

平成21年6月9日現在

研究種目：基盤研究（A）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18209041  
 研究課題名（和文） 転写因子 NF- $\kappa$ B 制御による安全な肝臓移植法の開発  
 研究課題名（英文） Development of safe liver transplantation by modulation of transcription factor, nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)  
 研究代表者  
 藤堂 省 (TODO SATORU)  
 北海道大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号：60136463

研究成果の概要：移植後の拒絶反応と炎症を軽減するために、新規 NF- $\kappa$ B 阻害剤 Q の効果、投与法、剤型を検討した。拒絶、炎症に関わる免疫担当細胞の抑制や、小動物の肝、小腸、心、膵島細胞移植および虚血再灌流で有効性が確認された。また、新規臓器保存液を試作し、肝および多くの細胞や心移植における冷保存障害の軽減に成功した。臨床開発に不可欠な生体～細胞での有効性が確認され、新たな臓器保護法の実用化が期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	16,500,000	4,950,000	21,450,000
2007年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2008年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
年度			
年度			
総計	38,100,000	11,430,000	49,530,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床外科・外科学一般

キーワード：NF- $\kappa$ B, 免疫抑制、臓器保存、虚血再灌流障害

## 1. 研究開始当初の背景

肝移植は末期肝不全の治療法として普及してきたが、更なる成績向上のためには免疫抑制法と臓器保存法の改良が必須である。肝移植の短期予後は冷保存障害と再灌流時の炎症を本態とする、虚血再灌流障害に規定される。長期予後は拒絶反応に規定され、リンパ球、血管内皮、マクロファージ、樹状細胞の活性化、相互作用が抗原提示と認識、T細胞増殖に関与する。これらの反応を促進する転写活性因子 NF- $\kappa$ B を阻害することにより免疫反応を抑制できるが、既存の薬剤は安全域が狭く、臨床応用されたものはない。

## 2. 研究の目的

本研究は拒絶や炎症において中心的な役割を果たす転写因子 NF- $\kappa$ B を制御することにより、免疫抑制療法と臓器保存法の改良を図り、肝臓移植の成績の更なる向上を目指すことを目的とする。また、NF- $\kappa$ B 阻害以外を主作用とする保存液を開発し、NF- $\kappa$ B 阻害との併用による多角的な臓器保存法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法。

## (1) Qの免疫抑制効果 &lt;in vitro&gt;

**T細胞**： C57BL/6 マウス脾細胞よりT細胞を単離し、抗CD3+CD28 抗体で刺激し、48時間後の増殖およびIL-2、IFN- $\gamma$ 産生に対するQの抑制効果を検討した。

**リンパ球**： Lewis ラットのリンパ節、

ヒトPBMCをそれぞれ照射ACI ラット脾細胞もしくは照射ヒトPBMCと混合し、Concanavalline-A刺激による増殖反応を5日目に評価し、Qの抑制効果を検討した。

**樹状細胞**：C57BL/6 mouseの骨髄細胞から未成熟樹状細胞を誘導し、LPS/TNF- $\alpha$ /CD40抗体によって刺激し、24時間後の成熟化とQの抑制効果を検討した。

**マクロファージ**：Ratマクロファージ細胞株(RAW264.7)を用いた。LPS刺激によってp50, p65の核内移行ならびにTNF- $\alpha$ /IL-6産生を促し、Qの抑制効果を検討した。

## (2) Qの安全域と肝保存障害軽減効果

<in vitro>

### Qの安全濃度

RAW264.7、ラット血管平滑筋細胞、マウス肝細胞株(AML12)を用いてQの安全域を検討した。同時に既存のNF- $\kappa$ B阻害剤BAY11-7082、PDTC、Bortezomibの安全域も検討した。RAW264.7ではLPS刺激によりNO産生を促し、NO産生の阻害濃度と、安全域との関係を検討した。

### 低酸素・再酸素化障害抑制効果

肝細胞(AML12)とマクロファージ(RAW264.7)を細胞数が5:1となるように、24wellディッシュとインサートに別々に培養した。各細胞の単独あるいは共培養の状態、チャンバー内で37°C、6時間の低酸素とし、インキュベータに戻すことで再酸素化した。低酸素前に培養液中にQを添加し、障害抑制効果を評価した。低酸素終了時、再酸素化1時間後の上清LDH活性を測定した。

## (3) Qの動脈硬化抑制効果 <in vitro>

### 血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の増殖に対するQの抑制効果

ヒト大動脈血管内皮細胞、ラット血管平滑筋細胞を低血清培養によって刺激し、その後の増殖を評価した。QおよびRapamycin, FK778, FK506の増殖抑制作用を<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みで評価、比較した。

## (4) Qの肝虚血再灌流障害に対する効果

### 単離ラット肝灌流(IPRL) <ex vivo>

220-280gの雄性SD ratを絶食せずに使用。

- ① Qは $\beta$ -シクロデキストリン誘導体に包接し、乳酸リンゲル液に溶解した(5, 10  $\mu$ g/ml)。この液で体内灌流後、同液内で37°C 60分保存した。再灌流は、十分な酸素供給が可能な定量灌流(3 ml/min/g肝)で行った。
- ② 門脈のシアストレスが少ない定圧灌流モード(8 cmH<sub>2</sub>O)でも検討した。QをDMSOで50 mg/mlに溶解し、肝摘出の2時間前に腹腔内投与した(20mg/kg)。肝は薬剤を含まない乳酸リンゲル液で体内灌流後、同液内で37°C 60分保存した。

### マウス肝温阻血再灌流モデル <in vivo>

絶食した20-25gの雄性C57BL6マウスを用い、70%肝部分温阻血(45分)、再灌流を行った。QはDMSOに溶解後、0.5%CMCに懸濁し、虚血2時間前に腹腔内投与した。DMSOのみ、4, 8, 12 mg/kg群を作成し、再灌流16時間後の肝逸脱酵素活性を測定した。

## (5) 静脈内投与を目指したQの剤型の工夫

QはDMSO溶液としてしか調製できず、組織液や臓器保存液などに触れると析出したため、in vivoで安定して効果を発揮し得る剤型を模索した。

ラセミ体Qを $\beta$ -シクロデキストリン誘導体で包接、Na塩、K塩、キラル体の分離、リポソーム化などの剤型を調製した。免疫担当細胞での免疫抑制効果、安全域、血管内皮および血管平滑筋の増殖抑制効果、を前記と同様に確認した。

## (6) 拒絶反応、虚血再灌流障害が強い、他臓器でのQの効果

**ラット小腸虚血再灌流**：雄性SD ratにQ 20 mg/kgを腹腔内投与し、2時間後に上腸間膜動静脈、辺縁動静脈をクランプし、60分後に再灌流した。生存率、小腸、肺の病理所見を評価した。

**膵島細胞移植**：マウス、ラットから膵島細胞を単離し、STZによる糖尿病発症マウスの門脈に注入した。allo, xeno移植モデルにおける血糖の推移を評価した。

**心移植**：Balb/cからC57BL6へのallo心移植モデルを作成した。Qを20-40mg/kgあるいは、Q(20mg/kg)+FK506(1.5mg/kg)を投与し、グラフトの生存期間を評価した。

## (7) 新規臓器保存液の開発

細胞内Ca<sup>2+</sup> overload, ミトコンドリア障害、アクチン脱重合、Na<sup>+</sup>と水の流入などが冷保存中の臓器障害の原因となり、再灌流障害を増悪させる。既存の臓器保存液にこれらの変化を阻害する物質Dを添加し、細胞、臓器保護効果を評価した。NF- $\kappa$ B阻害剤との併用による、多角的な臓器保護法を確立するための基礎的検討を行った。

### Dの肝細胞保護効果

細胞保護成分を含まない通常の培養液(DMEM)を種々の濃度のDを添加した。肝細胞株AML12をD含有DMEM下に低温低酸素で12時間静置し、通常のDMEMに置換し、CO<sub>2</sub> incubator内に12時間静置した。上清のLDH活性を測定した。

### D含有保存液の肝保護効果

ラット肝をHTK液とD化HTK(HTKD)液で24時間冷保存し、8 cmH<sub>2</sub>Oで再灌流した。

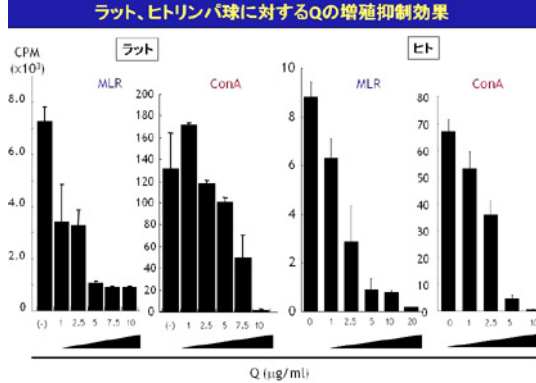
冷保存終了時、再灌流終了時の肝重量増加、逸脱ALT活性、および門脈抵抗を評価した。

## 4. 研究成果

### 1) Qの免疫抑制効果 <in vitro>

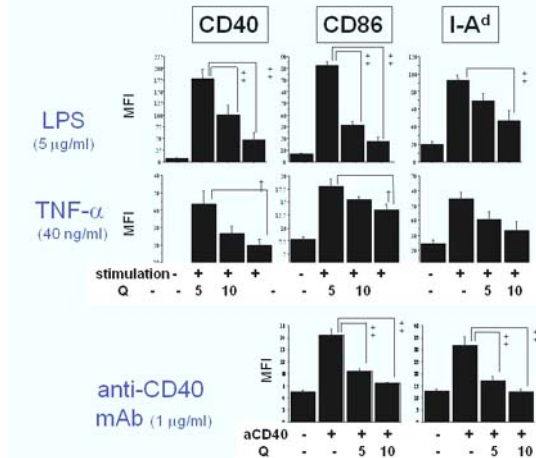
免疫担当細胞に対するNF-κB阻害剤Qの効果を確認し、その機序を検討した。

**リンパ球**：抗体・抗原刺激によるT細胞増殖を、用量依存性に阻害した。増殖性サイトカイン(IL-2, IFN-γ)産生も抑制した。(図1)



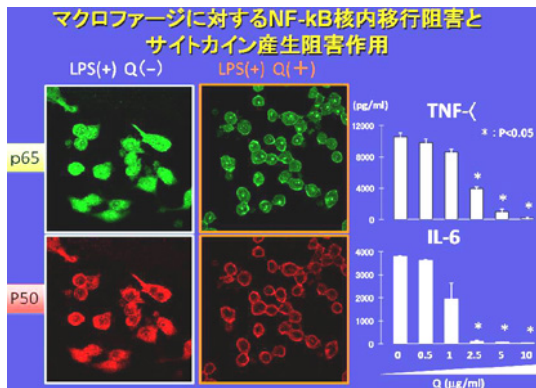
**樹状細胞**：LPS/TNF-α刺激に伴う細胞成熟、活性化(CD40, CD80, CD86, MHCクラスIIの発現)を用量依存性に抑制した。(図2)

未熟樹状細胞を標的とした免疫寛容の誘導



**マクロファージ**：LPS刺激によるTNF-α、IL-6産生及び貪食能を抑制した。(図3)

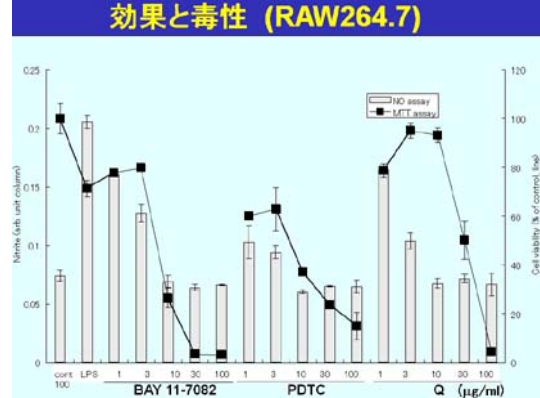
Qは抗原刺激によるT細胞の活性化、増殖に対して直接的に阻害するとともに、樹状細胞の成熟、活性化の阻害により、間接的にも阻害した。これらの反応を抗原と無関係に促進するマクロファージの反応も阻害した。



### 2) Qの安全域と肝保存障害軽減効果

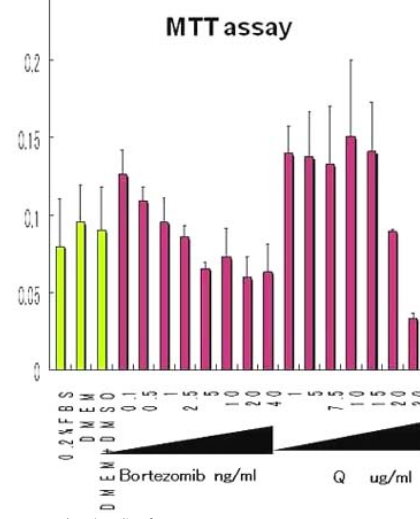
<in vitro>

肝細胞株および初代培養肝細胞を用いて、低酸素・再酸素化をおこなった。安全域の確認はマクロファージ、血管内皮細胞、肝細胞で行った。



(上; 図4, 下; 図5)

血管平滑筋細胞における毒性



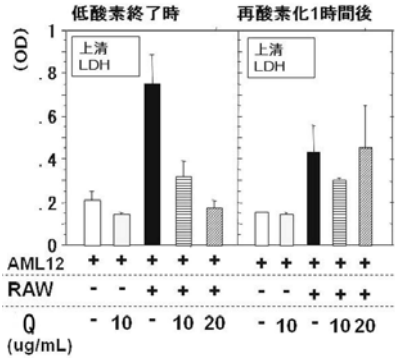
**Qの安全濃度**：マクロファージ(RAW264.7)では、Qは3-10 μg/mlでNO産生を阻害したが、バイアビリティーは低下しなかった。しかし、NF-κB阻害作用を有する既存の化合物BAY11-7082とPDTCでは50%阻害を呈する濃度でバイアビリティーも低下した(図4)。肝細胞では5 μg/ml以下で細胞障害を認めなかった。ラット血管平滑筋細胞では20 μg/ml以上で毒性を示した(図5)。

**低酸素・再酸素化障害抑制効果**

肝細胞単独での低酸素・再酸素化では軽度の障害を認め、Qは軽度に障害を軽減した。肝細胞とマクロファージの共培養下での低酸素・再酸素化では、高度の肝細胞障害を認め、Qはこの障害を効果的に軽減した。(図6)

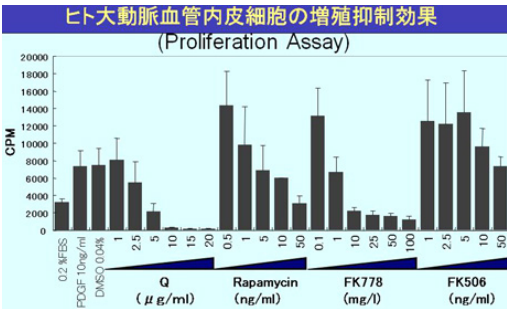
Qの作用機序は、マクロファージのNF-κB活性化を抑え、TNF-αなどのサイトカイン分泌を抑えることにより発揮されることが示唆された。(図6)

肝細胞・マクロファージ共培養下での低酸素・再酸素化障害に対するDHMEQの効果



(3) Qの動脈硬化抑制効果 <in vitro>

慢性拒絶は血管内皮、血管平滑筋細胞の増殖と中膜の肥厚を特徴とした動脈硬化像を呈し、これを抑制できるかは重要である。



(図7)

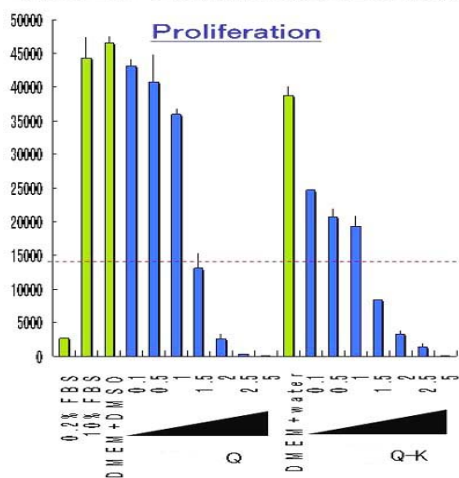
血管内皮細胞の増殖抑制効果：

Qはヒト胸部大動脈血管内皮細胞の増殖を、強く阻害した。毒性を示さない濃度域での増殖抑制効果は、ラパマイシン、FK778、タクロリムスよりも強かった。(図7)

血管平滑筋細胞の増殖抑制効果：

Qは安全濃度域内で平滑筋細胞の増殖を強力に阻害した。(図8)

ラット血管平滑筋細胞の増殖抑制効果



(図8)

