

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08544

研究課題名(和文) 動脈硬化促進遺伝子導入MHC確立ミニブタを用いた移植心冠動脈病変進展機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of development of cardiac allograft vasculopathy following heart transplantation using genetically engineered MHC-defined miniature swine.

研究代表者

関島 光裕 (SEKIJIMA, Mitsuhiro)

鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研究センター・特任助教

研究者番号：20568589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：移植心冠動脈病変CAVは慢性期心機能低下に大きな影響を与えるため、病変進展機序の解明と治療戦略の開発は最重要課題である。本研究では、拒絶に重要な主要組織適合性抗原MHCが確立したブタを用いて、免疫学(自然/獲得免疫)と非免疫学(動脈硬化/年齢)的因子が複雑に絡むCAV発症機序の解明を図ることを目的とした。実験の結果、MHC適合間移植モデルでは、CAVは発症せず、獲得免疫反応や動脈硬化・加齢などの重要性が示唆された。今後、緩徐に拒絶反応が進行するMHC完全不適合間心移植モデルの作成による獲得免疫系の関与、動脈硬化誘発動物の使用による非免疫学的因子の関与をもとにCAV発症機序を明確する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓移植後慢性期の心機能低下に大きな影響を与え、また生命予後も規定する因子である移植心冠動脈病変(CAV)に対し、病変が発症し進展する機序を解明することは、治療方法を開発するためにも最重要課題である。今回、実験結果を臨床応用に直結させることができる実験動物である主要組織適合性抗原(MHC)確立ミニブタを用いた研究によって、CAV発症に関連する因子の同定と研究展開の道筋を得ており、今後、治療方法の開発にも結び付く高い意義を有する成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Since cardiac allograft vasculopathy (CAV) have a significant impact on chronic cardiac dysfunction and prognosis of the patients after heart transplantation, elucidation of the mechanisms of CAV and development of therapeutic strategies are very important. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of CAV development, which is complicated by immunological (innate/acquired immunity) and non-immunological (atherosclerosis/age) factors, using MHC-inbred CLAWN miniature swine. The results showed that CAV did not develop in the MHC-matched heterotopic heart transplant model, suggesting that involvement of strong immune response or non-immunological factors need to be investigated by using atherosclerosis-inducing animals.

研究分野：移植外科学

キーワード：移植・再生医療 移植心冠動脈病変 心移植 MHC 加齢 自然免疫 動脈硬化 ミニブタ

1. 研究開始当初の背景

(1) 心臓移植後の移植心冠動脈病変 (Cardiac allograft vasculopathy: CAV) の問題点

免疫抑制剤と周術期管理の改善により、心臓移植 1 年生存率は 85% と向上したものの、1 年以降は移植年代に関わらず年間 3~4% が死亡し、10 年生存率は依然 60% に満たない。主な死因は悪性腫瘍と、移植後数ヶ月から数年の経過で出現し進展するびまん性の冠動脈狭窄病変移植心冠動脈病変 (Cardiac allograft vasculopathy: CAV) であり、CAV は 10 年以内に 50% に発症し、移植心の慢性虚血をきたす。CAV が進行した際は、再移植が唯一の治療手段となり、心臓再移植の 60% は CAV が原因であることから、その発症予防戦略の確立は急務である (*J Heart Lung Transplant* 2017)。CAV の発症機序として、血管内皮障害を契機とするリンパ球やマクロファージなどの血管内皮下への遊走や血小板凝集、脂質の血管壁への蓄積が、種々のサイトカインや増殖因子放出を引き起こし、炎症や線維化の増悪により冠動脈内膜肥厚が進展する、と想定されており、この現象の増悪因子として、心臓移植後の虚血再灌流障害、急性拒絶、感染、ドナーあるいはレシピエントの年齢、高脂血症などが挙げられる (*J Am Coll Cardiol* 2016)。しかし免疫学 (自然免疫もしくは獲得免疫) および非免疫学 (動脈硬化や加齢) 的因子が複雑に絡む CAV 発症機序は明確でなかった。

(2) 動脈硬化促進因子を導入した遺伝子改変ミニブタの開発

CAV はプラーク形成や石灰化を伴う通常の冠動脈狭窄とは病理学的に異なるとされる一方、高脂血症が CAV 増悪因子であること、高脂血症薬スタチンが CAV 発症を減らすことなど、動脈硬化促進因子と CAV 発症は密接に関与しうる。Apo(a) は血中で LDL 構成成分 ApoB-100 と結合し Lp(a) として存在するが、Lp(a) 自身が動脈硬化危険因子であることに加え、Apo(a) とプラスミノーゲンの構造的相同性から、プラスミノーゲン阻害による線溶系活性低下を介する動脈硬化発症への関与が示唆される (*JAMA* 2009)。しかし Apo(a) は霊長類のみが有するため、これまで Lp(a) に焦点をあてた動脈硬化病変進展の検討は困難であった。動脈硬化危険因子 Lp(a) に着目した Apo(a) 導入ミニブタは、動脈硬化発症モデルとして疾患機序解明と治療法開発に必須であると考え、鹿児島大学では、Apo(a) 遺伝子を発現ベクターに組み込み、ミニブタ体細胞に導入して樹立した Apo(a) 発現細胞の核を未受精卵に移植後に仮親に戻し、高濃度に Apo(a) を発現し、血中 Lp(a) が高値を示すヒト Apo(a) 発現 MHC 確立ミニブタ作製に世界で初めて成功した。このブタを用いることによって、免疫学的因子や非免疫学的因子が複雑に絡む CAV 発症機序を解明することに大きく役立つことが期待されていた。

