

学 位 論 文 題 名

# The SDF-1 and CXCR4 Interaction is Critical for the Development of Transplant Arteriosclerosis

(SDF-1 と CXCR 4 の結合が移植後動脈硬化の発症に重要である)

## 学位論文内容の要旨

(序論) 免疫抑制剤の発達により臓器移植後の短期間の成績は向上しているが、長期間ではほとんど進歩がみられない。その大きな原因は慢性拒絶の発症である。慢性拒絶の病理学的特徴は、移植臓器(グラフト)の動脈に主に平滑筋からなる内膜肥厚(移植後動脈硬化、以下 TA)が認められることであり、これは各臓器に共通したものである。

従来、免疫学的要素 (MHC mismatch)と非免疫学的要素 (Ishemic-reperfusion injury など)により、中膜の平滑筋が惹起され、これが内膜に移動するもの(Donor 由来)と考えられてきた。しかし近年、内膜平滑筋が Recipient 骨髄細胞由来、特に造血幹細胞由来であることが証明され、今後の新しい治療ターゲットが示唆されている。しかしながら、分子レベル、細胞レベルでの TA の解明はいまだ不十分である。

TA の研究に関し、動脈移植モデル(Donor の大動脈を採取し、Recipient の大動脈に吻合)が広く用いられている。このモデルの特長は、1. 計時的に内膜肥厚を数値化できること。2.移植後、免疫抑制剤などの Immuno-modulator を使用する必要が無く、遺伝子、蛋白レベルでの解析などの際これらの影響を除去できることである。

今回我々は、TA のメカニズムを解明する目的で、のマウス動脈移植モデルを用いて Differential Display 法を施行した。

(結果) C57BL/6 (Donor)-ICR (Recipient)の組み合わせで、移植後2週 (TA発症前)比し、8週 (TA発症後)の graft に増強した遺伝子を Differential Display 法にて検索した。さらに組み合わせ特異的な遺伝子発現ではないことを確認するため、BALB/c (Donor)- C3H (Recipient)の組み合わせにかえ、Real-time PCR にて再現性を確認した。その結果、Stromal derived factor-1(以下 SDF-1), SH2-containing phosphatase-1 (SHP-1), Dexamethasone-induced product の3遺伝子の発現増強が認められた。

SDF-1 は、骨髄の形成、Bリンパ球の分化、心室中隔、腹部血管系形成に関与しており、CXCR4 が唯一の receptor である。また、Angiogenesis, Atherosclerosis の形成に関与している報告がなされ、このケモカインの血管形成への重要性が示唆されている。しかし、TA との関係については報告がない。TA の病理像と類似点が多い Atheroma においてその関与が示唆されていることから、TA 形成にも関係があると類推し、SDF-1 の役割に焦点を合わせ、以後の実験を進めた。

免疫染色において、SDF-1 陽性細胞は、移植後2週 of Allograft では外膜に散見された。4週目では中膜に、また6週目には肥厚した内膜に認められた。および CXCR4 陽性細胞も同様の傾向を示した。一方、Isograft は、2週、4週、6週のいずれの時期においても SDF-1 および CXCR4 はほとんど認められなかった。共焦点顕微鏡をもちいた二重染色により、肥厚した内膜の平滑筋は SDF-1 および CXCR4 を発現していること、また、内膜の CXCR4 陽性細

胞は recipient 由来であることがわかった。以上の病理組織学的検索から、Recipient 由来の CXCR4 陽性細胞は、外膜側から Allograft に浸潤した後、内腔側に移動し、内膜平滑筋に分化することが示唆された。

次に、内膜平滑筋の前駆細胞は骨髄由来、特に造血幹細胞であるという報告をもとに、In vitro で骨髄造血幹細胞が平滑筋に分化するか調べた。マウス造血幹細胞と平滑筋細胞を共培養すると、造血幹細胞は 3 日目で紡錘状になり、10 日目では  $\alpha$ -actin 陽性となった。また Allograft を移植した Recipient の血中造血幹細胞の数は、Isograft を移植した Recipient や Non-treatment 群に比べ、有意に増加していた。さらにこの血中造血幹細胞は CXCR4 を発現していた。