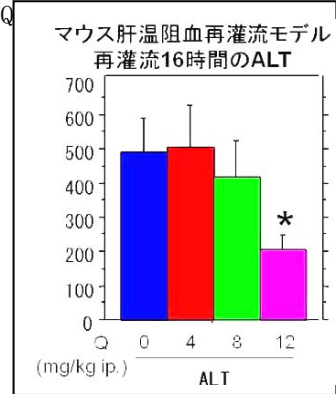
(4) Qの肝虚血再灌流障害に対する効果

単離ラット肝灌流装置(IPRL) <ex vivo>

定量灌流では、無治療群と比べて有意に門脈圧が軽減され、10ug/mlでは正常肝と同様の門脈圧を示した。肝逸脱酵素は減少傾向を示し(N.S.)、胆汁産生量は有意に増加した。しかし、白色胆汁であり、肝機能の改善によるものか組織構築の破壊による短絡かは鑑別できなかった。定圧灌流モードでも門脈抵抗は低下する傾向を認めた。しかし、胆汁産生を認めず、肝逸脱酵素も減少しなかった。

マウス肝温阻血再灌流 <in vivo> (図9)

12mg/kgのQ投与により、再灌流後16時間のALT値は無治療群と比べ、有意に減少した。しかし、検討の後半から、腹腔内でQの析出が認められた。また、血中濃度の不安定性、半減期が異常に短い



ことなどが見出されたため、剤型の改良を優先し、詳細な解析は行わなかった。Ex vivo, in vivoモデルでの検討により、Qは肝温阻血再灌流障害を軽減することが強く示唆された。

(5) 静脈内投与を目指したQの剤型の模索

剤型によってEC<sub>50</sub>は変動したが、桁が変わるほどの変化ではなく、概ねラセミ体Qと同等以上の免疫抑制、血管内皮細胞増殖抑制、血管平滑筋細胞増殖抑制などの効果が確認された。中でもキラル体の効果が強く、リポソーム化製剤の安定性が優れていた。図8はラセミ体とK塩の効果、安全域を示している。

(6) 拒絶反応、虚血再灌流障害が強い、他臓器でのQの効果

ラット小腸虚血再灌流：

Qは、再灌流後の小腸組織障害を軽減し、肺障害も軽減した。

膵島細胞移植：

マウス allo, xeno 移植モデルでQはFK506との併用により、グラフト生存を延長し、血糖正常化率を向上させた。

心移植：

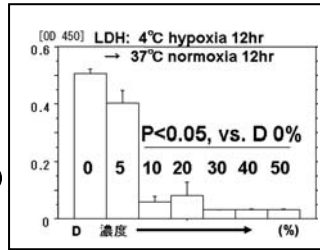
リポソーム化Qは静脈内投与により、マウス allo 心グラフトの生着期間を延長した。また、FK506との併用により強い免疫抑制効果が得られた。

静脈内投与可能な剤型の開発に成功した。Qは拒絶反応、虚血再灌流障害を軽減することが確認された。

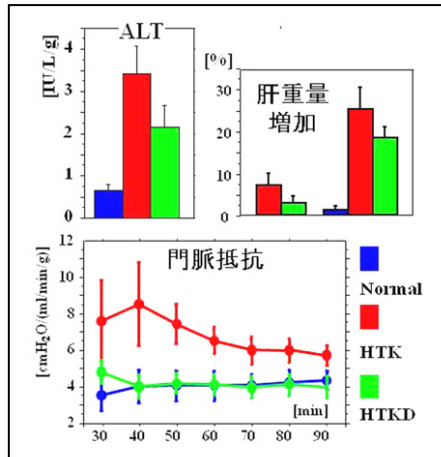
(7) 新規臓器保存液の開発

(図10)

**Dの肝細胞保護効果**  
細胞保護成分を含まない、培養液(DMEM)をD化すると、再酸素化後の障害が有意に軽減された(図10)



**新規臓器保存液の肝保護効果**



(図11)

HTK液では肝重量は24時間肝冷保存後、再灌流終了時に増加したが、HTKDでは重量増加が阻害された。HTK液では再灌流時の門脈抵抗が上昇し、逸脱ALT活性が上昇したが、HTKDではそれらが抑制された。(図11)

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  overload やアクチン脱重合の阻害、ミトコンドリアの保護および解糖と酸化リン酸化の促進などによる、アポトーシス、ネクローシスの阻害が、肝細胞の他、小腸上皮、気管上皮、心筋細胞などで示され、これらの作用がDの細胞保護機序と考えられた。ユーロコリンズ、HTK、UW液および数種類の新規組成の臓器保存液でも、Dは同様の細胞保護効果を示した。

