

学位論文題名

Purified eicosapentaenoic acid induces prolonged survival of cardiac allografts and generates regulatory T cells

(エイコサペンタエン酸はマウス移植心生着を延長し、
制御性T細胞を誘導する)

学位論文内容の要旨

背景と目的：臓器移植における免疫寛容とはドナー抗原に対しては無反応でありながら病原微生物、悪性腫瘍など他の抗原に対しては正常の免疫反応を示す状態である。免疫寛容が誘導できれば、従来型の非特異的な免疫抑制剤の減量・中止も可能になりうる。一方、免疫寛容を達成するメカニズムのひとつとしてここ10年で急速に研究が進んだ制御性T細胞(Treg)による immune regulation が提唱されている。何らかの前処置や薬剤によりドナー特異的な Treg を積極的に誘導することができれば免疫寛容誘導の1つの有効なアプローチとなる可能性がある。

エイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid: EPA) は魚油に豊富に含まれる不飽和脂肪酸のひとつで、すでに高脂血症および動脈硬化症の治療薬として臨床応用されている。そのほか自己免疫疾患に対する有効性など免疫機能に対する作用が数多く報告されているが、臓器移植における EPA の効果を詳細に検討した報告はない。そこで今回われわれは、マウス異所性心移植モデルを用いて EPA の効果とそのメカニズムを検討した。

方法と結果：C57BL/10 マウス (MHC : H-2^b) をドナー、CBA マウス (MHC : H-2^k) をレシピエントとする MHC 完全不一致の異所性心移植を行った。治療群は移植直後に 0.1g/kg、0.5g/kg および 1.0g/kg の EPA を腹腔内投与(EPA0.1 群、EPA0.5 群および EPA1.0 群)し、無処置で心移植を行った無処置群と移植心の生着期間を比較した。結果、無処置群では生着期間中央値(MST)8 日であったのに対し EPA0.1 群で 13 日、EPA0.5 群で 24 日、EPA1.0 群で 100 日以上と、それぞれ有意に延長した。また移植心を組織学的に検討したところ EPA1.0 群の移植心は移植後 100 日経過時点でも細胞浸潤および心筋組織破壊は軽度であった。

次に EPA がどのようにして移植心の生着延長を誘導したのか、そのメカニズムを検討した。まず、レシピエント脾細胞とドナー脾細胞との混合培養を行った。すなわち EPA を投与して心移植を行い 7 日間経過したレシピエントの脾細胞 (responders) と、MMC 処理したドナーの脾細胞 (stimulators) を 4 日間混合培養し、細胞増殖の程度と培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA 法により測定した。その結果、EPA 投与によりドナーに対するレシピエント脾細胞の細胞増殖および炎症性サイトカイン (IL-2、IFN- γ 、IL-12) の分泌は抑制され、抑制性サイトカインである IL-10 は増加した。また、これらの効果は 3rd party である BALB/c マウス (MHC : H-2^d) の脾細胞を stimulator としたときは認められなかった。

続いて細胞移入実験を行った。まず、第1レシピエント (CBA マウス) に EPA を投与し心移植を行い、30 日後にこのレシピエントから脾細胞を採取して、無処置の第2レシピエント (CBA マウス) に移入した。同日に第2レシピエントに心移植を行った。この第2レシピエントは EPA 投与は受けず細胞移入の処置のみ受けているので、移入した細胞の持つ効果・機能のみを見ることができる。第2レシピエントで移植心の生着が延長すれば、移入

した細胞はアロ免疫応答を制御する機能を持っている細胞、すなわち Treg である、と考えられる。移入する細胞としては全脾細胞、CD4 陽性 T 細胞、そして CD4CD25 両陽性 T 細胞を用いた。その結果、全脾細胞、CD4 陽性細胞、CD4CD25 両陽性細胞を移入したいずれの場合も MST は 100 日を越えた。一方、EPA も心移植も受けていない naïve マウスから細胞移入した第 2 レシピエントでは移植心は拒絶された。これらのデータから、EPA を投与した第 1 レシピエントには CD4CD25 陽性の Treg を含む免疫制御機能を持った細胞ができていたことが示された。また、3rd party である BALB/c マウスの移植心は EPA 投与第 1 レシピエントから細胞移入された第 2 レシピエントにおいても急性拒絶されたので免疫制御細胞は特異性を持っていると考えられた。なお、EPA を投与したレシピエントの CD4CD25 両陽性 T 細胞は高率に Foxp3 陽性であった。

最後に、脂質代謝を司る核内受容体である peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) が Treg 誘導に関与するという近年の報告から、EPA の効果における PPAR γ の関与について検討した。レシピエントに予め PPAR γ アнтаゴニスト (BADGE) を 9 日間投与し、EPA は今までと同じく腹腔内投与して心移植を行った。移植心の生着期間について比較、さらに移植 3 日後の脾臓組織内の PPAR γ の発現を RT-PCR で測定した。EPA 投与して移植したマウスでは無処置で心移植したマウスや naïve マウスに比べ PPAR γ の発現が亢進していた。生着期間は EPA 単独では MST 100 日以上なのに対して BADGE 投与により MST 16 日に短縮した。また、先ほどのリンパ球混合培養でも EPA の効果が BADGE 投与により減弱した。