最後に、SDF-1/CXCR4 interaction が TA 形成に重要であるか調べるために、中和実験を施行した。移植後 recipient に SDF-1 中和抗体およびコントロール抗体を 3 週間投与し、6 週目にグラフトを採取した。中和抗体投与群では、コントロール抗体投与群にくらべ、血中造血幹細胞の数が減少し、内膜の肥厚が抑制されていた。また、中和抗体投与群では、グラフト内の CXCR4 発現細胞も減少していた。以上のことから SDF-1/CXCR4 interaction が造血幹細胞の mobilization と TA の発症に関与することが示唆された。

(考察) SDF-1 は、1993 年に骨髄ストローマ細胞での発現から同定された CXC ケモカインであり、骨髄の形成、B リンパ球の分化、心室中隔、腹部血管系形成に関与している。また、血中造血幹細胞の SDF-1 の上昇が HSC mobilization を促すと報告されている。SDF-1/CXCR4 interaction の臓器移植への関与はほとんど報告されていない。一方、CXCR3, CCR5 などの chemokine-receptor は T-cell に発現し、主に acute cellular rejection に関係が示唆されている。今回我々の実験で allograft を CXCR4 と CD4 や CD8 と二重染色してみたが、特に関連はなかった。また、血中造血幹細胞は CXCR4 を発現していたが、CCR5 は認められなかった。以上のことより、SDF-1/CXCR4 interaction は、他の chemokine とは異なり、T-cell ではなく造血幹細胞の遊走に関与していると示唆された。SDF-1 中和抗体を recipient に投与と、Allograft の内膜肥厚が著明に抑制され、かつ血中造血幹細胞が減少した。このことから、allograft そのものに加え、造血幹細胞の遊走を抑制するという観点から、SDF-1/CXCR4 interaction は TA の新しい治療ターゲットになりうる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 筒 井 裕 之  
副 査 教 授 浅 香 正 博  
副 査 教 授 上 出 利 光  
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

## The SDF-1 and CXCR4 Interaction is Critical for the Development of Transplant Arteriosclerosis

(SDF-1 と CXCR 4 の結合が移植後動脈硬化の発症に重要である)

免疫抑制剤の発達により臓器移植後の短期間の成績は向上しているが、長期間ではほとんど進歩がみられない。その大きな原因は慢性拒絶の発症である。慢性拒絶の病理学的特徴は、移植臓器(グラフト)の動脈に主に平滑筋からなる内膜肥厚(移植後動脈硬化、以下 TA)が認められることであり、これは各臓器に共通したものである。今回我々は、TA のメカニズムを解明する目的で、のマウス動脈移植モデルを用いて Differential Display 法を施行した。C57BL/6 (Donor)- ICR (Recipient)の組み合わせで、移植後 2 週 (TA 発症前)比し、8 週 (TA 発症後)の graft に増強した遺伝子を Differential Display 法にて検索した。さらに組み合わせ特異的な遺伝子発現ではないことを確認するため、BALB/c (Donor)- C3H (Recipient)の組み合わせにかえ、Real-time PCR にて再現性を確認した。その結果、Stromal derived factor-1(以下 SDF-1), SH2-containing phosphatase-1(SHP-1), Dexamethasone-induced product の 3 遺伝子の発現増強が認められた。

SDF-1 は、骨髄の形成、B リンパ球の分化、心室中隔、腹部血管系形成に関与しており、CXCR4 が唯一の receptor である。また、Atherosclerosis の形成に関与している報告された。TA の病理像と類似点が多い Atheroma においてその関与が示唆されていることから、TA 形成にも関係があると類推し、SDF-1 の役割に焦点を合わせ、以後の実験を進めた。

