

200200464A

200200478A

200200479A

200200480A

厚生労働科学研究費補助金

「ヒトゲノム・再生医療等研究事業」

平成14年度 総括・分担研究報告書

平成15（2003）年3月

序

臓器移植の研究課題としての特殊性、困難性は一方では先端技術的医学の側面を含み、他方では臓器移植や脳死、臓器提供と一般市民に納得してもらうという社会的側面を含むこともあろう。特定の組織の、特定の細胞の、特定の遺伝子の解明と応用にゲートをかけて進めるのが生物学的研究の一般的手法であるが、本課題にはそれだけでは許されない困難さがつきまとう。時間の流れから見ても、現実の臓器移植の推進や成績の向上を基盤に近未来的成績向上、先端的基礎研究の導入による未来型への飛躍を求められる。言い換えると縦（時間軸）と横（取り上げる問題の幅）との座標軸から、適切なポイントを選んで攻め込むことが要求される。

医療の現実的な問題点に出発点をおき、遺伝子操作によって解決を求めるという現代生物学研究の流れからみれば、移植臓器の慢性拒絶反応への対応が適切に進展している実例であろう。

心移植は本邦でも17例実施され、全例短期的には生着し機能を発揮している。国際レベルでも誇るに足る成績である。しかし長期的には慢性拒絶反応、特に移植心の血管内膜の肥厚による血流不全が待ち構えている難問となる。それに対応する研究が進められ、小動物・大動物のモデル実験では遺伝子操作のさまざまな手法によって防止が可能となっている。移植心に限定した操作が可能であり、臨床応用の道も近いと期待されよう。このような進展は臓器移植を軸として、臨床研究者とさまざまな分野の基礎科学者の合同チームが編成された結果であろう。

縦軸と横軸から生まれるポイントは無数であり、その中から少数のポイントを好みで選んでは的はずれになる可能性があり、一方でのポイントも重要とむやみに取り上げるとエネルギーが分散し、成果は上げられない。プロジェクトリーダーとして主任研究者・他のメンバーに要望したことは、初年度には育ちそうな芽をもつ研究者を拾い上げ、かつ広い眼の研究網を構成する。2年目には育ちかかったテーマをもりあげ、共同研究によって育てあげる。3年目にはさらに育てあげるべきテーマを取りあげ、集中的にエネルギーを投入し、高い山に育てあげることであった。

この3年間で、手のつけようもない拮かりをもつ臓器移植の研究において、見るべき成果を上げられたことに敬意を表したい。この成果が臓器移植の臨床現場のレベルアップに直結する姿を求めるのが次のステップと大いに期待している。

平成15年3月

野 本 亀 久 雄

**平成14年度 厚生労働科学研究費補助金
「ヒトゲノム・再生医療等研究事業」研究報告書**

序文 野本亀久雄 (社)日本臓器移植
ネットワーク医療本部
長

I. 安全な移植技術の確立に関する研究

ページ

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 院循環制御学 教授	1
分担研究報告			
1 転与因子、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 院循環制御学 教授	8
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・未来医療開発 専攻組織再生医学教授	15
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	梨井 康	国立成育医療センター 研究所 移植・外科研究 部移植免疫研究室長	22
4 長時間心保存における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 御外科助教授	26
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	29
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	31
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 究所器官形成応用教授	33
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	42
9 基礎研究の臨床成果とその社会的影響	篠崎尚史	東京歯科大学市川総合 病院角膜センター長	47

Ⅱ. 臓器移植の成績向上と開発に関する研究

総括研究報告	主任研究者 深尾 立	労働福祉事業団千葉労 災病院院長	69
分担研究報告			
1 手術の術式および周術期管理の研究	…………… 深尾 立	労働福祉事業団千葉労 災病院院長	72
2 心停止ドナーからの移植可能限界に関する 研究	…………… 長尾 桓	東京医科大学八王子医 療センター第5外科教 授	77
3 臓器移植後の長期成績向上を目指しての研 究	…………… 田中紘一	京都大学大学院移植免 疫医学教授・附属病院 長	80
4 臓器移植長期予後に及ぼす組織適合性の意 義に関する研究	…………… 柏原英彦	国立佐倉病院院長	83
5 献腎移植における危険因子の解析と成績向 上のための方策に関する研究	…………… 寺岡 慧	東京女子医科大学腎臓 病総合医療センター第 三外科教授	103
6 臓器移植新領域開発に関する研究	…………… 藤堂 省	北海道大学大学院移植 外科治療学教授	123

Ⅲ. 臓器移植の社会基盤に向けての研究

総括・分担研究報告	主任研究者 大島伸一	名古屋大学大学院医学 研究科病態外科学教授	129
1 病院開発モデル作成			

IV. 脳死下での臓器移植の社会基盤に向けての研究

総括研究報告	主任研究者 横田裕行	日本医科大学多摩永山 病院救命救急センター 助教授	137
分担研究報告			
1 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	横田裕行	日本医科大学多摩永山 病院救命救急センター 助教授	150
2 臓器提供にかかわる看護師の意識及び今後 の課題に関する調査（その2）	山勢善江	日本赤十字九州国際看 護大学看護学部助教授	174
3 臓器提供病院における医師の役割と問題点	大和田隆	北里大学救命救急医学 教授	180
4 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	堀川直史	東京女子医科大学神経 精神科教授	188
5 ドナー家族のメンタルケアのあり方に関する 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	192
6 臓器移植におけるレシ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	200
7 臓器移植コーディネーターの教育書作成に 関する研究	菊地耕三	（社）日本臓器移植 ネットワーク移植コー ディネーター	202
8 法的脳死判定における脳血流検査の意義	貫井英明	山梨大学医学部長・脳 神経外科教授	204

平成14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
 , ((社)日本臓器移植ネットワーク医療本部長)

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学総合研究科器官システム制御学系呼吸循環病理学講座教授)

- 1 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学総合研究科器官システム制御学系呼吸循環病理学講座教授)
- 2 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野生化学教授)
- 3 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
梨井 康 (国立成育医療センター研究所移植外科研究部室長)
- 4 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助教授)
- 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
上出利光 (北海道大学遺伝子病制御研究所 免疫学教授)
- 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
金田安史 (大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学教授)
- 7 臓器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)
- 8 NKT細胞移行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細胞医学教授)
- 9 基礎研究の臨床成果とその社会的影響
篠崎尚史 (東京歯科大学市川総合病院角膜センター長)