(3) CAV 発症に関する免疫学的因子や年齢因子の重要性

これまで我々の研究グループは移植後の拒絶反応の発症に重要である、主要組織適合性抗原 (Major Histocompatibility Complex: MHC) 確立ミニブタを用いた実験から、T 細胞免疫寛容誘導例では CAV 発症が稀なこと (*Transplantation* 2000&2003)、加齢により T 細胞免疫寛容誘導能が低下すること (*Transplantation* 1999) を示してきた。さらにマウス実験から NK 細胞やマクロファージなどの自然免疫系と CAV 発症の関連性が報告されることや (*J Immunol* 2005, *Am J Transplant* 2007)、近年、加齢に伴う獲得免疫系の変化に加え、自然免疫系の炎症促進と抑制のバランスが変化すること (Toll-like receptor からのサイトカインが過剰に産生される、マクロファージが炎症促進 M1 型へタイプシフトすることなど) が、慢性炎症に関与することが示唆されていた (*Nat Rev Immunol* 2013)。加齢による代謝変化だけでなく、加齢による免疫系への影響も CAV 発症に重要な因子になりうることに着目し、CAV 発症に対する加齢因子の影響も加味した獲得もしくは自然免疫応答への関与を複合的に解明する必要がある。

(4) CAV 発症機序解明における MHC 確立遺伝子改変動物の有用性

マウス・ラット (小動物) に比べ、大動物であるブタを移植実験に使うことは非常に有用である。これは、ブタとヒトとの解剖学的な類似性に加え、CAV の主場であり抗原提示能を有する内皮細胞が、免疫反応に重要な MHC クラス II を小動物では抗原刺激後に発現するのに対し、ブタではヒトと同様に常時発現するという免疫的な相同性があることや (*Transplantation* 2004) や、ブタとヒトの脂質代謝の類似性 (小動物は血清 LDL 低値を始め脂質代謝がヒトと大きく異なる) という点は、CAV 進展機序の検討や治療薬開発において、大動物実験が重要であることを意味している。本研究では、MHC 確立ミニブタへヒト Apo(a) 遺伝子導入したブタの開発によって、Lp(a) が高値となり、かつ詳細な免疫反応評価も可能な大動物動脈硬化モデルを有する利点をいしかし、これまで大動物実験では成し得なかった CAV 発症機序の解明に対し、ドナーおよびレシピエントの内在性動脈硬化促進因子、レシピエント年齢、獲得免疫系や自然免疫系の関与を複合的にアプローチし、CAV 発症機序を体系的に解明し、発症予防や治療戦略の開発につなげる。

2. 研究の目的

本研究は、ヒトに近い前臨床実験動物を用いて心移植予後を規定する CAV 発症機序の解明と治療法開発をはかる、高い緊急性と社会的ニーズを有する研究である。目的 1 では、CAV 発症における、自然免疫系や獲得免疫系の関与を評価する。目的 2 では、ドナー臓器やレシピエントでの動脈硬化促進因子の関与について、レシピエント加齢の関与を含め評価し、さらに Apo(a) 導入による CAV 発症が、細胞免疫反応を加えた MHC 不適合間で増強するかという点について解明をはかる。

3. 研究の方法

(1) MHC 確立クラウン系ミニブタ異所性心移植モデルにおける、CAV 進展に関する評価 (MHC 適合移植モデルもしくは MHC 不適合移植モデル)

動物： MHC 確立クラウン系ミニブタの C1 および C2 タイプの動物を用いて実験を行う。ドナーとレシピエントのタイプが一致する場合は MHC 適合、C1 をドナーとし、C2 をレシピエントとする場合は (あるいは逆に C2 をドナー、C1 をレシピエント) MHC 不適合移植となる。

心移植： ドナーの上行大動脈をレシピエントの腹部大動脈に、肺動脈を下大静脈に吻合する異所性心移植を行う (ドナーの肺静脈や上大静脈、下大静脈は閉塞)。この移植によって、ドナー心臓は、レシピエントの大動脈から血液を受け、大動脈基部 冠動脈 冠静脈 右心室 肺動脈とドナー心臓内を血液が灌流することによって、心臓の拍動が維持されることとなる。

