

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 吉田 雅

学位論文題名

同種異系膵島移植における c-Fos/Activator protein-1 阻害による免疫抑制効果に関する研究
(Studies on Immunosuppressive Effect of c-Fos/Activator Protein-1 Inhibition on
Allogeneic Pancreatic Islet Transplantation)

【背景と目的】

膵島移植は、1型糖尿病の根治的治療として期待されているが、その術後成績は十分なものとは言えない。Edmonton protocol の導入によって、インスリン離脱率は著明に向上したが、長期成績は非常に不良である。その原因の一つとして、T細胞を介した急性拒絶反応が挙げられており、新たな免疫抑制療法の開発は急務である。Tacrolimus に代表される様な T細胞の転写因子阻害は、急性拒絶反応を抑制させる免疫抑制療法の中心的な役割を果たしている。Activator Protein-1 (AP-1) は、Fos や Jun family によって、二量体を形成する転写因子である。これまで、膵島移植において AP-1 阻害による免疫抑制効果を検討した報告は無い。新規 AP-1 阻害剤 T-5224 は、選択的に c-Fos/AP-1 を阻害し、マウスリウマチモデルにおいて抗炎症効果を発揮したが、移植モデルでの免疫抑制効果の有無は不明である。本研究では、マウス同種膵島移植モデルにおける新規 AP-1 阻害剤 T-5224 の免疫抑制効果について検討した。また、AP-1 と密接な関係を持つ nuclear factor of activated T cells (NFAT) 阻害薬 Tacrolimus との併用効果についても合わせて検討した。

【材料と方法】

抗 CD3+抗 CD28 抗体刺激による C57BL/6 (B6: H-2^b) マウスの T細胞核内における T-5224 の c-Fos/AP-1-DNA 結合抑制能を検討した。また、B6 由来 T細胞の増殖抑制試験を行い、培養液中の interleukin (IL)-2, interferon (IFN)- γ 濃度を ELISA 法にて検討した。また、B6 由来 CD4 陽性 T細胞中の CD25 発現抑制能を flow cytometry で検討した。T-5224 と Tacrolimus の併用によるサイトカイン産生抑制効果を q-PCR を用いて検討した。Streptozotocin 誘導糖尿病 B6 マウスへ BALB/c (H-2^d) マウス膵島 600, 300 個を経門脈的に肝内へ移植し、T-5224 を術直後から 14 日間、1 日 1 回、経口投与した。また、Tacrolimus は術後 4 日目から 14 日間、1 日 1 回、腹腔内投与した。血糖正常化は随時血糖 200 mg/dL 以下が 2 日連続、グラフト拒絶は随時血糖 350 mg/dL 以上が 2 日連続した場合と定義した。レシピエント内のアロ免疫反応を検討する為に、レシピエント B6 マウスを術後 10 日目に犠牲死させ、脾細胞の混合リンパ球反応、IFN- γ ELISpot assay、グラフトの抗 CD4/ CD8 免疫組織学染色を施行した。また、長期生着例に対し、術後 60 日目に腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTT) を施行した。

【結果】

T-5224 は、80 μ g/mL 以下の濃度において B6 由来脾細胞、BALB/c 由来単離膵島に対して毒性を示さなかった。T-5224 (80 μ g/mL) 群は、対照群に対し、抗体刺激による B6 由来 c-Fos/AP-1-DNA 結合 (100 \pm 4.7 vs. 67.2 \pm 1.1%, n=3, p<0.01), T細胞増殖 (648320 \pm 29372 vs. 3903 \pm 1885, n=3, p<0.05), IL-2 (5321 \pm 999 vs. 26 \pm 26 pg/mL, n=3, p<0.01), IFN- γ (70.6 \pm 5.2 vs. 1.9 \pm 0.9 ng/mL, n=3, p<0.01) 産生, CD25 発現 (55 \pm 5.5 vs. 31 \pm 2.2, n=3, p<0.05) を抑制した。また、IL-6, IL-10, IFN- γ の mRNA 産生を抑制し (n=3, p<0.05), Tacrolimus と併用すると、IFN- γ の抑制効果が更に増強した (n=3, p<0.05)。

膵島アログラフト生着期間中央値 (MST) は無治療群 15 日 (n=6) に対し、T-5224 単独群 [50,

100, 250, 500 mg/kg body weight (BW)/day]では, それぞれ 20.5 日 (n=6, p=0.60), 28 日 (n=6, p=0.06), 30 日 (n=6, p=0.01), 101.5 日 (n=6, p=0.0004) と延長した. 術後 10 日目のレシピエントマウスにおいて, T-5224 治療群は無治療群に対し, 混合リンパ球反応 (33248 ± 7423 vs. 16664 ± 2482 , n=4, p<0.05), IFN- γ 産生細胞数 (58 ± 6.7 vs. 33 ± 7.1 , n=4, p<0.05) を有意に低下させ, グラフト内の CD4/CD8 陽性細胞数も減少させた. 長期生着例の IPGTT は正常パターンを呈した. Tacrolimus 単独群 (1.0 mg/kg BW/day) の MST は, 14 日 (n=4, p=0.71) であったが, T-5224 (100 mg/kg BW/day) と併用すると, 全例 300 日以上血糖正常化を維持した (n=5). しかしながら, 移植膵島を 300 個に減少させると血糖正常化率 50%, MST14 日まで低下した (n=6).

【考察】

新規 AP-1 阻害剤 T-5224 は, c-Fos/AP-1 を阻害する事により, 抗 CD3+抗 CD28 抗体刺激下マウス T 細胞の増殖, サイトカイン (IL-2/IFN- γ) 産生, CD25 発現を抑制することが判明した. また, 同種異系マウス膵島移植モデルにおいてレシピエントマウスのアロ免疫反応を抑制し, アログラフト生着期間を有意に延長させた. これまで, ラットの同種異系心移植モデルで JNK inhibitor や AP-1 decoy oligonucleotide を用いた AP-1 阻害の報告例があるが, それらの報告に対して, 本研究でのグラフト生着期間延長効果は著しい. 膵島移植後早期には非特異的炎症反応によってグラフトの 50%以上が傷害されると報告されており, T-5224 の抗炎症作用によって, 移植後早期の炎症反応を抑制し, グラフト保護効果が増強したと考えられた. また, T-5224 と Tacrolimus と併用すると主に Th1 系のサイトカインの mRNA 発現を抑制し, アログラフト生着期間を著明に延長させた. しかし, 移植膵島を 300 個に減少させたモデルでは, その効果は減弱した. 移植後長期間の血糖正常化を維持する為には十分量の膵島を移植することが必要であるが, 膵島が過剰に移植されると, 「インスリン分泌の蓄え」として機能する為, 拒絶反応が生じていても見掛け上正常血糖が持続する事がある. これらの知見と実験結果から, T-5224 と Tacrolimus の併用では, ドナー特異的免疫寛容は誘導出来ていない可能性が高いと判断した. ただし, 厳密には長期血糖正常化例に対する皮膚移植 (skin challenge test), グラフトやリンパ組織での制御性 T 細胞増加の有無などの検討が必要である.

【結論】

T-5224 による c-Fos/AP-1 阻害法は, 膵島移植において非常に有望な免疫抑制療法と考えられる. この治療戦略は, 膵島移植以外の細胞・臓器移植や自己免疫性疾患に対しても効果的である可能性を有している.