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 (労働福祉事業団千葉労災病院院長)

- 1 手術術式及び围術期管理の研究
深尾 立 (労働福祉事業団千葉労災病院院長)
- 2 心停止ドナーからの移植可能限界に関する研究
長尾 桓 (東京医科大学八王子医療センター移植外科教授)
- 3 臓器移植長期成績向上に関する研究
田中敏一 (京大医学部附属病院長・移植免疫学教授)
- 4 臓器移植長期予後に及ぼす組織適合性の意義
柏原英彦 (国立佐倉病院院長)
- 5 献腎移植における危険因子の解析と成績向上のための方策に関する研究
寺岡 慧 (東京女子医科大学腎臓病総合医療センター第一外科教授)
- 6 臓器移植新補助開塞に関する研究
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 (名古屋大学大学院医学系研究科病態外科学講座泌尿器科学教授)

- 1 病院開発モデル作成
大島伸一 (名古屋大学大学院医学系研究科病態外科学講座泌尿器科学教授・附属病院副院長)

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 横田 裕行 (日本医科大学多摩永山病院救急救命センター助教授)

- 1 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
横田裕行 (日本医科大学多摩永山病院救急救命センター助教授)
- 2 臓器提供にかかわる看護師の意識および今後の課題に関する研究
山勢善江 (日本赤十字九州国際看護大学看護学部助教授)
- 3 臓器提供病院における医師の役割と問題点
大和田 隆 (北里大学医学部救急医学教授)
- 4 ドナー家族のメンタルヘルスの実態とメンタルケアに関する研究
堀川直史 (東京女子医科大学精神科教授)
- 5 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)
- 6 臓器移植提供におけるレシ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)
- 7 コーディネーターの教育書作成に関する研究
菊地耕三 ((社)日本臓器移植ネットワーク 移植コーディネーター)
- 8 脳死下での臓器移植の社会基盤に向けての研究
眞井英明 (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

研究要旨 臓器移植における医学的な問題点は移植時の虚血再灌流障害、免疫抑制剤による副作用、急性拒絶反応、慢性拒絶反応である。これらを解決する画期的な技術を解決するために研究を行った。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、組織保護因子の開発、膵島細胞移植の実現であり、またそれを可能とする遺伝子導入、T細胞活性化機構の解明、抑制T細胞の確立、NKT細胞移植などの基盤技術の開発を行った。それぞれの領域で新たな基礎的なデータが集積した。さらに、拒絶の軽減に関して、新しい知見と臨床応用可能な技術が開発された。またHLAタイピングが術後短期の拒絶反応の発生率や長期予後に与える影響について考察を加えた。

研究組織

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循環制御内科学 教授

分担研究者

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

梨井 康 国立成育医療センター研究所移植・外科研究部移植免疫研究室室長

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

篠崎 尚史 東京歯科大学市川総合病院角膜センター センター長

A. 研究目的

本邦でも脳死臓器移植が始まり、順調に症例が重ねられている。しかし、移植患者の生存率、生活の質（QOL）はなお万全とは言えない。本研究は安全で確実な移植技術を開発するために、細胞、小動物レベルで病態解明と基礎検討を行い、大動物での基礎的データを集積し、さらに臨床応用可能な技術を確立することを目標とする。

現在の移植医療における医学的問題点は、周術期の虚血再灌流障害、急性拒絶反応、慢性期の臓器機能障害（慢性拒絶反応）、等である。これらを解決するためには、臓器保存法の改良、抗原特異性の高い免疫抑制法、特に免疫寛容の導入、また慢性拒絶反応の病態解明とその抑制等に必要な基盤技術を開発することが必要である。

本研究班ではこれまで2年間の研究により、移植免疫における基礎的知見の集積と遺伝子導入技術や細胞移植技術を基盤として、それぞれの領域で新たな技術の開発を行ってきた。本年度は臨床応用に向けて新たな技術をそれぞれ深化させた。さらに、阻血時間の変化と阻血における腎機能の評価を行なうことで、2002年の腎配分ルール変更による変化を検討して、それらのファクターについての医学的安全性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

磯部らは免疫寛容に関する基礎的検討と、慢性拒絶反応の予防法について前年度に引き続いて基礎検討と前臨床研究を行った。T 細胞活性化に関わる新しい抑制性副刺激分子である PD-1 の阻害により、寛容誘導が出来るか、ICOS の阻害が慢性拒絶である冠動脈硬化を軽減するかを検討し、また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した。さらに組織保護作用が確認されている肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor = HGF) が急性拒絶反応に及ぼす効果について検討した。

中村らは腎移植時の虚血再灌流障害の機序における HGF の役割と治療効果について、TNF α で刺激したヒト培養内皮細胞およびマウス腎の 30 分虚血モデルで ICAM-1 の発現を検討した。また HGF の腎慢性拒絶予防をはかるために、ミニプタを用いて HGF 遺伝子投与経路について検討した。即ち、腎動脈または尿管よりルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ nakid plasmid を注入し、腎臓全体を生食中に沈めて通電を行いエレクトロポレーションによる導入を図った。導入後 6 ヶ月目まで HGF の発現について検討した。また移植腎の病理学的変化を検討した。

上出らは前年度までに作成した CTLA4Ig, CD40Ig, ICOSIg, HVEMIg 及び 4-1BBIg 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターの拒絶反応の抑制効果を検討した。ラット肢移植、心移植モデルを用いて、各種アデノウイルスベクターを単独あるいは併用し、移植臓器の生着を検討した。

澤らはラット 8 時間心保存モデルにおいて、再灌流後の心機能を測定し、TUNEL 染色によるアポトーシスの評価を行なった。更に、リコンビナント HGF 投与による各指標の変化を検討した。

鈴木らは臓器移植免疫寛容動物の作製を行い、リンパ球の細胞表面分子について解析を行った。特に CD4⁺、CD25⁺の細胞集団の存在に焦点を当て解析した。次いで免疫寛容動物から採取した細胞、組織を使い、DNA マイクロアレイを用いて、

既知遺伝子の解析を行った。免疫寛容関連遺伝子の情報に基づき、その発現時期及び発現量を定量 PCR にて検討した。

金田らは HVJ エンベロープベクターにポリマーを修飾することにより移植後の臓器に対してターゲティングできるような標的融合ベクターを開発した。また臨床用 HVJ エンベロープベクターの大量生産をめざし、ヒト由来の培養細胞を用いて HVJ を増殖させることを試みた。

中山らは C57BL/6 マウスや V α 14NKT ノックアウトマウスで streptozotocin による糖尿病を作成し、ラットまたは、アロ (BALB/c) のラ氏島を経門脈的に移植した。この系を使い、トランス誘導と NKT 細胞の必要性について検討した。また、アデノウイルスを用いた遺伝子治療のためにアデノウイルスレセプターのトランスジェニックマウスを用いてアデノウイルスベクターを用いたリンパ球への遺伝子導入を検討した。

井上らは PVA を用いたバイオ人工膵開発を行った。PVA ゲル内に従来の方法で分離したラット膵島を混合し、polyethylene terephthalate (PET) メッシュでサンドイッチ状に挟み、凍結解凍して実験に用いた。解凍後の膵島数を実体顕微鏡下に計測して、膵島回収率を計算した。デバイスおよび遊離膵島を培養し、インスリン分泌試験を行った。またラットの皮下に作製したポケットに、コラーゲン被覆メッシュ補強 PVA バッグを埋入し、その部位に酸性ゼラチン微粒子に含浸させた bFGF (0, 5, 10, 50 μ g) を散布した。2 週間後に血管新生を観察、比較検討した。

篠崎らは腎臓移植を受けた患者を対象に、HLA のマッチング状況、温疎血時間、提供腎臓の品質、術後管理の状況を比較検討し、生着率、及び亜急性拒絶反応の発症率、長期予後の比較を行い、腎臓移植の HLA マッチング方法の変更に伴う安全性を評価する。同時に、これらの腎移植後のレシピエントに対する術後の免疫抑制方法とその程度を元に、細菌性、およびウイルス性感染症の発症の因子、状況、治療方法、脳症の発症、予後を検

証した。また、CJD に代表されるプリオン病や他の感染症に関しても、臓器移植におけるリスク vs. ベネフィットについての考察を行った。

(倫理的配慮) 動物実験は、科学的かつ倫理的な実施を図るため、「動物の保護および管理に関する法律」に基づき、施設内指針に準拠し、各施設において承認された実験計画に従って実施された。腎移植患者での研究では、すべて匿名でのドナー及びレシピエント情報からスクリーニングを実施するために、プライバシーの問題は発生しない。結果の公表に際しても、匿名で実施する予定である。提供、移植施設からの個人の特定もできない。

C. 研究結果

抗 ICOS 抗体投与、ICOSIg 投与によりマウス移植心において著明な内膜肥厚の抑制が見られた。抗 PD-L1 抗体投与でコントロール (17.4 ± 2.9 日) に比し 8.7 ± 0.6 日と拒絶が促進された。4 週間後の冠動脈の狭窄率も抗 PD-L1 抗体投与群で促進していた。免疫染色では、移植心の GAD 病変の血管内皮細胞に PD-L1 の発現が確認された。HGF の短期投与によりマウス移植心の著明な生着延長が認められた。PBS コントロール 11.1 ± 0.6 日に対して、 $200 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 投与群で 39.7 ± 15.6 日、 $500 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 投与群で 56.6 ± 12.0 日と有意に延長した。40% の移植心は 100 日以上生着を続けた。長期生着マウスではドナーの皮膚が全例長期生着し免疫寛容の誘導が証明された。

TNF α で刺激した培養ヒト血管内皮細胞における ICAM-1 の発現はリコンビナント HGF の添加で抑制された。腎虚血再灌流モデルでも ICAM-1 の発現は HGF 投与によって減少し、アポトーシス陽性細胞も減少していた。エレクトロポレーションによる遺伝子導入により HGF は血中に検出されるようになり、6 ヶ月以上持続した。移植腎ではメサンギウム間質、および尿細管間質における線維化は HGF 遺伝子導入群で減少した。

肢移植モデルでは、CD40Ig と CTLA4Ig アデ

ノウイルスベクターの併用により、移植肢の長期生着が可能となった。心移植モデルでは、CD40Ig アデノウイルスベクター単回投与により、長期生着が可能となった。

ラット 8 時間心保存において心筋アポトーシスは著しく増加した。リコンビナント HGF 投与にて心筋アポトーシスは抑制され、再灌流後の心機能の改善を認めた。心機能は HGF 非投与 4 時間心保存後の心機能と同等であった。

免疫寛容ラットの脾細胞では CD4⁺、CD25⁺ 細胞集団 (11.9%) が Naive のラット (8.1%) に比して有意に増加していた。寛容動物から得られたリンパ球の養子移植実験では生着期間が延長したことから、免疫調節機能を持つリンパ球の存在が確認できた。DNA チップによる遺伝子発現の解析では、464 個の有意に変化した遺伝子を見だし 211 個 ($p < 0.05$) の候補遺伝子を見つけた。既知遺伝子で、免疫調節リンパ球において上昇した遺伝子は 58 個、isograft において上昇した遺伝子は 80 個。未知遺伝子について免疫調節リンパ球において上昇した遺伝子は 41 個、isograft において上昇した遺伝子は 35 個であった。

HVJ エンベロープベクターはマウスの尾静脈より注入すると脾臓に遺伝子導入できる。硫酸プロタミンで修飾することにより尾静脈注入すると肺特異的に遺伝子導入が可能となった。またヘパリンと共導入すると導入効率を約 5 倍増強できた。HVJ を高効率で生産できるヒト培養細胞株をクローン化した。これを浮遊培養系で高密度に培養できる条件を決定した。これらによって、無血清培地で大量培養が可能になった。

レシピエントに V α 14NKT ノックアウトマウスを用いると、FK506 で誘導される免疫寛容の成立が困難になる。このことから FK506 で誘導したゼノのラ氏島の移植免疫寛容にも NKT 細胞の存在が必須であることが分かった。

アデノウイルスレセプターのトランスジェニックマウスは、CD2 のエンハンサー、Ick のプロモーター、ヒト成長ホルモンエンハンサーの入った

トランスジェニック作成用のカセットに、細胞質内部分の欠損したヒトの CAR 遺伝子(CARd1)をいれて作成した。このマウスの末梢 T 細胞では 60-80% の効率でアデノウイルスが感染し、組み込んだベクターが発現する。IL-10 遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込み、アロの皮膚移植、アロの膵島移植の系で IL-10 遺伝子導入 T 細胞を移入して、とくにアロの皮膚移植の系で有意に移植片の生着延長が見られた。

