

学位論文題名

Combination treatment with FTY720 and CTLA4IgG preserves the respiratory epithelium and prevents obliterative disease in a murine airway model

(CTLA4IgG および FTY720 併用投与は、マウス気道モデルにおいて呼吸上皮を温存しかつ閉塞性病変の発症を防ぐ)

学位論文内容の要旨

<背景>

同種移植において、急性期の免疫反応は免疫抑制剤により、コントロールできるようになってきた。しかし、その後の合併症として慢性拒絶が有り、移植患者の長期予後に大きな影響をおよぼしている。肺移植では閉塞性気管病変が慢性拒絶の主体であり、気管上皮が慢性拒絶反応の重要なターゲットである。近年、マウス異所性気管移植は閉塞性気管病変を再現するモデルとして注目を集めている。

抗原特異的 T 細胞の活性化には TCR からの抗原特異的信号と共に、副信号刺激が必要である。CTLA4IgG は抗原提示細胞の B7 分子に結合し、T 細胞上の CD28 分子からの副信号を遮断して抗原特異的不応答を誘導する。私はこれまでに、マウス異所性気管移植モデルを用い、CTLA4IgG 投与で(i)同種気管移植後、気管内腔閉塞を抑制すること、(ii)しかし、呼吸上皮の変性を防ぐことができないことを示した。この結果は、同種肺移植後の慢性拒絶病変の進行には、(i)CD28-B7 依存性の pathway (アロ特異的 T 細胞を主体とする抗原特異的免疫反応) のほかに、(ii)CD28-B7 非依存性の pathway (T 細胞非依存性の因子) の関与を示している。

FTY720 はリンパ球のアポトーシスおよびホーミング作用をもつ免疫抑制剤である。今回我々はマウス異所性気管移植モデルを用いて、FTY720 と CTLA4IgG の併用投与が呼吸上皮の変性を防ぎ気管内腔の閉塞を抑制できるかどうかについて検討した。

<方法>

(移植) C3H/He donor mouse より摘出した気管 allograft を BALB/c recipient mouse の背側皮下に移植し、移植後 35 日目における移植気管片の気管内腔および上皮について病理組織学的に検討した。(薬剤投与) : CTLA4IgG 200  $\mu$ g/body または 500  $\mu$ g/body を day0,2,4,6 に皮下注入した(group 2, 3)。FTY720 は 1mg/kg または 5mg/kg を day0-13 に皮下注入した(group 5, 6)。CTLA4IgG 200  $\mu$ g/body または 500  $\mu$ g/body と FTY720 1mg/kg または 5mg/kg の併用投与を同様に行った(group 7, 8, 9)。(末梢血中および

spleen・lymph node 中リンパ球数の測定)：投与後 7 日目および 14 日目における血中および spleen・lymph node 中のリンパ球数を測定した。(MLR)：移植後の免疫応答を調べるため donor mouse 脾細胞( $2.5 \times 10^5$ )、と recipient mouse 脾細胞( $2.5 \times 10^5$ )を用いた Mixed lymphocyte reaction(MLR)を調べた。(アポトーシス)：薬剤投与後のアポトーシスの有無を調べるため recipient mouse の脾細胞 およびリンパ節の細胞を用いて Annexin V および propidium iodide(PI)免疫染色を行った。(FTY720 濃度)：血中・腸間膜リンパ節および脾臓中の FTY720 濃度測定を行った。

#### <結果および考察>

FTY720 1mg/kg 投与群では移植後 35 日目における気管内腔開存率は、 $8.1 \pm 12.2\%$ (group5)、5mg/kg 投与群では  $86.4 \pm 30.3\%$ であり、dose-dependent な効果が認められた。しかしいずれの群においても呼吸上皮は変性していた。FTY720 および CTLA4IgG 併用投与では、FTY720 5mg/kg と CTLA4IgG 200  $\mu$ g/body または 500  $\mu$ g/body 併用投与群(group8,9)において、いずれも気管内腔開存率 100%、正常呼吸上皮を温存するという結果が得られた。閉塞性気管病変における重要なターゲットと考えられる呼吸上皮の変性を防ぎかつ内腔の閉塞を完全に抑制できたことの意義は大きいと考えられる。前述したように、私はマウスアロ異所性気管移植モデルに、CD28-B7 依存性の pathway と非依存性の pathway が存在することを示したが、今回の結果から FTY720 が CD28-B7 非依存性の pathway を抑制する作用を持つ可能性を示すことができた。

