

2002年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

— 在留中国人研究者研究助成 —

2003年 2月28日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 華南 
所属機関名 北大医学部大学院消化器外科
指導責任者氏名 藤堂 省
職 名 教授
所 在 地 札幌市北区北15条西7丁目
電 話 706-5927 内線 5927

1. 研究テーマ Concordant 異種心移植における AdCD40Ig and AdCTLA4Ig の遺伝子治療と
FK779 の短期治療の併用による免疫抑制効果

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 有 ・ 無 (学会名・演題)

第6回 日本異種移植研究会にて口演する。

演題: Concordant 異種心移植における AdCD40Ig and AdCTLA4Ig の遺伝子治療と
FK779 の短期治療の併用による免疫抑制効果

American Transplant Congress 2003 Washington D.C.

Title: Effect of adenovirus mediated CD40Ig and/or CTLA4Ig gene therapy
with a transient induction treatment by FK779 on hamster-to-rat cardiac transplantation.

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

Concordant 異種心移植における AdCD40Ig and/or AdCTLA4Ig の遺伝子治療と FK779 の短期治療の併用による免疫抑制効果

研究者氏名	華 南
中国所属機関	吉林省腫瘍病院 肝胆膵外科 主治医師
日本研究機関	北海道大学医学部大学院研究科 消化器、一般外科
指導責任者	教授 藤堂 省
共同研究者名	山下健一郎、橋本卓、増永太郎

〈要旨〉

【背景】 Concordant 異種移植における Delayed xenograft rejection (DXR) には、液性免疫反応のほか、グラフトの血管内皮の活性化が関与していると考えられている。FK779 は Leflunomide の誘導体で、より半減期の短い新規 pyrimidine 系代謝拮抗剤であるが、その免疫抑制効果は細胞性免疫のほか、液性免疫をも抑制するという特徴を持つ。一方、costimulatory signal である CD40-CD154 の遮断は宿主の細胞性、液性免疫反応を抑制するほか、in vitro の実験系において血管内皮の活性化を抑制することが報告されている。ハムスターからラットへの異種心移植において、FK779 により T 細胞非依存性の IgM を、CD40-CD154 の遮断により血管内皮の活性化を抑制し、さらに CD28-CD80/CD86 を遮断することで細胞性免疫をも抑制することができれば、グラフトの長期生着を期待することができる。更に、costimulatory signals の遮断を、アデノウイルスベクターにより CD40Ig 及び CTLA4Ig 遺伝子を導入する方法をとることで、より簡便に免疫抑制効果が得られるものである。【目的】 Concordant 異種心移植における AdCD40Ig and/or AdCTLA4Ig の 遺伝子治療と FK779 の短期治療の併用による免疫抑制効果を検討した。【方法】 Golden Syrian ハムスターをドナー、LEW ラットをレシピエントとし異所性心移植を行った。FK779 は 1% CMC 溶液に懸濁し、移植前日より一週間経口投与した。AdCTLA4Ig、AdCD40Ig はそれぞれ移植直後および移植 2 日前にレシピエントの陰茎静脈より 1×10^9 pfu 単回投与した。薬の種類及び組み合わせにより実験群は 9 群とした ($n = 6$)。検討項目は、グラフト生着期間 (中央値: MGS)、抗ドナー種特異的 IgM 抗体、HE 染色、免疫染色 (IgM, Macrophage, E selectin, P selectin) とした。【結果】 対照群の MGS は 3 日であるのに対し、FK779、AdCTLA4Ig、AdCD40Ig の 3 剤併用群では 100 日以上であった。【結論】 FK779 と遺伝子治療の併用は Concordant 異種心移植において有用であり、特に FK779、AdCTLA4Ig、AdCD40Ig の 3 者の併用で顕著な効果が得られた。

Key Words: xenotransplantation, concordant, costimulation, adenovirus.