免疫染色において、SDF-1 陽性細胞は、移植後 2 週の Allograft では外膜に散見された。4 週目では中膜に、また 6 週目には肥厚した内膜に認められた。および CXCR4 陽性細胞も同様の傾向を示した。一方、Isograft は、2、4、6 週のいずれの時期においても SDF-1 および CXCR4 はほとんど認められなかった。共焦点顕微鏡をもちいた二重染色により、肥厚した内膜の平滑筋は SDF-1 および CXCR4 を発現していること、また、内膜の CXCR4 陽性細胞は recipient 由来であることがわかった。以上の病理組織学的検索から、Recipient 由来の CXCR4 陽性細胞は、外膜側から Allograft に浸潤した後、内腔側に移動し、内膜平滑筋に分

化することが示唆された。

次に、内膜平滑筋の前駆細胞は骨髄由来、特に造血幹細胞であるという報告をもとに、*In vitro* で骨髄造血幹細胞が平滑筋に分化するか調べた。マウス造血幹細胞と平滑筋細胞を共培養すると、造血幹細胞は3日目で紡錘状になり、10日目では  $\alpha$ -actin 陽性となった。また Allograft を移植した Recipient の血中造血幹細胞の数は、Isograft を移植した Recipient や Non-treatment 群に比べ、有意に増加していた。さらにこの血中造血幹細胞は CXCR4 を発現していた。

最後に、SDF-1/CXCR4 interaction が TA 形成に重要であるか調べるために、中和実験を施行した。移植後 recipient に SDF-1 中和抗体およびコントロール抗体を3週間投与し、6週目にグラフトを採取した。中和抗体投与群では、コントロール抗体投与群に比べ、血中造血幹細胞の数が減少し、内膜の肥厚が抑制されていた。また、中和抗体投与群では、グラフト内の CXCR4 発現細胞も減少していた。以上のことから SDF-1/CXCR4 interaction が造血幹細胞の mobilization と TA の発症に関与することが示唆された。

審査にあたっては、まず浅香教授より、(1) SDF-1 と CXCR4 はそれぞれ単独も作用しているのか？それとも SDF-1 と CXCR4 の interaction が関係しているのか？ (2) 免疫抑制剤がアログraftの SDF-1 の発現や造血幹細胞での CXCR4 の発現に与える影響について等の質問があった。それに対し、(1) SDF-1 KO mice と CXCR4 KO mice ではほとんど同じ結果になり、1996年、1998年に報告されている。そういう点ではおそらく単独の作用ではなく SDF-1 と CXCR4 の相互作用が大まかな作用機序と考えられるということ (2) 免疫抑制剤の影響は不明 と解答があった。上出教授から、(1) TA のモデルとして動脈移植の妥当性について (2) TA の動脈硬化と普通の動脈硬化で何が違っているのかとの違いについての質問があり、(1)大きな利点として、TA は各臓器の共通所見であること、免疫抑制剤が不要であり遺伝子を検索するうえで余計な factor を入れなくてもいいこと (2) vascular remodeling が起こる際のメカニズムはほとんど同じと考えていると解答があった。藤堂教授から、(1) ほかに再現性の認められた SHP-1 について (2) SDF-1 の中和抗体ではなく SDF-1 を投与した場合についてなどの質問があった。これに対し、(1)平滑筋細胞の apoptosis に関与していると考えられること (2) Adex SDF-1 により血中 SDF-1 濃度が上昇し、HSCs の mobilization が促進されること等の解答があった。筒井教授より、HSC が SDF-1 や CXCR4 を発現するその機序についての質問があった。これに対し、その機序は不明、しかし、血中 HSC が SDF-1/CXCR4 を発現し、autocrine / paracrine 的に apoptosis を抑制していると報告があること、また骨髄内の HSCs は、CXCR4 を持っているとの解答があった。

この論文は慢性拒絶における SDF-1/CXCR4 の関与について初めての報告であり、今後、更なる機序の解明、及びこの経路をブロックすることで慢性拒絶防止への臨床応用が期待される。

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。