

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462093

研究課題名(和文) 抗BTLA抗体とHMG-CoA還元酵素阻害薬による冠動脈内膜肥厚抑制効果の解析

研究課題名(英文) Analysis of cardiac allograft protective effect by HMG-CoA reductase inhibitor and anti-BTLA monoclonal antibody

研究代表者

原 真範 (Hara, Masanori)

帝京大学・医学部・助手

研究者番号：90385849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：臓器移植における最大の課題である拒絶反応の中で長期生着の阻害要因である慢性拒絶反応を制御する薬剤の探究のため、動脈硬化抑制効果をもつとされるHMG-CoA還元酵素阻害薬(プラバスタチン)をマウス心臓移植モデルに投与し、生着延長期間を調査した。プラバスタチン10ug/日を術後1週間投与することで50日間の生着期間を認め、制御性T細胞の誘導を確認した。プラバスタチン群の左冠動脈は無治療群よりも内腔面積と血管面積は保たれ、狭窄率は低かった。さらに、リンパ球培養反応によりプラバスタチンの直接的免疫制御作用も確認された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects on the graft survival of HMG-CoA reductase inhibitor Pravastatin, an anti-arteriosclerosis drug, in the murine cardiac transplant model. Our models injected intraperitoneally with one dose of 10 μg/day of Pravastatin for 7 days after grafting had the significant prolongation of graft survival and the generation of regulatory T cells. Morphometric analysis showed the suppression of intimal hyperplasia in left coronary arteries of donor B6 heart from Pravastatin-exposed recipients. Moreover, the addition of Pravastatin to allogeneic mix leukocyte culture could inhibit alloproliferation in a dose-dependent manner. This study has been published in Transplantation Proceedings.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：HMG-CoA還元酵素阻害薬 マウス 心臓移植 拒絶反応 冠動脈 内膜肥厚 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

- [1] 急性拒絶反応に関してはシクロスポリン等の免疫抑制薬やステロイドの使用により、一定の制御が可能になった。しかし、慢性拒絶反応に関しては、上記の薬剤では制御が困難であり、慢性拒絶反応を制御可能にすることが最新の移植医療の命題である。
- [2] プラバスタチン・シンバスタチン等の HMG-CoA 還元酵素阻害薬に関する基礎研究、臨床研究は数多く行われ、各診療科における一定のコンセンサスを得ているように思われる。特に、循環器科に関する報告は数多く、HPS(Heart Protection Study; Lancet 378:2013-2020, 2011)等の meta-analysis がその根幹を支えており、長期投与における狭心症、心筋梗塞に代表される冠動脈イベントリスクの減少やそれを誘因する動脈硬化の抑制効果が期待できるとされている。しかし、臓器移植分野において、抗炎症作用を併せ持つと指摘された HMG-CoA 還元酵素阻害薬を検討した研究は、1973 年に遠藤章らが最初のスタチンを発見して以来行われているが、移植手術後の治療プロトコールの適応には入っていない。

2. 研究の目的

マウス心臓移植モデルによる拒絶反応抑制に関わる HMG-CoA 還元酵素阻害薬（プラバスタチン）と抗 BTLA 抗体の併用効果の解析を行う。

- [1] マウス移植心の生着延長期間の測定と制御性 T 細胞の誘導の有無の確認
- [2] 長期生着移植心の冠血管周囲への炎症性・抗炎症性細胞浸潤評価
- [3] 長期生着心グラフトの冠動脈内膜増殖抑制効果の確認

3. 研究の方法

実験モデルはマウスの異所性心臓移植モデルであ

る。方法は原著論文 (Niimi M. J Heart Lung Transplant 2001;20:1123-8.) で詳細に記載されている。手術用顕微鏡は 6 台あり、その内 1 台は Teaching 可能な眼科脳外科手術用顕微鏡システムであり、多くの国内、国外留学生が実験に使用している。使用する漢方薬、漢方生薬は医薬品の原末を購入している。免疫学的解析設備は現在までに既に整備された状態である。さらに、獨協医科大学医学部マクロ解剖学教室で機材を借用し、免疫組織染色と免疫学的解析等を我々がやっている。

