

平成20年3月12日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591495
 研究課題名 (和文) 移植臓器の拒絶反応を抑制する免疫制御細胞を誘導する既存薬剤の探索とその機序の解明
 研究課題名 (英文) Investigation of clinically used drugs for inhibition of graft rejection and generation of regulatory cells
 研究代表者
 新見 正則 (NIIMI MASANORI)
 帝京大学・医学部・准教授
 研究者番号：80198415

研究成果の概要：

MMFとラパマイシンが免疫制御細胞を誘導した。また、免疫抑制剤ではない通常薬剤ではウルソデオキシコール酸、ラジカット、塩酸サルボグレラート、柴苓湯が免疫制御細胞を誘導した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：移植外科学

1. 研究開始当初の背景

骨髄から常時新しい細胞が供給される通常の状態では、免疫寛容をうるためにアナジヤやディレーションによれば、終生薬剤の投与が必要になる。ところが、免疫制御細胞を

誘導するレギュレーションを樹立すれば、その時点で薬剤の投与は不要になる。臨床では免疫制御細胞の誘導を導けば、少なくとも従来型の免疫抑制剤の量を軽減でき、副作用を回避できる。急性期は今まで通りのプロトコ

ールで移植心の拒絶反応を防止し、慢性期には免疫制御細胞が誘導できる薬剤に適宜変更することで、上記が達成できる。

2. 研究の目的

臨床応用するためには、すでに日常臨床で使用されている薬剤が望ましい。更なる既存薬剤の解析と漢方薬の免疫制御細胞誘導の可能性を調べた。

3. 研究の方法

マウスの心臓移植モデルを用いた。C57BL/10 をドナーとして、CBA をレシピエントにした。ドナー抗原を気管内に投与し7日後に心臓移植をするモデルと、心臓移植後に調べる既存薬剤を投与するモデルで行った。手術は手術用の顕微鏡を用いた。

4. 研究成果

MMFとラパマイシンが免疫制御細胞を誘導した。また、免疫抑制剤ではない通常薬剤ではウルソデオキシコール酸、ラジカット、塩酸サルボグレラート、柴苓湯が免疫制御細胞を誘導した。

.....
柴苓湯のマウス心臓移植片生着延長に及ぼす効果について詳細に述べる。

無処置の CBA レシピエントは、C57BL/6 マウスの心臓を生存中間値 (Median survival time : MST) 7 日で拒絶した。また蒸留水を経口投与した群でも、CBA レシピエントは、C57BL/6 マウスの心臓を MST8 日で拒絶した。ところが、柴苓湯を 2 g/kg/day で投与した群では、すべての CBA レシピエントは、C57BL/6 マウスの心臓を 100 日以上受け入れた。柴苓湯を 0.2 mg/kg/day, 0.02 mg/kg/day, 0.002

mg/kg/day で投与した群では、MST はそれぞれ 41 日, 7 日, 7 日であり、柴苓湯は用量依存性に移植片の拒絶抑制に作用したと考えられた。

柴苓湯を構成する 12 種類の生薬のうち、どの生薬が有効かを調べるために、それぞれ 8 日間心臓移植後に投与した。柴苓湯の移植片拒絶抑制効果に用量依存性が認められたため、まずはそれぞれの生薬の投与量を柴苓湯の構成割合に減量せず、2 g/kg/day を一律に投与した。MST はそれぞれ黄芩 (12 日), 甘草 (17 日), 半夏 (17 日), 柴胡 (8 日), 人参 (8 日), 生姜 (8 日), 大棗 (8 日), 桂皮 (13 日), 茯苓 (18 日), 猪苓 (7 日), 蒼朮 (8 日), 沢瀉 (8 日) となり、いずれの生薬も柴苓湯と同等の効果は認められなかった (表 1)。さらに、柴苓湯 (2 g/kg/day) の構成割合に従った分量で投与したが、MST はそれぞれ黄芩 (7 日), 甘草 (7 日), 半夏 (6 日), 柴胡 (6 日), 人参 (7 日), 生姜 (13 日), 大棗 (7 日), 桂皮 (11 日), 茯苓 (7 日), 猪苓 (6 日), 蒼朮 (7 日), 沢瀉 (18 日) となり、いずれの生薬も柴苓湯と同等の効果は認められなかった。

柴苓湯は五苓散と小柴胡湯の合方であるので、小柴胡湯と五苓散をそれぞれ 2 g/kg/day で 8 日間心臓移植後に投与した。MST は、五苓散 (8 日), 小柴胡湯 (7 日) で、心臓移植片の生着延長効果は見られなかった。

柴苓湯によってすべての心臓移植片は 100 日以上生着したが、その組織像は炎症細胞の浸潤も軽度で、冠動脈の内膜肥厚もわずかであった。

柴苓湯のマウスでの作用を調べるために、混合リンパ球培養試験 (MLR) と、その上清の酵素免疫測定法 (ELISA) を行った。その結果、柴苓湯投与群は無処置群に比べて細胞の増殖が抑制され、IFN- γ の産生も抑制された。IL-2, IL-4 と IL-10 の産生の有意差は認めなかった。

