

CONTROL OF ALLOGRAFT REJECTION BY APPLYING A NOVEL NF- κ B INHIBITOR, DEHYDROXYMETHYLEPOXYQUINOMICIN

(新規 NF - κ B 阻害剤 DEHYDROXYMETHYLEPOXYQUINOMICIN
による移植片拒絶反応の制御)

学位論文内容の要旨

【背景・目的】

NF- κ B は T 細胞の活性化や分化, 増殖に重要な役割を果たしている. 特に副刺激-TCR (T 細胞受容体) 同時刺激を受けた T 細胞は強く活性化するが, この系で NF- κ B は重要な因子とされている. さらにこの経路は calcineurin-NFAT 非依存的であると言われており, カルシニューリン阻害剤に抵抗性の拒絶反応を説明する上で重要視されている. Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) は NF- κ B 核内移行を特異的に阻害する新しい薬剤で, 実験的に *in vitro* および *in vivo* で種々のガン細胞に対し増殖抑制効果が認められている. 本研究では DHMEQ のアロ拒絶反応抑制効果及び, DHMEQ とタクロリムスとの併用効果について検討した.

【方法】

照射した BALB/c (H-2^d) マウス脾細胞 (2.5×10^5 /well) と, C57BL/6 (H-2^b) マウス脾細胞 (2.5×10^5 /well) を, DHMEQ を各濃度含んだ培地内で反応させ, ³H-Thimidine の取り込み (増殖能) を比較した. また, 各濃度の DHMEQ を含んだ培地内で C57BL/6 マウス T 細胞 (1×10^5) を抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体で刺激しリンパ球の活性化抑制効果を, ³H-Thimidine 取り込み, CD4⁺ T 細胞上の CD69, CD25 発現, 培地中の IL-2, IFN- γ 濃度, 細胞周期に関し比較検討した. さらにこの系において刺激 3 時間後の核内での NF- κ B 及び NFAT 活性を ELISA 法で測定した.

in-vivo の実験では BALB/c マウスをドナー, C57BL/6 マウスをレシピエントとする high responding combination の心移植モデルで DHMEQ を各投与量, 投与間隔で腹腔内投与しグラフト拍動停止までの期間を比較した.

次に DHMEQ と tacrolimus との併用効果について検討した. DHMEQ とタクロリムスをそれぞれ各濃度で培地内に添加し, リンパ球の活性化抑制効果を増殖, 表面マーカーの発現, サイトカインの産生の 3 点に関し検討した. その上で BALB/c から C57BL/6 への心移植モデルにおける DHMEQ とタクロリムスの併用効果を検討した. DHMEQ 単独投与の実験と同様, BALB/c の心を C57BL/6 の腹部に移植し, レシピエントに DHMEQ 及びタクロリムスを腹腔内投与し, グラフト拍動の停止までの日数を比較した. さらに移植後 5 日, 12 日が経過したレシピエントの脾細胞を照射した BALB/c 脾細胞と反応させ, IFN- γ 産生細胞数の比較検討を ELISpot assay を用いて行った. また, その際心グラフトも同時に摘出し, それらの組織学的所見を比較検討した.

【結果】

DHMEQ を 1~10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で培地内に添加したリンパ球混合試験において、DHMEQ は 72 時間後のマウス脾細胞の増殖を用量依存的に抑制した。CD3/CD28 刺激においても DHMEQ は 48 時間後のマウス T 細胞の増殖を用量依存的に抑制した。CD3/28 刺激において、5 $\mu\text{g/ml}$ の DHMEQ を培地内に添加すると CD4⁺T 細胞上の 3 時間後の CD69 発現または 9 時間後の CD25 発現は強く抑制された。また、CD3/CD28 刺激において 48 時間後の培地中 IL-2、IFN- γ 濃度は、DHMEQ の用量に依存して減少した。DHMEQ 添加が T 細胞の細胞周期に及ぼす影響を調べるために、CD3/CD28 で刺激した T 細胞に DHMEQ を 5 $\mu\text{g/ml}$ 添加し、48 時間後に抽出した T 細胞を 7-AAD (DNA) と pyronin-Y (RNA) で染色した。コントロールの T 細胞は多くが G₁/S/G₂/M 期に移行していたのに対し、DHMEQ を添加した T 細胞は多くが G₀ 期にとどまっていた。この系において DHMEQ が NF- κ B を抑制していたか否かを調べるため、CD3/CD28 で 3 時間刺激した T 細胞から核内蛋白を抽出し、NF- κ B の重要なサブユニットである p65、p50 と、T 細胞の活性化に大変重要な転写因子である NFAT の結合活性を ELISA 法で測定した結果、DHMEQ の添加によって p65 と p50 は有意に抑制されたのに対し、NFAT は抑制されなかった。