〈緒言〉

現在、臨床移植では臓器不足が深刻な問題となっている。この臓器不足に対する一つの解決策として動物の臓器を利用する異種移植がある。異種移植は動物種の組み合わせによって discordant と concordant に分類されている。Discordant 異種移植の場合、移植臓器の動物種に対する自然抗体と補体を主体とする超急性拒絶反応 (Hyper acute rejection: HAR) により、臓器は数分から数時間で拒絶されてしまう。また、HAR を克服し得ても、ドナー特異的抗体の出現と血管内皮細胞の活性化に伴う急性血管性拒絶反応 (Acute vascular rejection: AVR, または Delayed xenograft rejection: DXR) や同種間移植で認められる T 細胞が関与している急性拒絶反応そして慢性拒絶反応と、多種多様な拒絶反応が生じ乗り越えるべき障壁は高い。近年の遺伝子改変技術の目覚ましい進歩に伴い、ドナー動物に対する補体制御因子の遺伝子導入やノックアウト動物が作成され、これら動物を用いた実験的異種移植の成績は良好であり HAR の克服は明確

になった。しかし、HARに引き続きおこるDXR以降の拒絶反応機構の解明と制御は未だ解決されておらず、異種移植を臨床応用する上でこれら拒絶反応の克服は必要かつ急務である。

1990年代初頭からの分子免疫学の発展により、アロ抗原に対するT細胞の活性化には2つのシグナルが必須であることが解明されている。即ち、抗原提示細胞 (Antigen presenting cell: APC) 上のMHC (Major histocompatibility complex) Class II抗原とT cell receptor (TCR)を介する最初のシグナル (シグナル1)、そしてAPC及びT細胞の細胞膜表面上に発現する接着分子を介するシグナル (シグナル2)である。この第2シグナルにはCD80/CD86-CD28、CD40-CD154、CD2-CD48、CD27-CD70やICAM-1-LFA-1等の分子を介することが知られ、これらシグナルをブロックするCTLA4Igや抗CD154抗体などを用いた同種間臓器移植実験で良好なグラフト生着成績が多数報告されており、アロ臓器移植の拒絶反応機構における第2シグナルの重要性が示されている。一方、異種移植拒絶反応においてもCTLA4Igと抗CD154抗体の併用効果がラット-マウス間での皮膚及び心移植モデルで最近報告され、異種移植におけるCD80/CD86-CD28及びCD40-CD154の第2シグナルの関与が示唆された。しかし、異種移植拒絶反応のDXR機構における第2シグナルの詳細な役割については全く解明されていない。

Concordant異種移植におけるDelayed xenograft rejection (DXR)には、液性免疫反応のほか、グラフトの血管内皮の活性化が関与していると考えられている。FK779はLeflunomideの誘導体で、より半減期の短い新規pyrimidine系代謝拮抗剤であるが、その免疫抑制効果は細胞性免疫のほか、液性免疫をも抑制するという特徴を持つ。一方、costimulatory signalであるCD40-CD154の遮断は宿主の細胞性、液性免疫反応を抑制するほか、in vitroの実験系において血管内皮の活性化を抑制することが報告されている。ハムスターからラットへの異種心移植において、FK779によりT細胞非依存性のIgMを、CD40-CD154の遮断により血管内皮の活性化を抑制し、さらにCD28-CD80/CD86を遮断することで細胞性免疫をも抑制することができれば、グラフトの長期生着を期待することができる。更に、costimulatory signalsの遮断を、アテノウイルスベクターによりCD40Ig及びCTLA4Ig遺伝子を導入する方法を取ることで、より簡便に免疫抑制効果が得られるものである。

新しい遺伝子治療を応用した免疫抑制法は、単回治療で有効な免疫抑制効果が得られることや遺伝子導入のターゲットによっては臓器特異的免疫寛容の誘導がされ、従来の免疫抑制療法における問題点、即ち、非特異的免疫抑制に起因する移植後感染症や悪性腫瘍の発生、薬剤の副作用による臓器傷害や患者の終生に渡る免疫抑制剤服用の必要性などを解決し得る可能性もある。

