

図 3 ミニブタで移植後 3 ヶ  
月目に見られた冠動脈内膜肥  
厚

# 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

## 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・教授

### 研究要旨

私達はHGFが肝・腎を始めとする様々な実質臓器において組織再生因子、臓器保護因子として機能することを明らかにして来た。以上の背景の元、ラット腎移植モデルを用いてHGFが腎移植後の虚血再灌流傷害を抑制するとともに『免疫寛容』を誘導し、慢性拒絶反応の発症を完全にブロックすることを報告した。そこで本年度は、腎虚血のマウスモデルを用い、虚血再灌流傷害の初期病態とされる血管内皮傷害および実質破壊に中心的な役割を担う好中球の動態に着目した。その結果、HGFは血管内皮細胞でのアポトーシス抑制と接着分子発現制御を介して、好中球を始めとする白血球浸潤をブロックすることを見出した。さらにHGFによる安全な腎移植技術を確認すべく、大型実験動物であるブタを用いて腎局所に特異的なHGF遺伝子発現系の確立に成功した。この系を用いて腎移植を実施したところ、HGFの遺伝子導入によっても移植後の腎硬化症が抑制されることが確認された。以上の結果から、血管内皮での恒常性維持機能ならびにネフロン保護機能を両有するHGF（またはその遺伝子）の体外的補充は、安全かつ有効な腎移植技術の確立に向けて合理的な治療戦略に成ることが期待される。

### A. 研究目的

腎移植は我国で行われている臓器移植の中では（角膜移植と並んで）もっとも施行例も多い。腎移植によって血液透析からの離脱、社会復帰が期待される一方、リンパ球浸潤／腎硬化症に代表される慢性拒絶反応が克服すべき大きな課題として残されている。この点について慢性拒絶反応の発症率と術後1週間以内に起こる虚血再灌流傷害の程度が密接に相関することがよく知られている。このことから、周術期の虚血再灌流傷害の制御が移植後の安定したグラフト腎の保持において最初に克服すべき問題と言える。

虚血再灌流傷害は腎臓などの多くの臓器移植において外科的手技上よく遭遇する問題である。虚血再灌流傷害の最上流病態として血行再開に伴う好中球の血管内皮細胞への接着が重要である。接着した好中球は

血管内皮細胞をアポトーシスに陥れることも判明している。虚血に暴露された組織の血管ではICAM-1などの接着に関わる分子の発現が速やかに誘導される一方、この分子の発現制御が移植後の拒絶反応の発症回避に有効であることも明らかにされている。虚血によって引き起こされる血管内皮での病的イベントをHGFによって制御できれば、虚血再灌流傷害の作用起点に対する理解を深めるのみならず、炎症時における生体恒常性維持機構の解明に向けて大きなインパクトを持つことが期待される。

以上の背景の元、本年度は虚血組織の中でもとりわけ血管バリアーに注目し、内皮細胞での接着分子の発現、好中球接着およびアポトーシス誘導に対するHGFの機能を解析することとした。その一方でヒトでの実用に向けて生体内で長期に安定してHGF蛋白を発現させるシステムの構築が

不可欠である。そこで大型実験動物であるブタにHGF遺伝子導入を行い、HGF蛋白発現を持続できる条件を検討した。次いで、この発現系を用いて腎移植を行い、HGF遺伝子導入によっても腎移植後の白血球浸潤／組織線維化が制御できる可能性を検証することとした。

## B. 研究方法

### 1) 腎虚血時の内皮ICAM-1発現誘導に対するHGFの抑制

虚血再灌流後の管内皮細胞におけるICAM-1発現制御機構を明らかにすべく、培養細胞を用いたin vitro系および腎虚血マウスモデルを用いたin vivo系を用いてHGFによる機能解析に着手した。虚血時には炎症性サイトカニンやラジカル物質の刺激により内皮細胞にICAM-1の発現が迅速に誘導される。そこで今回、代表的な炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ を用いて培養したヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を刺激し、ICAM-1の発現に対するHGFの影響をウエスタンブロット法により解析した。

さらに虚血時における腎組織でのICAM-1の発現を見るために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。このマウスモデルにリコンビナントHGFを投与し、腎間質血管におけるICAM-1の発現を酵素抗体法により検出する一方、その発現程度を染色スコアにより数値化させた。次いで好中球による血管内壁接着およびアポトーシスの発症をそれぞれGr-1およびTUNEL染色を用いて解析し、HGFによる病態修飾の可能性を解析した。さらに血管傷害を示す水腫形成の程度、好中球の血管外漏出、尿細管上皮細胞のアポトーシスといった一連の病態に対するHGFの効果も詳細に調べた。これによりHGFによる腎虚血時の腎傷害抑制の作用起点を明らかにすることを目指した。

### 2) ブタにおけるHGF遺伝子導入法の条件検討と腎移植への応用

HGFによる腎移植後のグラフト生着率

の向上を目指す上で腎特異的にHGF蛋白を供給できる技術の開発が重要である。そこでヒトHGF cDNAのnaked plasmidを構築し、ミニブタを用いて腎特異的なHGF遺伝子導入技術の確立を目指した。順行性投与経路として腎動脈、逆行性投与経路として尿管を選択し、HGF遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだnaked plasmidを注入した。さらに腎組織全体を生食入りのバットに沈めて通電し、いわゆるエレクトロポレーションによる遺伝子導入効率の改善を試みた。外来遺伝子の発現はゲノムに対するPCR法によって確認し、導入後6か月までフォローアップした。外来性HGF蛋白の発現はヒトHGFのみを特異的に認識する抗体を用いたELISAおよび免疫組織化学の手法を用いて解析した。

次いでこの生体遺伝子導入系を用いて腎移植後の拒絶反応に及ぼすHGF発現の影響を病理学的に調べた。即ち、マクロファージやリンパ球といった免疫担当細胞の流入を観察するとともに、線維化に重要な役割を担う筋線維芽細胞の発現を $\alpha$ -SMAを指標に解析した。さらにマッソントリクローム染色を行い、尿細管間質およびメサンギウム間質における線維物質の沈着領域をコンピュータ上で画像解析し、その面積を数値化した。

## C. 研究結果

### 1) HGFから見た血管内皮細胞でのICAM-1発現誘導制御機構の解析

ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) の培養系ではTNF- $\alpha$ 刺激後3時間目よりICAM-1蛋白の発現が検出できることがウエスタンブロット解析によって確認された。一方、この系にリコンビナントHGFを添加したところ、その用量に依存してICAM-1の発現が抑制されることが明らかとなった。

一方、腎虚血のマウスモデルにおいても虚血-再灌流後3時間目で既にICAM-1の発現が間質小血管の内皮に沿って連続的に観察された。一方、HGF投与群ではこの

ような内皮でのICAM-1発現は弱くその分布も極めて断続的であった。このようなHGFによるICAM-1発現の抑制に一致して血管内皮に接着する好中球の数もHGF投与群で減少していた。さらにTUNEL染色を用いて血管内皮細胞でのアポトーシス陽性細胞を数えてみると、HGF群では有意に減少していることが判明した。これにもなって血管バリアーの破綻を反映する間質血管周囲での水腫形成はHGF投与によって有意に抑制されていた。以上に示したHGFによる虚血後の血管傷害の抑制に一致して尿細管間質における好中球、マクロファージおよびCD4+/CD8+細胞の浸潤が虚血-再灌流後の既に3時間目からHGF投与群では抑制されていることが確認された。さらにHGFは尿細管上皮の脱落、アポトーシス発症を阻止するとともに高カリウム血症や蛋白尿で見た腎不全の発症を抑制することが実証された。

## 2) ミニブタにおけるHGF遺伝子導入を介した慢性腎拒絶反応の制御

大阪大学第1内科・今井らのグループとの共同研究の元、ブタの腎臓にヒトHGF cDNAのnaked plasmidを投与するとともにエレクトロポレーションの影響を検討した。その結果、腎動脈から上行性に注入した場合は皮質の糸球体(特にメサンギウム細胞)を中心にHGF蛋白が発現していることが免疫組織化学的手法を用いた検討から明らかとなった。一方、尿管から逆行性に入れた場合は髄質/皮髄質境界部の尿細管周囲線維芽細胞/血管内皮細胞(および一部の尿細管上皮細胞)に選択的に外来性HGFの発現が見られた。ヒトHGF特異的なELISA系を用いて外来性HGFの発現量を測定したところ、HGF遺伝子導入群では1 ng/g以上の発現が認められた。さらにHGF遺伝子導入群ではゲノムPCRによってhuman HGF cDNAの発現が腎臓においてのみ検出されること、この発現は導入後も6か月以上維持されることが明らかとなった。

次に腎特異的なHGF遺伝子導入系を用いて実際に腎移植を行い、慢性拒絶反応の発症に及ぼす影響を観察した。現在迄術後6か月までフォローアップした限り、メサンギウム間質ならびに尿細管間質における線維化エリアの面積はHGF遺伝子導入群で(ルシフェラーゼ遺伝子を導入した対照群と比較して有意に減少していることが明らかとなった。これに一致して白血球浸潤および $\alpha$ -SAMで見た間質での筋線維芽細胞の過形成もHGF遺伝子導入によって抑制されることが確認された。

## D. 考察

虚血-再灌流傷害は腎臓のみならず、肝臓や心臓などほとんど全ての臓器の移植医療に共通する厄介な問題である。私達は腎臓を始め、肝臓や肺、心臓などの多くの臓器でHGFの初期投与が虚血-再灌流傷害をブロックすることを明らかにして来た。このメカニズムの一端として腎尿細管上皮や心筋細胞などの実質細胞におけるBcl-xLなどの抗アポトーシス分子の早期誘導の可能性を提唱して来た。その一方で虚血-再灌流傷害の最上流病態である血管イベントに対するHGFの効果は全く不明であった。今回、HGFが血管内皮細胞での恒常性維持に寄与し、好中球の接着、漏出を阻止する機能があることを明らかにした。

長時間の虚血に暴露された血管内皮細胞では転写因子NF- $\kappa$ Bの活性化/核内移行によってTNF- $\alpha$ 、IL-1、-6、-8、などの炎症性サイトカイン、E-selectin/ICAM-1などの接着分子の転写が促進される。これにより好中球の遊走、接着が誘起される。今回、HUVEC細胞を用いた検討から、HGFが内皮に直接作用してICAM-1の発現を抑制することが明らかとなった。ICAM-1の発現抑制が虚血-再灌流傷害の抑制につながることはノックアウトマウスや中和抗体投与の実験から明らかにされている。HGFはほとんど全ての臓器で虚血-再灌流傷害を阻止することから、私達は共通のメカニズムが存在すると予測して来

た。今回新たになったHGFによる血管内皮を主座とした接着分子発現抑制機構の駆動は臓器移植の対象となる多くの実質臓器で虚血-再灌流傷害の発症阻止に有効と考えられる。

一方、血管バリアーをすり抜けて間質に進出した好中球はエラストラーゼなどの蛋白質分解酵素を放出し、ネフロン実質細胞をアポトーシスに陥れる。死滅した尿細管の周囲にはマクロファージやTリンパ球が浸潤し、免疫初期感作が起こる。これにより抗原メモリーをインプットした白血球がネフロンを攻撃し、免疫学的な拒絶反応が駆動される。HGFは好中球の血管外漏出の機会を減らし、尿細管の破壊を最小限に抑えることで、免疫初期感作ならびに慢性拒絶反応の発症を抑制している可能性が考えられた。

一方、HGFによる安全な腎移植技術を実現するにあたって、HGF蛋白を腎特異的に発現させる遺伝子導入技術の開発が重要と考えられる。HGFの遺伝子治療は既に閉塞性動脈硬化症 (ASO) の症例に対して一昨年より阪大附属病院で実施され、その安全性と有効性が確認されつつある。今回、ASOの際に用いたnaked plasmidを用い、エレクトロポレーション法との併用により安全かつ腎特異的にHGF発現を維持できる技術が開発された。実際、この系に腎移植を適用した結果、腎硬化症に代表される慢性拒絶反応がHGFのジーンドラッグによっても抑制できることが確認された。また、腎動脈/尿管と言う2つのcDNA注入経路を組み合わせることで、皮質と髄質の両方にHGF発現を誘導することが可能となった点でも重要な意味を持つ。現在、臨床応用に向けてブタでの基礎的データが集積されつつある。

以上、HGFによる内皮バリアー保護を介した白血球浸潤抑制が虚血-再灌流傷害の発症予防を担う可能性に言及して来た。一方でHGFは尿細管上皮に直接作用し、Bcl-xLの発現誘導を介した細胞死抑制、細胞増殖/形態形成を介した組織修復に寄与

することも確認している。HGFは腎虚血部位に対しては血管新生促進因子として機能し、局所を好氣的にすることで組織再生に有利な環境を提供する。さらにHGFは線維化組織に対してはマトリックスを分解して間質線維化を解除させる。このような多岐に渡る生理活性を合わせ持つHGFの体外的補充は、安全な腎移植医療技術の確立に向けて、大きな意義を持つものと考えられる。

## E. 結論

慢性拒絶反応の発症と深く関わる虚血-再灌流傷害の発症に対するHGFの腎保護効果とその作用起点を解析した。その結果、HGFは腎虚血後の血管内皮細胞での恒常性を維持することによって(好中球を始めとする)白血球の浸潤をブロックしていることが判明した。このことから、HGFは免疫初期感作を抑制することにより免疫寛容を誘導している可能性が考えられた。その一方で、ミニブタを用いて腎特異的なHGF遺伝子導入法を確立するとともに、腎移植後の慢性拒絶反応抑制に対するHGF遺伝子治療の可能性を実験的に立証した。