考察：マウス MHC 完全不一致心移植モデルにおいて EPA の単回投与によりマウス移植心の生着期間が延長した。そのメカニズムの 1 つとして細胞増殖抑制・炎症性サイトカインの産生抑制など拒絶反応において重要なリンパ球の effector function に対する EPA の直接的な免疫抑制作用が挙げられる。そして、これらの作用は PPAR γ の活性化が深く関与していると考えられた。もうひとつの可能性として、細胞移入実験の結果から、EPA 投与により CD4CD25 陽性 Treg を含む免疫制御細胞がレシピエント内に誘導され、移植臓器保護的に作用し続けていることが考えられた。本モデルにおいて EPA の血中濃度は投与後数日間で前値に復することが確認されており、EPA の直接的な作用のみでは単回投与での 100 日以上 of 移植心長期生着は説明できない。さらに、先の実験で EPA 投与により PPAR γ が活性化されること、IL-10 の産生が増加していることも、EPA 群では Treg が誘導され易い環境であると考えられる。以上のことから EPA の単回投与は PPAR γ の活性化を介してリンパ球の effector function を抑制し、さらにはドナー特異的な CD4CD25 陽性 Treg を誘導することで移植心の長期生着をもたらしている可能性が強く示唆された。

結論：EPA 投与によりマウス移植心生着期間が延長し、レシピエント脾臓内に Treg が誘導されていた。また、PPAR γ アнтаゴニスト投与によりこれら EPA の効果が阻害された。EPA の効果発現には PPAR γ が深く関与していると思われた。EPA はすでに臨床で使用されている。急性拒絶反応は従来型の免疫抑制剤で抑制しつつ EPA を併用して抗原特異的な免疫制御細胞の誘導を確認しながら、従来型の免疫抑制剤を減量できれば、従来型の免疫抑制剤の長期的内服による副作用を回避できると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 堂 省
副 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 野々村 克 也

学位論文題名

Purified eicosapentaenoic acid induces prolonged survival of cardiac allografts and generates regulatory T cells

(エイコサペンタエン酸はマウス移植心生着を延長し、
制御性T細胞を誘導する)

エイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid: EPA) は魚油に豊富に含まれる不飽和脂肪酸で、すでに高脂血症および動脈硬化症の治療薬として臨床応用されているが purified EPA の移植免疫における効果を検討した報告はまだない。本研究は、マウス心移植モデルにおける purified EPA の効果とそのメカニズムを検討したものである。まず C57BL/10 マウス (MHC : H-2^b) をドナー、CBA マウス (MHC : H-2^k) をレシピエントとする MHC 完全不一致異所性心移植を行った。治療群は移植直後に purified EPA を腹腔内投与し、無処置で心移植を行った無処置群と移植心の生着期間を比較した。結果、無処置群では生着期間中央値(MST)8 日であったのに対し EPA0.1g/kg 投与で 13 日、EPA1.0g/kg 投与で 100 日以上と、それぞれ有意に延長した。次に allo-MLR を行い purified EPA 投与によりレシピエント脾細胞の細胞増殖および炎症性サイトカイン (IL-2、IFN- γ) の産生が抑制され、逆に抑制性サイトカインである IL-10 は増加することが示された。また、脾臓内樹状細胞の副刺激分子および MHC class II 分子の発現が無処置群に比べ purified EPA 投与により抑制されることが示された。さらに EPA 投与したレシピエントから naive レシピエントへの細胞移入実験から EPA 投与によりレシピエントの脾臓内に CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells を含む regulatory cells が誘導されたことが示された。最後に peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) の antagonist を用いて前述の purified EPA の効果が PPAR γ 依存性であることが示された。

質疑応答において上出利光教授より、本モデルにおいてアロ反応性細胞がどのようなメカニズムで抑制されているかについての質問があった。この質問に対し、細胞移入実験において移植後 7 日の脾細胞を naive レシピエントに移入して心移植を行った場合は移植後 30 日の脾細胞を移入した場合に比べて生着延長効果が弱まったことを示し、移植後ごく早期は EPA による直接的な作用がアロ反応性細胞を抑制し、regulatory T cells はやや遅れて誘導されその後長期にわたってアロ反応性細胞を抑制し続けていることが推測されると答えた。また、他の臓器移植モデルにおける効果についての質問があった。この質問に対し、皮膚移植においては EPA の効果はあまり強くなく、臓器の抗原性の違いや拒絶に至る詳細なメカニズムの相違が原因ではないかと答えた。ついで、野々村克也教授より、他の免疫抑制剤との併用効果について質問があった。この質問に対し、臨床での免疫抑制剤の中心であるカルシニューリン阻害剤は regulatory T cells の誘導を阻害するという報告が多く

あり一方ラパマイシンなどの mTOR 阻害剤は誘導を促進するという報告があることから併用薬剤との相互作用は重要な要素であると答えた。最後に藤堂省教授から臨床応用を考える上で注意すべき点について質問があった。この質問に対しては副作用としての出血傾向の克服のほか、EPA の効果をモニタリングするために regulatory T cells の存在および機能を評価する方法の確立が重要と答えた。

この論文は、すでに臨床において安全性が証明されている既存の薬剤による制御性 T 細胞誘導効果が示された点で American Journal of Transplantation において高く評価され、今後の regulatory T Cell 誘導のメカニズムの解明およびその知見が臓器移植において積極的に応用されることが期待される。EPA はすでに臨床で使用されている。急性拒絶反応は従来型の免疫抑制剤で抑制しつつ EPA を併用して抗原特異的な免疫制御細胞の誘導を確認しながら、従来型の免疫抑制剤を減量できれば、従来型の免疫抑制剤の長期的内服による副作用を回避できると思われる。

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。