〈研究方法〉

Golden Syrian ハムスターをドナー、LEW ラットをレシピエントとし異所性心移植を行った。FK779は1% CMC溶液に懸濁し、移植前日より一週間経口投与した。AdLacZ、AdCTLA4Ig、AdCD40Igはそれぞれ移植直後および移植2日前にレシピエントの陰茎静脈より 1×10^9 pfu 単回投与した。薬の種類及び組み合わせにより実験群は9群とした (n=6)。検討項目は、グラフト生着期間 (中央値: MGS)、抗ドナー種特異的IgM抗体、HE染色、免疫染色 (IgM, C3, Macrophage, E selectin, P selectin) とした。

〈研究結果〉

対照群のMGSは3日であるのに対し、FK779、AdCTLA4Ig、AdCD40Igの3剤併用群では100日以上であった『図-1』。対照群では抗ドナー特異的IgM抗体血中濃度の上昇を認め、免疫染色でもIgM, E selectin, P selectin沈着、macrophage浸潤が見られたのに対し、FK779を使用した群ではIgM抗体の血中濃度の上昇は抑えられ、更にAdCD40Igを併用した群ではFK779を切れる後E selectin, P selectin沈着 (血管内皮の活性化) も抑制された『図-2, 3』。

〈考査と結論〉

Concordant異種移植におけるDelayed xenograft rejection (DXR)には、液性免疫反応のほか、グラフトの血管内皮の活性化が関与していると考えられている。DXRでは急速増加した抗ドナー種特異的なIgM抗

体は主な役割を果たし、IgM抗体によりグラフトの血管内皮の活性化を起こすことと考えられている。その特徴は抗ドナー種特異的なIgM抗体の急速上昇のほか、グラフトの免染でIgM, P selectin, E selectinの沈着やmacrophageの浸潤もみられている。

FK779投与により抗ドナー種特異的なIgM抗体の上昇を抑制したのみならず、グラフトの血管内皮の活性化もmacrophageの浸潤も抑制できた。しかし、FK779の短期投与はDXRを完全に抑制できず、FK779を切れると異種グラフトはまたDXRに数日以内に拒絶される。一方、FK779短期投与とAdCD40Igの併用は異種移植のグラフトの生着期間を延長させた上で、組織で血管内皮の活性化もmacrophageの浸潤も抑制できた。そして、CD40-CD154 costimulatory signalは異種移植のDXRには強く関与することが判明した。更に、FK779、AdCTLA4Ig、AdCD40Igの3者の併用でDXRに引き続きおこる同種間移植で認められるT細胞が関与している急性拒絶反応も抑制でき、顕著な効果が得られた。本実験では長期生着グラフトにおける慢性拒絶反応を見られた。この治療法は慢性拒絶反応に対する不十分であり、今後の研究は移植免疫の最後の壁となる慢性拒絶反応を解明していくべきであろう。

Acknowledgments. This work was supported in part by Grant from Japan and China medical organization.

References

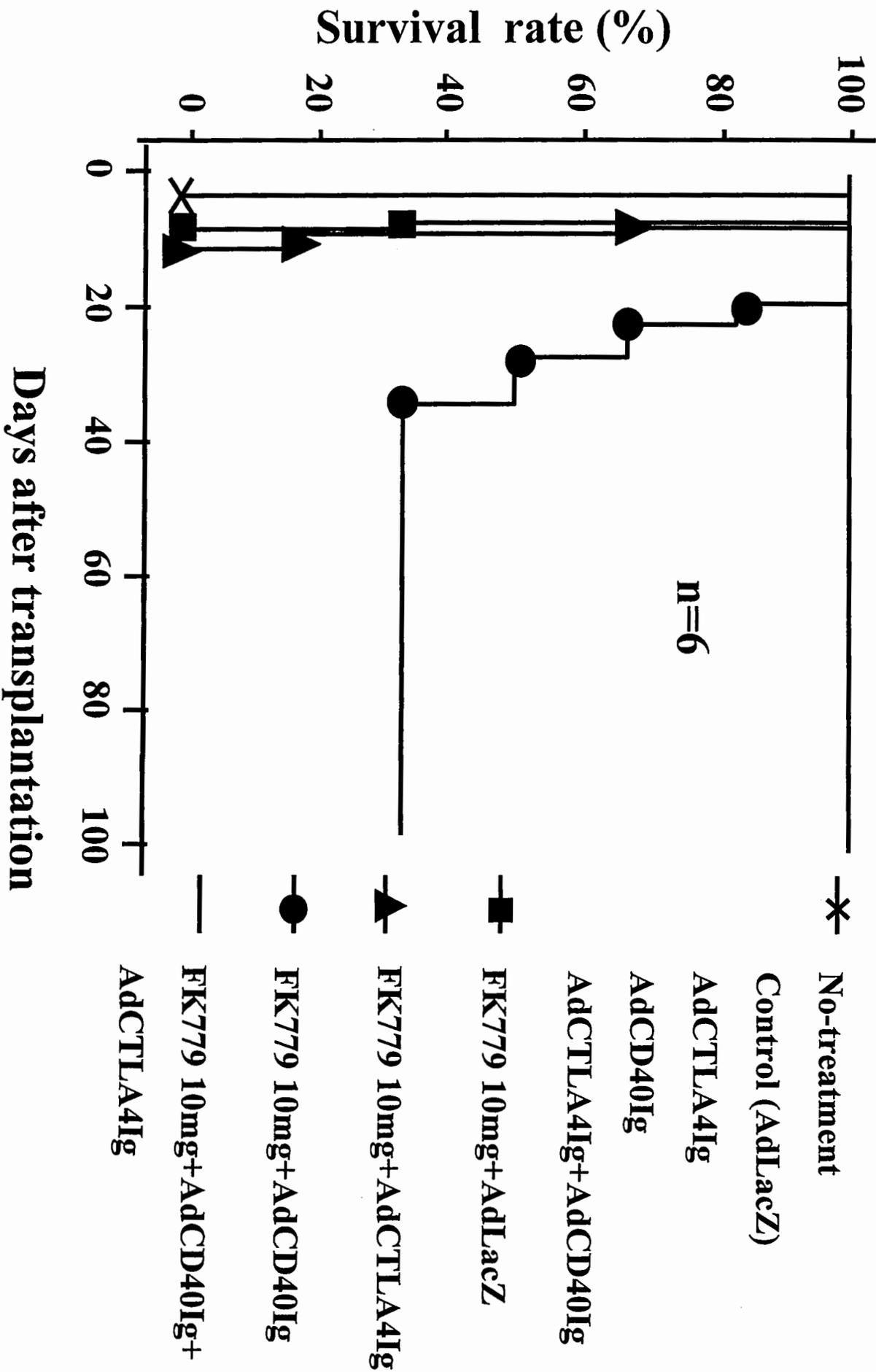
1. Fritz H. Bach. Xenotransplantation: problems and prospects. *Annu Rev Med* 1998; 49: 301.
2. B. Soin, C. M. Vial, P. J. Friend. Xenotransplantation. *B J Surg* 2000; 87: 138.
3. John S Logan. Prospects for xenotransplantation. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 563.
4. Miguel P. Soares, Yuan Lin, Koichiro Sato, et al. Pathogenesis of and potential therapies for delayed xenograft rejection. *Curr Opin Organ Transplant* 1999; 4: 80.
5. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990; 248: 1349.
6. Laurence Bugeon, Margaret J. Dallman. Costimulation of T cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 164.
7. Lasen CP, Elwood ET, Alexander DZ, et al. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 1996; 381: 434.
8. Allan D. Kirk, David M. Harlan, Nicholas N. Armstrong, et al. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8789.
9. Iqbal S. Grewal, Richard A. Flavell. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 111.
10. …… (略)

30. Masaru Nomura, Kenichiro Yamashita, Masaaki Murakami, et al. Induction of donor-specific tolerance by adenovirus-mediated CD40Ig gene therapy in rat liver transplantation. *Transplantation* 2002; 73: 1403.

