

学位論文題名

NK026680 inhibits T-cell function in an IL-2-dependent manner and prolongs cardiac allograft survival in rats

(NK026680はIL-2依存性にT細胞機能を抑制し、ラットの
アロ心グラフトの生着期間を延長させる)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 臓器移植後の免疫抑制療法において、カルシニューリン阻害剤(CNI)の長期投与により腎不全や代謝障害等の副作用のリスクが増大することが問題となっているが、CNIに替わる免疫抑制剤は限られているのが現状であり、より副作用の少ない新規薬剤の開発が重要である。トリアゾロピリミジン類は、様々な生理活性をもつ合成ヘテロ環であり、新規トリアゾロピリミジン合剤であるNK026680は、これまでにマウス骨髄移植後の致命的な移植片対宿主反応の改善効果、SCG/Kjマウスにおける糸球体腎炎発症抑制効果、ラット肝移植におけるアログラフトの生着期間延長効果などの免疫抑制作用をもつことが報告されてきた。これらの機序として樹状細胞機能を抑制することが示唆されているが、T細胞に対する抑制効果は不明である。今回の実験では、①in vitroにおいてNK026680のT細胞に対する抑制効果、②心移植モデルを用いたNK026680単独、もしくはCNIであるtacrolimusとの併用下での生体内での免疫抑制効果を検討した。

【材料と方法】 ①C57BL/6 (H-2^b)マウス脾細胞よりT細胞を単離し、抗CD3/CD28抗体刺激下でNK026680と共培養したT細胞の増殖能、IL-2産生量、CD25発現率、細胞周期を測定・解析した。次に、NK026680のT細胞抑制効果の機序を解明するために、T細胞受容体(TCR)の伝達経路のひとつでありIL-2産生にも関与するMAPK系のリン酸化に対する影響をWestern-blot法にて、転写因子であるNFAT、NF- κ B、AP-1の核内移行蛋白量をELISA法にて解析した。②ACI(RT1^{av1})ラットをドナー、Lewis(RT1^l)ラットをレシピエントとした異所性心移植モデルにおいて、移植直後よりNK026680を単独、もしくはtacrolimusとの併用で14日間投与し、アログラフト生着期間を検討した。また、レシピエントラットのアロ免疫応答の評価としてリンパ球混合試験やドナー抗原特異的IFN- γ 産生細胞数の測定を行い、グラフト組織の病理組織所見や免疫染色所見を評価した。NK026680とtacrolimusの併用効果の有効性は、combination index(C.I.)を算出して検討した。

【結果】 ①NK026680は抗CD3/CD28抗体刺激に対するT細胞の増殖能、IL-2産生量、CD25発現率を、無治療群と比較して濃度依存性に有意に抑制した。また、NK026680治療により、T細胞のG1期からS期への移行を有意に抑制した。これらの有効濃度における細胞毒性は認めなかった。また、NK026680は抗体刺激30分後のp38MAPKのリン酸

化を約 30%抑制した。ERK や JNK のリン酸化は抑制しなかった。また、抗体刺激 2 時間後の p65 と c-Fos の核内移行を約 30%, c-Jun のそれを約 20%抑制した。その一方で NFAT や p50 の核内移行は抑制しなかった。②ラット心移植において、30 mg/kg の NK026680 の投与により、無治療群 (6 日)と比較してグラフト生着期間中央値 (MST)が 19 日に延長した($p < 0.05$)。1.0 mg/kg の tacrolimus 単剤でグラフト MST : 9 日と、若干の延長効果を認め、両者の併用により MST : 28 日と、さらなる生着期間の延長を認めた。両者の C.I. は 0.9 であり、軽度の相乗的効果と判定された。また、2.5 mg/kg の tacrolimus との併用においてもグラフト MST は有意に延長し、C.I. は 0.987 であったため、やはり軽度の相乗的効果があると判定された。移植後 4 日目に施行したレシピエントラットのドナー抗原に対するリンパ球混合試験とドナー抗原特異的 IFN- γ 産生能の検討では、NK026680 治療群は無治療群と比較して有意に抑制されていた。術後 10 日目の同解析では、NK026680 と tacrolimus の併用群において、各々の単剤治療群と比較してアロ抗原に対する免疫反応が有意に抑制されていた。また、グラフト内の浸潤リンパ球数も有意に抑制されていた。