FTY720 はリンパ球のアポトーシス誘導およびホーミング作用をもつ新しい免疫抑制剤である。FTY720 単独群および FTY720 と CTLA4IgG 併用投与群において 14 日目のリンパ球数が血中および spleen・lymph node 中いずれも有意に減少していた。移植後 7 日目および 14 日目における MLR では、FTY720 単独投与群および FTY720 と CTLA4IgG の併用投与群において有意に抑制されており、FTY720 の免疫反応抑制効果が示された。しかし、FTY720 の免疫反応抑制効果は FTY720 投与後の細胞が 3rd party との MLR も抑制していたことから、抗原非特異的な作用であった。FTY720 単独投与群および FTY720 と CTLA4IgG の併用投与群のいずれにおいても mesenteric lymph node 中に有意なアポトーシス細胞の増加が認められた。FTY720 は 1300ng/ml 以上でアポトーシスを誘導すると言われていたが、in vivo においては通常の投与量では FTY720 末梢血中濃度が低いことが指摘されていた。しかし、本実験において、FTY720 投与 7 日目における組織中濃度は、mesenteric lymph node: 約 7216ng/ml, spleen: 約 6488ng/ml と末梢血中濃度の約 20 倍と高い値であり FTY720 が十分にアポトーシスを誘導する濃度が得られている。CTLA4IgG は T 細胞のアポトーシスを誘導することが知られている。CTLA4IgG あるいは FTY720 単独群に比較して併用投与群において、より多くのアポトーシス細胞が認められた。CTLA4IgG による T 細胞の死と FTY720 による細胞の死の両者が、閉塞性気管病変を完全に抑制しかつ呼吸上皮を温存するという、今回の結果に関係している可能性が示唆された。

結論： FTY720 は、組織中濃度が高く組織におけるアポトーシスを誘導する。CTLA4IgG と FTY720 の併用投与は同種肺移植後の閉塞性気管病変を防ぐ治療として有用かもしれない。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 柳 知 彦  
副 査 教 授 藤 堂 省  
副 査 教 授 上 出 利 光

## 学位論文題名

### Combination treatment with FTY720 and CTLA4IgG preserves the respiratory epithelium and prevents obliterative disease in a murine airway model

(CTLA4IgG および FTY720 併用投与は、マウス気道モデルにおいて呼吸上皮を温存しかつ閉塞性病変の発症を防ぐ)

マウス異所性気管移植モデルは、肺移植後の閉塞性気管病変を再現する慢性拒絶モデルとして近年注目されている。すでに申請者らはこのモデルにおける拒絶反応が T 細胞依存性であること、および CD28・B7 依存性と非依存性の 2 つの pathway が存在することを 2000 年の *Transplantation* 誌に発表した。マウス異所性気管移植モデルに CTLA4IgG と作用機序が異なりホーミングおよびアポトーシス作用を持つ FTY720 を単独または CTLA4IgG との併用投与を行い、呼吸上皮の変性または気管内腔の閉塞を抑制できるかどうかを検討した結果、FTY720 単独では 5mg/kg 投与において気管内腔の開存率は有意に改善したが、上皮の変性は免れなかった。併用投与においては FTY720 5mg/kg と CTLA4IgG 200  $\mu$  または 500  $\mu$  g 投与で 100%の開存率が得られ、かつ呼吸上皮を温存することができ、FTY720 が CD28・B7 非依存性の pathway を抑制する働きを持つと考えられた。リンパ球数は FTY720 投与群で血中・脾臓およびリンパ節中のいずれも有意に減少し、これまでに報告されているホーミングの変化は認められなかったが、FACS 解析により FTY720 投与群でリンパ節中に有意なアポトーシス細胞の増加が認められ、FTY720 によるアポトーシスが確認された。また組織中の FTY720 濃度は血液中に比べて非常に高濃度である事が明らかとなり、それは FTY720 がリンパ球のアポトーシスを誘導するのに十分な濃度であった。FTY720 単独および併用投与群で有意に MLR を抑制していたが、3rd party との MLR でも同様に MLR の抑制が認められ、FTY720 による免疫抑制は抗原非特異的と考えられた。結論として CTLA4IgG に FTY720 を併用投与することにより、リンパ球のアポトーシスを介して CD28・B7 非依存的な経路を阻害し、閉塞性気管病変の形成を抑制し、困難であった呼吸上皮の温存が可能となった。

