

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390366

研究課題名（和文） 臓器受容および組織再生における血管新生機構の包括的解明と新規免疫制御法の開発

研究課題名（英文） Systematic analysis of angiogenesis system and development of novel immunomodulation in organ acceptance and regeneration

研究代表者 中島祥介 (NAKAJIMA YOSHIYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00142381

## 研究成果の概要（和文）：

臓器受容(Graft Acceptance)および組織再生(Tissue Regeneration)における未知のメカニズムを、血管新生の観点から明らかとし、臓器移植あるいは細胞移植において、より安定した拒絶反応の抑制および長期生着を目指した新たな治療戦略を開発することを目的とした。種々の実験の結果、虚血再灌流障害における新たな機序として、TWEAK/Fn14 経路の関与を明らかとした。さらに Fn14 を標的とした治療により、有意な障害抑制効果を認めることが判明した。また炎症性腸疾患モデルにおいて抗血管新生療法による有意な障害抑制効果ならびに血管新生促進物質による組織修復促進効果を認めることが明らかとなった。これらはこれまでに未知の機序であり、さらに新規治療法の臨床応用の可能性が大きいものであると思われた。

## 研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to clarify unknown mechanisms relating to angiogenesis in graft acceptance and tissue regeneration. Moreover, we aimed to develop novel therapeutic strategy inducing durable immunoregulation and long-term acceptance in organ and cell transplantation. We found that TWEAK/Fn14 pathway plays a critical role in ischemia-reperfusion injury. Importantly, Fn14 blockade had a significant inhibitory effect on inhibition of injury. In inflammatory bowel disease model, we found that erythropoietin, which has a proangiogenic property, was found to not only prevent tissue injury, but also accelerate tissue repair. These revealed mechanisms may lead to develop novel therapeutic strategy for intractable disease conditions.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2012年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

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：臓器移植・拒絶反応・血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

移植医療は、多岐にわたる末期疾患や難治性疾患に対する根治治療として定着し、多くの患者の救命に貢献してきた。また、新規免疫抑制剤の開発等により、臓器生着率、患者生存率も向上している。しかし一方では、小腸移植や膵島細胞移植などにおいては、移植直後の安定した生着が今なお困難であり、また心臓移植や腎臓移植などでは、経年的な臓器機能低下により、その長期成績は不良である。さらなる移植治療成績の向上のためには、新たな観点からの臓器受容 (Graft Acceptance) および組織再生 (Tissue Regeneration) のメカニズムの解明およびより能動的な免疫制御法の開発が必須である。これまでに臓器移植において臨床検体を用いた検討から、拒絶反応の発生、進行と主要血管新生因子である **Vascular endothelial growth factor (VEGF)** との関連が示唆されている。これまで我々が行ってきた一連の研究成果を踏まえて、臓器および細胞移植での移植後早期の機能発現と生着および組織修復・再生を含めた長期の生着において、血管新生機構が重要な関与を果たすことが予想され、その制御は飛躍的な移植成績の向上をもたらす可能性があるとの着想を得た。一方、血管新生に関わる基礎研究は世界的にもすすみ、血管新生関連分子の機能解明など新たな展開がみられている。これらの新たな知見を踏まえて、臓器受容や組織再生に関わる血管新生機構を、より体系的に解明することが新たな免疫機構の解明につながるのではないかと、またそれらの結果に基づいて、特異抗体あるいは各種血管新生阻害物質あるいは血管新生促進物質を用いて、臨床応用可能な、より安定した免疫制御に基づく治療戦略を開発することが可能となるのではないかとこの着想に至った。

## 2. 研究の目的

臓器移植および細胞移植における虚血再灌流障害・急性および慢性拒絶反応の過程において、**VEGF** やその受容体だけでなく、新規血管新生関連分子の各々の動態を明らかとし、血管新生機構のダイナミクスを包括的に明らかとする。これにより、いずれの分子が、生体にとって、正常かつ安定した修復や生着に如何に関与するかを解明することを目標とする。得られた結果に基づいて、それらの制御による新たな免疫制御法を開発し、その有用性を **in vivo** および **in vitro** の種々の方法により検証する。それらの新しい治療法の有用性、安全性について評価し、臨床導入に向けて、従来型とは異なる新規治療法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 虚血再灌流障害における TWEAK/Fn14 経路の関与に関する基礎的・臨床的検討