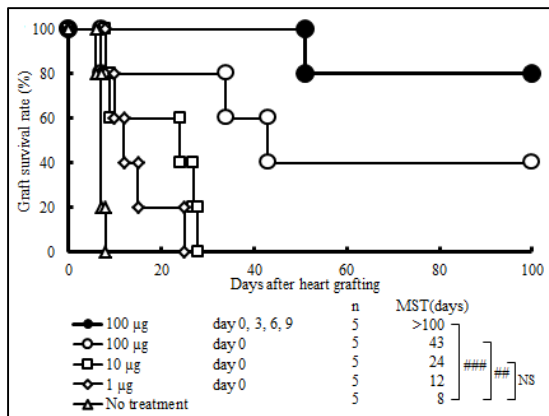
- [1] C57BL/6 マウス心臓を手術用顕微鏡を用いて CBA マウスの腹部に移植すると、無処置（無治療）では中央値が 7~8 日で拒絶される。このモデルの移植実験は現在までに 1000 組以上が行われ、英文論文として多数報告している。現在、帝京大学医学部心臓血管外科学教室では研究代表者の原真範が心臓移植を行っており、成功率は 99% である。
- [2] まず、移植手術当日に抗 BTLA 抗体 100 μ g を 1 回投与すると移植心の拒絶中央値（代表例のみ）は 43 日となった。次に、術後に 4 回投与すると 100 日以上となった。
- [3] HMG-CoA 還元酵素阻害薬に関してはプラバスタチン（製品名メバロチン）を使用し、5 μ g・50 μ g・500 μ g を拒絶が完了するまで経口投与し、心臓移植片の生着期間を調査する。
- [4] 上記実験を更に進める。生着延長効果が抗 BTLA 抗体や HMG-CoA 還元酵素阻害薬そのものの効果であるかどうか、免疫制御細胞の誘導によるものかどうか等をそれぞれ科学的に検証していく。抗 BTLA 抗体そのものの効果を検証するために、リンパ球混合培養（以下、MLR）に直接投与する、もしくは精製し刺激した T 細胞や B 細胞に抗体を投与することでアロ反応性や細胞表面の BTLA に対する反応性を確認する。
- [5] 免疫制御細胞 (Regulatory T cell; Treg) の誘導

に関しては、養子移植 (Adoptive Transfer Study) を行い検証する。

- [6] 上記検証と同時に、移植心臓の病理組織染色や免疫組織染色を行う。30 日以上生着延長しているマウス移植心の冠動脈内膜肥厚について検証する。微小血管閉塞の形態計測は参考文献(Transplantation 1997;63:941)に従う。

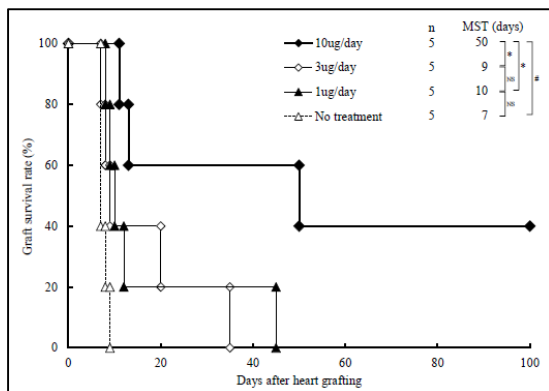
4. 研究成果

- [1] 抗 BTLA 抗体による異所性マウス心臓移植片生着延長効果



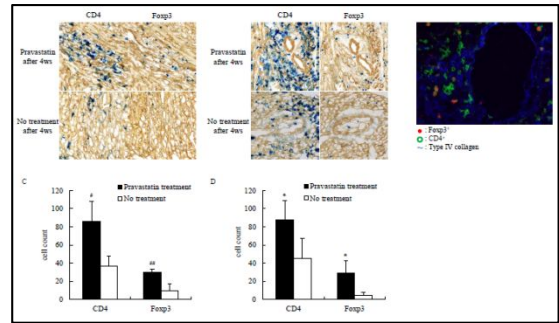
プラバスタチンの移植心に対する検討の基礎実験として、移植心長期生着マウスを抗 BTLA 抗体を用いて作成した。図が示す通り、100µg/4 回投与が最も生着延長効果を示した。

- [2] プラバスタチン投与によるマウス心臓移植片生着延長効果と制御性 T 細胞の誘導



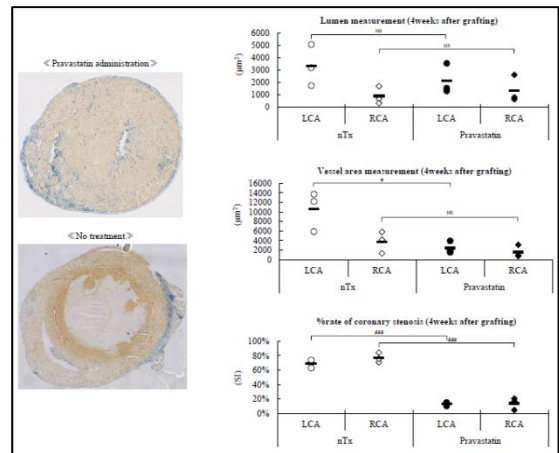
次に、プラバスタチン投与によるマウス移植心生着延長期間の測定を行い、10µg・1週間

投与群が有意に生着延長を示した。



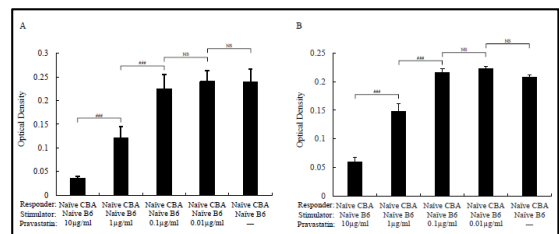
また、移植心筋と冠動脈周囲への CD4 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞の集積を認めており、生着延長効果の一因と考えられた。

- [3] プラバスタチン投与によるマウス移植心冠動脈内膜肥厚の抑制効果



プラバスタチン投与後 30 日目のマウス移植心の冠動脈内膜肥厚を計測ソフト (NDP view) を用いて評価した。プラバスタチン群の左冠動脈は無治療群よりも内腔面積と血管面積は保たれ、狭窄率は低かった。右冠動脈は狭窄率のみ低かった。

- [4] プラバスタチンによるアロ反応抑制能の証明



プラバスタチンの直接的免疫制御機能を評価

するために、MLR に直接プラバスタチンを添加して、リンパ球のアロ反応性(細胞分裂能)を評価した。全脾細胞でも、CD4陽性細胞でも同様の結果を得ており、プラバスタチンがCD4陽性細胞に対するアロ反応抑制能(右図)を持つことが示唆された。

- [5] 抗 BTLA 抗体とプラバスタチン併用投与によるマウス移植片の生着延長効果の検討
抗 BTLA 抗体単剤、もしくはプラバスタチン単剤投与による生着延長効果は示唆されたが、併用療法による 30 日以上生着延長は示されなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- [1] Enzhi Yin, Masanori Hara, Masateru Uchiyama, Masanori Niimi. Graft protective effect of HMG-CoA reductase inhibitor Pravastatin in murine cardiac allograft transplantation. *Transplantation Proceedings* (In press), 査読有
DOI: 10.1016/j.transproceed.2018.05.029.
- [2] Enzhi Yin, Shigefumi Matsuyama, Masateru Uchiyama, Kento Kawai, Masanori Niimi. Graft Protective Effect and Induction of CD4+Foxp3+ cell by Thrombomodulin on allograft arteriosclerosis in mice. *Journal of Cardiothoracic Surgery* 2018;13:48. 査読有
DOI: 10.1186/s13019-018-0731-8.
- [3] Enzhi Yin, Shigefumi Matsuyama, Masateru Uchiyama, Michitaka Kono, Masanori Niimi. Administration of Thrombomodulin (CD141) could improve cardiac allograft survival in mice. *Transplantation Proceedings* (In press), 査読有

- DOI: 10.1016/j.transproceed.2018.02.204
- [4] Kento Kawai, Masateru Uchiyama, Joanna Hester, Kathryn Wood, Fadi Issa. Regulatory T cells for tolerance. *Human Immunology*. 2018;79:294-303. 査読有
DOI: 10.1016/j.humimm.2017.12.013.
- [5] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Takako Yanagisawa, Xiangyuan Jin, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Koichiro Uchida, Masafumi Kawamura, Masanori Niimi. Yogurt Feeding Induced the Prolongation of Fully MHC-mismatched Murine Cardiac Graft Survival by induction of CD4+Foxp3+ cells. *Transplantation Proceedings*. 2017;49:1477-82. 査読有
DOI: 10.1016/j.transproceed.2017.03.092.
- [6] Uchiyama M, Yin E, Jin X, Niimi M. Food Restriction Prolongs Murine Cardiac Grafts. *Transplantation Proceedings*. 2015;47:2528-32. 査読有
DOI: 10.1016/j.transproceed.2015.09.016
- [7] Masateru Uchiyama, Xiangyuan Jin, Enzhi Yin, Tomoki Shimokawa and Masanori Niimi. Treadmill Exercise Induces Murine Cardiac Allograft Survival and Generates Regulatory T cell. *Transplant International*. 2015;28:352-62. 査読有
DOI: 10.1111/tri.12491
- [8] Masateru Uchiyama, Xiangyuan Jin, Hironori Matsuda, Hisashi Bashuda, Tomohiro Imazuru, Tomoki Shimokawa, Hideo Yagita and Masanori Niimi. An Agonistic Anti-BTLA mAb (3C10) Induced Generation of IL-10 Dependent Regulatory CD4+ T Cells and Prolongation of Murine Cardiac Allograft. *Transplantation*. 2014;97:301-9. 査読有

[学会報告] (計 8 件)

2017 年度 (平成 29 年度)

15th CAST [アジア移植学会] (フィリピン・セブ)
11 月 27 日 ~ 30 日開催

- [1] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Shigefumi Matsuyama, Xiangyuan Jin, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Masanori Hara, Tomohiro Imazuru, Masafumi Kawamura, and Masanori Niimi.
Administration of Thrombomodulin (CD141) could improve cardiac allograft survival in mice.
- [2] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Masanori Hara, Xiangyuan Jin, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Masafumi Kawamura, and Masanori Niimi.
Graft protective effect of HMG-CoA reductase inhibitor Pravastatin in murine cardiac allograft transplantation.

2016 年度 (平成 28 年度)

ATC [アメリカ移植学会] (ボストン) 6 月 11 日 ~ 15 日開催

- [3] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Xiangyuan Jin, Satoko Mizuno, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Hideo Yagita, Masanori Niimi.
Anti-BTLA Antibody (6B2) Induced Prolongation of Fully MHC-Mismatched Murine Cardiac Allograft and Generation of Foxp3+ Regulatory T Cells.
- [4] Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Xiangyuan Jin, Takako Yanagisawa, Xiangyuan Jin, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Hideo Yagita and

Masanori Niimi.

Indefinite Survival of Fully

MHC-Mismatched Murine Cardiac

Allografts by Combination of Anti-BTLA mAb (6B2) and Anti-PD-1 mAb (PIM-2).

TTS[国際移植学会] (香港) 8 月 18 日 ~ 23 日開催

- [5] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Takako Yanagisawa, Xiangyuan Jin, Satoko Mizuno, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Hideo Yagita and Masanori Niimi.
Anti-CD272 antibody (6B2) induced prolongation of fully MHC-mismatched murine cardiac allograft and generation of Foxp3+ regulatory T cells.

2015 年度 (平成 27 年度)

ATC [アメリカ移植学会] (フィラデルフィア) 5 月 2 日 ~ 6 日開催

- [6] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Xiangyuan Jin, Tomoki Shimokawa, Hideo Yagita and Masanori Niimi.
Anti-BTLA Antibody (6B2) Induced Prolongation of Fully MHC-Mismatched Murine Cardiac Allograft and Generation of Foxp3+ Regulatory T Cells.
- [7] Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Xiangyuan Jin, Tomoki Shimokawa, Hideo Yagita and Masanori Niimi.
Indefinite Survival of Fully MHC-Mismatched Murine Cardiac Allografts by Combination of Anti-BTLA mAb (6B2) and Anti-PD-1 mAb (PIM-2).

2014 年度 (平成 26 年度)

World Transplant Congress[世界移植学会議] (サンフランシスコ) 7 月 26 日 ~ 31 日開催

- [8] Masateru Uchiyama, Xiangyuan Jin, Enzhi Yin, Tomoki Shimokawa, Hideo Yagita and Masanori Niimi.
Combination of Anti-BTLA Antibody (6B2) and Anti-PD-1 Antibody (PIM-2) Induced Indefinite Survival of Fully MHC-Mismatched Murine Cardiac Allograft.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 真範 (HARA, Masanori)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：90385849

(2) 研究分担者

内山 雅照 (UCHIYAMA, Masateru)

帝京大学・医学部・助手

研究者番号：60713295