

学位論文題名

シクロスポリン連日投与および短期間の 15-デオキシスパーガリン投与による 異種心臓移植の長期生着

学位論文内容の要旨

ブタの心臓をヒトに移植する異種心臓移植が、重症心不全治療に不可欠な心臓移植の抱えるドナー不足という深刻な問題の解決策のひとつとして注目されている。

ブタからヒトへのようにレシピエントが多くの抗ドナー自然抗体を有する discordant 異種移植では、超急性拒絶が移植後、数分から数時間のうちに起こる。この超急性拒絶は自然抗体を減らすこと、あるいは、補体を抑制することにより克服することができる。しかし、その後に異種反応性抗体の産生とグラフトの内皮細胞の活性化によってグラフトは移植後数日で拒絶される。この拒絶反応は超急性拒絶反応と区別して、遅延型拒絶、もしくは急性血管性拒絶と言われている。ラットにハムスター心臓を移植するような、レシピエントが比較的少ない抗ドナー自然抗体しか持たない concordant 異種心臓移植モデルでは、移植後短時間に起こる超急性拒絶は認められないが、移植後数日後にグラフトは拒絶される。この移植後数日で起こる拒絶反応は、discordant 異種移植の遅延型拒絶と病的に酷似している。ともに、内皮細胞の活性化やマクロファージと Natural Killer 細胞の浸潤、そして毛細血管の血栓閉塞が観察される。よって discordant の遅延型拒絶と concordant の拒絶は機序的に多くの類似点があると考えられる。これらのことよりハムスター心臓をラットに移植する concordant 異種心臓移植の拒絶反応を研究することはブタからヒトへのような discordant 異種心臓移植の遅延型拒絶の機序解明に有用と思われる。

Concordant 異種心臓移植の拒絶反応を避けるために様々な方法が試みられている。一つの方法として、ハムスター心臓をラットに移植するときに T 細胞を抑制した上で補体を短期間抑制するとグラフトは長期間生着する。この治療では抗体と補体の存在下でも生着するいわゆる accommodation と呼ばれる状態が導かれる。移植後数日間、惹起された異種反応性抗体と補体に同時にグラフトが暴露されるのを阻止したことにより、その間にグラフトに何らかの防御システムが確立されたと考えられる。他には、抗 IgM モノクローナル抗体の投与により血中 IgM を T 細胞抑制下に短期間抑制すると、同様にグラフトの長期生着が得られる。これらの報告からすると、数日間異種反応性抗体と補体に同時に暴露することを一過性に妨ぐことが concordant 異種心臓移植に有効な治療と考えられる。

本研究では、T細胞抑制にシクロスポリン(CyA)を使用し、concordant 異種心臓移植の長期生着を得るのに必要な 15-デオキシスパーガリン(DSG)投与期間を短期間に定める。このことはブタからヒトへの移植時のB細胞とT細胞抑制治療につながる可能性がある。次に我々は、本モデルで、T細胞抑制剤投与を止めた後にグラフトはどのくらい生着しているかを検討した。今日まで concordant 異種心臓移植で長期生着が得られた方法はいくつか存在し、そのいくつかは accommodation として報告されている。しかし我々の知る限りでは異種心臓移植で免疫寛容まで得られたとしている報告はない。

ゴールデンシリアンハムスターの心臓を摘出し、ルーイスラットの腹部に光学顕微鏡下に Ono and Lindsey 変法にて異所性心臓移植を行った。T細胞抑制剤として CyA(15mg/kg/day, 筋肉内投与)を移植当日(day0)から連日投与、そして異種反応性抗体抑制として DSG(5mg/kg/day, 筋肉内投与)は移植日前日(day -1)から投与した。

生理食塩水のみ投与した群(コントロール群)と CyAのみ投与した群(CyA 単独群)の異種心臓グラフトは4日以内に拒絶された。DSGのみ投与した群(DSG 単独群)は投与中止後最長でも4日しか生着しなかった。CyAを毎日と DSGを7日間投与した群; CyA+DSG(7)群では4例中3例が長期生着した(>98日, >105日)。CyA+DSG(9)群では観察中止まで生着した。しかしながら、CyA+DSG(5)群では3例すべてが8日以内に拒絶された。これらの結果から、CyA連日投与下の DSG投与は7日から9日で十分であり5日間では不十分であることがわかった。また DSGのみ投与する場合、グラフトは10日以上生着しなかった。

コントロール群のラット血漿中の IgM 異種反応性抗体価は急激に上昇し、day 0の値に比して day 3の値が有意に高値であった。CyA 単独群でも、day 3の値は、day 0に比して高値であったが、コントロール群よりは低値であった。CyA+DSG(7)や CyA+DSG(9)の長期生着群では IgM 抗体価は7日間ほぼ完全に抑制され、コントロール群および CyA 単独群に比して低値であった。

ヘマトキシリン-エオジン染色にて、4日目で拒絶されたコントロール群、CyA 単独群で間質出血や浮腫を認めたが、70日以上生着した DSG+CyA(7)もしくは DSG+CyA(9)群では、血管内膜肥厚、間質出血や浮腫は認めなかった。免疫染色標本ではコントロール群に比して長期生着群ではより少量の IgM 異種反応性抗体の沈着を認めるのみであった。

今回の我々の実験から導き出される結論は、異種移植後、はじめの数日間でグラフトは何らかの防御システムを獲得し、抗体や補体の存在下でも生着し続けることができるようになったこと、そのためには、CyAによるT細胞抑制が必要であったということである。また、CyAとDSGの組み合わせによって長期生着したグラフトはCyA投与を中止した後も長期生着しつづける。このことはわれわれの知る範囲では、ハムスター心臓をラットに移植したモデルでの治療中止後の最長記録である。