血管新生促進作用を有するとして知られている TWEAK/Fn14 経路の虚血再灌流障害 (Ischemia/Reperfusion Injury: IRI) における関与を検討するために、**in vitro** およびマウス腎虚血再灌流障害モデルによる **in vivo** での検討。さらに臨床腎移植における生検検体を用いて、それらの発現についても検討した。IRI 下における TWEAK/Fn14 の発現の検討に続き、Fn14 特異的阻害モノクローナル抗体 (ITEM-2) を用いて、**in vitro** および **in vivo** における Fn14 阻害による障害抑制効果を検討した。同時にサイトカイン、ケモカイン等発現の検討から、機序の解析も行った。**in vivo** においては、マウスの生存率ならびに長期的な障害抑制効果についても検討し、臨床応用の有用性を検討した。

### (2) 炎症性腸疾患モデルにおける血管新生制御による障害抑制効果ならびに組織修復促進効果の検討

炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD) をモデルとして、抗炎症作用ならびに血管新生促進作用を有する Erythropoietin (EPO) に注目し、障害抑制効果等について検討した。EPO の **in vivo** での治療効果を検討するために、9-10 週令の雄性 BALB/c マウスに 3% DSS を 5 日間自由飲水させ、IBD モデルを作成した。治療群では、recombinant EPO 5000 単位/kg を 1 日 1 回連日皮下投与した。DSS 投与終了後さらに 1 週間 EPO を投与した後に犠牲死させ大腸を採取した。生存率、体重減少率、組織学的評価また腸管局所の免疫応答について定量 Real-time PCR 法を用いて、種々の免疫学的パラメータを対照群と比較検討した。さらに **in vitro** において、ヒト腸上皮細胞 (HT29, Caco2) に対する EPO の細胞増殖促進効果を検討した。さらに **in vivo** での組織再生促進作用について検討するために、DSS 投与後 4 日目から EPO を投与するモデルにおいて、体重増加ならびに障害腸管における PCNA 発現の検討を行った。

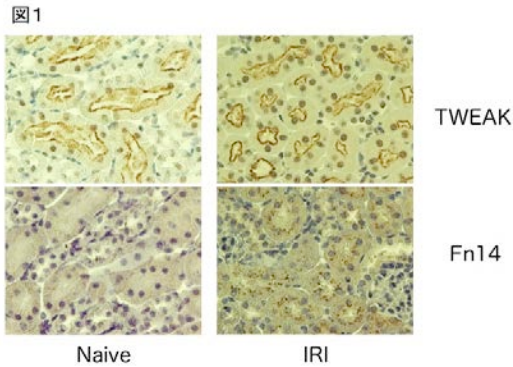
### (3) 血管新生と T 細胞宿主免疫応答との関連に関する検討

新規免疫制御法の開発に向けてのメカニズムを解明するために、腫瘍モデルを用いて、血管新生と T 細胞免疫との関連について検討した。マウスモデルあるいは膵癌等の臨床検体を用いて、血管新生因子の臨床的意義ならびに血管新生阻害と T 細胞免疫応答制御との相乗的効果について検討した。

