

平成13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

2002.3

平成13年度「ヒトゲノム・再生医療等研究事業」研究報告

ページ

I. 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系呼吸循環病学講座教授	1
分担研究報告			
1 転写因子、補助シグナルの制御と抑制T細胞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教授	6
2 HGFによる移植臓器での免疫抑制を介した組織保護効果	中村敏一	大阪大学大学院医学部教育研究センター教授	11
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	国立成育医療センター研究所移植・外科研究部長	16
4 心筋虚血再灌流障害におけるHGFの心筋保護効果に関する研究	澤 芳樹	大阪大学大学院臓器制御外科講師	20
5 可溶性補助シグナル分子による免疫寛容の導入法の確立に関する研究	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教授	25
6 遺伝子導入による移植臓器の機能保持に関する研究	金田安史	大阪大学大学院医学系研究科分子治療学教授	27
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教授	32
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院免疫細胞医学教授	38
9 安全な移植技術の確立に関する研究	山岡義生	京都大学医学研究科消化器外科教授	43
10 再生膵β細胞の安全な移植技術の確立に関する研究	清野 裕	京都大学医学研究科臨床生体統御医学教授	48
11 安全な移植技術の確立に関する研究	宮島 篤	東京大学分子細胞生物学研究所教授	50

平成13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 亀久雄
(日本移植学会理事長・(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 (東京医科大学大学院医学総合研究科幹細胞学・再生医学研究科、呼吸器腫瘍学講座教授)
--

- 転写因子・補因子の制御による心臓細胞の抑制
磯部光章 (東京医科大学大学院医学総合研究科幹細胞学・再生医学研究科、呼吸器腫瘍学講座教授)
- HGFによる虚血再灌流障害の抑制
中村敏一 (大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻組織再生医学講座分子組織再生分生化学学教授)
- 新規免疫抑制剤と遺伝子導入による移植後の拒絶反応の制御
鈴木盛一 (国立成育医療センター研究所 移植・外科研究部長)
- 虚血耐性獲得を応用した移植心臓の機能向上
藤 芳樹 (大阪大学大学院医学系研究科臓器制御学講座)
- 可溶性補因子分子による免疫寛容の導入法の確立
上出利光 (北海道大学遺伝子病研究研究所免疫学教授)
- 遺伝子導入による拒絶反応抑制と移植臓器の機能制御
金田安史 (大阪大学大学院医学系研究科分子治療学教授)
- 肝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分野教授)
- NKT細胞移行による移植免疫制御
中山俊彦 (千葉大学大学院医学研究科免疫細胞医学教授)
- 安全な移植技術の確立に関する研究
山岡英生 (京都大学医学研究科消化器外科教授)
- 再生肝臓細胞の安全な移植技術の確立に関する研究
清野 裕 (京都大学医学研究科臨床生体細胞医学教授)
- 安全な移植技術の確立に関する研究
富島 茂 (東京大学分子細胞生体科学研究科教授)

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外科教授)

- 手術術式及び周術期管理の研究
深尾 立 (筑波大学臨床医学系外科教授)
- 臓器移植における移植可能限界に関する研究
長尾 恒 (東京医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 (京都大学医学部附属病院長、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浸透
柏原英彦 (国立佐倉病院院長)
- 臓器移植に去ける危険因子の解析と成績向上のための対策に関する研究
寺岡 寛 (東京女子医科大学腎臓病総合医療センター第3外科教授)
- 臓器移植新領域開発に関する研究
藤屋 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)

- 病院間連携モデル作成
大島伸一 (名古屋大学医学部泌尿器科教授)
- 腎バンクの今後のあり方について
澤 宏紀 (鈴鹿医療科学大学学長)

脳死下での臓器移植の社会基盤に向けての研究 (H12-再生-022) 主任研究者 大塚 敏文 (日本医科大学理事)
--

- 臓器提供施設内における臓器提供システムに関する研究
大塚敏文 (日本医科大学理事)
- 臓器提供にかかわる看護婦・士の意識および今後の課題に関する研究
山崎善江 (日本赤十字九州国際看護大学看護学部助教授)
- 臓器提供施設における医師の役割と問題点
大和田 隆 (北里大学医学部救命救命医学教授)
- ドナー家族のメンタルヘルスの実態とメンタルケアの実践に関する研究
堀川匡史 (東京女子医科大学精神科教授)
- ドナー家族のメンタルケアシステムのあり方に関する研究
吉川武彦 (国立精神・神経センター精神保健研究所名誉所長)
- 臓器移植提供におけるレジリ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)
- コーディネーターの教育書作成に関する研究
菊池研三 ((社) 日本臓器移植ネットワーク(体ナ))
- 脳死下での臓器移植の社会基盤に向けての研究
貫井英明 (山梨医科大学脳神経外科教授)

安全な移植技術の確立に 関する研究

厚生省科学研究費補助金（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 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して、急性拒絶反応、慢性拒絶反応、虚血再灌流障害の抑制、免疫寛容の導入、免疫隔離システムの確立、膵島細胞移植、肝細胞移植などの基盤技術の開発を行った。各領域で顕著な成果が得られた。遺伝子導入、細胞移植、抑制T細胞、HGFなどの新しい組織保護因子、免疫隔離膜、新しい遺伝子導入ベクターなど革新的な技術を利用して、臨床応用に向けての基礎的なデータが集積した。

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科器官形成応用講座 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

山岡 義生 京都大学医学研究科消化器外科学講座 教授

宮島 篤 東京大学分子細胞生物学研究所 教授

清野 裕 京都大学医学研究科内科学 教授

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し、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。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。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。また肝幹細胞移植の確立を目指す。

B. 研究方法

磯部らはICOSにの阻害により、免疫寛容が誘導できるか否か、②慢性拒絶である冠動脈硬化が移植時の小動物（マウス）ドナー心に対するMMPリポザイムの導入により予防されるか、③大動物（ミニブタ）における慢性拒絶反応の実験モデルを作成して遺伝子治療の基礎データを収集すること、④抑制T細胞を同定して、大動物モデルでその移入により特異的免疫抑制が誘導されるかどうかを確認した。

中村はマウスの左腎動脈の遮断解除によって作成した腎虚血モデルにおいて血中HGF濃度を測定するとともに、腎臓でのc-Met/HGF受容体の発現動態を調べた。次にHGF中和抗体を投与し、尿細管上皮細胞のアポトーシス、腎機能を示すBUN値等を指標にHGF中和処理の影響を調べた。またリコンビナントHGFを投与し、尿細管上皮の破壊や腎機能傷害に対する改善効果を検討した。さらに尿細管萎縮の機序を明らかにする目的で、アポトーシスを検出し、また免疫組織学的検討をした。

鈴木らはICOSなど補助シグナル経路の臓器特性を解析し、移植臓器に対する拒絶反応阻止効果、免疫

疫寛容導入・維持とその作用機序を検討する目的で、ラット同所性肝移植、異所性心移植を行った。ICOS抗体単独投与およびCTLA4Igアデノベクターとの併用について検討した。さらに寛容動物から得られたリンパ球の養子移植実験を行った。

澤らは肝細胞増殖因子（HGF）のもつ心筋保護作用に注目して心筋虚血・再灌流障害における内因性HGFの役割とその外的補充による心筋保護効果につき検討する目的で、ラットの冠動脈の短時間虚血再灌流モデルを作成した。再灌流後の心機能を測定し、血中・心筋内HGF値の測定、心筋中のc-METレセプター数の測定、梗塞巣の大きさ、生存率、虚血領域のアポトーシスの検出などの評価を行った。またrHGF、HGF抗体投与による各指標の変化と心筋中Bcl-xLの発現を検討した。

上出らは可溶性補助シグナル経路の障害で免疫寛容を誘導する方法を確立する目的で、ラット及びマウスを用いて肝移植、腎移植、肢移植、気管支移植を行った。CTLA4Ig、ICOSIg、HVEM Ig、CD40Ig、4I-BBIgを精製し、また樹状細胞（DC）を分離培養した。各移植モデルにおいて、これら可溶性補助シグナル分子、およびDCを単独あるいは併用し、移植臓器の生着を検討する。