注：本研究は、2003年3月29日『第6回日本異種移植研究会』にて口演発表、2003年6月2日『American Transplant Congress 2003』にてposter発表、採納されている。

作成日：2003年2月15日

Figure 1: Xenograft Survivals



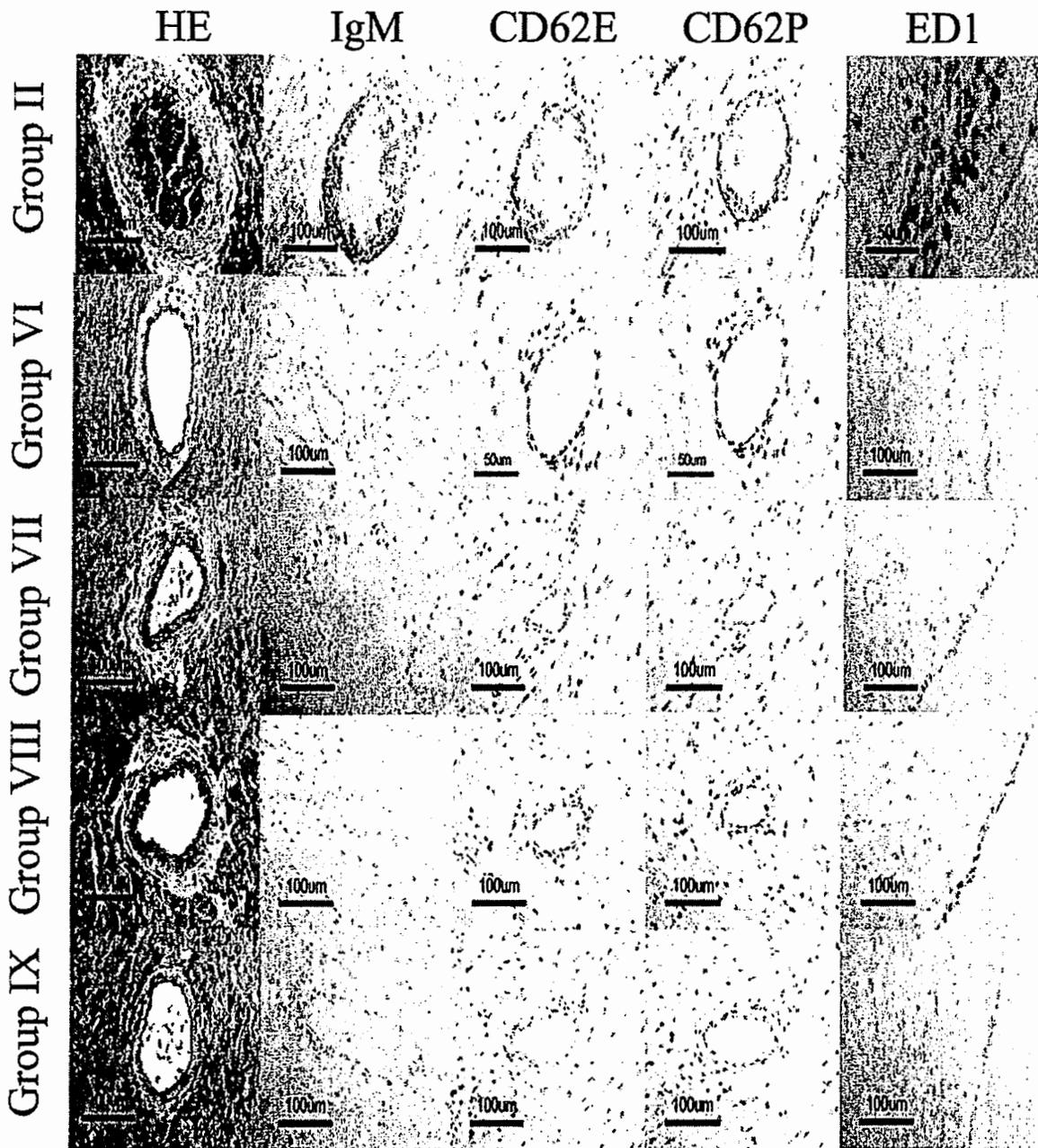


Figure 2: The pathologic findings of DXR show severe microvascular endothelial damage, which are consisted of deposition of IgM antibody, infiltration of macrophages, pro-coagulation, platelet aggregation (expressing on deposition of P selectin) and EC activation (expressing on deposition of E selectin) in