HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies of efficacies of 3-[(dodecylthiocarbonyl) methyl] glutarimide on graft arterial disease in mice. [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	財津, 雅昭
Description	配架番号：2179
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11932号
Issue Date	2015-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59667
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Masaaki_Zaitsu_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　財　津　雅　昭

学 位 論 文 題 名

Studies of efficacies of 3-[(dodecylthiocarbonyl) methyl] glutarimide on graft arterial disease in mice.
（マウス移植後動脈硬化症モデルにおける 3-[(dodecylthiocarbonyl) methyl] glutarimide の効果およびその機序の検討）

【背景と目的】過去２０年の免疫抑制剤の進歩により移植後急性拒絶反応を抑制することで臓器移植後の短期グラフト生着率の成績は飛躍的に向上したが、長期グラフト生着率の改善には至っていない。長期グラフト生着率を妨げる主要な原因として移植後動脈硬化症が挙げられるが、その治療法がないのが現状である。移植後動脈硬化症は、動脈グラフトの内膜の肥厚により血管閉塞が起こり、血流が保てず臓器の線維化に繋がる特徴的な所見がみられる。この動脈グラフト内膜肥厚を惹起・血管閉塞を促進させる中心的な役割を担っているのは、主に T 細胞系の免疫反応である。特に CD4+T 細胞を欠損もしくは減少させることで移植後動脈硬化を抑制させることはマウスの研究で示されている。移植後動脈硬化症の進行は以下のように分けることができる。１）グラフト組織損傷期；抗原の有無に関係なくグラフト組織障害が引き起こされる。２）炎症期；マクロファージや T 細胞がグラフト動脈の周囲に遊走、活性化され炎症性サイトカイン（IL-2、IFNγ, TNFαなど）を産生し、最終的に血管平滑筋細胞の増殖および動脈グラフト内膜肥厚を引き起こす。３）動脈グラフト内膜肥厚期；種々の増殖因子（PDGF,bFGF,VEGF など）産生により、血管平滑筋の遊走および増殖により血管閉塞に至る。

移植後動脈硬化症の治療法の確立のため､主に T 細胞標的とした免疫抑制剤だけでなく、カルシウム阻害剤、ACE 阻害剤から HMG-CoA 還元剤まで臨床に使用されている既存の薬剤を用いたマウスの研究は行われ移植後動脈硬化の進行を阻害する効果は確認されている。しかし、これら薬剤の臨床での効果は不十分であるかもしくは臨床試験段階である。それゆえ、移植後動脈硬化症の新しい治療戦略の確立は重要である。我々の以前の研究で、抗生物質９-メチルストレプトチミドン由来の新規化合物である 3-[(dodecylthiocarbonyl) methyl]glutarimide (DTCM-G)が 抗炎症効果および免疫抑制効果を示すこと発表した。また、DTCM-G は T 細胞活性化を抑制することで急性拒絶反応を抑制し、特にカルシニューリン阻害剤と NFκB 阻害剤を併用することで著名なグラフト生着率の改善を認めた。本研究は移植後動脈硬化症に対する DTCM-G の効果および抑制効果の機序について検討した。

【材料と方法】(1) *In vitro*: C57BL/6(B6)マウスの脾細胞と 30Gy で照射した B6.CH-2^{bm12}(Bm12)マウスの脾細胞でリンパ球混合試験を行い DTCM-G 添加による増殖抑制試験を行った。また、Bm12 マウスの胸部大動脈から血管平滑筋細胞を培養し、DTCM-G 添加による増殖抑制試験を行った。血管平滑筋細胞の周期の評価は BrdU flow kit で染色後解析をフローサイトメトリーで行った。イムノブロットを用いて血管平滑筋細胞内の蛋白評価を行い DTCM-G の作用機序の検討を行った。(2) *In vivo*:Bm12 マウス心を B6 マウスに異所性心移植を行い DTCM-G (40 mg/kg/day)を腹腔内投与した。移植後 14 日目と 28 日目にアロ免疫応答の評価のため IFNγ ELIspot およびアロ抗原再刺激 $CD4^+CD154^+$細胞をフローサイトメトリーで解析した。移植後 28 日目に組織学的評価及び免疫組織科学評価を行い DTCM-G