PVA を用いたバイオ人工膵での膵島回収率は遊離膵島とデバイスで差がなく、膵島の損失は最小限に抑えられていると考えられた。培養 1 日目のインスリン分泌量は遊離膵島で 14 日目にはほとんど分泌が無くなったのに比べ、デバイスではなおブドウ糖濃度に反応した分泌が観察された。コラーゲンコーティング PVA ゲルによる血管誘導では、bFGF 含浸ゼラチン微粒子をゼラチン微粒子を散布した場合、1 型/4 型混合コラーゲン処理の方が 1 型コラーゲン処理よりも新生血管が多く観察された。一方、bFGF を含浸しないゼラチン微粒子を散布した場合は、コラーゲンの種類によらず、新生血管はわずかであった。50 μ g の bFGF を含浸したゼラチン微粒子を散布しても、MRPB を埋入しなかった場合は、新生血管はわずかであった。

2002 年に実施された腎臓移植 (124 例) の総阻血時間は平均 12 時間 13 分であり、前年より短縮した。L-FABP の値は、阻血時間が採尿された中で最短の症例 (210 分) の場合では、血流再開後 75 分で移植前の 1/5 にまで減少したが、阻血時間伸長に伴い増加した。海外の臓器提供に関するクライテリアの検討を行ったが、CJD など感染症の立場と、社会的ベネフィットの相関に鑑みて作成されたクライテリアが欧米で作成されており、リスク対ベネフィットの算定方法が確立されていた。

D. 考察

末梢性寛容を誘導する方法としてこれまで研究されてきた CTLA4Ig 単独ではヒトの臓器移植で寛容は誘導できない。他の副刺激経路についても研究が必要である。本年度得られた成果として、ICOS、CD40 の重要性が上げられる。ICOSIg は CTLA4Ig との併用で寛容を誘導するが、慢性拒絶も抑制することが判明した。CD40Ig と CTLA4Ig との併用効果も確認できた。また PD-1 が急性、慢性拒絶をともに増強すること、寛容導入に関して重要な新知見である。

HGF がラット腎慢性拒絶を抑制することを報告してきた。今回その機序に関する検討と臨床応用を目指してミニプタにおける遺伝子導入に関する検討を行った。ICAM-1 とアポトーシスの関与が明らかになった。またエレクトロポレーション法でプタ移植腎に遺伝子導入ができ、6 ヶ月後の血中濃度が認められたこと、また線維化を抑制できたことは、臨床応用を考える上で大きな成果であろう。また移植心の保存においても HGF の優れた効果を認めた。遺伝子導入についての検討が進めば、臨床に直結する重要な知見である。

このように遺伝子導入により移植臓器に保護が可能であることは明かであるが、臨床応用を考える上で、重要な技術は遺伝子導入にかかわる安全性、効率、特異性、経済性である。金田らの研究はこの領域における新しい方法を示しており、臓器移植への応用が今後の課題である。

抑制細胞は最新の重要な研究課題である。CD4+、CD25+細胞集団にその分画があることが今回の検討でも確認された。さらに研究協力者の場集田らは *in vitro* で、抗 CD80/CD86 抗体の存在下でドナーとレシピエント脾細胞と混合培養し、抑制 T 細胞を誘導した。この細胞をレシピエントに戻すことにより長期生着が得られることを確認している。さらに詳細な細胞分画の検討とより安全な抑制細胞の誘導法の検討が必要であるが、新たな寛容誘導法として期待される。

NKT 細胞の意義は既に悪性腫瘍に対する効果で

明らかにされている。中山らの移植における成績は寛容における NKT 細胞の存在の重要性を明らかにしており、今後細胞移植や免疫寛容誘導・維持において、応用が可能な技術である考えられる。

免疫隔離による膵島移植実験も臨床応用に近い成果をあげることができた。PVA は生体適合性に優れ、長期間有効なバイオ人工膵の材料として期待される。今回、PVA が凍結によって架橋することを応用して、ゾル状態の PVA に直接膵島を混入してこれを凍結することで、容易に大型化できる PVA デバイスの作製を試みた。今後、マウスやイヌの糖尿病モデルを用いて、in vivo での機能評価を行う予定である。

また今回試作した 1 型 / 4 型混合コラーゲン被覆 PVA デバイスは、bFGF 含浸ゼラチン微粒子と併用することで、周囲に良好な微小循環環境を形成することが確認された新型 PVA デバイスとこの方法を併用すれば、大動物にも応用可能な大型で血管誘導作用を有するデバイスの開発に結びつくものと思われる。

阻血に対する腎近位尿細管細胞へのストレスにより Induce される L-FABP により腎への疎血による影響を評価した。本方法が臨床的に確立されれば、移植時のみでなく腎不全の評価にも用いられる可能性がある。今後の血液中での測定方法の確立が望まれる。感染症に対しての国際比較については、CJD 発症症例数の少ないドナープールに対して、臓器移植におけるリスク vs. ベネフィットにおいてその他の医療行為との分別化が必要であると提言する。

E. 結論

本年度は本研究班での 3 年目として、ヒトへの臨床応用を目指した新技術の開発について様々な新知見を得た。急性拒絶に対する寛容誘導についての新たな副刺激分子の研究ツールの開発とその小動物移植での効果、HGF がもつ急性拒絶、慢性拒絶、臓器保存における優れた効果と臨床応用に直結するブタでの結果をえた。また遺伝子導入技

術バイオ人工膵開発、細胞移植についても一定の成果が得られ、今後の臨床応用の基盤技術の開発が一段進んでいる。さらに研究を深化させ、また分担研究者間での共同研究を進めていく中でトランスレーショナルリサーチを進めていく予定である。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Isobe M, Kosuge H, Koga N, Futamatsu H, Suzuki J: Gene Therapy for Heart Transplantation-associated Acute rejection, Ischemia/reperfusion Injury and Coronary Arteriosclerosis. *Curr Gene Ther*, in press
2. Kosuge H, Suzuki J, Gotoh R, Koga N, Ito H, Isobe M, Inobe M, Uede U: Induction of immuneologic tolerance to cardiac allograft by simultaneous blockade of inducible co-stimulator and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 pathway. *Transplantation*, in press.
3. 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 its attenuation by anti MMP-2 ribozyme gene transfection.. *Cardiovasc Res* 56;472-8, 2002
4. T. Tanaka, N. Ichimura, S. Takahara, K. Yazawa, M. Hatori, K. Suzuki, Y. Isaka, T. Moriyama, E. Imai, H. Azuma, T. Nakamura, A. Okuyama and H. Yamanaka (2002) In vivo gene transfer of hepatocyte growth factor to skeletal muscle prevents changes in rat kidney after 5/6

- nephrectomy. *Am. J. Transplant.*, 2, 828-836.
5. Y. Taniyama, K. Tachibana, K. Hiraoka, M. Aoki, S. Yamamoto, K. Matsumoto, T. Nakamura, T. Ogihara, Y. Kaneda and R. Morishita (2002) Development of safe and efficient novel non-viral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Therapy*, 9, 372-380.
 6. R. Yoshimura, Y. Watanabe, S. Kasai, S. Wada, A. Ohyama, T. Hase, T. Nakatani, J. Chargui, J-L. Touraine and T. Nakamura (2002) Hepatocyte growth factor (HGF) as a rapid diagnostic marker and its potential in the prevention of acute renal rejection. *Transpl. Int.*, 15, 156-162.
 7. Kanaya K, Tsuchida Y, Inobe M, Murakami M, Hirose T, Kon S, Kawaguchi S, Wada T, Yamashita T, Ishii S, Uede T Combined gene therapy with adenovirus vectors containing CTLA4Ig and CD40Ig prolongs survival of composite tissue allografts in rat model. *Transplantation*. 75:275- 281, 2003.
 8. Nomura M, Yamashita K, Murakami M, Takehara M, Echizenya H, Sunahara M, Kitagawa N, Fujita M, Furukawa H, Uede T, Todo S Induction of donor-specific tolerance by adenovirus-mediated CD 40Ig gene therapy in rat liver transplantation. *Transplantation*. 73:1403-1410, 2002.
 9. A potential cardioprotective role of hepatocyte growth factor in myocardial infarction in rats. H Ueda, Y Sawa, H Matsuda et al. *Cardiovascular Research*; 51:41-50.2001.
 10. Guo, X-K, Li, N. Funeshima, M. Fujino, 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 (ICOS). *Transplantation* 73(7): 1027-1032, 2002.
 11. L. Guo, M. Fujino, H. Kimura, N. Funeshima, Y. Kitazawa, Y. Harihara, K. Tezuka, M. Makuuchi, S. Suzuki, X-K. Li Simultaneous Blockade of Co-stimulatory Signals, CD28 and ICOS, Induced a Stable Tolerance in Rat Heart Transplantation. *Transpl Immunol* (In press)
 12. A potential cardioprotective role of hepatocyte growth factor in myocardial infarction in rats. H Ueda, Y Sawa, H Matsuda et al. *Cardiovasc Res*; 51:41-50.2001.
 13. Kaneda, Y., Nakajima, T., Nishikawa, T., Yamamoto, S., Ikegami, H., Suzuki, N., Nakamura, H., Morishita, R., and Kotani, H.: HVJ (hemagglutinating virus of Japan) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Molecular Therapy* 6, 219-226, 2002.
 14. Suzuki, K., Martuza, B., Suzuki, N., Khan, M., Kaneda, Y., and Yacoub, M.: Human cytomegalovirus immediate-early protein IE2-86, but not IE1-72, causes graft coronary arteriopathy in the transplanted rat heart. *Circulation* 106, 1-158-162, 2002.
 15. Suto, A., Nakajima, H., Ikeda, K., Kubo, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Saito, Y., and Iwamoto, I.: CD4⁺ CD25⁺ T-cell development is regulated by at least 2 distinct mechanisms. *Blood* 99:555-560

(2002).

16. Kamata, T., Yamashita, M., Kimura, M., Murata, K., Inami M., Shimizu, C., Sugaya, K., Wang C.-R., Taniguchi, M., and Nakayama, T.: src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase SHP-1 controls the development of allergic airway inflammation. *J Clin Invest* 111:109-119, 2003.
17. Wang W.J., Gu Y.J., Tabata Y., Miyamoto M., Hori H., Nagata N., Toma M., Balamurugan A.N., Kawakami Y., Nozawa M., Inoue K.: Reversal of diabetes in mice by xenotransplantation of bioartificial pancreas in a prevascularized subcutaneous site. *Transplantation* 73 : 122-129, 2002
18. Wang WJ, Gu YJ, Hori H, Sakurai T., Hiura H., Sumi S., Tabata Y. Inoue K.: Restoration of normoglycemia in diabetic mice by xenotransplantation of macroencapsulated porcine pancreatic endocrine cells into a prevascularized subcutaneous site. *Transplantation* (in press).

2. 学会発表等

1. Kosuge H, Suzuki J, Gotoh R, Koga N, Isobe M, Inobe M, Uede T: Induction of tolerance to cardiac allografts by a combined treatment with inducible costimulator-immunoglobulin (ICOSIg) and CTLA4Ig: Attenuation of graft artery disease. American Heart Association Scientific Meeting, Chicago, 2002, 11月
2. Inhibition of the ICOS-B7h T cell costimulatory pathway abrogates long-term allograft survival induced by B7 blockade. AST-ASTS meeting, April, 2002. (Salama AD, Yuan X, Uede T, Sayegh MH)

3. Li X-K, Kawasaki M, Funeshima N, Okuyama T, Kosuga M, Suzuki S. CrmA gene expression protects mice against concanavalin A-induced hepatitis by inhibition of IL-18 secretion and hepatocyte apoptosis. The American Society of Gene Therapy's 5th Annual Meeting. Boston, June 5-9, 2002.
4. Overexpression of 150-kDa Oxygen-regulated Protein(ORP-150) Attenuates Myocardial Ischemia-Reperfusion injury in Rat Heart: A Role of ORP-150 in Myocardium. Alechine AN, Sawa Y, Ono M, et al. AHA 2002. 11.16-21
5. Hiura A, Inoue K: Subcutaneous implantation therapy of macroencapsulated islets for diabetes mellitus. 29th Annual Meeting and Exposition of Controlled Release Society. Mini-Symposia " Drug Delivery for Diabetic Disease Treatment Symposium, Second Department of Internal Medicine" (2002. 7.22 Seoul)

H.知的所有権の取得状況

1. 特許取得

篠崎尚史:

特願 2003-071029 「腎臓幹細胞/前駆細胞、腎臓幹細胞/前駆細胞の分離方法、及び腎疾患の治療方法

2. 実用新案登録

金田安史: "化学療法剤を封入した医薬製剤" 特願 2002-320577

金田安史: "ゲノムライブラリーの迅速スクリーニングおよび高効率遺伝子機能解析方法" 特願 2002-337545

3. その他

無し

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

転写因子、補助シグナルの制御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 PD-1 経路の拒絶反応における役割を検討した。ICOS の阻害を行うと慢性心拒絶反応が抑制される。抗 PD-1 または PD-L1 抗体により急性・慢性拒絶は促進することから PD-1 は T 細胞に抑制性のシグナルを入れているものと考えられる。HGF を短期投与することにより移植心に対する免疫寛容を導入することが出来る。機序の解明は今後の課題である。ミニブタを用いた心移植実験系で慢性拒絶反応のモデルを作成した。今後このモデルで遺伝子治療の安全性と効果に関する検討を行う。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 4 例で長期生着を得た。

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以下の通りである。いずれも前年の研究成果を踏まえ、研究を発展させた。最終的には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、場集田、伊藤と共同して行った。

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 と PD-1 に着目して、本分子の阻害により、急性・慢性拒絶反応にどのような変化が見られるかを検討する。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。最近同定された ICOS(inducible costimulator)について、その機能を阻害する ICOSIg と CTLA4Ig の併用により約半数のマウスにおいて移植心が長期生着し、その免疫抑制が抗原特異的であること、即ち免疫寛容が誘導されることを昨年までに報告した。今年度はさらに ICOS の阻害が心慢性拒絶に及ぼす効果を検討した。

PD-1 も最近同定された T 細胞活性化に関わる副刺激分子である。抑制性のシグナルを伝達するとする報告があるが、一方逆の結果を報告する論文も見られる。我々は PD-1 とそのリガンドの一つである PD-L1 に対するモノクローナル抗体によりその機能阻害を行い、マウス移植心に対する急性・慢性拒絶に対する効果を検討した。

②組織保護作用や血管新生作用を有する Hepatocyte growth factor (HGF)が急性拒絶反応に及ぼす効果を検討する。HGF がラット腎移植において保護的な作用を示し、免疫抑制剤の非投与下で線維化などの慢性的な組織障害を抑制することが本班での中村らの研究で示されてきた。その機序についてはなお不明な点が多い。我々はその強力な組織保護作用が急性拒絶に及ぼす効果についてマウス移植心モデルを用いて検討した。

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。ミニブタを用いて、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心筋保護を目的とした心筋虚血再灌流障害の検討。低酸素刺激による心筋のアポトーシスには細胞周期制御因子の活性化が関与している。NO が細胞周期制御因子の制御に関与しているという報告もある。今回虚血/再灌流刺激による心筋のアポトーシスにおける細胞周期制御因子と NO の関わりについて検討した。

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 抗体の存在下に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。既に昨年度の研究でサル腎移植モデルで、同様の手法により移植腎が長期生着することを見出しているが、さらに匹数を増やしその効果と機序を検討する。

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東京医科歯科大学と信州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。

①ICOS 経路の阻害：慢性拒絶を検討するために C57BL/6 の心臓を Bm12 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。抗 ICOS 抗体(100 μ g)、ICOSIg(50 μ g)を移植直後、週一回ずつ腹腔内に投与して、56 日目に病理学的検討を行った。

PD-1 に関する検討：急性拒絶モデルとして、ドナーに C57BL/6 マウス、レシピエントに Balb/c マウスを用いた。抗体は抗-PD-1 200 μ g/日または抗 PD-L1 200 μ /日を、Day 0, 2, 4, 6 に投与した。慢性拒絶のモデルとしてはドナーに C57BL/6 マウス、レシピエントに Bm12 マウスを用いた。抗体は PD-

1 抗体(200 μ g/日)または PD-L1 抗体 (200 μ /日)を週 2 回、4 週間投与した。急性拒絶は移植心の拍動の日数で評価し、慢性拒絶は 4 週間後の移植心の冠動脈硬化を病理学的に評価した。また RNA protection assay により移植心での mRNA の解析を行った。

②HGF の急性拒絶への効果は上記と同様の系で検討した。100 または 250 μ g/kg のリコンビナント HGF を一日 2 回 14 日間投与して、生着期間を検討した。血中 HGF 値、移植心におけるサイトカイン mRNA の発現は real-time RT-PCR により検討し、受容体である c-Met の発現は免疫染色を用いて検討した。移植心が長期生着したマウスには皮膚移植によるチャレンジテストを行った。

③ ミニプタで異所性心移植を行った。サイクロスポリンにより免疫抑制を行い、3 ヶ月の観察期間で慢性拒絶反応の出現を検討した。拒絶は心エコーで定期的にフォローし、またサイクロスポリンの血中濃度をモニターして適切な免疫抑制を行った。3 ヶ月後に病理学的検討を行った。

④ 新生児ラット培養心筋細胞を 1 時間低酸素刺激に曝露した後に再酸素化するという方法で再灌流刺激を加えた。TUNEL 法によりアポトーシスと培地内の NO 濃度を Griess 法で経時的に測定した。NOS 阻害剤である Nitro-L-arginine methylester (L-NAME, 10⁻³M)の効果を検討した。Western Blotting 法にて再灌流刺激による cyclin A, cdk 阻害因子のひとつである p21cip1/waf1 の蛋白量の変化について検討した。

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た。ドナーの脾細胞は放射線照射した。ex vivo で抗 CD80/CD86 抗体を添加して二週間混合培養を行った。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ファミドを用いて免疫

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 副刺激の障害：

ICOSの阻害

図 1 に示すように、無治療コントロールマウスでは内膜の血管内腔に占める率は $70 \pm 6\%$ であったのに対し、抗 ICOS 抗体投与マウスでは $8.3 \pm 4.8\%$ 、ICOSIg 投与マウスでは $10 \pm 5.6\%$ と著明な内膜肥厚の抑制が見られた。

抗 PD-L1 抗体の効果

急性拒絶：移植心の生着に関しては、無治療群は 17.4 ± 2.9 day、抗 PD-1 抗体投与群では 17.7 ± 7 dayであったのに対し、抗 PD-L1 抗体投与群では 8.7 ± 0.6 day であり、有意に拒絶が促進されていた ($p < 0.05$)。免疫染色では、移植心 (day7) への浸潤した単核球に PDL1 の発現が認められた。移植後 5 日、7 日では IFN- γ の発現が亢進していた。

慢性拒絶：4 週間後の冠動脈の狭窄率は、無治療群 $7.4 \pm 3.1\%$ 、抗 PD-1 抗体投与群 $8.4 \pm 5.5\%$ に対して、抗 PD-L1 抗体投与群では $48 \pm 11\%$ と有意に冠動脈の狭窄が促進していた。 ($p < 0.05$) 免疫染色では、移植心の GAD 病変の血管内皮細胞に PD-L1 の発現が確認された (図 2)。

② HGF の効果：HGF の短期投与によりマウス移植心の著明な生着延長が認められた。PBS コントロール 11.1 ± 0.6 日に対して、 $200 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 投与群で 39.7 ± 15.6 日、 $500 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 投与群で 56.6 ± 12.0 日と有意に延長した。40%の移植心は 100 日以上生着を続けた。長期生着マウスにドナー及びサ

ードパーティーの皮膚移植を行った。ドナー (Balb/c) の皮膚は全例が長期生着し、サードパーティー (C57BL/10) の皮膚は 2 週以内に拒絶された。免疫寛容の誘導が証明された。組織学的にも移植後 4 日目のグラフト内の細胞浸潤は HGF 群で著明に抑制されていた。C-Met mRNA の発現は正常心では見られなかったが、無治療移植心では、4 日目より発現の亢進が認められた。HGF 治療マウスでの発現は無治療心より観察期間を通じて高値であった。免疫組織学的には心筋細胞を中心に発現が認められた。サイトカイン mRNA の発現について検討したところ、HGF 投与群では INF γ の発現が抑制され、IL-10、TGF- β の発現が期間を通して無治療群より亢進していた。

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。19 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。3 ヶ月で採取した移植心 4 ヶ (21%) で病理学的に著明な内膜肥厚を確認できた (図 3)。

④ 再灌流刺激による心筋細胞のアポトーシスは 24 時間後に有意に上昇していた [対照群; $9.3 \pm 0.8\%$ 、再灌流刺激群; $20.6 \pm 2.7\%$]。また、培地内の NO 濃度は 15 分後以降で有意に上昇していた [15 分後: 1.8 ± 0.2 -fold]。L-NAME で処理するとアポトーシスをきたした心筋細胞の数は更に上昇した [再灌流刺激群; $36.2 \pm 1.7\%$]。cyclin A、p21cip1/waf1 の蛋白量も同様な変化を示した。cyclin A に関連した Kinase 活性は上昇していたが、cyclin E に関連した Kinase 活性は有意な変化を認めなかった。L-NAME 処理下では cyclin A の蛋白量は更に増加していたのに対し、p21cip1/waf1 の蛋白量の増加は有意に抑制された。cyclin A に関連した Kinase 活性は更に上昇していた。

⑤ 抑制性 T 細胞：4 例で移植腎が長期生着している。500 日、450 日、150 日、50 日を越えて生存中であ

る。長期生着サルに対して、行った皮膚移植では免疫抑制は抗原特異的であることが示されている。In vitro では CD4 陽性分画に免疫抑制機能を有する細胞群が存在することが示されているが、詳細は検討中である。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副刺激の阻害による寛容誘導は 10 年来世界的に研究が進み、CLA4Ig による寛容導入の臨床応用が期待されてきた。現在のところ、CTLA4Ig 単独での寛容誘導は臨床では実現していない。CD154 (CD40L) の阻害との併用に期待がかかっているが、血栓症などの問題が指摘されている。人の免疫系でも末梢性寛容誘導は可能と考えられるが、副刺激の経路については未解決の問題が残されており、複数の経路についての役割分担についてさらに詳細な検討が必要であろう。最近同定された副刺激経路として、ICOS の他に、PD-1、4-1BB、HVEM などがある。それらの移植免疫における役割はほとんどわかっていない。前年度までの研究で、我々は ICOS と CTLA4 (CD28) 経路の同時阻害で免疫寛容が導入できることを報告してきた。今回、ICOS 経路が慢性拒絶に関わっていることが明らかにされた。今後さらに他の経路についての検討が必要である。

PD-1 についても移植における役割はほとんどわかっていない。PD-1 は T 細胞に抑制性の副刺激を入れると想定されており、今回の結果からも抗 PD-1 抗体や抗 PD-L1 抗体投与により急性拒絶反応、慢性拒絶反応がともに促進された。PD-1-PD-L1 の経路は移植免疫において抑制的な役割を果たしているものと考えられる。米国 Hancock らの研究は反対の結果を示しており、なお今後の検討が必要である。

②HGF による急性拒絶の抑制と寛容の導入は初めて報告される成果である。既に移植腎の慢性的な機能保持に有効であることと合わせて、臨床的な意義

が高い結果である。今後はその機序についての検討が課題である。T 細胞の修飾、心筋アポトーシスの抑制、NF κ B や接着分子の機能阻害による抗炎症効果などを中心に今後検討していく予定である。また臨床応用を目指して大動物での実験を計画する。

③ミニブタ心移植における慢性拒絶モデルの作成：3 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。昨年より例数を増やし、系として安定させることが出来た。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虚血再灌流障害における NO と心筋アポトーシスの検討：再灌流刺激により心筋細胞から放出された NO は cyclin A に関連した Kinase 活性を抑制することで心筋細胞のアポトーシスを抑制する作用があり、その機序に p21^{cip1/waf1} 蛋白の増加が関与している可能性が示唆された。今後はこの成果を臨床的な心保存の改良に生かしていくために、小動物における実験を行う予定である。

⑤抑制性 T 細胞の寛容誘導：本年度は長期生着した腎移植のサルを増やすことと、500 日に及ぶ生着が可能であること、免疫抑制の抗原特異性を示すことが出来た。この寛容誘導は、マウスを用いての実験で移入細胞中の CD25 陽性細胞が免疫抑制の鍵を担うことが判明している。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。ヒトへの応用を考えると問題となることの一つは、培養に用いるマウス抗体の安全性である。今後は培養時に抗体の代わりに CTLA4Ig が使用可能か否かについて検討していく予定である。

E. 結論

三年計画の最終年度として急性拒絶、心慢性拒絶反応における諸因子の役割の解明を行ってきた。急性拒絶、慢性拒絶における PD-1 の関与、HGF による寛容誘導、慢性拒絶における ICOS 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プタモデルが安定した。心保存における NO とアポトーシスの関連について新しい知見を得た。さらに抑制 T 細胞の存在をサル腎移植モデルで示した。今後はそれぞれが臨床応用に向けて必要とされるステップに向けての検討を行っていく予定である。