Group II (control). The groups (Groups: VI, VII, VIII, IX) containing a transient treatment with FK779 10mg/kg suppressed the features of DXR at post-transplant day3.

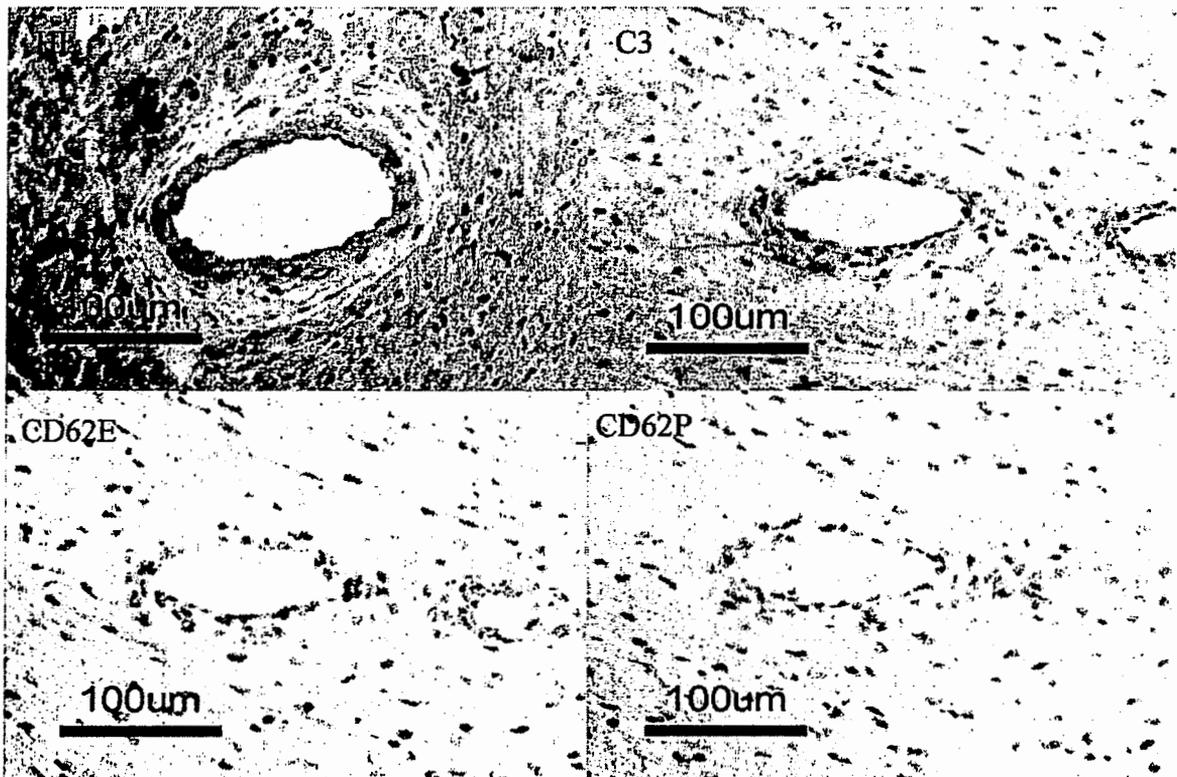


Figure3: After cessation of FK779 treatment in GroupVIII xenografts were not rejected despite appearing deposition of C3, the pathologic findings of xenografts show complete microvascular endothelial outline following suppressions of P selectin and E selectin at post-transplant day7.