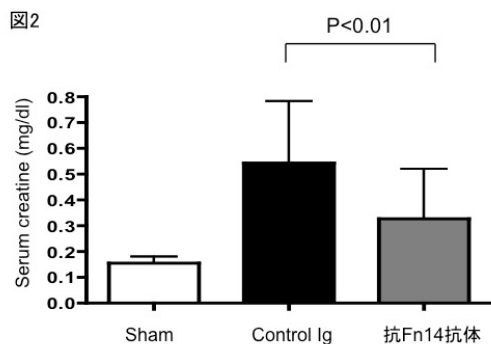
#### 4. 研究成果

##### (1) 成果1

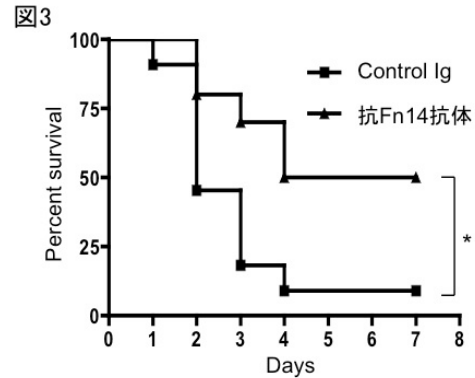
まず低酸素刺激およびIRI時のTWEAK, Fn14発現について検討した. ヒト遠位尿細管細胞RPTECを用いた *in vitro* モデルにおいて, 低酸素刺激によりFn14の発現は有意に増加したが, TWEAKの発現に変化はなかった. さらにC57BL/6マウスの右腎摘出後左腎動静脈30分間遮断によるIRI *in vivo* モデルにて検討した. その結果, 虚血腎における再灌流後のTWEAK mRNA発現の上昇はマウス正常腎に比べ1.7倍であったのに対し, Fn14の発現上昇は顕著であり, 16.4倍もの上昇を認めた. さらに免疫染色では, TWEAK発現はマウス正常腎, 虚血腎ともに認めたのに対し, Fn14発現は正常腎には認めず, 虚血腎の尿細管にのみ認めた(図1).



さらにヒト腎におけるFn14蛋白発現を検討したところ, 同様にヒト正常腎には認めなかったが, 腎移植後1時間 protocol 生検の尿細管に明らかなFn14の発現を認めた. 従って, IRIの病態におけるFn14の何らかの関与が示唆された. その機能について, Fn14特異的阻害モノクローナル抗体(ITEM-2)を用いて詳細に検討した. *In vitro* では, 低酸素刺激によりRPTEC内のTNF- $\alpha$ やMCP-1のmRNA発現は増加したが, ITEM-2を共培養することにより, これらの発現は有意に抑制された. また, *in vivo* マウスモデルでは再灌流24時間後に, ITEM-2投与群の血清Cre値は対照群に比し有意に低く, 組織学的にも障害抑制効果を確認した(図2).

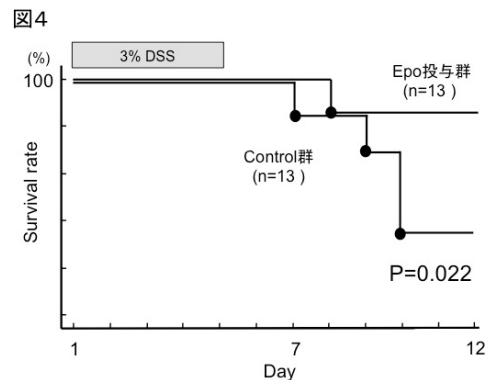


また, 免疫染色およびTUNEL法にて体系的に検討した結果, 抗体投与による虚血腎への好中球およびマクロファージの浸潤抑制および尿細管細胞のアポトーシスの有意な抑制がみられた. さらに腎局所における炎症性サイトカイン, ケモカイン, 接着因子の発現も抗体投与により有意に抑制され, これら局所の免疫活性低下と障害抑制効果との関連が示唆された. 次に抗体投与の長期的な影響を, 再灌流30日後の虚血腎を用いてMT染色にて検討した結果, 対照群では高度な線維化がみられたのに対し, 抗体投与群では有意に抑制されていた. さらに致死モデルでは, 抗体投与が有意なマウス生存率の改善をもたらした. Fn14阻害の長期的および前臨床的治療効果が確認された(図3).



##### (2) 成果2

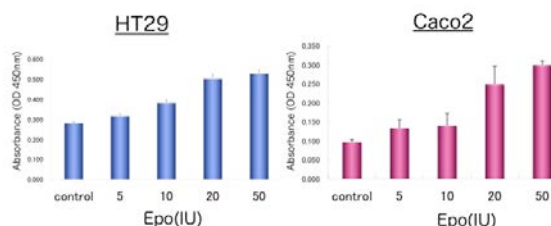
EPO投与は, マウスIBDモデルにおいて, 体重減少を有意に抑制し( $P < 0.01$ ), また生存率を有意に改善した( $P = 0.022$ )(図4).