## F. 研究成果

1. K. Bessho, S. Mizuno, K. Matsumoto, and T. Nakamura (2003) Counteractive effects of HGF on PDGF-mediated mesangial cell proliferation in a rat model of glomerulonephritis. **Am. J. Physiol.**, in press.
2. H. Funakoshi, and T. Nakamura (2003) Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. **Clin Chim Acta** 327:1-23.
3. S. Yoshida, Y. Yamaguchi, S. Itami, K. Yoshikawa, Y. Tabata, K. Matsumoto, and T. Nakamura (2003) Neutralization of hepatocyte growth factor leads to retarded cutaneous wound healing associated with decreased neovascularization and granulation tissue formation. **J. Dermatol. Invest.**, 120:

- 335-343.
4. T. Inoue, H. Okada, T. Kobayashi, Y. Watanabe, Y. Kanno, J.B. Kopp, T. Nishida, M. Takigawa, M. Ueno, T. Nakamura, and H. Suzuki (2003) Hepatocyte growth factor counteracts transforming growth factor- $\beta$ 1, through attenuation of connective growth factor induction, and prevents renal fibrogenesis in 5/6-nephrectomized mice. **FASEB J.**, 17: 268-280
  5. K. Matsumoto and T. Nakamura (2002) Renotropic role and therapeutic potential of HGF in the kidney. **Nephrol. Dial. Transplant.**, 17 (Suppl 9), 59-61.
  6. W. Sun, H. Funakoshi and T. Nakamura (2002) Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS. **J. Neurosci.**, 22, 6537-6548.
  7. Y. Sakamaki, K. Matsumoto, S. Mizuno, S. Miyoshi, H. Matsuda and T. Nakamura (2002) Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of respiratory epithelial cells during ostpnemonectomy compenbatory lung growth in mice. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 26, 525-533.
  8. H. Takahashi, U. Koshimizu, J. Miyazaki and T. Nakamura (2002) Impaired spermatogenic ability of testicular germ cells in mice deficient in the LIM-kinase 2 gene. **Develop. Biol.**, 241, 259-272.
  9. H. Funakoshi, T. Yonemasu, T. Nakao, 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. Neursci. Res.**, 68, 150-160.
  10. T. Sumi, K. Matsumoto, and T. Nakamura (2002) Mitosis-dependent phosphorylation and activation of LIM-kinase 1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 290, 1315-1320.
  11. Y. A. Kishi, H. Funakoshi, T. Nakano 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**, 288, 29-40.
  12. 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.**, 103, 36-48.
  13. H. Shibuki, N. Katai, S. Kuroiwa, T. Kurokawa, 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.
  14. M. Maemondo, K. Narumi, Y. Saijo, K. Usui, M. Tahara, R. Tazawa, K. Hagiwara, K. Matsumoto, T. Nakamura and T. Nukiwa (2002) Targeting angiogenesis and HGF function by an adenoviral vector expressing HGF antagonist, NK4 for cancer therapy. **Mol. Therapy**, 5, 177-185.
  15. S. Hirao, Y. Yamada, F. Koyama, H. Fujimoto, Y. Takahama, M. Ueno, K. Kamada, T. Mizuno, M. Maemondo, T. Nukiwa, K. Matsumoto, T. Nakamura and Y. Nakajima (2002) Tumor suppression effect using NK4, novel moleculeacting as the antagonist of HGF, on human gastric caranomas. **Cancer Gene Therapy**, 9, 700-707.
  16. M. Saimura, E. Nagai, K. Mizumoto, N. Maehara, H. Okino, M. Katano, K. Matsumoto, T. Nakamura, K. Narumi, T. Nukiwa and M. Tanaka (2002) Intraperitoneal injection of adenovirus-mediated NK4 gene suppresses peritoneal dissemination of pancreatic cancer cell line AsPC-1 in nude mice. **Cancer Gene Therapy**, 9, 799-806.
  17. R. Morishita, M. Sakai, K. Yamamoto, S. Iguchi, M. Aoki, K. Yamasaki, K. Matsumoto, T. Nakamura, R. Law, T. Ogihara, Y. Kaneda (2002) Impairment of collateral formation in lepoptrotein(a)transgenic mice: Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte

- growth factor gene. **Circulation**, 105, 1491-1496.
18. S. Miyagawa, Y. Sawa, S. Taketomi, N. Kawaguchi, T. Nakamura, N. Matsuura, and H. Matsuda (2002) Myocardial regeneration therapy for heart failure: Hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. **Circulation** 105, 2556-2561.
19. 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.
20. M. Ono, Y. Sawa, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda and H. Matsuda (2002) In vivo gene transfection with hepatocyte growth factor via pulmonary artery induces angiogenesis in the rat lung. **Circulation**, 106 (Suppl.1), I-264-I-269.
21. H. Nakagami, R. Morishita, K. Yamamoto, Y. Taniyama, M. Aoki, K. Yamasaki, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda and T. Ogihara (2002) Hepatocyte growth factor prevents endothelial cell death through inhibition of bax translocation from cytosol to mitochondrial membrane. **Diabetes**, 51, 2604-2611.
22. O. Amano, A. Yamane, U., Shimada, M., Koshimizu, T. Nakamura and S. Iseki (2002) Hepatocyte growth factor is essential for migration of myogenic cells and promotes their proliferation during the early periods of tongue morphogenesis in mouse embryos. **Develop. Dyn.** 223,169-179.
23. T. Sugimoto, S. Yamashita, M. Ishigami, N. Sakai, K. Hirano, M. Tahara, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Matsuzawa (2002) Decreased microsomal triglyceride transfer protein activity contributes to inhibition of alcoholic liver steatosis in rats. **J. Hepatol.**, 36, 157-162.
24. T. Funatsu, Y. Sawa, S. Ohtake, T. Takahashi, G. Matsumiya, N. Matsuura, T. Nakamura and H. Matsuda (2003) Therapeutic angiogenesis induced by myocardial injection of naked c DNA plasmid encoding hepatocyte growth factor in ischemic canine heart. **J. Thoracic & Cardiovas. Surg.**, 124, 1099-105.
25. 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.
26. H. Miura, K. Nishimura, A. Tsujimura, K. Matsumiya, K. Matsumoto, T. Nakamura and A. Okuyama (2002) Effect of hepatocyte growth factor on E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in DU 145 prostate cancer cells. **Urology**, 58, 1064-1069.
27. M. Saimura, E. Nagai, K. Mizumoto, N. Maehara, Y.A.Minamishima, M. Katano, K. Matsumoto, T. Nakamura and M. Tanaka (2002) Tumor suppression through angiogenesis inhibition by Suit-2 pancreatic cancer cells genetically engineered to secrete NK4. **Clin. Cancer Res.**, 8, 3243-3249.
28. N. Maehara, E. Nagai, K. Mizumoto, N. Sato, K. Matsumoto, T. Nakamura, K. Narumi, T. Nukiwa and M. Tanaka (2002) Gene transduction of NK4, HGF antagonist, inhibits in vitro invasion and in vivo growth of human pancreatic cancer. **Clin. & Exp. Metastasis**, 19, 417-426.
29. S. Hirao, Y. Yamada, F. Koyama, H. Fujimoto, Y. Takahama, M. Ueno, K. Kamada, T. Mizuno, M. Maemondo, T. Nukiwa, K. Matsumoto, T. Nakamura and Y. Nakajima (2002) Tumor suppression effect using NK4, novel moleculeacting as the antagonist of HGF, on human gastric carcinomas. **Cancer Gene**

**Therapy**, 9, 700-707.

30. K. Nakanishi, M. Uenoyama, N. Tomita, R. Morishita, Y. Kaneda, T. Ogihara, K. Matsumoto, T. Nakamura, A. Maruta, S. Matsuyama, T. Kawai, T. Aurues, T. Hayashi and T. Ikeda (2002) Gene transfer of human HGF into rat skin wounds mediated by liposomes coated with the Sendai virus (Hemagglutinating virus of Japan). **Am. J. Pathol.**, 161, 1761-1772.

