

ラット同種複合組織移植における CTLA4-Ig と ICOS-Ig 複合投与の効果

学位論文内容の要旨

緒言

複合組織移植(肢移植)は四肢の欠損の症例に行われる有用な治療法と考えられるが、いずれの臓器の場合でも同様ではあるが、移植片の生着のためには手術後の拒絶反応を抑制する治療を行わなければならない。現在臨床的に使用されている免疫抑制剤は重篤な副作用があるものがほとんどで、四肢のように生命維持に必須でない組織の移植については、より副作用の少ない手法の開発が必要である。

この問題点を克服するため、補助シグナル阻害の手法を肢移植後の拒絶反応抑制に応用した。抗原が生体内に侵入すると、抗原提示細胞(以下 APC)と T 細胞間で細胞膜上の分子同士が結合し、この反応によりシグナルの応答を行う。First signal は APC から T 細胞に抗原が提示され、T 細胞が抗原を認識し、続いて抗原非特異的な補助シグナルが伝達され、T 細胞は抗原に対して免疫の様式を決定することになる。すなわち、補助シグナルが伝達されれば T 細胞は抗原に対し免疫反応を惹起するが、補助シグナルが欠如すれば T 細胞は抗原に対し免疫寛容となる。この現象を利用し、代表的な補助シグナル経路である B7→CD28 経路や B7h→ICOS 経路をそれぞれ CTLA4-Ig と ICOS-Ig を遮断分子として補助シグナル阻害を行い、移植片生着延長を示した研究が発表されている。本研究の目的は、ICOS-Ig を使用して補助シグナルを遮断することにより、同種複合組織移植の移植免疫を抑制しうるかどうかを評価することである。さらに、移植片各組織の病理組織学的検査と血中サイトカイン濃度の測定を行い、CTLA4-Ig と ICOS-Ig の両者を使用して移植免疫抑制に相乗的な効果があるかどうかを評価することである。

材料と方法

ACI の後肢を大腿遠位で切断し、大腿動静脈を吻合して Lewis に異所性移植し、複合組織移植のモデルとした。実験群は対照群、ICOS-Ig 群、CTLA4-Ig と ICOS-Ig の複合投与群に分類し、それぞれ術後にヒト IgG、ICOS-Ig、CTLA4-Ig と ICOS-Ig を投与した。手術から移植片の皮膚に焼痂形成が出現するまでを生着期間とし、各群間で比較した。術後 1 週目の組織を採取し病理組織学的評価を行った。さらに、術前と術後 4、7、14 日目に採血を行い血中サイトカイン濃度、すなわち IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10 の血中濃度を測定した。

結果

生着期間は対照群 6.2 日に対し、ICOS-Ig 群 12.7 日、複合投与群 27.0 日と延長しており、ICOS-Ig 群は対照群に対し、複合投与群は対照群と ICOS-Ig 群の両者に対し有意差を認めた。病理組織学的評価では、皮膚、軟骨、神経、腱では複合投与群が対照群と ICOS-Ig 群の両者に対し有意に拒絶の抑制を示したものの、ICOS-Ig 群と対照群の間では有意差は認めなかった。筋、骨では ICOS-Ig 群は対照群に対し、複合投与群は対照群と ICOS-Ig 群に対して有意に拒絶の抑制を認めた。血中サイトカイン濃度の測定の結果では、ICOS-Ig 群では対照群と比較して TNF- α と IL-10 の濃度が低下しており、複合投与群では IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10 の濃度が低下していた。

考察

本研究の第1の目的であるICOS-Igの効果であるが、移植片の有意な生着延長を示し、複合組織移植片の生着延長に有用であると考えられた。しかし、CTLA4-Igの肢移植に対する生着延長効果や、またICOS-Igの肝や膵島移植に対する効果を検討した研究から考察すると、肢移植の拒絶反応抑制効果は少ないと考えられた。第2の目的であるCTLA4-IgとICOS-Igの複合投与の効果であるが、これは対照群、ICOS-Ig群の両者に対し有意な生着延長を示した。しかし、延長期間の程度や、病理組織学な、特に皮膚の拒絶反応抑制効果から考えると、CTLA4-IgとICOS-Igの複合投与の相乗効果と考えるよりも、主にCTLA4-Igの効果が強く現れており、ICOS-Igの効果は補助的なものではないかと考えられた。心移植に対するCTLA4-IgとICOS-Ig複合投与では相乗効果があるとされているが、肢移植とのこの違いは、ひとつには心筋組織単一の心移植より、特に抗原性の強い皮膚、筋を含む肢移植のほうが移植片拒絶反応の抑制が困難であると考えられること、二つめは拒絶免疫が始動し、反応が拡大していく際に遮断分子を投与するという適切なタイミングを確立していないということにあると考えている。

CD28経路の補助シグナル阻害で1型ヘルパーT細胞(以下Th1)の関与する免疫反応を制御すること、一方ICOS経路の補助シグナル遮断はTh2の関与する免疫反応を制御することを示す研究がある。本実験でも血中サイトカイン濃度測定の結果から以下の結果が導かれた。TNF- α とIL-10はICOS-Igの作用でその血中濃度が減少し、IL-2とIFN- γ はCTLA4-Igの作用でその血中濃度が減少し、IL-4はCTLA4-IgとICOS-Igの相互作用でその血中濃度が減少した。これらの結果からICOS-Igは肢移植後のTh2サイトカインの産生を抑制し、CTLA4-IgはTh1サイトカインの産生を抑制するという過去のデータとおおむね一致するものとなった。本研究では、同種複合組織移植の拒絶反応に対し、CTLA4-IgとICOS-Igの複合投与はTh1とTh2の免疫反応の両者を抑制することを示し、改善の余地はあるもののこのメカニズムを応用し、複合組織移植片の生着に有用な治療戦略が開発されると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浪 明 男

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 笠 原 正 典

学 位 論 文 題 名

ラット同種複合組織移植における CTLA4-Ig と ICOS-Ig 複合投与の効果

複合組織移植(肢移植)は四肢の欠損の症例に行われる有用な治療法と考えられるが、いずれの臓器の場合でも同様ではあるが、移植片の生着のためには手術後の拒絶反応を抑制する治療を行わなければならない。現在臨床的に使用されている免疫抑制剤は重篤な副作用があるものがほとんどで、四肢のように生命維持に必須でない組織の移植については、より副作用の少ない手法の開発が必要である。この問題点を克服するため、補助シグナル阻害の手法を肢移植後の拒絶反応抑制に応用した。本研究の目的は B7h→ICOS 経路を ICOS-Ig を使用して肢移植の免疫抑制しうるかどうかを評価し、次いで ICOS 経路に併せて B7→CD28 経路を CTLA4-Ig を使用し移植免疫抑制に相乗的な効果があるかどうかを評価することである。

方法は、ACI の後肢を大腿遠位で切断し、大腿動静脈を吻合して Lewis に異所性移植し、対照群、ICOS-Ig 群、CTLA4-Ig と ICOS-Ig の複合投与群に分類し、それぞれ術後にヒト IgG、ICOS-Ig、CTLA4-Ig と ICOS-Ig を投与した。各群間で移植片生着期間を比較し、術後 1 週目の組織を採取し病理組織学的評価を行った。さらに、術前と術後 4、7、14 日目に採血を行い血中サイトカイン濃度、すなわち IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10 の血中濃度を測定した。

生着期間は対照群 6.2 日に対し、ICOS-Ig 群 12.7 日、複合投与群 27.0 日と延長しており、ICOS-Ig 群は対照群に対し、複合投与群は対照群と ICOS-Ig 群の両者に対し有意差を認めた。病理組織学的評価では、皮膚、軟骨、神経、腱では複合投与群が対照群と ICOS-Ig 群の両者に対し有意に拒絶の抑制を示したものの、ICOS-Ig 群と対照群の間では有意差は認めなかった。筋、骨では ICOS-Ig 群は対照群に対し、複合投与群は対照群と ICOS-Ig 群に対して有意に拒絶の抑制を認めた。血中サイトカイン濃度の測定の結果では、ICOS-Ig 群では対照群と比較して TNF- α と IL-10 の濃度が低下しており、複合投与群では IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10 の濃度が低下していた。

今回の研究結果より、ICOS-Ig の効果は、移植片の有意な生着延長を示し、複合組織移植片の生着延長に有用であると考えられたものの、CTLA4-Ig の肢移植に対する生着延長効果や、

また ICOS-Ig の肝や膵島移植に対する効果を検討した研究から考察すると、肢移植の拒絶反応抑制効果は少ないと考えられた。CTLA4-Ig と ICOS-Ig の複合投与の効果であるが、これは対照群、ICOS-Ig 群の両者に対し有意な生着延長を示した。しかし、延長期間の程度や、病理組織学的に、特に皮膚の拒絶反応抑制効果から考えると、CTLA4-Ig と ICOS-Ig の複合投与の相乗効果と考えるよりも、主に CTLA4-Ig の効果が強く現れており、ICOS-Ig の効果は補助的なものではないと考えられた。血中サイトカイン濃度測定の結果から以下の結果が導かれた。TNF-a と IL-10 は ICOS-Ig の作用でその血中濃度が減少し、IL-2 と IFN- γ は CTLA4-Ig の作用でその血中濃度が減少し、IL-4 は CTLA4-Ig と ICOS-Ig の相互作用でその血中濃度が減少した。これらの結果から ICOS-Ig は肢移植後の Th2 サイトカインの産生を抑制し、CTLA4-Ig は Th1 サイトカインの産生を抑制するという過去のデータとおおむね一致するものとなった。

審査にあたり、副査笠原正典教授から、TNF ファミリーとの併用や ICOS-Ig の投与のタイミングについての質問などがあつた。次いで主査三浪明男教授より、心移植での良好な成績と肢移植との差異についての質問などがあり、最後に副査上出利光教授から免疫抑制剤との併用、また補助シグナル遮断と免疫抑制剤とを比較した場合、その効果を量的に表せばどうなるかなどの質問があつた。申請者はこれらの質問に対して今回行った実験の結果と過去の文献、申請者自身の今後の実験計画から適切に回答した。

この論文は、複合組織移植における移植免疫抑制に、複数の補助シグナル遮断の手法を応用し、病理評価、サイトカイン濃度の分析とあわせて移植後の組織の変化を解析するという独創的な研究であり、将来的に臨床上の応用、発展が期待されると考えられる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院博士課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。