またEPO投与により, T細胞の浸潤, サイトカイン(TNF- $\alpha$ 等), 接着因子(E-selectin)の障害腸管での発現の抑制を認め, これら局所での免疫活性の低下とEPOの障害抑制効果との関連が示唆された. さらにEPOは, 腸上皮細胞に対して

濃度依存性に有意に増殖を促進した(図5)。

図5



さら治療遅延実験では、一旦腸管炎症を惹起した上でEPO投与を行った。このモデルでは、より臨床に近い形でのIBDに対する治療の有用性を検討し得るものと思われる。本モデルにおいても、より早期の有意な体重回復が認められた。また細胞増殖の指標であるPCNA発現は有意に上昇した。従って、EPOが炎症性腸障害に対して、障害抑制効果と同時に組織障害促進作用を持つ可能性が示唆された。現在臨床において広く用いられているEPOが、新たなIBDの治療戦略となり得る可能性が示唆された。

### (3) 成果3

新たな血管新生関連因子としてPCA-1/ALKBH3の機能を明らかにした。特に膵癌における予後因子としての意義、ならびにヒト膵癌細胞株において、PCA-1阻害が有意な細胞増殖抑制、アポトーシス誘導とともにVEGF発現の抑制とも有意に関連していることがわかった。これらのことから治療標的分子となり得る可能性が示唆された。臓器移植における免疫制御に関わるものと予測された。さらにPD-1とVEGFR2の阻害が相乗的な免疫制御を有することが腫瘍モデルで初めて明らかとなった。

上記の種々の疾患モデルおよび病態における広汎な研究成果から、血管新生因子が様々な分子と相関しており、これらを統合的に制御することにより、より強力な免疫制御および再生促進効果を発揮できる可能性が示唆された。多くの難治性疾患・疾病に対する新たな治療法の開発につながるものと期待できると思われた。

### 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4件)

1. Simultaneous blockade of programmed death 1 and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) induces synergistic anti-tumour effect in vivo. Yasuda S, Sho M, Yamato I, Yoshiji H, Wakatsuki K, Nishiwada

S, Yagita H, Nakajima Y. Clin Exp Immunol. 2013 Jun;172(3):500-6. doi: 10.1111/cei.12069.査読有

2. Yamato I, Sho M, Shimada K, Hotta K, Ueda Y, Yasuda S, Shigi N, Konishi N, Tsujikawa K, Nakajima Y. PCA-1/ALKBH3 contributes to pancreatic cancer by supporting apoptotic resistance and angiogenesis. Cancer Res. 2012;72 (18):4829-39. doi: 10.1158/0008-5472.査読有
3. Hotta K, Sho M, Yamato I, Shimada K, Harada H, Akahori T, Nakamura S, Konishi N, Yagita H, Nonomura K, Nakajima Y. Direct targeting of fibroblast growth factor-inducible 14 protein protects against renal ischemia reperfusion injury. Kidney Int. 2011;79(2):179-88. doi: 10.1038/ki.2010.379. 査読有
4. Therapeutic potential of the TWEAK/Fn14 pathway in intractable gastrointestinal cancer. Yoriki R, Akashi S, Sho M, Nomi T, Yamato I, Hotta K, Takayama T, Matsumoto S, Wakatsuki K, Migita K, Yagita H, Nakajima Y. Exp Ther Med. 2011 Jan;2(1):103-108. <http://www.spandidos-publications.com/etm/> 査読有

[学会発表] (計6件)

1. 庄 雅之. 膵癌における T 細胞 Negative Pathway の意義と新規免疫治療の可能性. 第113回日本外科学会定期学術集会 福岡 2013.4.11-13.
2. 山戸一郎. 膵癌における PCA-1/ALKBH3 の役割と新規治療の可能性 第113回日本外科学会定期学術集会 福岡 2013.4.11-13
3. 安田里司. Simultaneous blockade of PD-1 and VEGFR2 induces synergistic antitumor effect. 第71回日本癌学会学術総会 札幌 2012.9.19-21.
4. 堀田記世彦. Direct targeting of fibroblast growth factor-inducible 14 protein protects against renal ischemia reperfusion injury. 第7回日本移植学会賞 受賞講演. 第48回日本移植学会総会 名古屋 2012.9.20-22
5. 堀田記世彦. 腎虚血再灌流障害における TWEAK受容体Fn14の関与と新規治療戦略の可能性. 日本泌尿器科学会総会賞受賞. 第98回日本泌尿器科学会総会 盛岡 2010.4.27-30
6. 堀田記世彦. 腎虚血再灌流障害における TWEAK/Fn14経路の役割. 第45回日本移植学会総会 東京 2009.9.16-18

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島祥介 (NAKAJIMA YOSHIYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号:00142381

(2) 研究分担者

庄 雅之 (SHO MASAYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号:50364063