現在のところ、我々は concordant 異種心臓移植に対して大きく2つの治療法を有しているように考えている。ひとつは、われわれのモデルのような IgM 抑制と T細胞抑制の組み合わせ。もうひとつは、補体の抑制と T細胞抑制の組み合わせである。これらの治療法を discordant 異種移植に応用するには、'discordant' と 'concordant' の違いを考慮しなければならない。つまり、自然抗体の量の違いと IgG の性質の違いである。discordant 異種移植では、異種反応性 IgG は、T細胞非依存性のものが存在するが、concordant では、すべて、T細胞依存性である。最近作られたトランスジェニックブタである α -1, 3-Galactosyltransferase ノックアウトブタと人間の組み合わせでこの2

つの違いがどのように変化するのかに興味を持たれる。もし、このノックアウトブタを使用した場合、discordant が concordant に近づくのであれば、われわれの concordant の治療法はより、直接的に、discordant 異種移植に応用可能であろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 藤 堂 省
副 査 教 授 北 畠 顕

学 位 論 文 題 名

シクロスポリン連日投与および短期間の 15-デオキシスパーガリン投与による 異種心臓移植の長期生着

本研究は小動物モデル異種心臓移植における免疫抑制剤投与プロトコールを作成し、それによるグラフト長期生着効果、その機序、そして臨床応用について考察している。

ゴールデンシリアンハムスターの心臓を摘出し、ルーイスラットの腹部に手術用顕微鏡下に異所性心臓移植を行った。T細胞抑制剤としてサイクロスポリン：CyA(15mg/kg/day, 筋肉内投与)を移植当日(day0)から連日投与、そして異種反応性抗体抑制としてデオキシスパーガリン：DSG(5mg/kg/day, 筋肉内投与)は移植日前日(day -1)から投与した。DSGの投与期間を変えた5群を設定し以下の結果が得られた。即ち、1)無治療群と2)CyA単独群の異種心臓グラフトは4日以内に拒絶された。2)DSG単独群は投与中止後最長でも4日しか生着しなかった。3)CyAを毎日とDSGを移植後5日間投与した群では4例中3例が長期生着した(>98日, >105日)。4)CyAを毎日とDSGを移植後7日間投与した群では観察中止まで生着した。5)しかしながら、CyAを毎日とDSGを移植後3日間投与した群では3例すべてが8日以内に拒絶された。これらの結果から、CyA連日投与下のDSG投与は移植後5日から7日間で十分であり3日間では不十分であることがわかった。無治療群のラット血漿中のIgM異種反応性抗体価は急激に上昇し、day 0の値に比してday 3の値が有意に高値であった。CyA単独群でも、day 3の値は、day 0に比して高値であったが、コントロール群よりは低値であった。CyAを毎日とDSGを移植後5日間投与した群やCyAを毎日とDSGを移植後7日間投与した長期生着群ではIgM抗体価は7日間ほぼ完全に抑制され、無治療群およびCyA単独群に比して低値であった。

ヘマトキシリン-エオジン染色にて、4日目で拒絶された無治療群、CyA 単独群で間質出血や浮腫を認めたが、70 日以上生着した CyA を毎日と DSG を移植後短期間投与した群では、血管内膜肥厚、間質出血や浮腫は認めなかった。免疫染色標本では無治療群に比して長期生着群ではより少量の IgM 異種反応性抗体の沈着を認めるのみであった。今回の実験から導き出される結論は、異種移植後、はじめの数日間でグラフトは何らかの防御システムを獲得し、抗体や補体の存在下でも生着し続けることができるようになったこと、そのためには、CyA による T 細胞抑制が必要であったということである。また、CyA と DSG の組み合わせによって長期生着したグラフトは CyA 投与を中止した後も長期生着しつづける。このことはハムスター心臓をラットに移植したモデルでの治療中止後の最長記録である。

異種心臓移植長期生着を得るために用いられる主な治療法は、1) 本研究のような IgM 抑制と T 細胞抑制の組み合わせを用いる方法であり、もうひとつは 2) 補体の抑制と T 細胞抑制の組み合わせを用いる方法である。これらの治療法を discordant 異種移植に応用するには、' discordant ' と ' concordant ' の違いを考慮しなければならない。つまり、自然抗体の量の違いと IgG の性質の違いである。discordant 異種移植では、異種反応性 IgG は T 細胞非依存性のものが存在するが、concordant ではすべて T 細胞依存性である。最近作られたトランスジェニックブタである α -1, 3-Galactosyltransferase ノックアウトブタと人間の組み合わせでこの 2 つの違いがどのように変化するのかに興味を持たれる。このノックアウトブタを使用することにより discordant が concordant に近づくのであれば、本研究の concordant の治療法はより直接的に discordant 異種移植に応用可能であると考察される。

公開発表に際し、副査藤堂教授より免疫抑制剤 (DSG) の本モデルで長期生着をもたらした機序および IgG 抗体の関与等について、北畠教授より長期生着例における血管周囲への細胞成分の浸潤、移植免疫の臓器特異性、臨床応用への課題について、そして主査安田教授より抗体と補体存在下でのグラフト生着のメカニズム、等の質問があった。これらの質問に対し、申請者は自らの実験結果、論文の引用により、明瞭にかつ妥当な回答をした。

この研究は、サイクロスポリン投与を基本にデオキシスパガリンの短期間投与による異種心臓移植長期生着を確認し、異種心臓移植におけるグラフト長期生着の機序と免疫寛容の可能性に貢献し、異種移植グラフト生着期間の向上に寄与するものと評価される。審査員一同は、申請者の学識に合わせて、関連領域研究と臨床成績の進展に成果があることを評価し、申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに資格を有するものと判定した。