31. Y. Taniyama, R. Morishita, M. Aoki, K. Horaoka, K. Yamasaki, N. Hayashi, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda and T. Ogihara (2002) Angiogenesis and antifibrotic action by HGF in cardiomyopathy. **Hypertension**, 40, 47-53.

32. C. Paneda, I. Gorospe, B. Herrera, T. Nakamura, I. Fabregat and I. Varela-Nieto (2002) Liver cell proliferation requires methionine adenosyltransferase 2A mRNA up-regulation. **Hepatology**, 35, 1381-1391.

33. 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.

34. S. Yoshimura, R. Morishita, K. Hayashi, J. Kokuzawa, M. Aoki, K. Matsumoto, T. Nakamura, T. Ogihara, N. Sakai and Y. Kaneda (2002) Gene transfer of hepatocyte growth factor to subarachnoid space in cerebral hypoperfusion model. **Hypertension** 39, 1028-1034.

35. Y. To, M. Doki, K. Matsumoto, R. Tanaka, A. Sato, K. Nakagome, T. Nakamura and K. Yamamoto (2002) A two way interaction between hepatocyte growth factor and interleukin-6 on tissul invasion of lung cancer cell line. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 27, 220-226.

36. K. Takami, H. Takuwa, H. Okazaki, M. Kobayashi, T. Ohtoshi, S. Kawasaki, , M.

Dohi, K. Yamamoto, T. Nakamura, M. Tanaka, K. Nakahawa, Y. Takuwa and H. Takizaw (2002) Interferon- $\gamma$  (TNF- $\gamma$ ) inhibits hepatocyte growth factor (HGF)-stimulated cell proliferation of human bronchial epithelial cells. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 26, 231-238.

37. K. Matsumoto, R. Morishita, N. Tomita, A. Moriguchi, K. Yamasaki, M. Aoki, K. Matsumoto, T. Nakamura, J. Higaki and T. Ogihara (2002) Impaired endothelial dysfunction in diabetes mellitus rats was restored by oral administration of prostaglandin I2 analogue. **J. Endocrinol.**, 175, 217-223.

#### 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 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

研究要旨 臓器移植分野における移植免疫寛容状態を作り出す一連の遺伝子の発現について、寛容ラットの末梢血リンパ球を用い、特に最近注目されている免疫調整リンパ球に着目し、細胞免疫学及び分子生物学的手法により解析した。研究結果から移植後寛容に関わる細胞集団及び関連遺伝子の同定を行った。今後新たな免疫抑制遺伝子の発見が期待される。

A. 研究目的

移植医療において、欠かすことの出来ない重要な治療が免疫抑制である。今日の移植医療の華々しい成果も免疫抑制剤の開発無くしてはあり得ないことである。しかしながら免疫抑制剤は、その優れた効果をもたらす一方、深刻な副作用を患者に強いる。よって、今日の移植医療の大きな課題の一つは、いかにして副作用の少ない免疫抑制を行うかにある。今現在知られている遺伝子群のみでは、免疫寛容状態を説明するには不十分であり、まだ知られていない免疫寛容を誘導するような遺伝子があることが予想される。

本研究はそのゲノム情報をいち早く移植免疫学に取り入れ、遺伝子情報に基づく免疫寛容機序の解明を試みるものである。免疫という生体恒常性維持機構の存在を考えると、移植臓器における拒絶反応は、自然の摂理である。この拒絶反応を克服するためには、内的情報と外的情報のバランスを制御すること、すなわち免疫寛容が重要な手がかりとなる。そのような寛容を維持する機序を細胞免疫学的手法を用いて解析す

るとともに、大規模かつ網羅的な遺伝子解析を可能とする DNA チップ法を用いて、より効率的に解明していくことをこの研究の目的としている。

今までの *in vivo* モデルを用いた免疫寛容の解析において、大規模な遺伝子解析は行われていない。よって本研究による遺伝子解析の結果は、移植免疫学において長年の懸案であった、免疫寛容の解明に大きく貢献できるものと考えられる。また、免疫寛容状態を解析できる遺伝子を組み合わせた DNA チップを作成すること、ならびに移植免疫寛容遺伝子を直接治療へ用いること等による移植医療への応用が期待できる。

B. 研究方法

本年度は臓器移植免疫寛容動物の作製を行い、従来 of 細胞免疫学の方法を用いて解析する。次いで作製された移植免疫寛容動物から採取した細胞、組織を使い、市販の DNA マイクロアレイを用いて、既知遺伝子の解析を行った。

1. 臓器移植免疫寛容動物の作製及び解析  
同種異系ラットの臓器移植モデルを用い、

免疫寛容動物を作製する。移植片の生着が100日を超えた後、従来の細胞免疫学的手法を用いて末梢血リンパ球を分離する。その後、FACSにて細胞表面分子について解析を行い、特にCD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>の細胞集団の存在に焦点を当て解析した。一方、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った後、心臓テストグラフトを行い、その延長効果を確認した。

## 2. DNA マイクロアレイによる既知遺伝子の解析

免疫寛容動物の末梢血液からリンパ球を分離後、RNAを抽出した。Affymetrix社のRat Genome U34Aアレイを中心に解析を行い、既知遺伝子の発現プロファイルを検討した。得られた免疫寛容関連遺伝子の情報に基づき、移植免疫寛容ラットリンパ球において、その発現時期及び発現量を定量PCRにて検討した。

(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

1. 細胞生物学による解析: 免疫寛容ラットの移植片が100日を超えた後、従来の細胞免疫学的手法を用いて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<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>細胞集団がNaiveのラットより有意に増加していることを明らかにした。寛容ラットの末梢血リンパ球表面のCD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>共陽性細胞は11.9%に対して、Naiveのラットでは8.1%であった。一方、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った。control群における心移植片の生着期間が13.5日であるのに対して、免疫寛容を誘導したラットか

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は24日であり、心移植片の顕著な延長が見られた。これにより免疫調節機能を持つリンパ球の存在が確認できた。