免疫抑制療法： 頸静脈にカテーテルを留置し、12 日間にわたり (もしくは 28 日間) 持続的にタクロリムスを投与する。

移植心機能・CAV 評価： 移植心に電極を装着し、テレメトリーシステムによる持続的な心電図測定によって移植心の生着を評価する。経時的に開腹による移植心針生検を行い、生検検体については病理学的評価を行う (H&E/Elastica Masson、 α -actin、抗 PCNA、抗 von Willebrand、抗 MCP-1 抗体、TUNEL、マクロファージ CD68、NK 細胞 CD16/CD56 などをもとに評価する)。CAV の発症が疑われる際は、造影から形態学的に (全周性、部分的、形成血管数)、国際心肺移植学会 Grade に準じた評価を行う。

(2) ドナー臓器やレシピエント動物における動脈硬化因子 (年齢や動脈硬化促進遺伝子) の CAV への関与を検討

ドナー動物として、若年ブタ、加齢ブタ、動脈硬化促進遺伝子導入ブタの何れかの動物を、またレシピエントとしても同様の群に属する動物を用いて、年齢や動脈硬化促進因子のどの因子が CAV の発症や促進に重要であるのかについて評価を行う。また各々の移植手術について MHC 適合あるいは不適合移植の結果を加味することによって、自然免疫あるいは獲得免疫系の関与についても、更に評価を行う。なお動物の加齢の定義としては、これまでの自験例において、免疫寛容誘導能が阻害されるような年齢、胸腺の退縮程度、性成熟などの観点から得られた結果を基にして、24 か月齢以上を加齢動物とする。

移植手術、免疫抑制療法、移植新機能の評価については全て、上記研究方法 (1) に基づく。

4. 研究成果

(1) MHC 確立クラウン系ミニブタ異所性心移植モデルにおける、CAV 進展に関する評価 (MHC 適合移植モデルもしくは MHC 不適合移植モデル)

T 細胞免疫 (獲得免疫系) が殆ど関与しない実験系として、MHC 適合間心移植を 12 日間の免疫抑制療法下に行った (マイナー抗原に対する免疫反応を制御するため術後短期間免疫抑制療法を使用)。ドナーおよびレシピエントは、12 か月以下の若年個体を用いて実施した。このモデルでは、60 日以上にわたり心臓が長期生着することが確認され、生検所見では、拒絶反応や CAV の進展は認められなかった。この結果は CAV の発症および進展には、強い免疫反応、もしくは動脈硬化・加齢などの因子が重要であることを示唆するものと考えた。

獲得免疫系が強く関与する実験系として、MHC 完全不適合間心移植を 12 日間の免疫抑制療法下に行った。このモデルでは、12 日間の免疫抑制療法が終了する 2-4 週間には強い拒絶反応が生じグラフトが急速に液性免疫反応により拒絶されるため、CAV の発症や進展を評価することが困難であると考えられた。

以上のことから、MHC 完全不適合間心移植で、緩徐に拒絶反応が進行するモデルを作成することによって、CAV 進展の評価を行う必要性が示唆されるとともに、今後、MHC 適合移植モデルを用いた実験で、加齢ドナー (あるいはレシピエント) を用いた移植、もしくは動脈硬化モデルミニブタを用いた移植実験によって、免疫学的因子の関与が少ない条件で CAV 進展の評価を行うことの重要性が示唆された。

(2) ドナー臓器やレシピエント動物における動脈硬化因子 (年齢や動脈硬化促進遺伝子) の CAV への関与を検討

本研究では、遺伝子改変によって動脈硬化を促進するブタを使用する検討を計画していたものの、この動物の繁殖体制の整備に時間を要し、本実験に使用するだけの供給体制とならなかった。そこで、代案として、通常の高月齢 (36 か月以上) ミニブタと、食餌によって動脈硬化を誘発するモデルを用いて、大動脈や冠動脈の動脈硬化病変の差異を評価し、動脈硬化モデルとして

適切な実験動物を確立し、その動物を使用することによって CAV 進展評価を行う方針とした。この結果、食餌によって誘発される動脈硬化病変は、高月齢ブタで観察される動脈硬化病変に類似していることが明らかとなり、今後は移植実験に用いる動脈硬化誘発動物を確実に確保することが可能になると考えられた。今後この動物を使用して、研究目的を達成するための移植実験実施を進める方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

医用ミニブタ・先端医療開発研究センターのホームページ http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~xenotx/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐原 寿史 (SAHARA Hisashi) (90452333)	鹿児島大学・総合科学域総合研究学系・准教授 (17701)	
研究分担者	岩永 健裕 (IWANAGA Takehiro) (40518916)	鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研究センター・特任助教 (17701)	
研究分担者	山田 和彦 (YAMADA Kazuhiko) (40241103)	鹿児島大学・総合科学域総合研究学系・教授 (17701)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	清水 章 (SHIMIZU Akira)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------