-1の移植腎での発現はHGF投与によって1/6~1/8のレベルに抑制されることも判明した。その結果、32週目までに対照群では50%の動物が腎機能不全で死亡したのに対し、HGF処置群では全例が生存した。

D. 考察

HGFは組織の破壊を抑制する臓器保護因子であるが、元来、破壊された組織の修復を司る再生因子として発見された。HGFは肝細胞におけるアルブミン合成、腎尿細管細胞でのNa⁺-K⁺ATPase発現誘導、膵 β 細胞でのインスリン産生促進といった臓器固有の機能を高める機能亢進因子としても重要な役割を担う。組織線維形成に際しては細胞外マトリックスの分解酵素であるMMPの発現と活性を高めるとともに線維化誘導因子の実体であるTGF- β の発現を抑制する。このような多岐に渡る生物活性を有するHGFの移植医療への応用を考えた時、1)実質細胞死の抑制による移植臓器の保護、2)慢性拒絶

反応後の荒廃組織の再生/再構築、3)組織線維化予防、以上のステップにおいて発症予防、病態改善にHGFが利用できると期待されたが、この予想は今回の検討によって現実的なものとなった。

移植手術の直後から遭遇する悩ましい問題として虚血再灌流傷害が挙げられる。臓器移植の手技上、多かれ少なかれ再灌流傷害が発生するが、とりわけこの程度が術後のグラフト生着率に大きな影響を及ぼすとされてきた。私達は典型的な虚血性疾患である心筋梗塞のモデルを用いて傷害認知によって誘導されるHGFが心筋アポトーシスの抑制に必須の役割を担う一方、活性型HGFの速やかな投与がBcl-xLの発現誘導を介してアポトーシスの発症をブロックすることを見出した。HGF補充療法は心筋梗塞巣の拡大を阻止するとともに損なわれた心筋機能を改善することも明らかとなった。HGFによる再灌流傷害の予防は心臓の他、肝臓や腎臓、肺といった移植の対象となる多くの実質臓器で再現されており、各種臓器に共通する再灌流傷害の共通経路にHGFが抑制的に機能すると考えられる。グラフト保存液に前もってHGFを添加したり、術中からリコンビナントHGFを投与することで来るべき血再灌流傷害を未然に予防できることが期待される。

臓器移植後の虚血再灌流傷害とともに慢性期ではリンパ球などの攻撃を受けた移植片が線維化に至ることが少なくない。慢性拒絶反応と呼ばれるこの問題もまたHGFの短期間投与によって克服できる可能性が腎移植の実験系から示唆された。

とりわけ、虚血再灌流傷害などの急性期での問題をHGFによってクリアできれば慢性期での線維形成、実質組織の荒廃を阻止できるという事象は移植医療の重要課題を克服している点で画期的ある。MHCを異にする個体間でもHGFによって免疫抑制剤を用いなくても移植片を長期に安定して維持できるという点でもその意義は大きい。これによってMHCの異なるドナーに対して移植待機患者が臓器提供を受けられる可能性が増すだろうし、免疫抑制剤からの離脱は感染症や発癌のリスクを減少させる可能性も期待できる。我国では腎臓移植の約半数(則ち、年間300例程)が死体腎に頼っている現状だが、死体移植では再灌流傷害が増幅される為に術後の遠隔成績は芳しくない。HGFによってこの問題が克服されれば、ドナー提供という点では死体腎移植の方が遥かに有利であり、今後の腎移植のあり方が大きく変わる可能性がある。

肝硬変や慢性腎不全、心筋症に代表される組織線維症では臓器の機能不全により致命的な経過を辿る。シクロスポリンの登場によって移植後の生着率は大きく改善され、慢性臓器疾患での唯一の根治療法としての地位を築きつつある。しかしながら、急性期での虚血再灌流傷害、慢性期拒絶反応と移植片線維化、免疫抑制剤の長期間服用による新たな副作用といった解決されるべき諸問題も少なくなかった。今回の結果から、移植現場で遭遇する問題の多くがHGFによって解決される可能性があり、今後の新しい移植医療の方向性をここに提言してみた。