【考察】 これまでの報告では、NK026680 の免疫抑制効果の主体は樹状細胞機能を抑制することであり、T 細胞に対する抑制効果は明らかにされていなかったが、本研究において NK026680 は IL-2 依存性に T 細胞機能を直接抑制することが証明された。IL-2 は、抗原提示細胞によって提示されたペプチドと副刺激経路に T 細胞が共結合することで直ちに MAPK 系経路や NFAT, NF- κ B, AP-1 などの転写因子が活性化され、産生が開始される。IL-2 は IL-2 受容体の合成を誘導し、S 期へと細胞周期を移行させ核内で DNA 複製が開始され、T 細胞の増殖が開始される。MAPK 系経路のひとつである p38 MAPK は、IL-2 産生に直接関与しているだけでなく、その下流である NFAT, NF- κ B, AP-1 などの転写因子の活性化を直接調節しているといわれている。今回の結果では NK026680 がマウス T 細胞の IL-2 産生経路である p38 MAPK のリン酸化と p65, c-Fos, c-Jun の核内移行を抑制したことが示されており、このことは NK026680 が直接的に T 細胞の活性化を抑制することを示唆する。ラット心移植モデルを用いた In vivo 実験では、NK026680 治療によりドナー抗原特異的なリンパ球の増殖や IFN- γ 産生細胞数、グラフト内の浸潤細胞数を抑制し、グラフト生着期間を延長させた。これまでの報告では、NK026680 治療により生体内で樹状細胞が修飾され、Th2 にシフトさせることで二次的に T 細胞の反応を減弱させることが免疫抑制効果の主因と考えられていた。しかし、生体内に NK026680 を投与した際のピーク時ならびに 4 時間後の血中濃度は今回の実験で証明された T 細胞を十分抑制する濃度であったことが確認されているので、樹状細胞を介した効果のみならず、直接的な IL-2 抑制作用による T 細胞の反応低下も、生体内での免疫抑制効果に寄与していると考えられる。また、tacrolimus との併用療法は軽度の相乗的効果があることが確認されたが、お互いの血中濃度に影響することがなかったため、この効果は薬物相互作用によるものではないことが裏付けられた。今回の試験において、NK026680 の投与による重篤あるいは致死的な副作用は特に認められなかった。

【結論】 NK026680 は T 細胞機能の抑制効果ならびにラットのアロ心グラフト生着期間の延長効果があることを示しており、臓器移植後の免疫抑制療法として使用するにあたり有用な新規薬剤であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	松居喜郎
副査	教授	清野研一郎
副査	教授	武富紹信
副査	准教授	神山俊哉

学位論文題名

NK026680 inhibits T-cell function in an IL-2-dependent manner and prolongs cardiac allograft survival in rats

(NK026680はIL-2依存性にT細胞機能を抑制し、ラットの
アロ心グラフトの生着期間を延長させる)

臓器移植後の免疫抑制療法において、カルシニューリン阻害剤に替わる免疫抑制剤は限られているのが現状であり、より副作用の少ない新規薬剤の開発が重要である。新規トリアゾロピリミジン合剤であるNK026680は、樹状細胞の機能を抑制することで免疫抑制効果を発揮するとされているが、その詳細な機序は不明であり、またT細胞に対する抑制効果も不明である。本実験ではNK026680のT細胞に対する抑制効果、ならびに心移植モデルを用いたNK026680とtacrolimusの併用効果を検討した。

NK026680は、抗CD3/CD28抗体で刺激したT細胞の増殖能、CD25発現率、IL-2産生量を濃度依存性に有意に抑制した。T細胞のG1期からS期への移行も有意に抑制した。MAPK系経路のリン酸化をImmunoblottingで検討したところ、p38 MAPKのリン酸化を約40%抑制した。IL-2産生に関与する転写因子のうち、p65、c-Fos、c-Junの核内移行を抑制した。

