

学位論文題名

The immunomodulatory effect of nuclear factor- κ B inhibition by dehydroxymethylepoxyquinomicin in combination with donor-specific blood transfusion

(新規 Nuclear factor kappa B 阻害剤 Dehydroxymethylepoxyquinomicin とドナーリンパ球静脈投与の併用による免疫反応修飾効果)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】移植臓器の拒絶、生着(免疫寛容の誘導)は T 細胞、樹状細胞などの抗原提示細胞を中心とした免疫反応により決定されるが、これら免疫細胞の増殖、成熟、分化には核転写因子 Nuclear factor kappa B (NF- κ B) の活性化が重要である。一般的に T 細胞は、抗原提示細胞の主要組織適合抗原複合体 (MHC) と副刺激分子からの活性化シグナルを受けて免疫反応を開始するが、MHC-T 細胞受容体からの MAP キナーゼや、CD28 などの副刺激分子を経たシグナルは、最終的に T 細胞内の NF- κ B を活性化する。さらに 抗原提示細胞の分化、成熟の過程で NF- κ B が阻害されると 免疫寛容誘導性樹状細胞が誘導される。これらの事実から NF- κ B は移植免疫における重要なターゲット分子と考えられる。近年、共同研究者である梅澤らは、特異的に NF- κ B 阻害を行う低分子 Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) の開発に成功した。この新規 NF- κ B 阻害剤は NF- κ B と直接分子結合し、核内移行を抑制するという特異的な作用機序を持つ。これまでに我々の研究室では、マウス心移植モデルを用いて DHMEQ による拒絶反応抑制効果を確認した(参考文献参照)。一方で、移植治療においては長期成績の改善、生涯にわたる免疫抑制剤の服用とその弊害への対策が最重要課題である。その解決策として‘免疫寛容の誘導’が望まれている。ドナーリンパ球の静脈内投与(donor-specific transfusion: DST)は、特に副刺激経路の遮断や抗 CD4 抗体との併用治療により、T 細胞の activation-induced cell death (AICD)、制御性 T 細胞の生成を促し‘免疫寛容’を誘導する。逆に、移植治療に最も頻用されているカルシニューリン阻害剤は、この効果を阻害する。‘免疫寛容誘導’を妨げない免疫抑制剤の開発が急務であるが、この分野における NF- κ B 阻害剤の持つ役割はほとんど分かっていない。更に、NF- κ B が副刺激経路に重要であることを考慮すると、DST と NF- κ B 阻害の併用治療は、DST+副刺激遮断で得られるような、免疫寛容を誘導する可能性が示唆される。本研究では、DST に新規 NF- κ B 阻害剤、DHMEQ を併用し、NF- κ B 活性阻害の‘免疫寛容誘導’における効果を検証した。

【対象と方法】マウスは BALB/c (H-2^d)、C57BL/6 (B6: H-2^b) を用いた。腹部異所性心移植の 7 日前に DST としてドナー系統の脾臓リンパ球 (20x10⁶) を用いた。DHMEQ (30 mg/kg/日) は DST 直後から連日 2 週間、腹腔内投与した。グラフト生存日数 (Median survival time: MST)、グラフト組織像、免疫染色による CD4、CD8 陽性グラフト浸潤細胞数にて拒絶反応抑制効果を検討した。また、ドナー抗原刺激に対する免疫反応を所属リンパ組織である脾臓を用い、リンパ球混合培養後の ³H-thymidine の取り込み (Mixed lymphocyte reaction: MLR)、IFN γ ・ELISPOT アッセイ、CD4 陽性 T 細胞中の CD154 発現 (フローサイトメトリー: FACS) にて検討した。制御性 T 細胞 (Foxp3 陽性 T 細胞) の割合を FACS にて検討し、細胞分離には磁気細胞分離法 (MACS) のシステムを用いた。

【結果】BALB/c の心グラフトは B6 レシピエントにより 8 日以内に拒絶された (Vehicle 投与による control 群)。DST、DHMEQ それぞれの単独治療はわずかにグラフト生存期間を延長させた (DHMEQ: MST=16 日、DST: MST=15 日)。これに対し DST と DHMEQ の併用治療 (DST+DHMEQ) により有意なグラフト生存期間の延長がみられた (MST=39