E. 結論

臓器移植の永年の懸案であった急性期での虚血再灌流傷害、慢性期での組織線維化に際し、傷害認知の元に誘導されるHGFは抗アポトーシス効果、線維化抑制作用を発揮して抑制的に作用することが判明した。このような生理活性を合わせ持つHGFの体外的補充は、本来、生体が備え持つ防御機構に根を降ろした合理的な治療戦略として有望と考えられる。HGFはMHCが異なる個体間でも安全な臓器移植を実現する可能性を有することから、MHC適合性によるドナー選択制限の緩和に貢献できるかもしれない。HGF(またはその遺伝子)が移植後の急性/慢性期での臓器保護/再生、臓器不全の改善、免疫寛容導入と言った移植医療の様々な局面に活用できることが期待される。

F. 研究成果

1. T. Nakamura, S. Mizuno, K. Matsumoto, Y. Sawa, H. Matsuda and T. Nakamura (2000) Myocardial protection from infarction by endogenous and exogenous HGF. *J. Clin. Invest.* 106: 1511-1519.
2. K. Kuba, K. Matsumoto, K. Date, H. Shimura, M. Tanaka and T. Nakamura (2000) HGF/NK4, a four-kringle fragment of HGF, is an angiogenesis inhibitor that suppresses tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Res.* 60: 6737-6743.
3. S. Mizuno, K. Matsumoto, T. Kurosawa, Y. Mizuno-Horikawa and T. Nakamura (2000) Reciprocal balance of HGF and transforming growth factor-beta1 in renal fibrosis in mice. *Kidney Intl.* 57: 937-948.
4. K. Kuba, K. Matsumoto, K. Ohnishi, T. Shiratsuchi, M. Tanaka and T. Nakamura (2000) Kringle 1-4 of HGF inhibits proliferation and migration of human microvascular endothelial cells. *Biophys. Res. Commun.* 279: 846-852.
5. W. Sun, H. Funakoshi, K. Matsumoto and T. Nakamura (2000) A sensitive quantification method for evaluating the level of HGF and c-met/HGF receptor mRNAs in the nervous system using competitive RT-PCR. *Brain. Res. Brain. Res. Protoc.* 5: 190-7.
6. K. Matsumoto and T. Nakamura (2000) HGF and Met in tumor invasion-metastasis: Mechanisms related to cancer prevention. In "Cancer metastasis, molecular and cellular biology and clinical aspects" (eds by WG Jiang and RE Mancel), Kluwer Academic Publishers. pp.143-193.
7. K. Matsumoto, S. Mizuno and T. Nakamura (2000)

HGF in renal regeneration, renal disease, and potential therapeutics. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertension* 9: 395-402.

8. M. Nakano, Y. Yasunami, T. Maki, S. Kodama, Y. Ikehara, T. Nakamura, M. Tanaka and S. Ikeda (2000) HGF is essential for amelioration of hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice receiving a marginal mass of intrahepatic islet grafts. *Transplantation* 69: 214-221.

9. T. Yamada, M. Hisanaga, Y. Nakajima, S. Mizuno, K. Matsumoto, T. Nakamura and H. Nakano (2000) Enhanced expression of HGF by pulmonary ischemia reperfusion injury in the rat. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 162: 707-715.

10. Y. Taniyama, R. Morishita, H. Nakagami, A. Moriguchi, H. Sakonjo, S. Kim, K. Matsumoto, T. Nakamura, J. Higaki and T. Ogihara (2000) Potential contribution of a novel anti-fibrotic factor, HGF, to prevention of myocardial fibrosis by angiotensin II blockade in cardiomyopathic hamster. *Circulation* 102: 246-252.

11. S. Hiscox, C. Parr, T. Nakamura, K. Matsumoto, R. E. Mansel and W. G. Jiang (2000) Inhibition of HGF/SF-induced breast cancer cell motility and invasion by the HGF/SF variant, NK4. *Breast Cancer Res. & Treat.* 59: 245-254.

12. K. Beppu, A. Uchiyama, T. Morisaki, K. Nakamura, H. Noshiro, K. Matsumoto, T. Nakamura, M. Tanaka and M. Katano (2000) Elevation of serum HGF concentration in patients with gastric cancer is mediated by production by tumor tissue. *Anticancer Res.* 20: 1263-1268.

13. M. Aoki, R. Morishita, Y. Taniyama, I. Kida, A. Moriguchi, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kanda, J. Higashi and T. Ogihara (2000) Angiogenesis induced by HGF in non-infarcted myocardium and infarcted myocardium: Up-regulation of essential transcription factor for angiogenesis, ets. *Gene Therapy* 7: 417-427.

14. T. Kunisada, H. Yamazaki, T. Hirobe, S. Kamei, M. Omoteno, H. Tagaya, U. Koshimizu, T. Nakamura and S. Hayashi (2000) Keratinocyte expression of transgenic HGF affects melanocyte development, leading to dermal melanocytosis. *Mech. Dev.* 94: 67-78.

15. S. Radaeva, T. Nakamura and A. E. Sirica (2000) Unique epithelial cell production of HGF/SF by putative pre-cancerous intestinal metaplasias and associated "intestinal-type" of biliary cancer chemically induced in rat liver. *Hepatology* 31: 1257-1265.

16. J. M. Otte, F. Schmitz, K. Kiehne, H. U. Stechele, T. Banasiewicz, P. Krokowicz, T. Nakamura, U. R. Folsch and K. H. Herzig (2000) Functional expression of HGF and its receptor in human colorectal. *Cancer. Digestion* 61: 237-246.

17. O. Muto, Y. Sato, Y. Umeki, K. Yoshida, T. Yoshioka, Y. Nishikawa, T. Nakamura, M. Mori, K. Koyama and K. Enomoto (2000) HGF/SF-induced spreading of MDCK cells correlates with disappearance of barmotin/7H6, a tight junction-associated protein, from the cell membrane. *Cell Biol. Intern.* 24: 439-446.

18. T. Kikuchi, T. Abe, M. Yaekashiwa, Y. Tominaga, H. Mitsuhashi, K. Satoh, T. Nakamura and T. Nukiwa (2000) Secretory leukoprotease inhibitor augments HGF production in human lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23, 364-370.

19. K. Hayashi, S. Nakamura, R. Morishita, A. Moriguchi, M. Aoki, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda, N. Sakai and T. Ogihara (2000) In vivo transfer of human HGF gene accelerates re-endothelization and inhibition of neointimal formation after balloon injury in rat model. *Gene Therapy* 7: 1664-1671.

20. H. Nakagami, R. Morishita, K. Yamamoto, Y. Taniyama, M. Aoki, S. Kim, K. Matsumoto, T. Nakamura, J. Higaki and T. Ogihara (2000) Anti-apoptotic action of HGF through mitogen-activated protein kinase on human aortic endothelial cells. *J. Hypertension* 18: 1411-1420.

21. G. Shiota, T. Kunisada, K. Oyama, A. Udagawa, T. Nomi, K. Tanaka, A. Tsutsumi, M. Isono, T. Nakamura, H. Hamada, T. Sakatani, S. Sell, K. Sato, H. Ito, H. Kawasaki. (2000) In vivo transfer of HGF gene accelerates proliferation of hepatic oval cells in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats. *FEBS Lett.* 470, 325-330.

22. T. Sumi, K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) Specific activation of LIM-kinase 2 via threonine-505 phosphorylation by ROCK under the control of Rho. *J. Biol. Chem.* 276: 670-676.

23. T. Takahashi, U. Koshimizu, H. Abe, T. Obinata and T. Nakamura (2001) Functional involvement of LIM-kinase in *Xenopus* oocyte maturation. *Develop. Biol.* 229: 554-567.

24. T. Nakamura, S. Aoki, K. Kitajima, T. Takahashi, K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) Molecular cloning and characterization of Kremen, a novel krigle-containing transmembrane protein. *Biochem. Biophys. Acta* 1518: 63-72.

25. K. Nakamura, H. Funakoshi, K. Miyamoto, F. Tokugawa and T. Nakamura (2001) Molecular cloning and functional characterization of a human scavenger receptor with SRCL, a novel member of a scavenger receptor family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 1028-1035.

26. F. Tamura, M. Masuhara, I. Sakaida, K. Okita, T. Fukumoto and T. Nakamura (2000) FK506 promotes liver regeneration by suppressing natural killer cell activity. *J. Gastroenterol. and Hepatol.*, in press.

27. A. Uchiyama, T. Morisaki, M. Katoh, M. Kojima, Y. Matsunari, K. Beppu, A. Nakatsuka, M. Okido, H. Ichimiya, M. Nakagaki, H. Shimura, K. Matsumoto, T. Nakamura and M. Tanaka (2000) Significance of locally-secreted hepatocyte growth factor after thoracic cancer surgery as a stimulator for postoperative cancer invasion. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, in press.

28. H. Azuma, S. Takahara, K. Matsumoto, N. Ichimaru, J. D. Wang, T. Moriyama, A. Wega, Y. Otsuki, M. Kitamura, A. Okuyama, Y. Katsuoka, A. Chandraker, M. H. Sayegh and T. Nakamura (2001) HGF prevents development of chronic allograft nephropathy in an experimental rat transplant model. *J. Am. Soc. Nephrol.*, in press.

29. S. Mizuno, K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) HGF suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Intern.*, in press.

30. N. Maehara, K. Matsumoto, K. Kuba, K. Mizunoto, M. Tanaka and T. Nakamura (2001) NK4, a four-kringle antagonist of HGF, inhibits spreading and invasion of human pancreatic cancer cells. *Br. J. Cancer*, in press.

31. N. Tsuzuki, T. Miyazawa, K. Matsumoto, T. Nakamura, K. Shima and H. Chigasaki (2001) HGF reduces the infarct volume after transient focal cerebral ischemia. *Neurol. Res.*, in press.

32. K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Intern.*, in press.

33. H. Ueda, K. Matsumoto, Y. Sawa, T. Nakamura, H. Matsuda and T. Nakamura (2000) A role of hepatocyte growth factor in myocardial infarction induced in rats. *Cardiovas. Res.*, in press.

□

分担研究報告

新規免疫抑制剤と遺伝子導入による拒絶反応の制御に関する研究

分担研究者 鈴木盛一 国立小児病院児医療研究センター
実験外科生体工学部長

研究要旨 inducible co-stimulastor (ICOS) は活性化したリンパ球が発現する新たな共刺激分子である。本年度の研究では、ラットの肝移植モデルにおいて抗 ICOS 抗体の拒絶反応阻止効果を明らかにした。抗 ICOS 抗体を移植日から3日おきに3ないしは5回投与することにより、T細胞の活性化を抑え、著明な生着延長効果が得られた。移植肝組織内のリンパ球浸潤は抑制されないが、それらのリンパ球の活性化は阻止され、拒絶反応が発現しない状態となっていることが明らかにされた。

A. 研究目的

本研究では新規の免疫抑制剤や遺伝子導入療法を駆使することにより、臨床応用可能な新たな拒絶反応制御技術を開発することを目的としている。本年度は新たに発見されたリンパ球上に発現する共刺激分子 inducible co-stimulastor (ICOS) を認識する抗体を用いて、その拒絶反応抑制効果について検討した。ICOS はリンパ球が活性化した時に発現する分子で、そのリガンド ICOSL と結合することにより、細胞内へリンフォカイン産生増強のシグナルを伝える。したがって、抗 ICOS 抗体で処置することにより ICOS からのシグナル伝達を阻止すれば、リンパ球の活性化が抑えられ、拒絶反応の発現に対して予防効果があるものと考えられた。そこで、ラットの肝移植モデルを用いて、移植直後より一定期間を置いて抗 ICOS 抗体を投与し、その拒絶反応阻止効果と作用機序について検討した。

B. 研究方法

DA ラット (RT-1^a) をドナーとし LEW ラット (RT-1^l) をレシピエントとして、同所性肝移植を行なった。移植日に抗 ICOS 抗体を経静脈的に投与し、ついで3、6日目、さらには9、12日目に同様に投与した。移植後のレシピエントの生存日数とともに、移植7日目の肝組織を HE 染色ならびに免疫染色で検討した。また、腸間膜リンパ節よりリンパ球を単離し FACS 解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、国立小児病院小児医療研究センターの実験動物管理指針に則り研究がすすめられた。

C. 研究成果

レシピエントの生着日数を表1に示す。抗 ICOS 抗体 1 mg/kg を移植日 (0日) のみ (Group 2)、あるいは移植日と6日目

の2回だけ (Group 3) 投与した場合、対照群 (Group 1) に比較して有意な生着延長は得られなかった。しかし、0, 3, 6日ないしは0, 3, 6, 9, 12日と投与回数を増やすにつれて、著明な生着延長効果が得られた。さらに、抗体投与量を 0.3 mg/kg に減量しても6日間投与を行なえば、明らかな生着延長効果が得られることが示された。

HE 染色による組織像では、7日目の Group 2 (対照群) と Group 5 の比較で、移植肝のリンパ球浸潤は同程度に認められた。しかし、前者では肝細胞の広範な壊死像が認められたことに対して、後者ではそのような所見はなく肝組織の構築は正常に保たれていた。免疫染色では、対照群においては CD2, CD4, CD8 陽性細胞とともに

それらの浸潤部位に一致して ICOS 陽性細胞も多量に認められた。Group 5 でも多量の CD2, CD4, CD8 陽性細胞が存在してしたが、ICOS の発現は認められず、リンパ球浸潤はあるものの、それらの活性化は抑制されていると考えられた。

腸間膜リンパ球の FACS 解析では、対照群で CD4/CD25 および CD8/CD25 double-positive 細胞が著明に増加していたが、抗 ICOS 抗体治療群 (Group 5) ではそれらが著明に減少し、とりわけ CD8/CD25-double positive 細胞の減少が著しかった。CD4/ICOS および CD8/ICOS double-positive 細胞についても、全く同様の結果が得られ、in vivo においてリンパ球の活性化が抑制されていることが明らかとなった。

表1 ラット肝移植における抗 ICOS 抗体による拒絶反応阻止効果

実験群	抗 ICOS 抗体	投与日	生存日数	中央値	有意差
1	0 (対照)		10,11x3,12x2	11	
2	1 mg/kg	0	10x2,11,12,13	11	NS
3	1 mg/kg	0,6	10,11x2,12,14	11	NS
4	1 mg/kg	0,3,6	10,14,16,19,25,27,28	19	p<0.001
5	1 mg/kg	0,3,6,9,12	13,16,19x2,23,25,29,31,32	23	p<0.001
6	0.3 mg/kg	0,3,6,9,12	12x2,14,17,25,27	15.5	p<0.01

D. 考案

近年の免疫抑制技術の進歩は著しく、移植初期の成績は格段に改良された。しかし、薬剤の副作用は依然として問題となり、長期の予後となるとまだ完全に満足できるものではない。新しい免疫抑制手技、とりわけカルシニューリンフリーの免疫抑制を如何にして行なっていくかが、現在の大きな課題となっている。

この目的のために本研究では、遺伝子導入療法と共刺激分子の抑制に着目した検討を進めている。とりわけ、B7-CD28あるいはCD40-CD40Lを介するシグナル伝達は、リンパ球の反応性の調節に重要なものであり、その抑制は拒絶反応を阻止することが明らかにされている。最近新たな共刺激分子として活性化したリンパ球が発現するICOSが注目されている。これはCD28/CTLA4ファミリーの第3のメンバーとされ、細胞内へ活性化のシグナルを伝える。

われわれはこれまでに、T細胞の活性化がB7/CD28の伝達経路に依存していることを明らかにしている。すなわち、アデノウイルスベクターを用いてCTLA4Ig遺伝子をラットレシピエントの肝臓内に導入すると、その蛋白が血中に遊離されることにより、移植心が生着することを認めている (Kita Y et al. *Transplantation* 68:758,1999; Ohba M et al. *World J Surg*, in press)。

本研究では、新たな共刺激分子として発見されたICOS分子を認識する抗体を用いて、拒絶反応の阻止効果を検討したものである。1 mg/kgの1回ないしは2回投与では対照群と比較して、生存延長効果は認められなかったが、3回以上の投与により著明な拒絶反応阻止効果が得られた。しかしながら、抗ICOS抗体の投与は移植肝へ

のリンパ球浸潤を抑制することはできなかった。これは、ICOSはT細胞上に恒常的に発現しているものではなく、それが活性化したときにはじめて発現するものであり、投与した抗体は発現したICOSを認識するという特徴に基づいている。

したがって、移植肝へのリンパ球浸潤は抑えられないが、その活性化は阻止されることになり、その結果生着延長効果を得ることができたと考えられる。

現在のところ、移植免疫寛容を成立させるまでは至っていないが、この抗体にたの共刺激分子を抑制する蛋白、たとえばCTLA4Ig、を併用したり、あるいは遺伝子療法を行なうことにより永久生着を目指しことができると考えられ、そうした研究をさらに進めていく。

E. 結論

ラット肝移植において、抗ICOS抗体の投与はT細胞の活性化を抑え、著明な生着延長効果が得られることが明らかにされた。また、移植肝組織内のリンパ球浸潤は抑制されないが、それらのリンパ球の活性化は阻止され、拒絶反応が発現しない状態となっているものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Tamura A et al. Immunosuppressive therapy using FTY720 combined with tacrolimus in rat liver transplantation. *Surgery* 127(1): 47-54, 2000.
- (2) Nagahara Y et al. Evidence that FTY720 induces T cell apoptosis in vivo. *Immunopharmacology* 48(1): 75-85, 2000.
- (3) Yamashita, M et al. TCR-induced