2. DNA チップによる遺伝子発現の解析: 寛容ラットの末梢血から分離したリンパ球を用いてRNAを抽出した後、Affymetrix社のRat Genome U34Aアレイ(7000種のラット全長遺伝子を含む)を用いて、遺伝子発現プロファイルを解析した。発現データの二次元クラスター解析を行い、同種寛容ラットと同系移植ラットのプロファイルを比較し、さらにFACSによる解析結果及びリンパ球養子移植実験の結果との関連について検討した。寛容ラットの末梢血リンパ球では、既存の免疫抑制または免疫調整遺伝子の高い発現が認められた。また、isograftのそれと比較したところ、464個の有意に変化した遺伝子を見いだした。その中から統計学的な処理(t-test)を行い、211個(p<0.05)の候補遺伝子を見つけた。その内訳は既知遺伝子135個、ESTからなる未知の遺伝子76個である。既知遺伝子について、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。その意義について、現在検討を進めている。

## D. 考案

臓器移植の分野では、移植後一定期間免疫抑制剤を使用した後、宿主に移植免疫寛容が成立する例が確認されている。今回は動物実験で免疫寛容状態を誘導し、維持する機序を細胞免疫学の観点から解析することを目的とした。寛容ラットの末梢血から

リンパ球を分離し解析を行った。その結果、CD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>の細胞集団が Naive のラットに比べて有意に増加していることを明らかにした。この細胞集団は、最近文献で報告された免疫反応を調節するリンパ球集団と一致した。また、このリンパ球集団の養子移植実験を行ったところ、免疫調節機能を持つリンパ球の存在が確認された。

一方、高密度オリゴヌクレオチドアレイによる遺伝子発現解析は細胞あるいは組織における網羅的な発現プロファイルの探索を可能とし、その定量性については SAGE 法との比較などから実証されている。移植後宿主が寛容状態になるには、リンパ球による調整機構が働いていることが予測される。免疫寛容個体から分離したリンパ球の遺伝子発現プロファイルを解析し、特徴的な遺伝子発現パターンを同定する事により、診断や個別の治療計画を選択することが可能となる。今回の研究では、DNA チップを用いて遺伝子発現の解析を行うと共に、FACS の解析結果及びリンパ球養子移植実験の結果との関連について検討した。既知の免疫抑制、または免疫調整遺伝子の高い発現が寛容ラットの末梢血リンパ球で認められた。また、これまで免疫寛容との関連が示されていない遺伝子が多数見つかった。

その遺伝子の免疫抑制に及ぼす機能および発現の再確認について検討を進めている。さらに、未だ同定されていない遺伝子を新たに同定する作業を進めている。

今回、動物実験で得られた寛容ラットの移植免疫寛容誘導および維持に関連した遺伝子の解析から得られた研究結果は、移植免疫反応の抑制、あるいは免疫寛容を成立させる遺伝子を簡便に診断することができうる DNA チップの作成に基礎的データとして極めて重要である。基礎的研究から得られた結果を用い、臨床的には移植患者の

遺伝子発現情報の解析と整理を行うことにより、病態及び拒絶反応の診断、また基礎的には新しい免疫抑制遺伝子の発見が期待できる。そのような遺伝子を解明することにより、移植患者において免疫抑制剤を中止あるいは減量することが可能になり、さらには免疫寛容を誘導する遺伝子を導入することにより免疫寛容状態を成立させることも可能になると考えられる。さらにこれにより、移植患者の遺伝子発現の状況に応じた、免疫抑制剤の増減、中止や再投与が的確かつ安全にできるようになり、個々の患者ニーズに合わせた遺伝子薬物療法が行えると考えられる。

## E. 結論

臓器移植分野における移植免疫寛容状態を作り出す一連の遺伝子の発現について、寛容ラットの末梢血リンパ球を用い、細胞免疫学及び分子生物学的手法により解析した。本研究による遺伝子解析の結果は、免疫寛容状態を解析できる遺伝子を組み合わせた DNA チップを作成すること、ならびに移植免疫寛容遺伝子を直接治療へ用いること等による移植医療への応用が期待できる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) X-K. Li, M. Kosuga, K. Tokieda, A. Kanaji, Y. Fukuhara, M. Hashimoto, K. Okabe, H. Yaginuma, M. Yamada, S. Suzuki, T. Okuyama. Prolongation of transgene by co-expression of cytokine response modifier A in rodent liver after adenoviral gene transfer. **Mol Ther** 5: 262-268, 2002.

(2) L. 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.
- (3)M. Fujino, X-K. Li, Y. Kitazawa, L. Guo, M. Kawasaki, N. Funeshima, T. Amano, S.Suzuki. Distinct Pathways of Apoptosis Triggered by FY720, Etoposide and Anti-Fas Antibody in Human T-Lymphoma Cell Line (Jurkat Cells). **J Pharmacol Exp Ther** 300: 939-945,2002.
- (4)M. Fujino, M. Kawasaki, N. Funeshima, Y. Kitazawa, M. Kosuga, K.Okabe, M. Hashimoto, H.Yaginuma, K. Mikoshiba, T. Okuyama, S. Suzuki, X-K. Li. CrmA gene expression protects mice against concanavalin-A induced hepatitis by inhibiting IL-18 secretion and hepatocyte apoptosis. **Gene Ther** (In press)
- (5)M. Fujino, K.Adachi, M. Kawasaki, Y. Kitazawa, N. Funeshima, T. Okuyama, H. Kimura, S. Suzuki, X-K. Li. Prolonged Survival of Rat Liver Allograft with Adenoviral Gene Transfection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) *nef*. **Liver Transplant** (In press)
- (6)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)
- (7)M. Fujino, N. Funeshima, Y. Kitazawa, H. Kimura, H.Amemiya, S.Suzuki, X-K. Li Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Lewis Rats by FTY720 Treatment. **J Pharmacol Exp Ther** (In press)
2. 学会発表
- (1)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.
- (2)Sakai T, Sano T, Mizuno K, Papendra P, Charles H, Li X-K, Suzuki H. Long-term extragraft macrochimerism of donor-derived bone marrow cells is differentially affected by tissue-associated H-Y antigen after vascularized femoral bone marrow transplantation. 第32回日本免疫学会総会 東京、2002年12月4-6日.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得 なし
  2. 実用新案登録 なし
  3. その他

分担研究報告書

『長時間心保存における HGF の心筋保護効果に関する研究』

分担研究者 澤 芳樹 大阪大学医学系研究科 臓器制御外科学

研究要旨：ラット長時間心保存による虚血再灌流モデルを作成した。心停止液にリコンビナントヒト HGF を添加することにより、8 時間心保存後の心機能は対照群に比し有意に改善した。また、HGF 投与群では心筋アポトーシスは抑制された。HGF 投与により 8 時間保存後の心機能は HGF 非添加群の 4 時間保存群と同等であった。これにより、心筋細胞のアポトーシスを抑制する HGF の投与は、臨床における心筋保護効果の増強、心保存時間の延長等に対する有用な方法になる可能性が示唆された。