これらの結果を踏まえてマウス心移植の系で DHMEQ のアロ拒絶反応抑制効果を検討した。コントロールのレシピエントのグラフトは全例 7 日以内(中央値:6 日)で拒絶されたのに対し、DHMEQ 20 mg/kg 3 回/week 投与群では中央値 10 日と有意に延長し、さらに 20 mg/kg 連日 14 日間投与群では 28.5 日とさらに延長したが個体差が大きかった。すなわち DHMEQ 単独では十分なアロ拒絶反応抑制効果は得られなかった。

タクロリムスはカルシニューリンを阻害し、NFAT の核内移行を抑制することにより免疫抑制効果を発揮するといわれている。NFAT の阻害と NF- κ B の阻害を同時に行うことによってどの程度の免疫抑制効果が得られるかを調べるため、タクロリムスと DHMEQ の併用効果を検討した。

DHMEQ とタクロリムスを培地中に添加してリンパ球混合試験における脾細胞増殖抑制効果を検討したところ、1 $\mu\text{g/ml}$ の DHMEQ と 0.1 ng/ml のタクロリムスを添加した際に併用効果を認めた。また CD3/CD28 刺激系においては、各濃度で DHMEQ とタクロリムスに併用効果を認めた。また、CD3/CD28 刺激における T 細胞の表面マーカーの発現、サイトカインの産生能などの抑制効果においても DHMEQ とタクロリムスは併用効果を認めた。

in vivo での併用効果の検討も行った。タクロリムス 1.5 mg/kg/day 14 日間の投与ではグラフト生着期間中央値は 13 日、DHMEQ 20mg/kg 3 回/week の中央値が 10 日間であったが、両者の併用で中央値は 59.5 日まで延長し、全例が 40 日以上生着した。併用療法とタクロリムス単独とで移植後 5 日目、12 日目に ELISPOT assay、病理組織学的検討を行った。組織像は、5 日目では両者に差は無かったが、12 日目では、タクロリムス単独群でグラフト内の細胞浸潤が増加していたのに対し、併用群では CD4⁺、CD8⁺T 細胞共に細胞浸潤が抑えられていた。IFN- γ ELISPOT assay でも BALB/c 脾細胞による抗原刺激に対してレシピエント脾細胞中の IFN- γ 産生細胞の数は 12 日目の併用群で著明に抑制されていた。

【考察】

T 細胞の活性化は TCR と MHC-ペプチド複合体との接合の他に CD28 などの副刺激の有無によって左右される。これらの刺激の結果、NF- κ B や NFAT などの特定の転写因子が動員され、T 細胞の活性化、サイトカインの産生、エフェクター細胞への分化などの過程を経て移植片拒絶反応が惹起されるといわれている。これらの転写因子は様々なサイトカイン産生やレセプターの発現にとって共通の鍵のような働きをしているため、これら特定の転写因子を阻害することは有効な免疫抑制の手段となりうる。現行の免疫抑制剤であるタクロリムスやサイクロスポリン A はカルシニューリンを阻害することで NFAT の核内活性を抑制し、主に T 細胞の働きを強力に阻害する。しかしながら、これらカルシニューリン阻害剤に抵抗性の拒絶反応も問題となっている。このカルシニューリン阻害剤抵抗性の拒絶反応は、少なくとも一部には TCR-CD28 同時刺激の際に起こる PKC- θ - NF- κ B の経路が原因となっている可能性も示唆されている。今回我々は、NF- κ B 阻害 DHMEQ を用いて、NF- κ B 阻害と NFAT 阻害の併用がアロ拒絶反応の抑制に有効であることを示した。今回使用した NF- κ B 阻害剤 DHMEQ は選択的に NF- κ B の核内移行を抑制する薬剤として発見され、現在いくつかの癌種においてその発育を抑制することが示されているが、

移植片拒絶反応抑制効果の検討は今回が初である。特にこの薬剤は特記すべき副作用も認めていないことから、臨床への応用が期待される。しかしながら現状の剤形では溶解性に乏しく、投与経路は小動物における腹腔内投与に限定されている。臨床応用に向けてはまず、静注や内服による投与方法を開発し、大動物での検証を行う必要があるといえる。

【結論】NF- κ B 阻害剤 DHMEQ は非常に強力な T 細胞増殖活性化抑制効果を有し、特にタクロリムスなどのカルシニューリン阻害剤との併用において免疫抑制剤としての有用性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野々村 克 也

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

CONTROL OF ALLOGRAFT REJECTION BY APPLYING A NOVEL NF- κ B INHIBITOR, DEHYDROXYMETHYLEPOXYQUINOMICIN

(新規 NF - κ B 阻害剤 DEHYDROXYMETHYLEPOXYQUINOMICIN
による移植片拒絶反応の制御)