In vivoにおいては、ラット心移植モデルを用いて検討し、無治療群と比較して30 mg/kg以上のNK026680の投与により有意にグラフト生着期間中央値が延長した。tacrolimus単剤でも延長効果を認めたが、両者の併用によりさらなる生着期間の延長を認めた。NK026680とtacrolimusの併用による治療効果はCIが0.9であり、相乗的と評価できた。移植後のアロ免疫反応やグラフト内浸潤細胞数の検討では、NK026680治療群で無治療群と比較して有意に抑制されていたが、併用群ではさらに抑制されていた。

以上より、NK026680はT細胞機能を抑制し、またtacrolimusとの併用療法は臓器移植後の免疫抑制療法として有用と考えられた。

公開発表後、まず副査の清野教授から1)CNIシグナルへの作用について、2)NF- κ B活性の確認方法について質問があり、申請者は1)CNIシグナルであるNFATの活性は抑制しなかった、2)TransAM kitを用いたELISA法で、核内に移行した蛋白量を検討した、と回答した。次に副査の武富教授より1)TransAMの詳細な検査方法について、2)樹状細胞機能抑制の機序について、3)c-Jun、c-Fosの発現抑制の経過について、4)CIの詳細な算出方法について、質問があった。申請者は1)核内蛋白を抽出し、目的分子を測定できる専用のplateを用いて核内に移行した蛋白量をELISAで検討した。2)樹状細胞においてもWestern blot法でp38を抑制していた。これに加えてERK、JNKも抑えており、さらにc-Jun、c-Fosも抑制していたのでほぼ同様の機序と考えている。3)30分、1、2、4時間で追ったが、2時間の時点で一番差が出ていた。4)単剤の効果をグラフで式を導き出し、それをもとに実際の効果と予想される効果との比率を検討するものである。抗癌剤や免疫抑制剤など、併用で使用している実験においては多数の論文で使用されている。と回答した。次に、副査の神山准教授より1)樹状細胞への抑制効果、2)実際のvivoでの血中濃度、3)併用療法が単剤に比

べ10日目で差が出た機序、4) tacrolimus との相乗効果の機序について、質問があった。申請者は、1)樹状細胞においては、マウス CD40、CD80、CD86 の発現を抑制し、IL-12 の産生を抑制した、2)20mg/kg で投与した際、4 時間後には 125ng/ml であった、3)初期にはある程度の抑制効果があれば十分に反応するが、晩期では十分な効果がなければ抑制しきれないと考える。併用療法はそれぞれ別の作用機序と考えられるため、十分な効果が得られたものと考えられる。4) tacrolimus も NK026680 も血中濃度は変わらず、薬物相互作用で効果が出たわけではないと考える、と回答した。最後に、主査の松居教授から、1) vitro でマウスを、vivo でラットを使用した理由、2) 単剤での治療効果の程度、3)臨床応用への問題点について、質問があった。申請者は、1)解析ツールとしてはマウスの方がはるかに詳細に検討できるため vitro はマウスを使用した。Vivo ではマウスでも効果があったのだが、臨床的意義はラットの方が高いため、ラットを使用した。2)この NK026680 の単剤での効果は、直接比較した tacrolimus や、文献的な MMF やラパマイシン等と比較してもそれらを凌駕するものではないと考える。本実験の意義としては、tacrolimus の副作用減少のため、減量を可能に示した点である、3)ラットにおける毒性は、軽度の体重減少と下痢であった。これらを元に大動物実験の必要性がある、と回答した。いずれの質問にも妥当な回答をなした。

本研究により NK026680 は樹状細胞だけでなく、初めて T 細胞の機能を抑制したこととその抑制機序が証明された。また tacrolimus との併用により相乗効果を示し、臨床応用として tacrolimus の投与量減量、ならびに副作用の軽減に寄与する可能性を示唆する点で高く評価され、今後の臨床応用に期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。