金田らは移植臓器への遺伝子導入により、移植前後の移植臓器の機能保持、機能改善を行うための遺伝子導入法を開発し、HVJeベクターを用いてラットやマウスの移植臓器にどのような方法で注入するのが最も高い遺伝子導入かを検討した。また、HVJeベクターによる連続投与、複数の遺伝子の共導入について検討した。連続投与可能なHVJ-liposomeやHVJeベクターをベースにして移植後の臓器に対してターゲティングできるように、細胞表面抗原に対する抗体やリガンドのキメラ蛋白を表面に有する標的融合ベクターを開発した。

井上らは砂村と共同して、免疫隔離膜を利用した膵島移植治療法の開発のために、新規移植ドナー細胞として有用なブタ膵島細胞の調製とその異種移植における有効性・安全性の確認を行った。免疫隔離膜として、polystyrene sulfonic acid (PSSa) を主成分に用いカプセル化膵島細胞を調製し、血管新生誘導はbFGFの除法化デバイスを用いて実施した。ブタ膵臓を材料とし、コラゲナーゼと膵内在性酵素(群)を用いた2段階消化後にセルプロセッサーを用いて密度勾配遠心法で分画し得た膵内分泌細胞を用いた。糖尿病モデルマウスにカプセル化膵島細胞移植を腹腔内および皮下に行い、血糖値の変化や耐糖能に関する検討などで評価した。

中山らは岸原と共同して、患者本人のNKT細胞

や樹状細胞をin vitroで増殖・活性化させ、自己の細胞を使った細胞療法によって、これまでの免疫抑制剤だけではコントロールできなかった移植の慢性拒絶をコントロールすることを目的としてストレプトゾシン糖尿病マウスに、Lewisラットのラ氏島を経門脈的に注射した。このモデルを使い、ホストにVa14NKTノックアウトマウスなどを用いてトランス誘導とNKT細胞の必要性について検討した。

山岡らはヒトへ細胞移植可能な肝細胞を同定・分離する目的で、マウス胎児肝から肝前駆細胞の同定・分離を行い、細胞集塊の細胞移植を行った。

清野らは再生膵β細胞の移植による内在性膵β細胞の機能回復を確認する目的で、ラットより分離した膵ランゲルハンス島をストレプトゾトシン糖尿病ラットの腎皮膜下に移植してレシピエントの膵からのインスリン分泌を検討した。

宮島らは肝臓の幹細胞の分離・同定を行う目的で、オンコスタチンMによるマウス胎仔肝細胞in vitro分化系を利用して、分化マーカー遺伝子の発現および肝細胞の構造的な成熟化について詳細に調べた。

（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) 慢性拒絶の病態と予防：マウス移植心モデルでドナー臓器へのMMP-2リボザイム導入により冠動脈の新生内膜の増生が予防された。またミニブタを用いて心移植の手技と慢性拒絶実験モデルを確立した（磯部、天野）。

(2) 免疫寛容の導入：混合培養で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。2例は移植後各250日、200日を経過し生存中である。血清クレアチニン、尿素窒素共に基準値の範囲内を推移し、拒絶反応はない。移植後100日目に施行した生検でもグラフト内へのリンパ球の浸潤は軽度であった（磯部、場集田）。精製したDC細胞とCD40LIgをレシピエントラットに併用投与することにより移植腎の長期生着が可能なプロトコルを作成した。気管支移植モデルでは、CTLA4Ig投与により内腔閉塞の抑制ができた。CD40LIgアデノウイルスベクターの単回投与で肝移植で免疫寛容の誘導を確認した（上出）。ICOSIgとCTLA4Igの併用によりラット移植肝、マウス移植心モデルで免疫寛容が導入で

きることを確認した。寛容ラットから分離したリンパ球を養子移植した群の心移植片の生着期間が顕著に延長した（鈴木、磯部）。マウスのアロの心臓の移植では、抗LFA-1/ICAM-1抗体もしくは、抗CD80/CD86抗体によって誘導された免疫寛容で、NKT細胞ノックアウトマウスでは免疫寛容の成立が障害された。NKT細胞ノックアウトマウスに、正常のマウスからNKT細胞をあらかじめ移入しておくこと、免疫寛容の成立は有意に回復した。NKT細胞の存在が移植免疫寛容誘導に必須であることが分かった（中山）

(3) 虚血耐性の増強と移植組織保護：rHGF投与で冠動脈結紮・再灌流ラットモデルで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。また、Bcl-xLの発現亢進が確認された（澤）。マウス腎虚血-再灌流モデルにHGF中和抗体を投与すると尿細管上皮細胞でのアポトーシス誘導が増強し、腎機能不全が促進した。腎虚血のマウスに再灌流傷害後からrHGFを投与すると尿細管萎縮に基づく腎機能不全の発症はブロックされ尿細管上皮細胞にBcl-xLの発現が誘導され、アポトーシスの程度も軽度であった（中村）。

(4) 細胞移植：ラット膵島をカプセル化したロッド型デバイスに封入し血管新生誘導前処置後の糖尿病モデルマウス皮下に移植した結果、血糖値は正常化した。ブタ膵内分泌細胞は経膵管でコラゲナーゼ溶液を注入し冷消化および温消化、さらに膵内在性酵素による自己消化で得た細胞懸濁液を密度勾配遠心法で分画した。この膵内分泌細胞は、安定したインスリン放出能を有し、カプセル化膵島細胞に用いるバイオリクターとして十分な機能を示した。これらを用いたカプセル化膵島細胞を糖尿病モデルマウス腹腔内に移植した結果、45日以上血糖値は正常化した。膵β細胞に相当するブタ膵内分泌細胞をロッド型デバイスに封入したカプセル化膵島細胞を血管新生誘導前処置した糖尿病モデルマウス皮下に移植したところ、移植後30日間血糖値が正常化した。ブタ膵内分泌細胞がカプセル化膵島細胞のバイオリクターとして充分機能し、異種移植においてもモデル動物の糖尿病状態を改善することが証明できた（井上）。膵ランゲルハンス島移植を行ったラットでは、膵β細胞量、インスリン含量が著明に改善した。この方法で耐糖能の改善することにより、内在性の膵β細胞の質的量的な改善が出来ることが明らかになった（清野）。

(5) 移植に用いる遺伝子導入ベクターの開発：低侵襲で高効率の遺伝子導入法としてHVJエンベロープベクターを開発した。これは各種培養細胞、生体

組織、移植臓器に遺伝子や合成核酸の効率のよい導入法であることが明らかになった。連続投与も可能であった。Bcl-2遺伝子、HGF遺伝子はそれぞれ移植腎の機能保持、骨髄移植時のGVHDの抑制を促進した。また心停止下での脳虚血にNFκB decoy核酸の有効性等が明らかになった（金田）。

(6) 肝幹細胞の分離・同定：マウス胎児肝からHGF存在下で浮遊培養することで細胞集塊を得た。この細胞塊は、形態的にも発現する蛋白の面でも肝前駆細胞と考えられた。この細胞塊はFCS、HGF、インスリン存在下で旺盛な増殖能を示し、細胞塊の形で肝への移植・生着が可能であった（山岡）。オノコスタチンMによるマウス胎仔肝細胞*in vitro*分化系での検討では、アミノ酸代謝酵素の一つであるTATのプロモーター領域が明らかとなった。また、成熟した肝細胞構造を形成するためにはE-カドヘリンの細胞間接着面への局在が重要であること、およびその局在化にはK-Rasのシグナルが必要であることが明らかとなった（宮島）。

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。本年度はその第二年度に当たり、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、肝再生の五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。

慢性拒絶については、小動物で遺伝子導入の効果が示されており、今後はヒトに応用可能な最適標的分子の同定を行い、本年度確立したブタモデルでの検討が望まれるところである。免疫寛容の導入についても、ICOSの役割、CD40Lgの効果など顕著な結果が得られた。しかしなお成果は小動物のレベルにとどまっており、今後本年度の成果を生かして、大動物レベルでの検討が必要である。また抑制性T細胞の移入による免疫抑制は、その手技の簡便性、ならびに経済性を考えると、ヒトへの応用が可能であることを示唆する。サルでの検討は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。

HGFの効果については、移植各領域で顕著な作用があることが示されてきた。移植心の虚血耐性の向上、移植腎の線維化抑制などは臨床に応用可能性の高い成果である。またその作用機所にアポトーシスの抑制などの関与が明らかになってきた。近い将

来の臨床応用が可能と考えられる。

膵島細胞移植については、免疫隔離膜技術や血管新生誘導技術による安全で低侵襲な皮下移植治療法の開発を模索する過程で、免疫隔離デバイス選択肢の多様化がはかれた。また、ドナー不足の解消にブタ膵内分泌細胞を用いた異種移植が有効で安全あることを明らかとした。普遍的な臨床応用実現のために、大動物での有効性と安全性の確認することが必要であろう。

肝細胞移植については、高効率に外来遺伝子を導入することが可能な、細胞塊としての肝前駆細胞が分離され、また生体への移植・生着が可能であることが示された。今後、成熟肝細胞へと分化誘導を行っていくことによって、ヒトへの肝細胞移植、肝再生治療を実現させていく方向性が得られたと言えよう。

E. 結論

慢性拒絶、免疫寛容、虚血耐性、膵島細胞移植、肝細胞移植の各領域で実験が進められた。3年計画の第二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. Tsukioka K, Suzuki J, Fujimori M, Wada Y, Yamaura K, Ito K, Morishita R, Kaneda Y, Isobe M, Amano J Expression of matrix metalloproteinases in cardiac allograft vasculopathy and attenuation of it by anti MMP-2 ribozyme gene transfection. *Cardiovasc Res*, in press.
2. Seino K., Fukao T., Yanagisawa K., Takada Y., Kakuta S., Iwakura Y., Van-Kaer L., Takada K., Nakayama T., Taniguchi M., Bashuda H., Yagita H., and Okumura K. Requirement of natural killer (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. : *Proc. Natl. Acad.Sci.USA*. 2001, 98: 2577-2581
3. T. Kuroiwa, E. Kakishita, T. Hamano, K. Matsumoto, T. Nakamura and T. Iwasaki (2001) Hepatocyte growth factor ameliorates acute graft-versus-host disease and promotes hematopoietic function. *J. Clin. Invest.* 107, 1365-1373
4. H. Azuma, S. Takahara, K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) Hepatocyte growth factor prevents development of chronic allograft

nephropathy in an experimental rat transplant model. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 1280-1292

5. L Guo, X-K.li, N. Funeshima, M. Fujio, Y. Nagata, H. Kimura, H. Amemiya, S. Enosawa, T. Tsuji, Y. Harihara, M. Makuuchi, S. Suzuki: Prolonged survival in rat liver transplantation with mouse monoclonal antibody against an inducible co-stimulator. *Transplantation* 73: 1027-1032, 2002
6. Takehara M, Murakami M, Inobe M, Tanaka K, Chikura S, Saito I, Kanegae Y, Yasunami Y, Nakano M, Yamashita K, Todo S, Uede T: Long-term acceptance of allografts by in vivo gene transfer of regulatable adenovirus vector containing CTLA4IgG and loxP. *Hum Gene Ther* 12: 415-426, 2001
7. Shigeru Miyagawa, Yoshiki Sawa, Satoshi Taketani, Naomasa Kawaguchi, Toshikazu Nakamura, Nariaki Matsuura, and Hikaru Matsuda: Myocardial Regeneration Therapy for Heart Failure: Hepatocyte Growth Factor Enhances the Effect of Cellular Cardiomyoplasty. *Circulation* 105: 2556-2561, 2002
8. Nakamura, N., Hart, D.A., Frank, C.B., Marchuk, L .L., Shrive, N. G., Ota, N., Taira,T., Yoshikawa, H., and Kaneda, Y.: Efficient transfer of intact oligonucleotides into the nucleus of ligament scar fibroblasts by HVJ-cationic liposomes is correlated With effective antisense gene inhibition. *J Biochem* 129:755-759, 2001
9. Wang W.J., Gu Y.J., Tabata T., Miyamoto M., Hori H., Nagata N., Touma M., Balamurugan A.N., Kawakami Y., Nozawa M., and Inoue K.: Reversal of diabetes in mice by xenotransplantation of a bioartificial pancreas in a prevascularized subcutaneous site. *Transplantation* 15:122-129,2002
10. Sharif, S., Arreaza, G. A., Zucker, P., Mi, Q-S., Sondhi, J., Naidenko, O. V., Kronenberg, M., Koezuka, Y., Delovitch, T. L., Gombert, J.-M., Leite-de-Moraes, M., Gouarin, C., Zhu, R., Hameg, A., Nakayama, T., Taniguchi, M., Lepault, F., Lehen, A., Bach, J.-F., and Herbelin, A.:Activation of

- natural killer T cells by α -galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nature Medicine* 7 : 1057-1062, 2001
11. Hamamoto Y, Tsuura Y, Fujimoto S, Nagata M, Takeda T, Mukai E, Fujita J, Yamada Y, Seino Y: Recovery of function and mass of endogenous beta-cells in streptozotocin-induced diabetic rats treated with islet transplantation. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 104-109, 2001
12. Auma H, Hirose T, Fujii H, Oe S, Yasuchika K, Fujikawa T, Yamaoka Y: Alfa fetoprotein positive immature endodermal cells from adult mouse liver. In press.
13. Oe S, Hirose T, Fujii H, Yasuchika K, Nishio T, Iimuro Y, Morimoto T, Nagano M, Yamaoka Y. Continuous intravenous infusion of deleted form of hepatocyte growth factor attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *J Hepatol* 34: 832-839, 200
14. T.Matsui, T.Kinoshita, Y.Morikawa, K.Tohya, M.Katsuki, Y.Ito, A.Kamiya, and A.Miyajima. K-Ras mediates cytokine-induced formation of adherens junctions during liver development. *EMBO J.*, 21, 1021-1030, 2002
15. A.Kamiya, T.Kinoshita and A.Miyajima. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Letters*, 492, 90-94, 2001
7. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得
 発明者：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器具
 特許第3080299；特許権者：京都府京都市左京区吉田本町36の1 京都大学長
2. 特許出願
 発明者：磯部光章；移植片拒絶反応抑制剤（整理番号J01-0019、受付番号50100288773、出願番号通知2001-56216）
3. 実用新案登録
 “遺伝子導入のためのウイルスエンベロープベクター” 金田安史（発明者） 金田安史（出願人）
 番号90102208 2001年4月19日 出願中

転写因子、補助シグナルの制御と抑制T細胞による心拒絶反応の抑制

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 助教授
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 マウスの心移植モデルで、副刺激分子であるICOSとCD28経路の同時阻害で免疫寛容が得られることが明らかになった。マウス移植心に手術時にMMPリボザイムを導入すると、慢性拒絶が著明に抑制された。慢性拒絶反応を制御する遺伝子治療の効果と安全性を検討するためのミニプタを用いた心移植実験系を作成した。今後このモデルで安全性と効果に関する検討を行う必要がある。また混合リンパ球培養時にCD80/CD86抗体を添加することで出現する抑制性T細胞を同定した。このT細胞を腎移植のレシピエントサルに投与する実験を行い長期生着を得た。

A. 研究目的

心移植における臨床的問題点は、1. 急性拒絶反応とその抑制のために用いる免疫抑制剤の副作用、2. 血管平滑筋の増殖による冠動脈内膜肥厚（慢性拒絶反応）、3. 移植時に生じる虚血再灌流障害である。本年度の研究の目的は、

①新しく同定されたT細胞活性化に関わる副刺激物質であるICOSに着目して、本分子の阻害により、免疫寛容が誘導できるか否か、②慢性拒絶である冠動脈硬化が移植時の小動物（マウス）ドナー心に対するMMPリボザイムの導入により予防されるか、③大動物（ミニプタ）における慢性拒絶反応の実験モデルを作成して遺伝子治療の基礎データを収集すること、④心筋保護を目的とした遺伝子治療の開発するために種々のストレスで誘導されるATF3について検討すること、⑤抑制T細胞を同定して、大動物モデルでその移入により特異的免疫抑制が誘導されるかどうかを確認することにある。

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ルを作成する。本研究は研究協力者天野、場集田、伊藤と共同して行う。本年度は特に小動物レベルでの検討をい、また大動物実験モデルの作成を行う。