A. 研究目的

心筋症などの重症心不全に対する治療としての心臓移植は、欧米における外科的治療として確立されているのに加え、本邦においても 1999 年より再開された。しかしドナー不足は深刻な問題であり、補助人工心臓をブリッジとして利用してもその多くは移植を待たずして死亡している。現状の心筋保護法では心臓阻血時間の安全限界は 4 時間前後であり、虚血耐性獲得による保存心の移植後心機能向上は、その不足するドナープールを拡大するために是非とも達成されるべき課題である。

我々はこれまでに、肝細胞増殖因子 (HGF) のもつ心筋保護作用に注目し、HGF 遺伝子を HVJ-リポソーム法によりラット心筋内に導入し、虚血再灌流後の心機能改善、心筋逸脱酵素減少など虚血再灌流障害の抑制効果を報告し、更に HGF の心筋保護作用が主に心筋細胞に対する抗アポトーシス作用によることを明らかにしてきた。

本研究では、この HGF の長時間心保存モデルにおけるリコンビナント HGF 投与による心筋保護効果につき検討することを目的とした。

B. 研究方法

ラット心に対し 8 時間心保存モデルを作成した。

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。また、対照群では 4 時間心保存を行い、HGF 添加 8 時間心保存群と比較した。

(倫理面への配慮)

実験動物は本学附属動物実験施設にてガイドラインにのっとり飼育・管理し、実験にあたっては麻酔処置により苦痛を最小限にとどめるよう配慮した。また、犠牲死は麻酔薬の大量投与により得た。

C. 研究成果

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 (LVDP  $58 \pm 7$  vs.  $38 \pm 5\%$ , dp/dt  $74 \pm 8\%$  vs.  $53 \pm 6\%$ )。また、HGF 投与 8 時間心保存後の心機能は HGF 非投与 4 時間心保存後の心機能 (LVDP  $59 \pm 5\%$ , dp/dt  $72 \pm 4\%$ ) と同等であった。

D. 考察

HGF は心筋に対して直接作用し、虚血再灌流後の心筋保護作用を有することが明らかとなっており、8 時間長時間心保存モデルにおいても、そのアポトー

シスの抑制効果が示され、心機能の改善が認められた。今後はこの機序を大動物での心保存ひいては臨床の場へ応用し、心保存時間の延長、移植後心機能の改善に貢献させていく方針である。

#### E. 結論

リコンビナント HGF の心停止液への添加は心保存において心筋保護効果を改善させる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 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.
- A novel strategy of Decoy Transfection against nuclear factor-kB in myocardial preservation. T Sakaguchi, Y Sawa, H Matsuda, et al. Annals of Thoracic Surgery; 71: 624-630. 2001.
- Ecto-5'-nucleotidase plays a role in the cardioprotective effects of heat shock protein 72 in ischemia-reperfusion injury in rat hearts. Cardiovascular Research; 47:74-80.2000.
- Development of new techniques using genetic and tissue engineering for the treatment of severe heart failure. Y Sawa, H Matsuda, et al. Transplantation Proceedings; 32: 242-244. 2000.
- Myocardial protection from ischemia / reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. T Nakamura, Y Sawa, H Matsuda, et al. The Journal of Clinical Investigation; 106: 1511-1519.2000.

##### 2. 学会発表

- 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

- A Novel Inhibitor of p38 MAP kinase (FR167653) attenuates ischemia-reperfusion injury in myocardium. アレチン、澤 芳樹、松田 暉他. 第 102 回日本外科学会総会 2002. 4. 11 - 13
- 虚血再灌流障害における HGF の心筋保護因子としての有用性. 船津俊宏、澤 芳樹、松田 暉他. 第 102 回日本外科学会総会 2002. 4. 11 - 13
- 心筋虚血再灌流障害に対する JTE607 の心筋保護効果の検討. 流郷昌裕、澤 芳樹、宮本裕治、松田 暉他. 第 55 回日本胸部外科学会 2002. 10. 2-4