審査にあたって上出教授から、FTY720 濃度が血中に比べ組織中ではるかに高値を示している事はすでに明かにされている事なのかという質問があり、申請者は各種文献から *in vivo* においても FTY720 がアポトーシスを誘導している証拠を理論的に裏付ける新しい知見であることを説明した。さらに副作用についての質問に対し、犬における腎移植を例に高濃度 FTY720 投与で腎障害の可能性が指摘されている事を説明した。次に今までに呼吸上皮を温存できた報告があるかという質問に、Cyclosporin A, Rapamycin 等でも試されているが呼吸上皮は温存できておらず、Leflunomide のみが呼吸上皮を温存できているが副作用が非常に強いという問題点があることを説明した。次に小柳教授より、観察期間をさらに長くしたらどうなるか、また CD28-B7 以外の pathway は解かっているか、血管吻合が行われていないがこのモデルは肺移植を念頭においた慢性拒絶のスタンダードなモデルであるのか、という3つの質問があり、申請者は、70日の長期観察を行った結果拒絶がおきており tolerance にはなっていない事、FTY720 が CD28-B7 非依存性の pathway のうちどの部分を抑制しているかについては明かになっていない事、本モデルが急性拒絶を見ているのではという意見もあるが各種論文で閉塞性気管病変を再現する数少ないモデルとして認識されている事を説明した。次に藤堂教授より FTY720 の安全性に関して、動物実験で十分に安全性が確立されており現在アメリカで人第3相臨床試験が行われている旨の補足説明の後、CD28-B7 非依存性の経路としてどのようなものが考えられるかという質問があり、FTY720 のアポトーシスにはミトコンドリア活性化の経路が関与している事が解かっているが、それが CD28-B7 非依存性の経路とどのような関わりを持つかについては解明されていない事を説明した。次に藤堂教授より、本実験で MLR により FTY720 の免疫抑制作用が抗原非特異的である事を明らかにした点、および FTY720 の濃度が血中に比べ組織中で非常に高いことを明らかにした事が新しい知見であることを指摘した上で、今後更に pathway を解明するための実験を進める上でカルシニューリン・インヒビター、ラパマイシン、抗 CD40 抗体などが有用ではとの教示を得た。さらに藤堂教授より、このモデルが慢性拒絶のモデルとして適切でないとする意見も存在するがどの様な点が慢性拒絶かとの質問があり、申請者はリンパ球浸潤を中心とした拒絶でなく、それに続く因子または他の因子が影響して起こる線維増殖性の閉塞変化である事から慢性拒絶モデルと考えられている事を説明した。

この論文は、CTLA4IgG と FTY720 を併用投与することにより閉塞性気管病変モデルにおける拒絶反応の重要なターゲットである呼吸上皮を温存することができ、また FTY720 の組織中濃度が血中に比べはるかに高いことから *vivo* における FTY720 のアポトーシスの証拠を理論的に裏付ける事ができた点や、FTY720 の免疫抑制作用が抗原非特異的である事を明らかにした点が新しい知見として高く評価され、今後の本モデルや両薬剤のさらなる機能解析が期待される。

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。