F. 研究発表

論文発表

1. Suzuki J, Cole SE, Batirel S, Kosuge H, Shimizu K, Isobe M, Libby P, Mitchell RN. Tumor necrosis factor receptor -1 and -2 double deficiency reduces graft arterial disease in murine cardiac allografts . Am J Transplant, in press
2. Isobe M, Kosuge H, Koga N, Futamatsu H, Suzuki J: Gene Therapy for Heart Transplantation-associated Acute rejection, Ischemia/reperfusion Injury and Coronary Arteriosclerosis. Curr Gene Ther, in press
3. Kosuge H, Suzuki J, Gotoh R, Koga N, Ito H, Isobe M, Inobe M, Uede U: Induction of immuneologic tolerance to cardiac allograft by simultaneous blockade of inducible co-stimulator and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 pathway. Transplantation, in press.
4. Futamatsu H, Suzuki J, Kosuge H, Yokoseki O, Kamada M, Ito H, Inobe M, Isobe M, Uede T: Attenuation of Experimental Autoimmune Myocarditis by Blocking

Activated T Cells through Inducible Costimulatory Molecule Pathway. Cardiovasc Res, in press

5. Watanabe Y, Yoshimura R, Wada S, Chargui J, Suzuki J, Kishimoto T, Isobe M: Expression of myosin heavy chain B (SMemb) in rat allogeneic kidney transplantation. Nephron 91:316-323, 2002
6. 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 its attenuation by anti MMP-2 ribozyme gene transfection.. Cardiovasc Res 56:472-8, 2002
7. Isobe M: Sensitive Detection of cardiac allograft rejection by radioimmune scintigraphy targeting accessory molecules on cardiac myocytes. Cardiac Allograft Rejection. ed. Dec W, Ballester M, Narula J, Kluwer Academic Publishers, Nowell, pp367-380, 2001.
8. Tamamori-Adachi M, Ito H, S Piyamas, Adachi S, Hiroe M, Shimizu M, Kawauchi J, Sunamori M, Marumo F, Kitajima S, Ikeda M, Tamamori-Adachi M, Ito H, S Piyamas. et al. Critical role of Cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation. Circ Res. 92 12-19, 2003 (Web version: December 2, 2002)
9. Tamamori-Adachi M, Ito H, Nobori K, Hayashida K, Kawauchi J, Adachi S, Ikeda M, Kitajima S. Expression of cyclin D1 and CDK4 causes hypertrophic growth of cardiomyocytes in culture: a possible implication for cardiac hypertrophy.

Biochem. Biophys. Res Commun.
296(2):274-80, 2002

10. Akiyama Y, Shirasugi N, Uchida N, Matsumoto K, Kitajima M, Bashuda H, Yagita H, Okumura K, Aramaki O, Niimi M. B7/CTLA4 pathway is essential for generating regulatory cells after intratracheal delivery of alloantigen in mice. : Transplantation. 74: 732-738, 2002
11. 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. 71: 561-564, 2001
12. 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. 98: 2577-2581, 2001

学会発表

1. Wada Y, Suzuki J, Fujimori M, Tsukioka K, Sawa Y, Kaneda Y, Isobe M, Amano J : Intimal hyperplasia in cardiac allografts is dependent upon transcriptional regulator EGR-1 odn transfection . XII International Vascular Biology Meeting, 軽井沢, 2002
2. Kosuge H, Suzuki J, Gotoh R, Koga N, Isobe M, Inobe M, Uede T : Induction of tolerance to cardiac allografts by a combined treatment with inducible costimulator-immunoglobulin (ICOSIg) and CTLA4Ig:

Attenuation of graft artery disease.
American Heart Association Scientific Meeting, Chicago, 2002、11月

3. Yamaura K, Tsukioka K, Suzuki J, Fujimori M, Wada Y, Ito K, Morishita R, Kaneda Y, Isobe M, Amano J : Expression of matrix metalloproteinases in cardiac allograft vasculopathy and its attenuation by anti MMP-2 ribozyme gene transfection. American Heart Association Scientific Meeting, Chicago, 2002、11月

G. 知的所有権の出願・取得状況 なし。

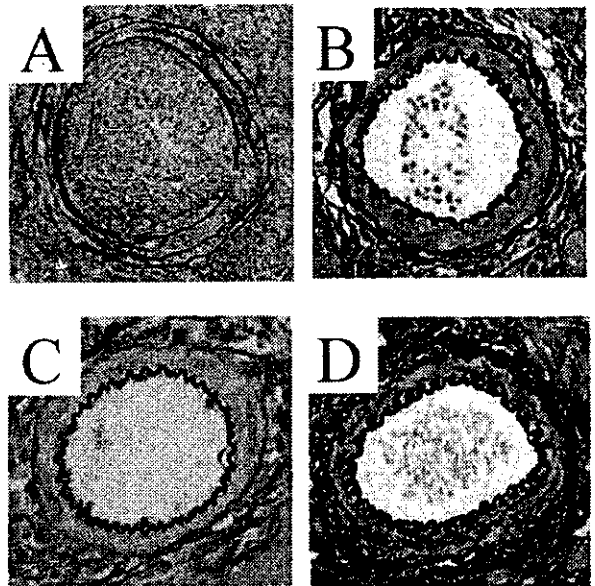


図 1 ICOS の阻害によるマウス心慢性拒絶反応の抑制。A: 無治療コントロール、B: 抗 ICOS 抗体投与、C: ICOSIg 投与、D: イソグラフト

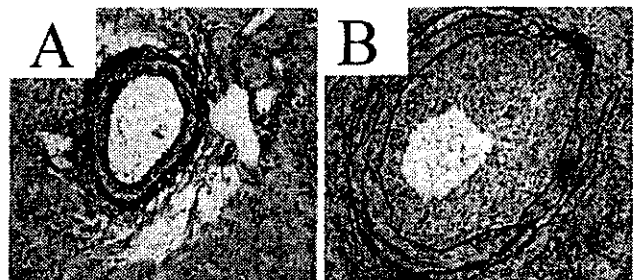


図 2 抗 PD-L1 抗体投与の効果。A: 無治療コントロール、B: 抗 PD-L1 抗体投与マウス。