NF- κ B は T 細胞の活性化や分化, 増殖に重要な役割を果たしている. 特に副刺激-TCR (T 細胞受容体) 同時刺激を受けた T 細胞は強く活性化するが, この系で NF- κ B は重要な因子とされている. さらにこの経路はカルシニューリン-NFAT 非依存的であると言われており, カルシニューリン阻害剤に抵抗性の拒絶反応を説明する上で重要視されている. Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) は NF- κ B 核内移行を特異的に阻害する新しい薬剤で, 実験的に *in vitro* および *in vivo* で種々のガン細胞に対し増殖抑制効果が認められている. 本研究では DHMEQ のアロ拒絶反応抑制効果及び, DHMEQ とタクロリムスとの併用効果について検討した. 各濃度の DHMEQ を含んだ培地内において C57BL/6 マウス T 細胞 (1×10^5) を抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体で刺激しリンパ球の活性化抑制効果を, ^3H -Thimidine 取り込み, CD4⁺ T 細胞上の CD69, CD25 発現, 培地中の IL-2, IFN- γ 濃度, 細胞周期, 核内 NF- κ B 結合活性に関し検討した. DHMEQ は用量依存的に T 細胞の増殖, 活性化, サイトカイン産生能を抑制し, 核内においては NF- κ B 活性を抑制したが NFAT 活性は抑制しないことを示した. *in vivo* の実験では BALB/c マウスをドナー, C57BL/6 マウスをレシピエントとする high responding combination の心移植モデルで DHMEQ を各投与量, 投与間隔で腹腔内投与しグラフト拍動停止までの期間を比較した. DHMEQ の投与でグラフト生着期間は延長した. 次に DHMEQ とタクロリムスとの併用効果について検討した. DHMEQ とタクロリムスをそれぞれ各濃度で培地内に添加し, リンパ球の活性化抑制効果を検討した. DHMEQ, タクロリムスの併用はそれぞれの単剤と比較して効果的に T 細胞を抑制した. その上で心移植モデルにおける DHMEQ とタクロリムスの併用効果を検討した. DHMEQ 単剤, タクロリムス単剤ではいずれも早期にグラフトが停止したのに対し, 両者の併用では全例が 40 日を越える生着期間が得られた. また, レシピエントの脾臓細胞を解析した結果, 術後 12 日の時点で両者の併用においてドナー特異的な低反応性を示した. NF- κ B 阻害剤 DHMEQ は非常に強力な T 細胞増殖活性化抑制効果を有し, 特にタクロリムスなどのカルシニューリン阻害剤との併用において免疫抑制剤としての有用性が示唆された.

公開発表後、主査の野々村教授より 1)タクロリムスなどの現行の免疫抑制剤と比べての DHMEQ の優位性について 2)DHMEQ と併用したタクロリムスの投与量について、3)カルシニューリン阻害剤抵抗性の拒絶反応についての質問があった。これらの質問に対して、1)DHMEQ は選択性が高いこと、機序が異なる新しいタイプの薬剤であること、2)今回用いたタクロリムスの投与量は suboptimal dose であること、3)カルシニューリン阻害剤ではコントロールできない拒絶反応が存在し、現状ではそれらに対し副作用の強い他薬剤を使用する必要があることを挙げ回答した。次いで、副査の上出教授からは 1)この薬剤の種差における違いについて、2)DHMEQ を培地中から除去した際の効果判定 (pre-conditioning) では効果があったかどうかについて、3)移植後 DHMEQ 投与による体重減少等の副作用について、4)他の薬剤との比較について、5)この薬剤の将来的な使用法の展望について質問があった。これらの質問に対し、1)現在 DHMEQ の剤型が水溶性のものが無く、げっ歯類の腹腔内投与を主な投与経路としている関係上、in vivo では大動物での実験はなされていないが、NF- κ B 自体が種差を超えて存在するグローバルな転写因子であることから、大動物で効果的である可能性は高いこと、2)pre-conditioning に関する実験もデータとして示しては行っており、効果があったこと、3)移植後の DHMEQ 単剤投与による体重減少はコントロールとほぼ同じ動向を見せたが、タクロリムスとの併用では若干体重減少が強かったこと、4)学位申請者の経験上では以前使用していた AdCD40Ig では長期生着が得られたのに対し DHMEQ ではそこまでの効果ではなかったが、NF- κ B 欠損マウスでの長期生着を考えると、剤型や投与方法の改善で効果が期待できること、5)DHMEQ はここに挙げた T 細胞の抑制のほかにも非特異的な炎症反応に対する抑制効果が強いいため、移植後ごく早期の使用などの方法があることなどを述べて回答した。最後に副査の藤堂教授より 1)DHMEQ が他の動物に対して効果があるかについて、2)DHMEQ の毒性試験についての質問があった。それらの質問に対し、1)最近 NF- κ B を抑制するといわれる新しい薬剤を用いたサルの実験で NF- κ B と NFAT との同時遮断が有効であったとの報告があり、当研究における治療戦略は大動物または人でも有効な可能性があること、2)教室内で行った毒性試験の結果では DHMEQ を投与した群とコントロール溶媒を投与した群とで肝機能、腎機能、CBC などの項目に関して全く差が生じなかったことなどを挙げ回答した。いずれの質問に対しても、申請者は概ね妥当に回答した。

新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ は現状では主だった副作用を認めず、免疫抑制効果は in vitro, in vivo 双方において認められたことから、当薬剤の臨床での応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得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。