新規臓器保存液は冷保存・再灌流による細胞、臓器の構築と機能の障害を軽減した。NF- $\kappa$ B 阻害との併用により、更に強力な臓器保護が可能になると期待される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

1. Y Hirano, **Satoru Todo** et al. (8人中5番目) Hypothermic preservation effect on mammalian cells of type III antifreeze proteins from notched-fin eelpout. *Cryobiology* 57, 46-51, 2008 査読有
2. Tomomi Suzuki, Hiroyuki Furukawa, Kazuo Umezawa, Michitaka Ozaki, **Satoru Todo** et al. (10人中10番目) The novel NF- $\kappa$ B inhibitor, Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) prevents local and remote organ injury following intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Journal of Surgical Research* 149, 69-75, 2008 査読有
3. Toshiro Ogata, **Satoru Todo** et al. (5人中5番目) Novel tumor necrosis

factor- $\alpha$  suppressant, ONO-SM362, prevents liver failure and promotes liver regeneration after extensive hepatectomy. *Surgery* 143, 545-555, 2008 査読有

4. Sanae Haga, **Satoru Todo** et al. (8人中7番目) Preventing hypoxia/reoxygenation damage to hepatocytes by p66(shc) ablation: Up-regulation of anti-oxidant and anti-apoptotic proteins. *J Hepatol* 48, 422-432, 2008 査読有
5. Magata Shinichiro, Hiroyuki Furukawa, **Satoru Todo** et al. (8人中8番目) The effect of antagonism of adenosine A1 receptor against ischemia and reperfusion injury of the liver. *Journal of Surgical Research* 139, 7-14, 2007 査読有
6. Shinya Ueki, Hiroyuki Furukawa, Michitaka Ozaki, Kazuo Umezawa, **Satoru Todo** et al. (12人中12番目) Control of allograft rejection by applying a novel NF- $\kappa$ B inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin. *Transplantation* 82(12) 1720-1727, 2006 査読有

[学会発表] (計24件)

1. **Moto Fukai** New concept of the treatment of cold preservation injury 第35回日本低温医学会総会 2008年11月23日、東京、六本木ヒルズ
2. **Ryoichi Goto** Inhibition of NF- $\kappa$ B and/or NFAT activation augments or abrogates immunomodulatory effects of donor specific transfusion. *Transplantation Society 2008* 2008年8月11日 Sydney Convention & Exhibition Centre Sydney, Australia
3. **Tetsu Oura** A novel human anti-CD40 monoclonal antibody, 4D11, for liver transplantation in non-human primate. *Motohiro Uno* A novel NF- $\kappa$ B inhibitor, DHMEQ, attenuate arterial Vasculopathy. *Transplantation Society 2008* 2008年8月11日 Sydney Convention & Exhibition Centre Sydney, Australia
4. **Masaaki Watanabe** Effect of NF- $\kappa$ B Inhibition by DHMEQ on islet transplantation in mice. *Transplantation Society 2008* 2008年8月11日 Sydney Convention & Exhibition Centre Sydney, Australia
5. **Takeshi Aoyagi** Induction of Immunosuppressive Dendritic Cells by Novel Nuclear Factor- $\kappa$ B Inhibitor DHMEQ. *Transplantation Society 2008* 2008年8月11日 Sydney Convention & Exhibition Centre Sydney, Australia
6. **Tomomi Suzuki** The novel NF- $\kappa$ B inhibitor, DHMEQ prevents local and remote organ injury following intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Transplantation Society 2008* 2008年8月11日 Sydney Convention & Exhibition Centre Sydney, Australia
7. **Yuka Oshima** The effect of DHMEQ, a novel NF- $\kappa$ B inhibitor on development of obliterative bronchiolitis in

- heterotopic murine airway allo-transplantation Transplantation Society 2008 2008年8月11日 Sydney Convention & Exhibition Centre Sydney, Australia
8. **Masahiko Taniguchi** Regulation of splanchnic circulation in living donor liver transplantation Annual Congress of International Liver Transplantation Society (ILTS) 2008 2008.7.9 Le Palais des Congres de Paris, France
  9. **Takeshi Aoyagi** Impact of induction with Basiliximab in combination with Tacrolimus-based immunosuppressive regimen in living donor liver transplantation Annual Congress of ILTS 2008 2008.7.9 Le Palais des Congres de Paris, France
  10. **後藤了一** NF- $\kappa$ BおよびNFAT活性化阻害とdonor-specific transfusionによる免疫抑制効果 第12回北海道移植フォーラム 2008年6月28日 北海道大学臨床大講堂
  11. **Satoru Todo** Hepatocellular Carcinoma in Liver Transplantation American Transplant Congress 2008 2008年6月2日 Metropolitan Toronto Convention Centre, Toronto, Canada
  12. **Takeshi Aoyagi** Induction of Immunosuppressive Dendritic Cells by a Novel NF- $\kappa$ B inhibitor, DHMEQ American Transplant Congress 2008 2008年6月2日 Metropolitan Toronto Convention Centre, Toronto, Canada
  13. **Masahiko Taniguchi** Regulation of Splanchnic Circulation in Adult to Adult living Donor Liver Transplantation American Transplant Congress 2008 2008年6月2日 Metropolitan Toronto Convention Centre, Toronto, Canada
  14. **Yuka Oshima** A novel nuclear factor kappa B inhibitor, DHMEQ ameliorates development of obliterative bronchiolitis in heterotopic murine airway transplantation. American Transplant Congress 2008 2008年6月2日 Metropolitan Toronto Convention Centre, Toronto, Canada
  15. **Motohiro Uno** A novel NF- $\kappa$ B inhibitor, DHMEQ, attenuates arteria vasculopathy. American Transplant Congress 2008 2008年6月2日 Metropolitan Toronto Convention Centre, Toronto, Canada
  16. **Ryoichi Goto** Inhibition of NF- $\kappa$ B activation augments immunomodulatory effect of donor specific transfusion American Transplant Congress 2008 2008年6月2日 Metropolitan Toronto Convention Centre, Toronto, Canada
  17. **Tetsu Oura** The influence of calcineurin inhibitors on CD-40-CD154 co-stimulation blockade mediated tolerance induction in heart and liver transplantation American Transplant Congress 2008 2008年6月2日 Metropolitan Toronto Convention Centre, Toronto, Canada
  18. **Ryoichi Goto** The immunomodulatory effect of donor specific transfusion plus NF- $\kappa$ B blockade by utilizing a novel inhibitor, DHMEQ 8th international conference Feb 14-17, 2008 Berlin, Germany Intercontinental Berlin hotel
  19. **高橋徹** 選択的NF- $\kappa$ B阻害剤DHMEQのドナー投与によるマウス膝蓋肝内移植成績の改善効果 第20回代用臓器・再生医学研究会 2008.2.2 北海道大学学術交流会館
  20. **後藤了一** Nuclear factor kappa B阻害とDonor specific transfusion併用による免疫抑制効果 第43回日本移植学会総会 2007.11.22-24 仙台国際センター
  21. **Tohru Takahashi** Donor pretreatment with a novel NF- $\kappa$ B inhibitor, DHMEQ can alleviate the graft damage in syngenic marginal islet transplantation. Cell Transplant Society 2007 Joint Conference 2007.9.15-20 Minneapolis ハイアットリジェンシー
  22. **崎浜秀康** The SDF-1 and CXCR4 Interaction is Critical for the Development of Transplantation Arteriosclerosis (第11回北海道移植フォーラム 2007.5.26 北海道大学学術交流会館
  23. **植木伸也** 新規NF- $\kappa$ B阻害剤“DHMEQ”の慢性拒絶反応抑制効果 第107回日本外科学会定期学術集会 2007.4.11-13 大阪国際会議場
  24. **Ryoichi Goto** Effect of a novel NF- $\kappa$ B inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin, in combination with donor specific transfusion in mouse heart transplantation American Transplant Congress May 5-9, 2007 San Francisco, Moscone West Convention Center
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
藤堂 省 (TODO SATORU)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：6 0 1 3 6 4 6 3
  - (2) 研究分担者  
尾崎 倫孝 (OZAKI MICHITAKA)  
北海道大学・大学院医学研究科・特任教授  
研究者番号：8 0 2 5 6 5 1 0
  - (3) 連携研究者  
梅澤 一夫 (UMEZAWA KAZUO)  
慶應義塾大学・理工学部・教授  
研究者番号：7 0 1 1 4 4 0 2  
岸野 吏志 (KISHINO SATOSHI)  
明治薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：9 0 3 7 3 0 2 6  
古川 博之 (FURUKAWA HIROYUKI)  
北海道大学・大学院医学研究科・特任教授  
研究者番号：7 0 2 9 2 0 2 6