柴苓湯を投与して誘導した移植免疫寛容に免疫制御細胞が関与するのかを調べるために、CD4陽性CD25陽性FOXP3陽性細胞の割合を調べた¹²⁾。柴苓湯投与群は無処置群に比べて、CD4陽性細胞中のCD4陽性CD25陽性FOXP3陽性細胞の比率が増加した。

臓器移植は生命維持に不可欠な臓器の働きが失われた患者に対する究極の治療法として確立されている。新規免疫抑制剤の導入などにより、移植医療の成績は向上してきているが、免疫抑制剤による非特異的な免疫の抑制下では、患者は感染症や腫瘍などに罹患する危険にさらされる。従って、非特異的な免疫抑制剤を投与されなくても、免疫が制御され拒絶が起こらない状態、すなわち、特異的な免疫寛容が成立することは移植拒絶の治療の究極の目標である。

移植免疫寛容のメカニズムには、アナジー(anergy)、消去(deletion)、免疫制御細胞の誘導(immune regulation)、無視(ignorance)などがある¹³⁾。アナジーはドナー抗原反応T細胞がドナー抗原による活性化に対して一時的に無反応になっている状態である。消去はドナー抗原反応T細胞が免疫制御治療によって消去された状態である。免疫制御細胞の誘導はレシピエントの免疫系において、ドナー抗原反応T細胞を抑制するような細胞(免疫制御細胞)が誘導され、機能をしている状態である。無視はグラフトが無視された状態である。その中でも免疫制御細胞(regulatory cell)の誘導は最近特に注目されている。

今まで数々の動物実験で集積された知見で、CD4陽性CD25陽性のフェノタイプを有する制御性T細胞は、臓器移植後の免疫寛容の成立に重要な役割を果たすことが示唆された。FOXP3は制御性T細胞の分化と機能を決定するマスターコントロール遺伝子で、制御

性T細胞に特異性が高いとされており、CD4陽性CD25陽性制御性T細胞の重要なマーカーとして知られている。われわれの研究グループの実験モデルでもsarpogrelate hydrochlorideとranitidine¹⁷⁾はCD4陽性制御性細胞を誘導して組織適合抗原完全不一致マウス移植心の生着を延長することが判明し既に報告した。今回同じモデルを使って漢方薬である柴苓湯の移植免疫についての効果及び免疫制御細胞の誘導などを検討した。

漢方薬は西洋薬と違って、特定の疾患の治療だけではなく、体全体のバランスを調整する効果を持ち、副作用が少ない特性もあり、過去から現在にわたって長く臨床に使用されている。柴苓湯は漢方薬の中でも頻用されているものの一つで、免疫反応を調整し、炎症をやわらげる働きがあり、免疫性腎炎や喘息などアレルギーや免疫系がかかわる病気にも応用されている。今回われわれの実験結果を見ると、柴苓湯は臓器移植の免疫反応を調整する効果もあることがわかった。

無処置のCBAマウスはC57BL/6マウスの心臓をMST7日で拒絶した。これは自然拒絶期間と考えられ、この結果をふまえて、CBAマウスに移植手術日から手術後7日目までの計8日間柴苓湯を経口投与した。すると、柴苓湯を2g/kg/dayで投与した群の移植心は100日以上生着し、永久生着したとも考えられる。柴苓湯を0.2g/kg/day以下で投与した群では、移植心は永久生着できなかった。これらの結果から、柴苓湯はC57BL/6マウスからCBAマウスへの組織適合抗原完全不一致マウス移植心の永久生着を誘導できることと、用量依存性があることが示唆された。マウスへの柴苓湯2g/kg/dayの投与量は、人に臨床で使用する場合の通常成人投与量9g/dayと比較すると多いが、本実験では漢方薬や生薬

の投与によると思われるマウスの死亡や虚弱を来したことはなかった。今後臨床で移植患者に投与する場合には、さらなる検討が必要であると思われる。

柴苓湯は小柴胡湯と五苓散の合方の漢方薬である。すなわち、柴苓湯は、小柴胡湯を構成する7種類の生薬（黄芩、甘草、半夏、柴胡、人参、生姜、大棗）と、五苓散を構成する5種類の生薬（桂皮、茯苓、猪苓、蒼朮、沢瀉）を合わせた12種類の生薬で構成されている。柴苓湯の移植心生着延長効果が、どの成分によるものかを検討したが、12種類の生薬それぞれ単独の成分だけでなく、五苓散、小柴胡湯でも移植心の生着を延長できなかった。漢方薬の西洋薬との最たる違いの一つは、単一薬理ではなく総合薬理であることである。漢方薬は、それぞれの構成生薬単独の効能だけでなく、生薬の組み合わせによって新しい効能が生じるという特性があることは周知の通りであり、この実験結果からも、柴苓湯の移植心生着延長効果は、単一の薬理効果によるものではなく、柴苓湯として12種類の生薬の組合せが重要であると考えられる。