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

申請中

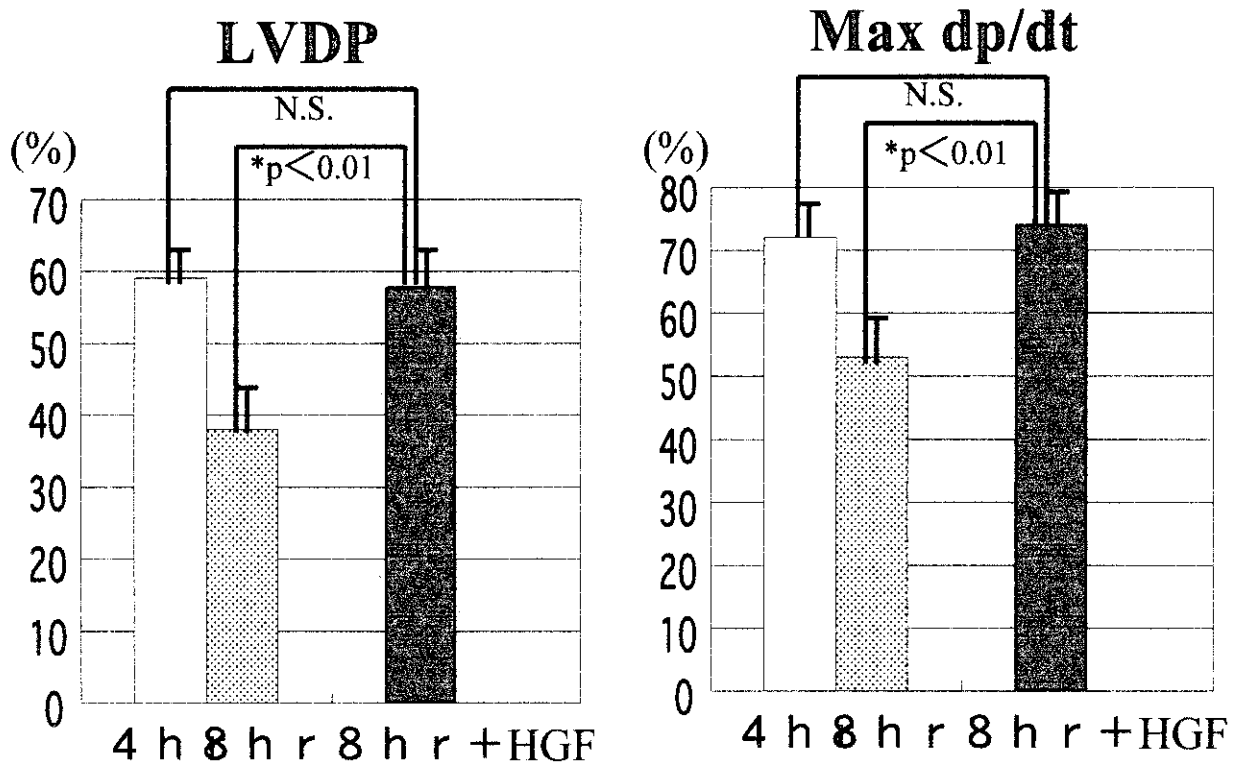
##### 2. 実用新案登録

なし

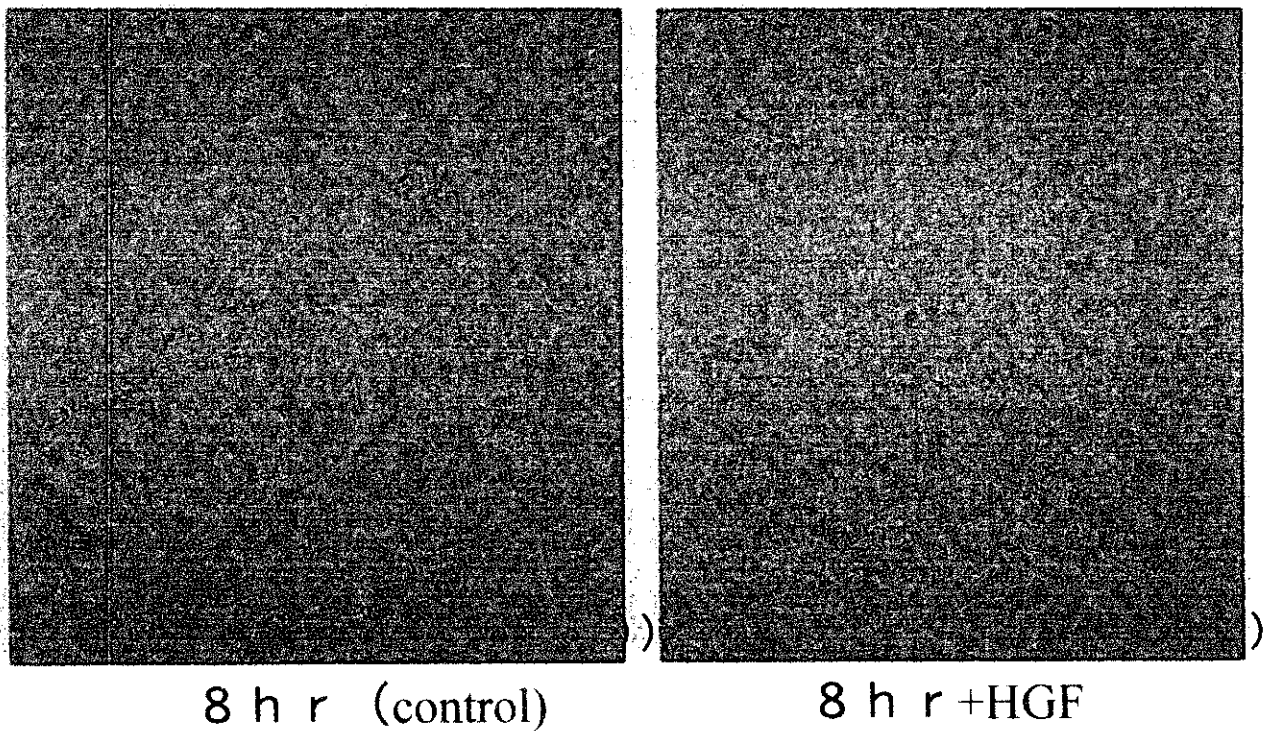
##### 3. その他

なし

**図1** Percent Recovery of Cardiac Function  
(60 min after reperfusion)



**図2** TUNEL染色



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

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

分担研究者 上出 利光 北海道大学遺伝子病制御研究所・教授

研究要旨：免疫学的寛容を導入する為に、5種類の可溶性補助シグナル分子を作成した。すなわち CTLA4Ig, CD40Ig, ICOSIg, HVEMIg, 及び 4-1BBIg である。同時に遺伝子治療用に上記遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを作成した。

- 1) ラット肢移植モデルでは、CD40Ig 及び CTLA4Ig アデノウイルスベクターの併用療法により、移植肢の長期生着を可能にした。
- 2) ラット心臓移植モデルでは、CD40Ig アデノウイルスベクター単回投与により移植心の長期生着をもたらした。CD4 陽性の調節性 T 細胞により、移植片に対するキラー T 細胞の障害活性を抑制することが、その機序であることを示した。

#### A. 研究目的

臓器移植における最大の問題は、拒絶反応をいかにして制御するかである。これまで非特異的免疫抑制剤が主体であり、易感染性や腫瘍発生の副作用があり、新たな治療戦略の開発が期待されている。本研究は、可溶性補助シグナル分子を用いて、T 細胞活性化補助シグナル経路を選択的に阻害し、免疫学的寛容を誘導する方法を確立することを研究の目的とする。

#### B. 研究方法

- 1) ラットを用いて、肢移植及び心臓移植モデル系を確立する。
- 2) CTLA4IgG, CD40IgG, ICOSIgG, HVEMIgG 及び 4-1BBIgG 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを作成する。
- 3) 上記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する。

#### (倫理面への配慮)

動物を用いた研究は、遺伝子病制御研究所の動物実験委員会に実験計画書を提出し、実験動物に対する倫理や福祉に、十分配慮しているか否か審議を受け許可された。

#### C. 研究結果

- 1) ラット肢移植モデルでは、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。しかし、免疫学的寛容は得られなかった。マイクロキメリズムは存在しなかった。
- 2) ラット心臓移植モデルでは、CD40Ig アデノウイルスベクター単回投与により、移植心の長期生着が可能となった。CD40Ig は CD40 と CD40 リガンドの結合を抑制するのみならず、CD40 リガンドに刺激を導入する。この 2 つの作用により、CD4 陽性 CD25 陽性の調節性 T 細胞が出現し、CD8 陽性細胞障害性 T 細胞の機能を、エフェクター相で抑制することにより、心臓移植の長期生着をもたらす。

#### D. 考察

可溶性補助シグナル分子は、補助シグナル経路を阻害すると同時に、リガンドの架橋により、リバースシグナリングを導入するという機序で、移植片に対する免疫反応を制御できることが明らかとなった。

#### E. 結論

小動物では、可溶性補助シグナル分子を用いることにより、移植臓器の拒絶反応をコントロールできることを示した。今後大型動物を用いた検討が急務である。



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Combined gene therapy with adenovirus vectors containing CTLA4Ig and CD40Ig prolongs survival of composite tissue allografts in rat model. *Transplantation*. 75 :275- 281, 2003. (Kanaya K, Tsuchida Y, Inobe M, Murakami M, Hirose T, Kon S, Kawaguchi S, Wada T, Yamashita T, Ishii S, Uede T)

2) Locally expressed CTLA4-Ig in a pancreatic beta-cell line suppresses accelerated graft rejection response induced by donor-specific transfusion. *Diabetologia*. 45:831-840, 2002. (Kimura F, Gotoh M, Tanaka T, Luo Z, Miyazaki J, Uede T, Monden M, Miyasaka M)

3) Prevention of acute lung allograft rejection in rat by CTLA4Ig. *Am J Transplant*. 2:223-228, 2002. (Shiraishi T, Yasunami Y, Takehara M, Uede T, Kawahara K, Shirakusa T)