の移植後動脈硬化症に対する効果の検討を行った。
【結果】DTCM-G はリンパ球増殖反応を濃度依存性に免疫抑制効果が認められた。*In vivo* では DTCM-G は移植後 28 日目のグラフト動脈内腔閉塞を有意に抑制した(Control vs. DTCM-G: 37.9±5.9 vs. 14.8±5.4 %, n=8, $P<0.05$)。DTCM-G 治療群においては有意にグラフトへの細胞浸潤が抑制されていた(CD4: 35.6±1.5 vs. 14.7±2.0/HPF, CD8: 25.7±2.6 vs. 12.7±0.9/HPF, F4/80: 31.7±4.3 vs. 11.0±2.9/HPF, n=3, $P<0.05$)。アロ免疫応答を評価するために移植後 14 日目にアロ抗原にて再刺激を加え IFNγ産生細胞を ELIspot で検出したところ、DTCM-G 治療群は INFγの産生を有意に抑制した (Control vs. DTCM-G: 20.9±2.2 vs. 5.0±1.7 spots/well, n=3, $P<0.05$)。同様に、移植後 14 日目のドナー細胞で再刺激した $CD4^+$細胞で CD154 の発現を確認した。IFNγ産生と同様に DTCM-G 治療群は有意にドナー特異的 CD154 発現を抑制した (Control vs. DTCM-G: 3.1±0.7 vs. 2.0±0.1%, n=3, $P<0.05$)。しかし、アロ免疫応答の抑制が移植後 28 日目に確認されなかったので、移植後動脈閉塞の進展に直接関わる血管平滑筋の増殖について検討した。DTCM-G は bFGF 刺激もしくは IFNγで活性化させた後アロ抗原暴露細胞で刺激した血管平滑筋細胞増殖を濃度依存性に抑制した。DTCM-G の血管平滑筋細胞に対する抑制効果の機序解明のため細胞周期の評価を行ったところ G1-S 期の移行を抑制していることが確認された。G1-S 期の移行に関わる蛋白の発現を評価したところ、DTCM-G は cyclin D1 の発現を有意に抑制していることがわかった。しかし、cyclin E, CDK2, CDK4, および CDK inhibitor である $p21^{Cip1}$ と $p27^{Kip1}$ の発現に変化はなかった。
【考察】本研究からマウスの移植後動脈硬化モデルにおいて DTCM-G が有用であることを示された。本実験で用いた Bm12 マウスから B6 マウスへの MHCⅡ class ミスマッチモデルは T 細胞由来のアロ免疫応答により慢性拒絶反応の特徴的な所見であるグラフト動脈内腔狭窄が惹起される。DTCM-G はアロ Bm12 抗原に対する B6 細胞の増殖を *in vitro* の実験では濃度依存性に抑制し、*in vivo* においてはアロ Bm12 抗原で再刺激による B6 T 細胞の IFNγ産生を抑制した。これらの結果は DTCM-G がグラフト動脈内腔狭窄を進行させる主な原因である CD4+細胞と CD8+細胞のグラフト浸潤を抑制していることからも確証が得られた。アロ免疫応答が惹起された後、グラフト動脈内では血管内皮細胞の損傷がおこり、引き続き血管内腔の再構築が行われる。この血管再構築の期間は、IFNγがトリガーもしくはブースターになる重要性が示されている。DTCM-G は b-FGF 刺激だけでなく IFNγとアロ抗原暴露細胞の刺激により増殖した血管平滑筋細胞の増殖抑制効果が得られたことは注目に価する。これらの結果より、*in vivo* で得られた結果は DTCM-G がアロ免疫応答とグラフト血管の再構築を抑制することで移植後動脈硬化症の進行を減弱したと考えた。
【結論】DTCM-G はアロ免疫抑制効果に加えて、血管平滑筋細胞の増殖を抑制することでグラウフト動脈内腔狭窄を減弱させたと考えられる。DTCM-G は移植後動脈硬化症の予防および治療に有用であることが示された。