日)。移植後 4、7 日目の免疫反応を観察すると、DST+DHMEQ 治療により MLR ($p<0.005$ vs. control, DST)、IFN γ 産生細胞 ($p<0.05$ vs. control, DST, DHMEQ)、CD154 発現 ($p<0.05$ vs. control, DST)、CD4、CD8 陽性グラフト浸潤細胞数 ($p<0.005$ vs. control, DHMEQ) はいずれも有意に抑制されていた。さらに、マウスの系統を変更（ドナーを B6、レシピエントを BALB/c）したところ、興味深いことに 60% の DST+DHMEQ 治療マウスに 100 日を越えるグラフト生着が得られた（DST、DHMEQ 単独は MST=38 日、20 日）。この移植後 100 日目の免疫反応は、直接（MLR）、間接（ドナーペプチドに対する反応）免疫反応ともドナー抗原特異的に抑制されていた（3rd party 抗原に対する免疫反応は保たれていた）。DHMEQ は移植後 7 日目までの投与であり、移植後 100 日目での薬剤効果は無いことを考えると、DST+DHMEQ 治療による免疫修飾によりドナー抗原特異的ないわゆる‘免疫寛容’が誘導されたと考えられた。この機序について、我々は Activation induced cell death (AICD) を促進することによるドナー抗原特異的 T 細胞の減少と、制御性 T 細胞の増加が関与していることを明らかにした。実際に DST+DHMEQ 治療を施したレシピエントマウス（H-2^d）から制御性 T 細胞を抽出し、ドナーと同系統（H-2^b）の心グラフトを移植した無治療レシピエントマウスに、細胞移入（adoptive transfer）すると、移植後の無治療マウスから抽出した制御性 T 細胞、Naïve マウスから抽出した、いわゆる 内在性（naturally occurring）制御性 T 細胞と比べて、有意な拒絶反応抑制効果がみられた。さらにこの制御性 T 細胞を、3rd party 系統（H-2^k）の心グラフトを移植したマウスに adoptive transfer した場合には、ドナー系統の心グラフトにみられたような拒絶反応抑制効果が観察されなかった。このことから DST+DHMEQ 治療によりドナー抗原特異的な制御性 T 細胞が生成されたと考えられた。

【考察】移植治療の最終目標とされる‘免疫寛容の誘導’はドナー抗原反応性細胞の減少（depletion）、anergy または制御性 T 細胞による免疫抑制などが作用機序として重要である。本研究では、NF- κ B 阻害が DST による‘免疫寛容の誘導’を増強することを示したが、その機序として AICD によるドナー抗原反応性 T 細胞の減少、制御性 T 細胞の増加が関与していると考えられた。NF- κ B は抗アポトーシス蛋白である Bcl-xL や Bcl-2 の発現に必須であるが、DHMEQ はこれを抑制し細胞死に向かわせることが、これまでの癌細胞、ヒト細胞を用いた研究で明らかにされている。同様に本研究でも、DST により活性化したドナー抗原反応性 T 細胞の抗アポトーシス反応を DHMEQ が抑制することで、選択的な T 細胞の減少が得られたと考えられた。NF- κ B の制御性 T 細胞における役割については、最近 NF- κ B ファミリー（Rel ファミリー）のひとつである c-Rel が制御性 T 細胞の誘導に重要であることが報告された。また NF- κ B 阻害は、制御性 T 細胞誘導に重要な、T 細胞受容体や副刺激経路からのシグナルを抑制することから、抑制性に働くことが示唆される。しかし、本実験において DHMEQ は、レシピエント脾細胞中の制御性 T 細胞を増加させる効果を示した。実際、*in vitro* において T 細胞の活性化を抑制する DHMEQ の効果は、*in vivo* においては明らかでなく、*in vivo* MLR の結果では細胞分裂を抑制しない。また、DHMEQ 単独治療による制御性 T 細胞誘導効果がみられないことを考えると、DST による AICD を DHMEQ が促進した結果、アポトーシス耐性が知られている制御性 T 細胞の割合が増加した可能性がある。一方で、DST+DHMEQ 治療マウスから抽出した制御性 T 細胞は、内在性制御性 T 細胞と比べて有意な拒絶反応抑制効果を示したこと、3rd party 心グラフトに対しては抑制効果がみられなかったことから、ドナー抗原特異的な制御性 T 細胞が生成されたと推察される。我々の最近の検討によると、樹状細胞の分化の過程で DHMEQ を作用させると、その成熟が抑えられ、免疫寛容誘導性樹状細胞が生成される。さらにこの樹状細胞はアロ心グラフトに対する拒絶反応も抑制する。本研究においても、DST との併用による DHMEQ の投与により、免疫寛容誘導性樹状細胞が生成され、ドナー抗原特異的な制御性 T 細胞の生成、増加が引き起こされた可能性も考えられる。

【結論】これまでにない治療戦略である、ドナーリンパ球静脈投与と NF- κ B 活性阻害の併用治療は、マウス心グラフトの長期生存を可能にした。また、免疫寛容誘導に重要な作用機序である AICD、制御性 T 細胞の生成を促進する結果から、新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ は、移植治療の更なる発展に貢献しうる免疫抑制剤であると考えられる。

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

The immunomodulatory effect of nuclear factor- κ B inhibition by dehydroxymethylepoxyquinomicin in combination with donor-specific blood transfusion

(新規 Nuclear factor kappa B 阻害剤 Dehydroxymethylepoxyquinomicin とドナーリンパ球静脈投与の併用による免疫反応修飾効果)