4) Combination treatment with FTY720 and CTLA4IgG preserves the respiratory epithelium and prevents obliterative disease in a murine airway model. *J Heart Lung Transplant*. 21:692-700, 2002. (Konishi K, Inobe M, Yamada A, Murakami M, Todo S, Uede T)

5) Induction of donor-specific tolerance by adenovirus-mediated CD 40Ig gene therapy in rat liver transplantation. *Transplantation*. 73:1403-1410, 2002. (Nomura M, Yamashita K, Murakami M, Takehara M, Echizenya H, Sunahara M, Kitagawa N, Fujita M, Furukawa H, Uede T, Todo S)

6) Vascularized bone-marrow allotransplantation in rats prolongs the survival of simultaneously grafted alloskin. *J Reconstr Microsurg*. 18:289-294, 2002. (Tsuchida Y, Usui M, Uede T)

7) Feasibility of immunosuppression in composite tissue allografts by systemic administration of CTLA4Ig. *Transplantation*. 73: 334-340, 2002. (Iwasaki N, Gohda T, Yoshioka C, Murakami M, Inobe M, Minami A, Uede T)

### 2. 学会発表

1) 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)

2) ICOS 経路阻害による移植心生着の検討。第 20 回日本心臓移植研究会学術集会, 大阪, 2 月 16 日, 2002. (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)

3) 高密度 CD40Ig で誘導される CD25 陽性 CD4 T細胞による Allo response の制御。第 32 回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 12 月 4 日-6 日, 2002. (増永太郎、山下健一郎、崎浜秀康、橋本 卓、華 南、猪部 学、宮崎忠昭、藤堂 省)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

#### 研究要旨

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。これを用いて各種培養細胞、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が可能であった。そこでこのベクターの移植臓器への応用をめざし、ターゲティング可能なポリマー修飾 HVJ エンベロープベクターの開発を試みた。また臨床応用をめざし培養細胞で大量にベクター生産ができる系を確立した。

#### A. 研究目的

遺伝子、合成核酸、蛋白質などの導入による移植臓器の機能制御を可能にするための低侵襲で高効率の遺伝子導入法である HVJ エンベロープベクターを改良しターゲティングを可能にすること、医療用材料化を行うことをめざした。

#### B. 研究方法

リポソームを用いず不活性化 HVJ に遺伝子を封入し細胞内導入可能な HVJ エンベロープベクターを開発した。この 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する。

また臨床用のベクターは、無菌性、高純度などが要求され、また決められた操作手順に基づいた生産が要求されるため、従来の鶏卵培養法による HVJ の生産では問題が多すぎる。そこで臨床用 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。

（倫理面への配慮）

動物実験については大阪大学医学系研究科で定める動物実験のガイドラインを遵守した。

#### C. 研究結果

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ことがわかった。このベクターを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、ほぼ鶏卵と同等の効率で HVJ の生産が可能になり、無血清培地で 10 L スケールの大量培養が可能になった。これは従来の技術ではなしえなかった成果であり、これ

によって臨床用ベクターの生産が期待できるようになった。

#### D. 考察

遺伝子導入実験において細胞障害性は特に認めなかったが、この低侵襲性はウイルスゲノムが完全に破壊されており、ウイルス蛋白が新生されないことによると考えられ、移植臓器への遺伝子導入には適している。

#### E. 結論

HVJ エンベロープベクターによる臓器への安全な遺伝子導入が可能になった。このベクターによる前臨床試験を行っていくことにより移植後の臓器の機能保持に大きな貢献をするであろう。

臨床応用が望まれる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

**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.

Tomita, N., Morishita, R., Yamamoto, K., Higaki, J., Dzau, V.J., Ogihara, T., and **Kaneda, Y.**: Targeted Gene Therapy for Rat Glomerulonephritis using HVJ-immunoliposomes. *J. Gene Medicine* 4, 527-535, 2002.

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, I-158-162, 2002.

##### 2. 学会発表

Kaneda, Y.: Development of HVJ envelope vector for in vitro and in vivo transfer of plasmid DNA, oligonucleotides and proteins. 5<sup>th</sup> Annual meeting of the American Society of Gene Therapy 2002年6月7日, Boston

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

“化学療法剤を封入した医薬製剤” 特願 2002-320577

“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

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

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

分担研究者 井上一知 京都大学再生医科学研究所教授

研究要旨 糖尿病に対する膵島移植療法の確立を目指した研究で、塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた皮下血管誘導前処置による皮下膵島移植部位の作製や免疫隔離膜を用いたマクロデバイスの有用性、これらに応用したブタ由来の分離膵内分泌細胞による糖尿病モデルマウスの治療実験などを行っている。今年度は、これに加えて、生体適合性に優れた polyvinyl alcohol (PVA) を用いてマクロデバイスを作製し、*in vitro* での機能解析したほか、PVA にコラーゲンをコーティングすることで血管誘導性に優れたデバイスを作製しうる事を示した。

A. 研究目的

世界的に罹患患者数が増加傾向にある糖尿病に対する根本的な治療法としては、膵臓器移植や膵島移植があるが、現在行われている移植医療では長期間の免疫抑制療法が不可欠であり、また、深刻なドナー不足は今後も続くものと思われる。このため、多くの重症糖尿病患者が困難なインスリン療法を続けながら、腎不全や網膜症などの重篤な合併症に苦しむ状況が続いている。

我々は、膵島細胞を半透膜で免疫から保護しつつ血糖に応じたインスリン分泌を行わせるバイオ人工膵島の研究・開発を行っており（図1）、現在までに、polyvinyl alcohol (PVA) 膜を用いたチューブ型やバッグ型のマクロデバイス、アガロースと polystyrene sulfonic acid (PSSa) 混合ゲルを用いたビーズ型や棒型デバイスなどを開発してきた。また、インスリン分泌を担う細胞としては、従来から実験的に汎用されているラット膵島や、MIN-6 などのインスリン産生培養細胞株のほか、近年ではブタの膵島細胞分離技術を確立して臨床応用にもつながる多量の膵島細胞を得ることが

可能になっている。

一方、膵島移植部位としては経門脈的に移植して肝臓に生着させるのが一般的であるが、この方法は容積の大きなビーズ型バイオ人工膵には不适当であり、また、デバイスの回収が不可能、開腹あるいは経肝の門脈穿刺による合併症など、問題点が多い。我々は、最も低浸襲でバイオ人工膵に適した移植部位として皮下組織に着目し、血管に乏しい皮下組織に対して前処置として塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 徐放デバイスによる血管誘導を行うことで、遊離膵島やバイオ人工膵の良好な膵島移植部位として利用できる事を示した。

昨年度の本研究では、アガロース・PSSa 混合ゲルを用いて、ラット膵島の棒型バイオ人工膵を作製し、糖尿病モデルマウスの血糖を数十日間正常化することに成功した。また、昨年度来検討してきたブタ膵内分泌細胞を用いた同様のバイオ人工膵によっても、ほぼ同程度の有効性を確認するに至っている。本年度はさらにバイオ人工膵の可能性を追求するために、抗補体作用を有するものの生体毒性が危惧される PSSa に代