①ICOS: T細胞の活性化にはT細胞受容体を介するシグナルに加えて、costimulatory分子を介したシグナルが必要である。最近新しいcostimulatory分子、ICOS(inducible costimulator)が同定された。ICOSは活性化T細胞上に発現し、CD28/CTLA4ファミリー

に属するがCD28/CTLA4とは独立した経路を持つ。今回マウス心移植後におけるICOSの発現、ICOS経路阻害による移植心生着効果を検討した。

②MMPリボザイム: Matrix metalloproteinase (MMP) は新生内膜が生ずる際に細胞外器質の融解に重要な役割を果たしている。本年度はMMPが慢性拒絶の病態に果たす役割を遺伝子学的手法を用いて検討し、MMP-2リボザイムの効果を確認し、臨床応用へ向けた基礎データを得る。

③慢性拒絶反応のミニプタモデルの作成: ミニプタを用いて、サイクロスポリンの投与下に長期生着を得、かつ慢性拒絶が出現するという、臨床例に類似した実験モデルを作成し、小動物実験で得られた遺伝子導入実験結果を確認する前臨床試験の準備をする。

④培養心筋細胞のアポトーシスに対するATF3の抑制効果について: 心筋細胞にアポトーシスを誘導するドキシソルピシン(DOX)で刺激を行いATF3のmRNAレベルでの発現を確認する。ATF3発現によるDOX誘導性アポトーシスへの影響について検討する。

⑤抑制T細胞の同定と移植への応用: 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抗体の存在下一週間培養した細胞を宿主に戻すことにより、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、従来報告してきた方法で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った。

- ①BALB/cマウスの心臓をC3H/Heマウスの腹部に移植した。移植後の脾細胞、グラフト浸潤細胞を用いてFACS解析、免疫染色を施行した。また移植心の生着効果を検討するため、抗ICOS抗体(100 μ g/日)、ICOSIg(100 μ g/日)を移植直後、2,4,7,10日後に腹腔内に投与した。さらに同様のプロトコールでCTLA4Igの併用投与の効果について検討した。
- ②MMP:マウス移植心(DBA→B10.D2)において、新生内膜におけるMMP-2,3,9,13の発現を経時的に検討した。HVJ-liposome法でマウス移植心臓へ移植時にMMP-2リボザイムの導入した。30日目の動脈硬化所見を検討した。
- ③ ミニブタ移植心への遺伝子導入の予備実験を行った。ミニブタで腹部異所性心移植を行い、サイクロスポリンにより免疫抑制を行い、3~6ヶ月の観察期間で慢性拒絶反応の出現を病理学的に検討した。
- ④ ラット培養心筋細胞をDOXで刺激し、この細胞を用いてATF3の発現の変化の時間経過をflow cytometry、TUNEL 染色法で検討した。さらにATF3を強制発現するアデノウイルスベクターを作成し、それによるATF3発現によりDOX誘導性アポトーシスへの影響について検討した。
- ⑤主要組織適合抗原の異なるアカゲザルを用いて腎臓移植を行った。ドナー、レシピエントの脾臓を摘出しリンパ球を取り出し、ex vivoで抗CD80/CD86抗体を添加して二週間混合培養を行って低応答性アロ反応性T細胞誘導した。この間、レシピエントはサイクロスポリンとサイクロフォスマイドを用いて免疫抑制を行い、その後、二週間培養した細胞をレシピエントに移入し、以後免疫抑制剤の使用を中止した。

(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 ICOSIgの効果：正常脾細胞に比べ、移植後の

脾細胞においてICOSの発現誘導がみられたが、グラフト浸潤細胞においてはさらにICOS発現増強を認めた。また移植心の免疫染色においても浸潤細胞に一致してICOSの発現がみられた。無治療群(n=10)では移植心はmedian graft survival 7日で拒絶されるが、抗ICOS抗体投与群(n=10)で29日、ICOSIg(n=7)投与群で20日と移植心の生着延長を認めた。またCTLA4Ig(total 200 μ g, n=7)単独投与では20日であったが、ICOSIg(500 μ g)とCTLA4Ig(200 μ g)との併用により>150日と移植心の生着は著明に延長した(n=7)。またskin challenge testにより併用群のうち5匹にてドナー特異的な免疫寛容の導入が認められた。(図1)リンパ球混合試験では、ICOSIgとCTLA4Igの同時投与により細胞増殖が著明に抑制され、CTLA4Ig単独では抑制されない増殖がICOSIgの添加によって抑制された。(図2)

② MMP発現とMMPリボザイムの効果：MMP-2,3,9,13とも慢性拒絶心の冠動脈内膜で発現増強が見られた(図3)。MMP-2リボザイム導入では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(25.0 \pm 6.5% vs 55.1 \pm 7.0, p<0.05)。(図4)

③ ミニブタの移植心実験系：ミニ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。12ペアの移植を行った。サイクロスポリンの投与プロトコールを変化させて至適な量、期間を検討した。6頭を急性拒絶とレシピエントの死亡で失った(8~48日)。3ヶ月生存した2頭、6ヶ月生存した2頭で移植心の病理学的検討を行ったところ、種々の程度の冠動脈内膜肥厚が見られた。残りは現在なお観察中である。

④遺伝子導入：ATF3 mRNAは1時間後を、蛋白レベルでは3時間後をピークとした上昇が認められた。ATF3アデノウイルスにより、DOX誘導性アポトーシスが有意に抑制されることが、flow cytometry、TUNEL 染色法で確認された。また、ATF3アデノウイルスがアポトーシス誘発のkey moleculeであるp53の発現を抑制することが示された。さらにゲルシフトアッセイにより、ATF3がAP-1 siteのみならずp53のpromoter上にあるAP-1 like site, すなわちPF-1 siteと結合することが確認された。

⑤抑制性T細胞：4組に腎移植を施行した。一例は急性尿管壊死に引き続く、拒絶反応にて失い、さらに一例は移植後80日目に施行した腎生検をきっかけに失ったが、拒絶グラフト内へのリンパ球の浸潤は軽度であった。残り2例は移植後各250日、

200日を経過し生存中である。血清クレアチニン、尿素窒素共に基準値の範囲内を推移し、拒絶反応はない。移植後100日目に施行した生検でもグラフト内へのリンパ球の浸潤は軽度であった。

D. 考察

①これまでの諸家の報告でCTLA4Ig単独での寛容導入はヒトでは困難であることが示されてきている。ヒトでは齧歯類と異なる副刺激分子が働いている可能性がある。また臓器に特有なT細胞活性化メカニズムが働いている可能性も否定できない。新しく同定された副刺激分子であるICOSの検討で新知見を得た。即ち、ICOS抗体、ICOSIgによるICOS経路の阻害により移植心の拒絶が効果的に抑制された。またCTLA4との同時阻害はさらに効果的である。ICOSとCD28(CTLA4)経路は協同的に働いている可能性もある。今後他の分子も含めて詳細に検討する必要がある。

②移植心冠動脈硬化発症におけるMMP-2を代表とするMMPの重要性を明らかにした。今後MMP-2リポザイムの有用性について、大動物実験で明らかにしていく必要がある。

③ミニブタ心移植における慢性拒絶モデルの作成：3～6ヶ月のサイクロスポリン治療によりミニブタで急性拒絶を抑えつつ、冠動脈内膜肥厚を出現させることが初めて示された。本モデルの難しさは、免疫抑制剤の投与プロトコールである。今後安定したモデルとするために、ブタ主要組織適合抗原の検討を行いつつ、効果を判定する必要がある。また、次年度はHGF、NF κ Bデコイなどの遺伝子を導入して、その効果について検討していく予定である。

④心保護を目的とする遺伝子導入：ATF3 homodimerがPF-1 siteに結合することにより、p53を発現抑制するものと考えられた。DOXにより誘導されたATF3は、p53発現誘導の抑制を介してアポトーシス抑制に働いている可能性が示唆された。これらの結果よりATF3アデノウイルスベクターが心筋保護作用を持つことが示されたので、このベクターをもちいて移植心の心筋保護を目的とした遺伝子治療の開発が可能であると考えられた。

⑤抑制性T細胞の寛容誘導能に関する結果は興味深い。マウスを用いての実験では、移入細胞中のCD25陽性細胞が免疫抑制の鍵を担うことが判明している。麻痺細胞とCD25陽性T細胞の免疫抑制作用は類似することが多いが、その詳細については今後の報告を待たなければならない。我々の考えた手法（免疫抑制状態のサルに、*ex vivo*で誘導したアロ反応性低応答細胞を移入すること）により移植片

が長期生着したことは、その手技の簡便性、ならびに経済性（使用する抗体は少量でも十分である）を考えると、ヒトへの応用が可能であることを示唆する。サルでの検討は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

三年計画の第二年度として急性拒絶、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。急性拒絶におけるICOSの関与、慢性拒絶におけるMMPの関与などが明らかにされた。また遺伝子導入による心拒絶反応の予防法の開発につながるミニブタモデルを作成した。心保存に関わる新しい分子ATF3を同定した。さらに抑制T細胞の存在をサルの腎移植モデルで示した。

F. 研究発表

1. 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
2. Kawauchi M, Suzuki J, Wada Y, Isobe M, Amano J, Takamoto S. Downregulation of nuclear factor kappa B expression in primate cardiac allograft arteries after E2F decoy transfection. *Transplant Proc*, 33: 451, 2001
3. Suzuki J, Kawauchi M, Wada Y, Isobe M, Takamoto S, Amano J. Altered expression of Bcl-x and Bax in cardiac allograft arteries of primates. *Transplant Proc*, 33: 252-253, 2001
4. Suzuki J, Kawauchi M, Wada Y, Isobe M, Takamoto S, Amano J. Nuclear factor -kappa B expression in primate cardiac allograft arteries. *Transplant Proc*, 33: 606, 2001
5. 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
6. Kobayashi A, Imamura H, Isobe M, Matsuyama Y, Matsunaga K, Kawasaki S: MAC-1 (CD11b/CD18) and intercellular adhesion molecule-1 in the ischemia reperfusion injury of rat liver. *Am J Physiol*, 281: G577-G585, 2001
 7. 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*, 21: 1172-1178, 2001
 8. Yokoseki O, Suzuki J, Kitabayashi H, Watanabe N, Wada Y, Aoki M, Morishita R, Kaneda Y, Ogihara T, Futamatsu H, Kobayashi Y, Isobe M: *cis* Element "Decoy" Against Nuclear Factor- κ B Attenuates Development of Experimental Autoimmune Myocarditis in Rats. *Circ Res*, 89: 899-906, 2001
 9. Tsukioka K, Suzuki J, Fujimori M, Wada Y, Yamaura K, Ito K, Morishita R, Kaneda Y, Isobe M, Amano J: Expression of matrix metalloproteinases in cardiac allograft vasculopathy and attenuation of it by anti MMP-2 ribozyme gene transfection. *Cardiovasc Res*, in press.
 10. Nobori K, Ito H, Tamamori-Adachi M, Adachi S, Ono Y, Kawauchi J, Kitajima S, Marumo F, Isobe M. ATF3 Inhibits Doxorubicin-induced Apoptosis in Cardiac Myocytes: A Novel Cardioprotective Role of ATF3. *J Mol Cell Cardiol*, 2002 (in press)
 11. Adachi S, Ito H, Tamamori M, Ono Y, Nozato T, Abe S, Ikeda M, Marumo F, Hiroe M: Cyclin A/cdk2 activation is involved in hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Circ Res*; 88:408-414, 2001
 12. Shirasugi N., Ikeda Y., Matsumoto K., Hamano K., Esato K., Bashuda H., Yagita H., Okumura K., Takami H., Kodaira S., and Niimi M. Induction of hyporesponsiveness to fully allogeneic cardiac allografts by intratracheal delivery of alloantigen.: *Transplantation*. 2001, 71: 561-564
 13. Seino K., Fukao T., Yanagisawa K., Takada Y., Kakuta S., Iwakura Y., Van-Kaer L., Takada K., Nakayama T., Taniguchi M., Bashuda H., Yagita H., and Okumura K. Requirement of natural killer (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001, 98: 2577-2581
 14. Shirasugi N., Matsumoto S., Hamano K., Esato K., Matsumoto K., Bashuda H., Yagita H., Okumura K., Ikeda Y., Takami H., Kodaira S., and Niimi M. Survival of fully allogeneic cardiac allografts induced by delivery of alloantigen via respiratory mucosa is abrogated by blockade of the B7 pathway.: *Transplant. Proc.* 2000, 32: 2034
 15. Hamano K., Bashuda H., Ito H., Shirasawa B., Okumura K., and Esato K. Graft vasculopathy and tolerance: does the balance of Th cells contribute to graft vasculopathy?: *J. Surg. Res.* 2000, 93: 28-34
- 学会発表
1. Isobe M: Gene Therapy for Heart Transplantation-associated Coronary Arteriosclerosis. International Conference on Transplantation in Nagoya 2001.
 2. Isobe M: Gene Therapy for Heart Transplantation-associated Coronary Arteriosclerosis. 第5回開放的融合研究公開シンポジウム。科学技術振興調整費による開放的融合研究推進制度-「21世紀の再生医療と移植遺伝子療法」-、東京、2001年7月
 3. 小菅寿徳, 後藤亮, 古賀規貴, 小林靖, 磯部光章, 猪部学, 上出利光: 「ICOS経路阻害による同種移植心生着効果」, 第37回日本移植学会総会, 東京, 2001
 4. 月岡勝晶, 鈴木淳一, 和田有子, 森下竜一, 金田安史, 磯部光章, 天野純: 「移植心冠動脈肥厚における、細胞外マトリックスとMMPsの役割について」, 第37回日本移植学会総会, 東京, 2001
- G. 知的所有権の出願・取得状況
- 特許出願
- 発明者: 磯部光章; 移植片拒絶反応抑制剤 (整理番号 J 01-0019、受付番号 50100288773、出願番号 通知2001-56216)

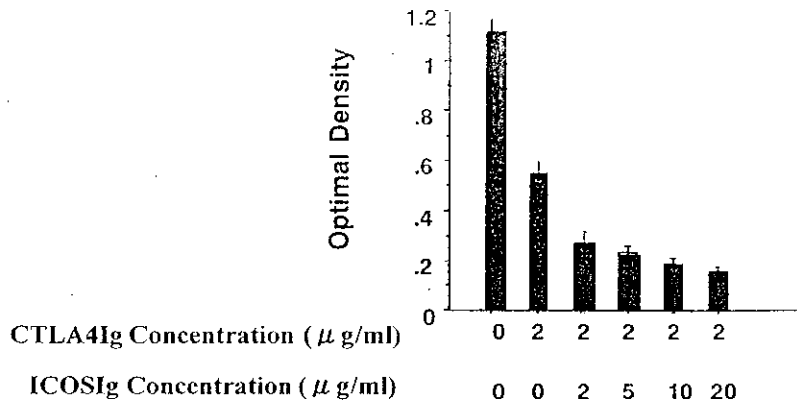


図1 混合リンパ球培養。CTLA4IgにICOSIgを添加することによりリンパ球の増殖がさらに抑制された。

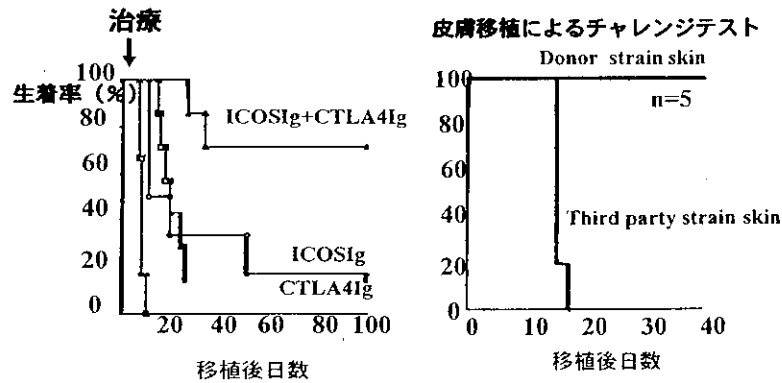


図2 マウス移植心の生着日数（左）と長期生着マウスにおける抗原特異性を示す皮膚移植片生着。

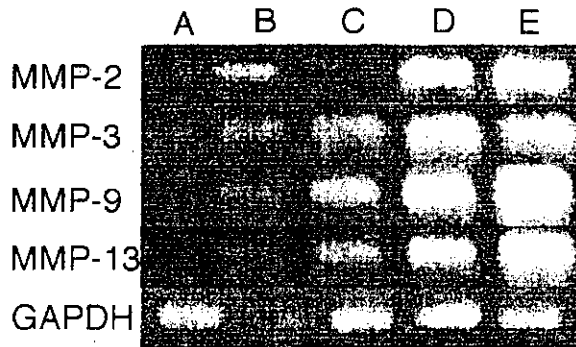


図3 培養血管平滑筋におけるMMP-2,3,9,13の発現。(RT-PCR) A:無刺激、B:PMAによる刺激、C:MMP-2リボザイムの存在下でのPMA刺激、D:コントロールリボザイムの存在下でのPMA刺激、E:DNAリボザイムの存在下でのPMA刺激



図4マウス移植心30日目の免疫染色(MMP抗体による染色)。
A:MMP-2の発現(無治療)、B:MMP-3(無治療)、C:MMP-9(無治療)、D:MMP-13(無治療)、E:MMP-2の発現(MMP-2リボザイム導入マウス)、F:MMP-2の発現(コントロールリボザイム導入マウス)

HGFによる移植臓器での免疫抑制を介した組織保護効果

分担研究者 中村敏一 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

安全な臓器移植技術の確立に向けて慢性拒絶反応、GVHD (移植片対宿主病) などの免疫に起因した諸問題の克服が急務とされている。HGFは様々な臓器/器官において組織修復、細胞保護を司る生理的因子の実体である。私達は昨年度までにHGFが移植臓器において免疫寛容を誘導するとともに慢性拒絶反応の発症を阻止することを腎移植モデルを用いて明らかにして来た。そこで今回、HGFによる免疫寛容誘導のメカニズムを解析すべく、腎虚血モデルを用いてHGFによる白血球浸潤の抑制効果とその作用機序を明らかにした。さらにドナー側の白血球が宿主を攻撃する病態として知られているGVHDもまたHGFによって抑制できることをマウスの骨髄移植モデルを用いて立証した。以上によってHGFは移植臓器の組織形態・生理的機能を維持するだけでなく、白血球浸潤、免疫賦活化を抑制する作用も併せ持つことが今回明らかとなった。このような多岐に渡る生物活性を有するHGFの補充療法は現行の移植医療が抱える様々な問題の克服に向けて、病態に基づいた理想的な治療戦略となり得ると考えられる。

A. 研究目的

臓器移植の宿命として免疫担当細胞による組織傷害が挙げられ、これを克服すべく今迄にサイクロスポリンやタクロリムス(FK506)といった免疫抑制剤が開発されて来た。これらの免疫抑制剤の利用により1980年代以降、各科での移植成績は飛躍的に向上した。その一方で長期生存者が増えるに伴い、免疫抑制剤の長期間服用による発がんや感染症罹患のリスク向上、シクロスポリン自身による薬剤性腎症、といった新たな薬害問題も浮上して来た。より安全な移植医療技術を確立するに当たって、免疫寛容の導入は大きな意味を持つものと予想される。

移植医療で遭遇する拒絶反応には大きく分けて、1) レシピエント側の免疫細胞がグラフトを攻撃する慢性拒絶反応、2) ドナー側の免疫細胞が攻撃するGVHDの2つがある。前者においては術後数時間以内に起こる虚血再灌流傷害の程度がグラフトロスとの間で強い相関を示すことが近年明らかとなりつつある。とりわけ腎移植では腎虚血によって術後尿毒

症を併発した症例では5年後生着率は有意に低下することが知られている。移植後の長期生着率の向上には術後数時間単位で発症する虚血再灌流傷害の制御が重要である。そのためにも虚血後の白血球浸潤抑制が重要な治療標的と考えられる。

一方、白血病や再生不良性貧血などの難治性造血疾患の根治療法として行われる骨髄移植では移植したドナー骨髄がMHCの異なる宿主を非自己と認識し、肝臓や消化管などを攻撃し、多臓器不全を招来する。このようなGVHDの病態においてもリンパ球浸潤の抑制、実質組織の保護を達成できれば安全な骨髄移植の医療技術確立に向けて大きなインパクトを与えることが予想された。

このような背景の元に、本年度はまず腎虚血再灌流傷害の発症に対するHGFの予防効果、特に白血球浸潤に対する抑制効果をマウスモデルを用いて検討した。さらに骨髄移入後の免疫反応として懸念されているGVHDに対し、HGFによる阻止効果の可能性を骨髄移植マウスを用いて免疫学的に解析することとした。

B. 研究方法

1) 腎虚血モデルを用いたHGFによる再灌流傷害／白血球浸潤の抑制

マウスの左腎動脈の血行をクランプで遮断、30分間後にクリップを解除することによって腎虚血モデルを作成した。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、腎臓での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、尿細管上皮細胞のアポトーシス、腎機能を示すBUN値等を指標にHGF中和処理の影響を調べた。逆に再灌流後の腎傷害に対するHGFの治療因子としての意義を証明すべく、リコンビナントHGFを投与し、尿細管上皮の破壊や腎機能傷害に対する改善効果を検討した。さらに尿細管萎縮の機序を明らかにする目的で、TUNEL法を用いてアポトーシスを検出する一方、抗アポトーシス分子の1つであるBcl-xLの蛋白発現をウエスタンブロット法によって調べた。最後に白血球の腎組織浸潤とHGFによる浸潤抑制の可能性をMac-1やGr-1, CD4, CD8などの細胞マーカーを用いて免疫組織学的に検討した。

2) 骨髄移植モデルを用いたHGFによる免疫寛容の誘導

レシピエントとしてC57B6マウス、ドナーとしてBDF1マウスを選抜し、2系統間で骨髄移入を行った。このマウスモデルでの骨髄移植後のGVHDを見るために小腸粘膜病変を病理組織学的に調べた。さらに肝臓におけるリンパ球浸潤の程度を定量する目的で各種リンパ球マーカーを用いてフローサイトメトリーを行った。次の実験として、骨髄移植を受けたBDF1マウス(レシピエント)の筋肉内にHVJリボソーム法を用いてHGF cDNAを導入し、その治療効果を検討した。小腸粘膜上皮の脱落、肝傷害に及ぶHGF遺伝子導入の影響を明らかにするとともに、HGF遺伝子導入後のIL-12やTNF- α 、 γ -IFNの発現変化をELISA/RT-PCRによって測定した。さらに致死量のX線量をマウスに全身照射した後、骨髄移植を行った。このような骨髄再建モデルに対

してもHGF遺伝子導入を行い、髄外造血が誘導されるかどうかを照射後の生存率ならびに骨髄や脾臓、胸腺などの実質細胞数を指標に解析した。

C. 研究結果

1) 虚血再灌流後の腎尿細管傷害とHGFによる腎保護効果

腎虚血-再灌流傷害後、尿細管萎縮、蛋白円柱蓄積によって腎機能不全が速やかに進行し、BUN値は術後18時間目でピークを示した。一方、内因性HGFの産生は術後1時間目には既に有意な上昇を示しており、以後も高値を維持していた。尿細管上皮でのc-Met/HGF受容体の発現も再灌流後に高まる傾向を示した。そこでこのマウスモデルにHGF中和抗体を投与した結果、尿細管上皮細胞でのアポトーシス誘導の増強、尿細管萎縮に一致して、BUN値の上昇、即ち、腎機能不全が促進した。このことから、腎虚血後に速やかに誘導される内因性HGFは尿細管上皮に発現誘導したc-Metに結合し、腎組織破壊の進行を抑制している可能性が示唆された。そこで次にHGFの治療因子としての可能性を検証すべく、腎虚血のマウスに再灌流傷害後から活性型の剤型を有するリコンビナントHGFを投与した。その結果、尿細管萎縮に基づく腎機能不全の発症はHGF投与によってほぼ完全にブロックされることが判った。HGF投与群では尿細管上皮細胞にBcl-xLの発現が早期に誘導され、TUNEL法で見たアポトーシスの程度も生食対照群と比べて軽度であった。術後3時間目で観察されるGr-1陽性細胞(即ち、好中球)、Mac-1陽性細胞(即ち、マクロファージ)の浸潤はHGF投与群では強く阻止された。さらに16時間目で見つかったCD4陽性/CD8陽性T細胞の浸潤もHGFによって阻止されることが判った。虚血再灌流後に間質小動脈(特に血管内皮細胞)に誘導されるICAM-1の発現はHGF投与群で生食群の1/5の程度に軽減していることも判明した。さらに生食群では小血管周囲に水腫が形成されたのに対し、HGF投与群ではこのような水腫性変化は軽度に抑制されることも明らかとなった。

2) 骨髄移植におけるHGFによるGVHDの抑制と造血促進

MHCが異なるマウスの2系統で骨髄移植を行ったところ、小腸粘膜の萎縮によって特徴付けられるGVHDの発症はHGF遺伝子導入によって抑制された。則ち、PBS投与群で認められた粘膜ヒダの脱落、粘膜上皮のアポトーシスはHGF遺伝子導入によって阻止された。もう1つの典型的な病変である肝傷害、Tリンパ球の浸潤もまたHGF遺伝子導入によってブロックされた。免疫亢進因子であるIL-12の血中レベルを測定したところ、骨髄移植後のIL-12値の上昇はHGF遺伝子導入群でbasal levelに抑制されていた。同様に小腸でのTNF- α , γ -IFNといった免疫を活性化させるサイトカインの産生もHGF遺伝子導入により阻害された。結果的にHGF遺伝子導入群では白血球浸潤、上皮傷害といったGVHDを示す所見は消失した。致死量の放射線傷害を照射した後に骨髄移植を行った骨髄置換モデルにおいてPBS投与群では造血不良に基づく栄養不良によって全例が65日以内に死亡したのに対し、HGF遺伝子導入群では90日が経過しても75%の動物が生存した。HGF遺伝子導入群では脾臓などでの髓外造血が明らかに亢進しており、末梢白血球数も正常値に近くまで回復していることも明らかとなった。

D. 考察

腎臓を含むほとんどすべての臓器移植ではその手術手技の性質上、虚血再灌流傷害が避けられない。HGFは腎臓における虚血再灌流傷害を抑制したが、その作用起点として少なくとも3つのプロセスが考えられる。まずHGFが血管内皮細胞でのICAM-1に代表される接着分子の発現を抑制し、血管内皮傷害そのものを阻害した可能性が考えられる。これによって内皮細胞の連続性が保持され、白血球の血管外漏出が抑制された可能性がある。第2にマクロファージやリンパ球などにHGF受容体であるc-Metの発現がわずかながらも観察されることから、これらの白血球にHGFが直接作用してその遊走を抑制した可能性も考えられる。第3に血管を通り抜けて来た白

血球が示す尿細管傷害に際してはHGFは尿細管上皮に抗アポトーシス分子であるBcl-xLの発現を誘導することによってアポトーシスをブロックした可能性が高いと思われる。

虚血再灌流傷害によって死んだ尿細管周囲には貪食作用を担うマクロファージを始め、リンパ球や好中球が集簇する。このような白血球が尿細管を認識して活性化されることで免疫学的な感作が起これと考えられる。従ってHGFで処理した虚血腎では尿細管での細胞死が免れることによって免疫感作の機会が損なわれ、これによって免疫学的攻撃から回避に至った可能性が考えられる。

私達はMHCが異なるラット慢性腎拒絶のモデルを用いて術後の虚血再灌流傷害の抑制が腎硬化症/腎機能喪失を回避させることを既に報告している(文献1)。移植後合併症が起これり易い術後1か月の期間をHGFで凌ぐことにより来るべき慢性拒絶は抑制できるというこの事実は安全な移植医療の実現に向けて画期的な意味を持つ。HGFによる虚血再灌流傷害の抑制は肝臓や心臓、肺などの臓器でも確認されており、HGFによる急性期反応抑制を介した慢性拒絶反応の予防がこれらの臓器でも達成される見通しが高いと考えられる。

一方、骨髄移植では腎移植とは異なりドナー側の白血球がレシピエントを攻撃する、いわゆるGVHDの発症が問題視されている。即ち、白血病などの患者では腫瘍化した白血球細胞をエックス線照射などによって死滅させ、ドナー骨髄由来の細胞に全置換させる訳であるが、この際に生じるGVHDが患者のQOL低下などの問題を引き起こしている。そこでMHCが異なる系統間で骨髄移植を行ったマウスにHGF遺伝子を導入したところ、リンパ球浸潤の抑制に一致して小腸や肝臓の上皮傷害も抑制されることが判った。この機構として免疫サイトカインの産生抑制、上皮細胞死抑制を介した免疫感作の阻止などが考えられる。

骨髄移植では虚血再灌流傷害を伴わないことを考え合せると、HGFによる免疫抑制作用の貢献度の大きさがこのモデルを用いることで明瞭になったと言える。いずれにせよ、骨髄提供者が少ない我国で白血病の根治療法を

行う上でMHCを異にする個体間でも安全かつ有効な骨髄移植が実現できる可能性が示されたという点で本研究は重要な意義を持つと考えられる。

動物モデルを用いた今回の検討から、HGFは腎移植ではレシピエント側、骨髄移植ではドナー側の免疫応答反応を抑制することによって免疫寛容様の病態を誘導することがはじめて明らかとなった。このことはHGF(またはその遺伝子)が腎臓や骨髄などの移植医療において『免疫寛容誘導因子』として活用できる可能性を意味している。さらにHGFはほとんど全ての実質臓器において組織修復、器官保護を担うことが判っている。このような生理活性物質の体外的補充は様々な臓器移植に際して、虚血再灌流傷害抑制、組織線維化阻止、免疫寛容導入を実現する合理的な治療戦略となり得ると考えられる。

E. 結論

今回の検討によって腎移植ではHGFは移植臓器へのドナー由来白血球の浸潤を抑制する可能性が明らかとなった。一方、骨髄移植においてはレシピエント由来白血球による攻撃、すなわち、GVHDの発症をブロックする。即ち、HGFは移植直後の免疫反応を抑制することによって免疫抑制剤がなくても慢性拒絶やGVHDの発症を阻害することができる。このような免疫寛容作用に加え、HGFは組織再生、臓器保護などの多岐に渡る生理活性を合わせ持っている。したがってHGF補充療法は腎臓移植や骨髄移植を始めとする多くの移植医療において免疫寛容誘導、臓器保護、上皮再生促進を可能にする、安全かつ有効な治療法となり得ることが期待される。

F. 研究成果

1. H. Azuma, S. Takahara, K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) Hepatocyte growth factor prevents development of chronic allograft nephropathy in an experimental rat transplant model. **J. Am. Soc. Nephrol.** 12, 1280-1292
2. T. Kuroiwa, E. Kakishita, T. Hamano, K. Matsumoto, T. Nakamura and T. Iwasaki (2001) Hepatocyte growth factor ameliorates acute graft-versus-host disease and promotes

hematopoietic function. **J. Clin. Invest.** 107, 1365-1373
3. S. Mizuno, K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. **Kidney Intern.** 59, 1304-1314
4. K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. **Kidney Intern** 59, 2023-2038
5. 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
6. T. Sumi, K. Matsumoto, A. Shibuya and T. Nakamura (2001) Activation of LIM-kinases by myotonic dystrophy kinase-related Cdc 42-binding kinase- α . **J. Biol. Chem.** 276, 23092-23096
7. D. Tomioka, N. Maehara, K. Kuba, K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) Inhibition of growth, invasion and metastasis of human pancreatic carcinoma cells by NK4 in an orthotopic mouse model. **Cancer Res.** 61, 7518-7524
8. K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) HGF-cMet receptor pathway in tumor invasion-metastasis and potential cancer treatment with NK4. **Growth Factors and Their Receptors in Cancer Metastasis** (eds. W.G. Jiang, K. Matsumoto and T. Nakamura) pp.241-276, Kluwer Acad. Pub.
9. H. Ueda, K. Matsumoto, T. Nakamura, H. Matsuda and T. Nakamura (2001) A role of HGF in myocardial infarction induced in rats. **Cardiovas. Res.** 51, 41-50
10. K. Nakamura, H. Funakoshi and T. Nakamura (2001) Molecular cloning and functional characterization of human scavenger receptor with c-type lectin (SRCL), a novel member of scavenger receptor family. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 280, 1028-1035
11. H. Funakoshi and T. Nakamura (2001) Identification of HGF-like protein (HLP) as a novel neurotrophic factor for avian dorsal root ganglion sensory neurons. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 283, 606-612
12. K. Nakamura, H. Funakoshi and T. Nakamura (2001) Molecular cloning of a mouse scavenger receptor with c-type lectin (SRCL), a novel member of the scavenger receptor family. **Biochem. Biophys. Acta** 1522, 53-58
13. 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
14. T. Nakamura, S. Aoki, K. Kitajima, T. Takahashi, K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) Molecular cloning and characterization of Kremen, a novel Kringle-containing transmembrane protein. **Biochem. Biophys. Acta** 93513, 1-10

15. K. Yamamoto, R. Morishita, S. Hayashi, K. Matsumoto, T. Nakamura, and T. Ogihara (2001) Contribution of Bcl-2 but not Bcl-xL and Bax, to anti-apoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells. **Hypertension** 37, 1341-1348
16. Y. Taniyama, R. Morishita, M. Aoki, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda and T. Ogihara (2001) Therapeutic angiogenesis induced by human HGF gene in rat and rabbit hind limb ischemia models: Preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. **Gene Therapy** 8, 181-189
17. K. Hayashi, R. Morishita, K. Matsumoto, T. Nakamura, T. Ogihara and N. Sakai (2001) Gene therapy for preventing neuronal death using hepatocyte growth factor: in vivo gene transfer of HGF to subarachnoid space prevents delayed neuronal death in gerbil hippocampal CA1 neurons. **Gene Therapy** 8, 1167-1173
18. H. Nakagami, R. Morishita, K. Yamamoto, T. Nakamura and T. Ogihara (2001) Mitogenic and antiapoptotic action of HGF through ERK, STAT3, and Akt in endothelial cells. **Hypertension** 37, part 2 Suppl. S. pp581-586
19. K. Matsumoto, R. Morishita, K. Matsumoto, T. Nakamura, J. Higaki and T. Ogihara (2001) Inhibition of neointima by angiotensin-converting enzyme inhibitor in porcine coronary artery balloon-injury model. **Hypertension** 37, 270-274
20. N. Tsuzuki, T. Miyazawa, K. Matsumoto, T. Nakamura and K. Shima (2001) Hepatocyte growth factor reduces the infarct volume after transient focal cerebral ischemia in rats. **Neurol. Res.** 23, 417-424
21. Y. Saga, H. Mizukami, T. Nakamura and K. Ozawa (2001) Expression of HGF/NK4 in ovarian cancer cells suppresses intraperitoneal dissemination and extends host survival. **Gene Therapy** 8, 1450-1455
22. K. Hayashi, R. Morishita, H. Nakagami, K. Matsumoto, T. Nakamura, and N. Sakai (2001) Gene therapy for preventing neuronal death using HGF : in vivo gene transfer of HGF to subarachnoid space prevents delayed neuronal death in gerbil hippocampal CA1 neurons. **Gene Therapy** 8, 1167-1173
23. Z. Warzecha, A. Dembinski, D. Schuppan, J. Stachura and T. Nakamura (2001) Hepatocyte growth factor attenuates pancreatic damage in caerulein-induced pancreatitis in rats. **Eur. J. pharmacol.** 430, 113-121
24. M. Aoki, R. Morishita, S. Hayashi, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda, T. Ogihara (2001) Inhibition of neointimal formation after balloon injury by cilostazol accompanied by improvement of endothelial dysfunction and induction of hepatocyte growth factor in rat diabetes model. **Diabetologia** 44, 1034-1042
25. H. Takahashi, U. Koshimizu, J. Miyazaki and T. Nakamura (2002) Impaired spermatogenic ability of testicular germ cells in mice deficient in the LIMK2 gene. **Develop. Biol.** 241, 259-272
26. T. Sumi, K. Matsumoto and T. Nakamura (2002) Mitosis-Dependent Phosphorylation and Activation of LIM-Kinase 1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 290, 1315-1320
27. H. Funakoshi, T. Yonemasu, K. Matsumoto and T. Nakamura (2002) Identification of Gas 6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons. **J. Neurosci. Res.**, in press
28. W. Sun, H. Funakoshi and T. Nakamura (2002) Localization and functional role of hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor c-Met in the rat developing cerebral cortex. **Mol. Brain Res.**, in press
29. Y. A. Kishi, H. Funakoshi, K. Miyamoto and T. Nakamura (2002) Xksy, a gene expressed in developing neural tissues, encodes a novel Sky family receptor tyrosine kinase with a glutamic acid-rich domain. **Gene**, in press
30. Y. Sakamaki, K. Matsumoto, S. Mizuno, S. Miyoshi, H. Matsuda and T. Nakamura: HGF stimulates proliferation of respiratory epithelial cells during postpneumonectomy compensatory lung growth in mice. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, in press
31. H. Shibuki, N. Katai, K. Matsumoto, T. Nakamura and N. Yoshimura (2002) Expression and neuroprotective effect of hepatocyte growth factor in retinal ischemic-reperfusion injury. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 43, 528-536
32. Y. Taniyama, R. Morishita, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda and T. Ogihara (2002) Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hind limb ischemia model: Molecular mechanisms of delayed angiogenesis in diabetes. **Circulation** 104, 2344-2350
33. M. Maemondo, K. Narumi, Y. Saijo, K. Usui, M. Tahara, R. Tazawa, K. Hagiwara, K. Matsumoto, T. Nakamura and T. Nukiwa (2002) Multi-molecular targeting for angiogenesis and HGF function by adenoviral vector expressing HGF antagonist, NK4 in cancer therapy. **Human Gene Therapy**, in press
34. T. Funatsu, Y. Sawa, S. Ohtake, N. Matsuura, T. Nakamura and H. Matsuda (2002) Therapeutic angiogenesis induced by myocardial injection of naked cDNA plasmid encoding HGF in ischemic canine heart. **J. Thoracic & Cardiovas. Surg.**, in press
35. S. Miyagawa, Y. Sawa, T. Nakamura, N. Matsuura, and H. Matsuda (2002) Myocardial regeneration therapy for heart failure: Hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. **Circulation**, in press

G. 知的所有権の取得状況

特にありません。

分担研究報告書

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 国立成育医療センター 研究所
移植・外科研究部長

研究要旨 inducible co-stimulator (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、ラットの心移植モデルを用いて抗 ICOS 抗体と CTLA4Ig アデノウイルスベクターの併用で、リンパ球の活性化を阻止すると同時に CD28-CTLA4/B7 経路を通して抗原提示細胞の活性を抑制することで、安定な免疫寛容状態の誘導および維持ができた。

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。本年度は我々は、ICOS に対する抗体および CTLA4Ig アデノウイルスベクターを用い、ICOS/B7h 経路、CD28-CTLA4/B7 経路を選択的に阻害することにより、補助シグナル経路の臓器特性を解析し、移植臓器に対する拒絶反応阻止効果、免疫寛容導入・維持とその作用機序について検討した。

B. 研究方法

臓器移植急性拒絶モデルとしてラット同種 (DA to Lewis) 同所性肝移植、異所性心移植モデルを用いた。移植後移植片の生存延長効果を抗ラット ICOS 抗体単独投与および CTLA4Ig アデノウイルスベクターとの併用について検討を行った。また、免疫寛容誘導の作用機序について、移植後宿主のリンパ球活性化を FACS にて解析を行い、移植片の細胞浸潤を免疫組織染色で検討した。さらに免疫寛容動物から得られた

リンパ球の養子移植実験を行い、その寛容状態を評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、国立成育医療センター研究所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。抗ラット ICOS 抗体単独投与することにより同種ラット肝移植モデルにおいては、有意な生存延長効果が得られた。しかし、心移植モデルにおいては効果を認めなかった。その生存延長効果は T 細胞活性化と増殖の抑制に関係することがわかった。また、CTLA4Ig アデノウイルスベクターとの併用によって何れのモデルとも安定した免疫寛容の誘導ができた。一方、免疫寛容ラットの移植片が 100 日を超えた後、末梢血のリンパ球を分離した。その後 FACS にて細胞表面の分子について解析を行い、CD4⁺、CD25⁺細胞集団が Naive のラットよ