申請者は、臓器移植における治療戦略として、免疫寛容誘導における NF- κ B 阻害の役割とその効果についての研究成果を発表した。ドナーリンパ球静脈投与 (DST) と新規 NF- κ B 阻害剤 Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) の併用によりアロ心グラフトに免疫寛容誘導効果が得られることを示し、その機序として Activation induced cells death (AICD) の促進、ドナー抗原特異的な抑制作用を持つ制御性 T 細胞の生成の関与を明らかにした。また NF- κ B とアポトーシス、制御性 T 細胞との関与を考察し、発表を終えた。

この発表に対し、副査の清野教授からレシピエントを BALB/c マウスとした場合の方が、C57BL/6 より DST と DHMEQ の併用治療による生存期間延長効果が得られた点についての免疫学的機序について質問があった。申請者は一般的に C57BL/6 マウスは Th1 優位な免疫反応を示すのに対し、BALB/c は Th2 優位な免疫反応をもつこと、また DHMEQ が p65、c-Rel、Rel-B に対しては抑制効果をもつものの、p50、p52 への抑制効果は明らかではないこと、また p65、Rel-B が Th1 の分化に、p50、p52 は Th2 の分化に重要であること、また本研究結果で Th1 を誘導する IFN γ の産生が DST+DHMEQ 治療群で抑制されることから、DHMEQ は Th1 を抑制し Th2 優位のバランスを保つように働いた可能性を示唆した。さらに最近の知見から Th2 が制御性 T 細胞の誘導に重要であることを示し、BALB/c においてはより制御性 T 細胞を誘導し生存期間を延長させた可能性を示唆した。それに対し、Th2 のサイトカインの産生についても質問を受けたが、本研究では検討していないものの、文献的には DHMEQ を用いた自己免疫性ブドウ膜炎のマウスモデルにおいて IL-4 に対する抑制効果がえられていないことを報告した。また DST との併用において NF- κ B 以外のシグナル阻害の効果について質問を受けた。申請者はタクロリムスを用いた核転写因子 NFAT の阻害と DST との併用効果について自らのデータから、DST 直後からの NFAT 阻害は DST の機序である AICD を阻害することで、逆に DST 効果を妨げることを提示した。さらにラパマイシンと DST との併用についても質問を受けたが、申請者は自らの検討はないものの、他施設での研究においてマウス、サルでは効果があることが示されていると回答した。

続いて、副査の武富教授から DHMEQ 半減期についての質問があり、申請者のデータから DHMEQ が血中から 15-30 分で消失することを示し、組織移行性等については検討が必要であること、本研究においては BALB/c をレシピエントとしたモデルでは 1 日 3 回 i. p. 投与していることを明示した。また長期生存マウスの免疫状態について質問を受けたが、発表中に示したように移植後 100 日目の時点で direct、indirect pathway においてドナー抗原特異的な免疫抑制効果が得られていることを示した。また脾臓摘出の影響についても質問を受けたが、本研究において脾臓を主な免疫学的検討として用いたのは腹部心グラフトの場合の所属

リンパ組織が脾臓であることを説明した。また核転写因子 NF- κ B についての質問があり、NF- κ B には 5 つの分子があり、それらがヘテロ、ホモ複合体として働き、Canonical と noncanonical の経路があることを示し、それぞれ免疫学的な意味合いが異なると考えられていることを示した。DHMEQ は恐らく Canonical pathway を阻害すると考えられるが、さらなる検討が必要である旨も述べた。

副査の神山准教授からは本研究において抗アポトーシス遺伝子阻害の検討を行ったか質問を受けたが、申請者は検討していないことを述べた。また DST の時期についても質問を受けたが、論文によって移植 28 日前、移植当日などの報告があるが、移植前 7 日の時点での治療は頻用されている Timing であり、本実験ではこれを採用した旨を答えた。

主査の松居教授からは 100 日を越えるグラフト生存が得られるものが 60% あるものの、40% は拒絶されていることから、これらのグラフトには何が足りなかったのかについて質問を受けた。申請者は graft loss するものが移植後 50-60 日後であることを考慮すると、血管の内膜肥厚を主体とする慢性拒絶反応が生じた可能性が考えられるものの、更なる検討が必要であることを述べた。また 100 日目のグラフトの実際の状態についても質問を受けた。それに対し、発表内で示したように病理組織学的に心筋組織が保たれ、良好な状態ではあったことを確認した。しかし、C57Bl/6 マウスをレシピエントした場合には MST が 39 日であり、長期のグラフト生存が得られなかったことを考慮すると、実際に臨床等で用いる場合には他の免疫抑制剤の併用治療が必要である旨を申し添えた。また申請者はタクロリムスの併用効果について、移植後に併用することで十分なエフェクター T 細胞の制御が可能であることを自らのデータを交えて言及した。

本研究は免疫寛容の誘導における NF- κ B 阻害のもつ増強効果について明らかにし、その機序として AICD と制御性 T 細胞が関与することを示す、今後の臨床応用のみならず学術的にも大変興味深いものであった。審査員一同は、本研究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と判定した。