柴苓湯投与群の術後100日目の移植心病理組織標本では、グラフトに浸潤細胞の数は少なく、急性拒絶を抑えて、慢性拒絶の特徴である移植心の血管内膜増厚も少なかった。つまり、柴苓湯は移植心を急性拒絶を抑制し、慢性拒絶も抑えていたことが分かった。

つづいて、病理学的な組織変化を抑えること以外の柴苓湯の移植心生着のメカニズムを検討した。既に柴苓湯の免疫抑制効果については、ラットの腎炎モデルでメサングウム細胞の増殖を抑えること¹⁾や、マウスの慢性関節リウマチモデルでリンパ細胞の増殖を抑制できること⁷⁾など、他の実験モデルでも報告されている。また、IFN- γ は免疫細胞サイトカインの一種であり、Tリンパ細胞を活性化

させ、抗ウイルスや抗腫瘍など免疫系および炎症の調節などの働きをする。今回の実験では、心臓移植後14日目の脾細胞からMLRを行ったところ、柴苓湯投与群は無処置群と比べて、リンパ細胞の増殖を抑える効果が認められた。リンパ細胞の増殖を抑えることから、柴苓湯には直接免疫反応を抑制できる効果があると考えられる。また、続いて行ったELISAの実験では、炎症細胞因子IFN- γ の産生を抑える効果があることが分かった。柴苓湯のMLRでリンパ細胞の増殖を抑制し、IFN- γ の産生も抑える効果は、移植心の生着に大きく関与すると考えられる。

さらに、心臓移植後30日目の脾細胞のCD4陽性CD25陽性FOXP3陽性免疫制御性T細胞の割合をフローサイトメーターで分析した。今回の結果では、柴苓湯投与群は無処置群と比べて、CD4陽性細胞中のCD4陽性CD25陽性FOXP3陽性細胞の比率が増えた。つまり、柴苓湯はCD4陽性CD25陽性FOXP3陽性免疫制御性T細胞を誘導し、免疫寛容を誘導することが推測できる。この結果も、移植心の生着に大きく関与していると考えられる。

結論として、今回の実験では、柴苓湯は組織適合抗原完全不一致マウス移植心の生着を延長した、この結果は用量依存性であり、全12種類の総合作用であることが示唆された。その過程で急性拒絶と慢性拒絶とも抑えて、免疫反応細胞の増殖を抑えた上IFN- γ の産生も抑えて、免疫制御細胞の比率を上げた。

漢方薬は、長い歴史の中で臨床の経験を蓄積して発展してきた薬で、複合成分であるため、作用機序の解明はまだ不十分である。そして、現在の科学技術を用いて漢方薬をあらためて研究し、新しい薬理効果を発見する可能性がないとは言えない。今回の実験の結果を見ると、長い歴史を持つ漢方薬がわずか50年程の現代移植医療に有効であったこと

は、驚くべきことでもあり、臨床応用も含め、さらなる多角的な漢方の研究が必要であろう。ますます漢方が患者の福祉に貢献できるように願ってやまない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件) 現在投稿中 (採択済)

- ① M. Niimi, Prolonged Survival of Fully Mismatched Cardiac Allografts and Generation of Regulatory Cells by Sairei-to, a Japanese Herbal Medicine Transplantation, 2009 (査読有り)
- ② M. Niimi, Purified Eicosapentaenoic Acid Induces Prolonged Survival of Cardiac Allografts and Generates Regulatory T Cells American Journal of Transplantation, 2009 (査読有り)

[学会発表] (計4件)

- ① N. Shirasugi, Q. Zhang, D. Iwami, O. Aramaki, and M. Niimi Administration of donor alloantigen via the respiratory tract generates CD11c⁺ regulatory cells and induces hyporesponsiveness to fully allogeneic cardiac grafts. XXII International Congress of the Transplantation Society Sydney, Australia, August 10-14, 2008/08/13
- ② D. Iwami, Q. Zhang, O. Aramaki, N. K. Nonomura, Shirasugi, and M. Niimi

Induction of prolonged survival of fully allogeneic cardiac grafts and generation of regulatory cells by purified eicosapentaenoic acid
XXII International Congress of the Transplantation Society
Sydney, Australia, August 10-14,
2008/08/13

- ③ Q. Zhang, D. Iwami, O. Aramaki, K. Watanabe, A. Ishige, N. Shirasugi, and M. Niimi Saireito, a Japanese herbal medicine, induces indefinite survival of fully mismatched cardiac allografts and generates regulatory cells in mice
XXII International Congress of the Transplantation Society
Sydney, Australia, August 10-14,
2008/08/13
- ④ D. Iwami, Q. Zhang, O. Aramaki, N. K. Nonomura, Shirasugi, and M. Niimi Purified Eicosapentaenoic acid induces prolonged survival of fully allogeneic cardiac grafts and generates regulatory cells.
2008 American Transplant Congress
Toronto, Canada, May 31-4

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新見正則 (NIIMI MASANORI)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：80198415

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし