



Title	Studies of efficacies of 3-[(dodecylthiocarbonyl) methyl] glutarimide on graft arterial disease in mice.
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11932
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59668
Type	doctoral thesis
File Information	Masaaki_Zaitzu.pdf



学 位 論 文

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)

2015年6月

北 海 道 大 学

財 津 雅 昭

目次

発表論文目録および学会発表目録	・・・・・・・・・・・・・・・・	1 頁
緒言	・・・・・・・・・・・・・・・・	3 頁
略語表	・・・・・・・・・・・・・・・・	5 頁
実験方法	・・・・・・・・・・・・・・・・	6 頁
実験結果	・・・・・・・・・・・・・・・・	10 頁
考察	・・・・・・・・・・・・・・・・	25 頁
総括および結論	・・・・・・・・・・・・・・・・	27 頁
謝辞	・・・・・・・・・・・・・・・・	29 頁
引用文献	・・・・・・・・・・・・・・・・	30 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Masaaki Zaitzu, Kenichiro Yamashita, Susumu Shibasaki, Yusuke Tsunetoshi, Moto Fukai, Masaomi Ogura, Tadashi Yoshida, Rumi Igarashi, Nozomi Kobayashi, Kazuo Umezawa, Satoru Todo.
3-[(Dodecylthiocarbonyl) methyl]- Glutarimide Attenuates Graft Arterial Disease by Suppressing Alloimmune Responses and Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation.
Transplantation. 2015 May;99(5):948-56

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Masaaki Zaitzu, Kenichiro Yamashita, Susumu Shibasaki, Ryoichi Goto, Tomohiro Shibata, Kenji Wakayama, Gentaro Hirokata, Shoko Kimura, Yusuke Tsunetoshi, Rumi Igarashi, Michitaka Ozaki, Kazuo Umezawa, Satoru Todo
DTCM-glutarimide, a new activator protein-1 (AP-1) inhibitor ameliorates chronic allograft vasculopathy in mice
2010 American Transplant Congress, May 1-5, 2010 • San Diego
2. Masaaki Zaitzu, Kenichiro Yamashita, Susumu Shibasaki, Ryoichi Goto, Kenji Wakayama, Gentaro Hirokata, Yusuke Tsunetoshi, Rumi Igarashi, Michitaka Ozaki, Kazuo Umezawa, Satoru Todo
DTCM-glutarimide, a new activator protein-1 (AP-1) inhibitor ameliorates chronic allograft vasculopathy in mice
XXIII International Congress of The Transplantation Society, Aug 15-19, 2010 • Vancouver
3. Masaaki Zaitzu, Kenichiro Yamashita, Susumu Shibasaki, Yusuke Tsunetoshi, Kenji Wakayama, Gentaro Hirokata, Rumi Igarashi, Nozomi Kobayashi, Michitaka Ozaki, Kazuo Umezawa, Satoru Todo
DTCM-glutarimide suppresses IFN- γ and ameliorates chronic allograft rejection
2011 American Transplant Congress, Apr 30- May 4, 2011 • Philadelphia
4. 財津雅昭、山下健一郎、柴崎晋、常俊雄介、若山顕治、廣方玄太郎、五十嵐留美、小林希、尾崎倫孝、梅澤一夫、藤堂省
新規化合物 DTCM-G を用いたマウス慢性拒絶反応抑制効果の検討
第 46 回日本移植学会総会、2010 年 10 月 20-22 日、京都
5. 財津雅昭、山下健一郎、柴崎晋、常俊雄介、若山顕治、廣方玄太郎、五十嵐留美、

小林希、尾崎倫孝、梅澤一夫、藤堂省

新規化合物 DTCM-G を用いたマウス慢性拒絶反応抑制効果の検討

第 111 回日本外科学会定期学術集会、2011 年 5 月 26-28 日、東京

6. Masaaki Zaitzu, Kenichiro Yamashita, Susumu Shibasaki, Yusuke Tsunetoshi, Masaomi Ogura, Tadashi Yoshida, Kenji Wakayama, Gentaro Hirokata, Rumi Igarashi, Nozomi Kobayashi, Michitaka Ozaki, Kazuo Umezawa, Satoru Todo
DTCM-glutarimide suppresses IFN- γ and ameliorates cardiac allograft arteriosclerosis in mice.

15th Congress of the European Society for Organ Transplantation, Sep 4-7,
2011 • Glasgow

緒言

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¹。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。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 (interleukin (IL)-2, interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α 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²⁻⁴。(3) 動脈グラフト内膜肥厚期；種々の増殖因子 (platelet derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (b-FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor (TGF)- β 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⁵⁻⁷。

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⁸。T 細胞が活性化するには二つのシグナルが必要とされている⁹。第 1 シグナルは T 細胞受容体を介した抗原そのものの刺激により抗原特異的な反応を引き起こす。第 2 シグナルは副刺激と呼ばれ、抗原提示細胞の表面のリガンドと相互作用により刺激が加えられることにより T 細胞が完全に活性化される。代表的な副刺激経路として CD28-CD80/CD86 と CD40-CD154 が挙げられる。融合蛋白である Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4) Ig は抗原提示細胞に発現する CD80/CD86 に結合し CD28 シグナルの刺激を阻害することで T 細胞の活性化を抑制し、移植後動脈硬化症の進行減弱させることが動物モデルでは報告されている^{10,11}。また、T 細胞に発現する CD154 に結合することで抗原提示細胞からの CD40 シグナルを阻害する抗 CD154 抗体と CTLA-4 Ig を併用することで長期グラフト生着が得られている^{12,13}。さらに、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の進行を予防することができる¹⁴⁻¹⁷。一方、CD4+T 細胞を欠損させても CD40 シグナルを刺激させると移植後動脈硬化症は増悪し、CD40 シグナルを阻害すると移植後動脈硬化症の改善につながることから¹⁸、CD40-CD154 のシグナルが移植後動脈硬化症の治療標的の一つとして考えられている。

炎症性サイトカインである IFN- γ も移植後動脈硬化症の重要な促進因子と考えられている¹⁹⁻³¹。抗 IFN- γ 抗体の投与や IFN- γ ノックアウトにより移植後動脈硬化症の進展は抑制される^{19,20,22,24}。更に、T 細胞がない状態でも IFN- γ の刺激により移植後動脈硬

化症は惹起されることがわかっている^{22, 23}。つまり、IFN- γ の産生を抑制することが移植後動脈硬化症の治療につながると考えられている。

免疫抑制剤を使用しながらも移植後動脈硬化症の進展が抑制できないため、動脈内膜肥厚期で中心的な役割を果たす血管平滑筋細胞に対する評価も行われている。代表的なものとして mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害剤が挙げられる^{28, 32-42}。mTOR 阻害剤は免疫抑制効果に加えて、血管平滑筋細胞の増殖および遊走を阻害することで動脈内膜肥厚を抑制する効果があることが動物モデルの実験から考えられ、現在臨床試験で評価中である。

移植後動脈硬化症の治療法の確立のため、T 細胞の副刺激遮断薬だけでなく⁴³⁻⁵⁰、カルシウム阻害剤、angiotensin converting enzyme (ACE) 阻害剤から hydroxymethylglutaryl- CoA (HMG-CoA) 還元剤⁵¹⁻⁵³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。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。

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)⁵⁴は RAW264.7 マクロファージ細胞に対して炎症性転写因子 activator protein (AP)-1 の核内移行を抑制することで抗炎症効果を発揮することが示された⁵⁵。また、DTCM-G は mTOR シグナルの下流にある p70s6k のリン酸化を抑制し T 細胞の活性化を阻害することで免疫抑制効果を示し、特に calcineurin inhibitor (CNI) と nuclear factor-kappa B (NF- κ B) を併用することで著明なグラフト生着率の改善を認めた⁵⁶。本研究はさらに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。

本研究により、DTCM-G はアロ免疫応答を抑制する免疫抑制効果および血管平滑筋細胞内の cyclin D1 の発現を減少させ血管平滑筋細胞増殖抑制する血管再構築抑制効果により移植後動脈硬化症を減弱させたことが確認された。以上により、本剤は移植後動脈硬化症の予防および治療に有用である可能性が示された。

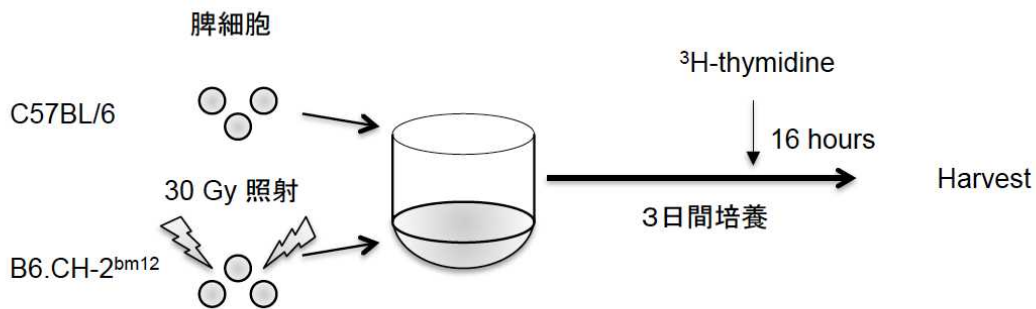
略語表

本文中および図中に使用した略語は以下の通りである

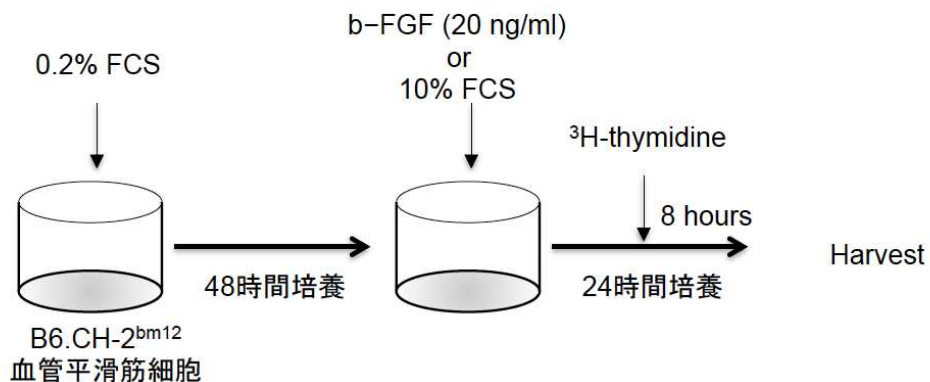
Akt	protein kinase B (also referred as PKB)
b-FGF	basic fibroblast growth factor
BrdU	bromodeoxyuridine
CDK	cyclin dependent kinase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DTCM-G	3-[(dodecylthiocarbonyl) methyl] glutarimide
ERK	extracellular signal-regulated kinase
EVG	elastic Van Gieson
FCS	fetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
FoxP3	forkhead box P3
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GSK-3 β	glycogen synthase kinase 3 beta
HE	hematoxylin and eosin
HPF	high power field
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IFN- γ	interferon gamma
JNK	c-jun N-terminal kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MHC	major histocompatibility complex
MLR	mixed lymphocyte reaction
mTOR	mammalian target of rapamycin
PE	phycoerythrin
PerCP	peridinin chlorophyll protein complex
PKD	3-phosphoinositide-dependent kinase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
p70s6k	p70s6 kinase
Rb	retinoblastoma
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
4EBP	eukaryotic translation initiation factor 4E - binding protein
7-AAD	7-amino-actinomycin D

実験方法

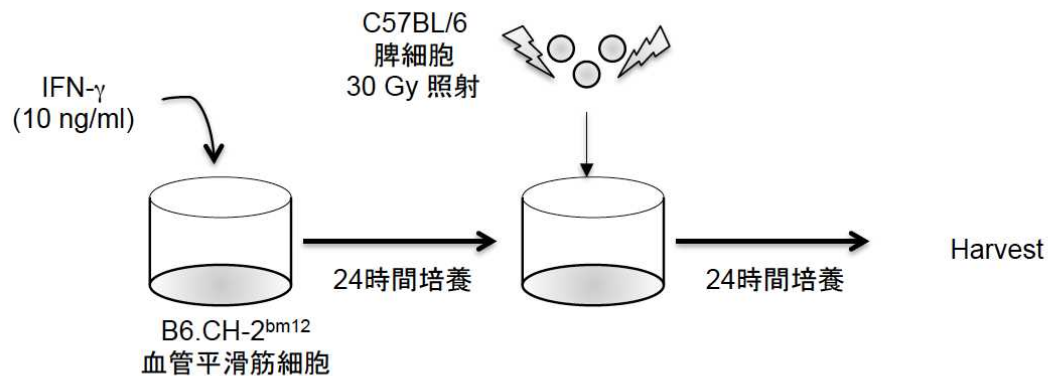
- (1) 動物：8-10 週齢の雄 C57BL/6 マウス（日本エスエルシー株式会社）および B6. CH-2^{bm12} マウス（日本チャールス・リバー株式会社）を実験に使用した。動物の飼育、管理および実験においては北海道大学動物実験に関する規定に従った。
- (2) 試薬：DTCM-G は、in vitro の実験用には 0.1% dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich) で、in vivo の実験用には 4% dimethylsulfoxide に溶解した後 -80°C 凍結保存した。マウスへの投薬には 0.5% carboxymethyl cellulose（信越化学工業株式会社）で溶解した後、腹腔内投与した。
- (3) 細胞培養：マウスの白血球は、マウスの脾臓から分離した後、2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin、10% fetal calf serum (FCS) および 50 µM 2-mercaptoethanol を加えた Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 培養液（Sigma-Aldrich Inc）で培養した。マウスの血管平滑筋細胞は、マウスの胸部大動脈より explant 法を用いて単離を行った。マウスの胸部大動脈を切開し、内膜をメスで除去した後、2x2 mm 切片にした。血管中膜面がプレートの底に接するようにして、20% FCS を加えた Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) 培養液（Sigma-Aldrich Inc）でプレートの底が乾燥しない程度に 48 時間毎に培地交換しながら 1-2 週間 37°C および加湿空气中 CO₂ 濃度 5% の条件下で培養した。血管平滑筋細胞が遊走しプレートに接着し始めたところで、大動脈切片を取り除き、細胞が confluent になるまで更に培養した。細胞継代後は 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin および 10% FCS を加えた DMEM 培養液で培養した。血管平滑筋細胞は alpha-smooth muscle actin (α-SMA) 免疫染色（Dako）で 99% の同質性を満たした 5-10 継代の細胞を実験に用いた。
- (4) リンパ球混合試験：Responder（レシピエント）の C57BL/6 マウスの脾細胞（5x10⁵ cells/well）と 30 Gy で照射した Stimulator（ドナー）の B6. CH-2^{bm12} マウスの脾細胞（5x10⁵ cells/well）を 96 well U 底プレートで 37°C および加湿空气中 CO₂ 濃度 5% の条件下で 72 時間培養した。培養終了 16 時間前に ³H-thymidine (MP Biomedical Inc) を 1 µCi/ml 加え、その取り込み量を β-counter (PerkinElmer) を用いて計測した。実験はそれぞれ 3 回行い、データは mean ± SE で表記した。



- (5) 血管平滑筋増殖試験：血管平滑筋細胞 ($5 \times 10^3/\text{well}$) は 96 well 平底プレートに接着を確認した後、0.2% FCS の DMEM 培養液で 37°C および加湿空気中 CO_2 濃度 5% の条件下で 48 時間培養し血清飢餓状態にすることで細胞周期を同調させた。その後、増殖因子である basic fibro growth factor (b-FGF) (R&D systems Inc) (20 ng/ml) もしくは 10% FCS で刺激し 24 時間培養した。培養終了 8 時間前に ³H-thymidine (MP Biomedical Inc) を $1 \mu\text{Ci/ml}$ 加え後、その取り込み量を β -counter (PerkinElmer) を用いて計測した。



本研究では血管平滑筋増殖試験の刺激に b-FGF の他、 $\text{IFN-}\gamma$ (BD Pharmingen) およびアロ抗原に暴露した脾細胞を用いて評価した。血管平滑筋細胞を 10 ng/ml の $\text{IFN-}\gamma$ で 24 時間刺激した後、Phosphate buffer saline で 2 度洗浄し、その後 30 Gy で照射した異所性心移植後 14 日目のレシピエントの脾細胞 (5×10^6) と 24 時間共培養を行った。共培養した血管平滑筋細胞の増殖は Cell counting kit (Dojindo) を用いて測定した。



細胞毒性試験も Cell counting kit-f (CCK-F)を用いて評価した。細胞生存率 (cell viability)は以下のように計算した。

$$\text{細胞生存率} = \left[\frac{(As - Ab)}{(Ac - Ab)} \right] \times 100$$

As: サンプルの蛍光強度 (血管平滑筋細胞+DTCM-G+CCK-f)

Ac: 陰性対象の蛍光強度 (血管平滑筋細胞+CCF-f, DTCM-G なし)

Ab: ブランクの蛍光強度 (培地+CCK-f, 細胞なし)

実験はそれぞれ3回行い、データは mean±SE で表記した。

- (6) 異所性心移植：ドナーの B6. CH-2^{bm12} マウスの心臓をレシピエントの C57BL/6 マウスの腹部に異所性心移植を行った。グラフト大動脈とレシピエントの腹部大動脈をグラフト肺動脈とレシピエントの下大静脈をそれぞれ 10-0 ナイロンで端側吻合を行った。グラフト心臓の拍動は腹壁より移植後毎日確認した。レシピエントの C57BL/6 マウスは移植日より毎日 DTCM-G (20 or 40 mg/kg/day) もしくは 0.5% carboxymethyl cellulose 溶媒を腹腔内に投薬した。
- (7) 組織学および免疫組織化学的評価：心臓移植後 28 日にレシピエントから心臓グラフトを摘出した。10%ホルマリンで組織固定し、パラフィン切片として Hematoxylin and Eosin (H&E) 染色および Elastic Van Gieson (EVG) 染色をした。動脈グラフト内腔の閉塞の評価 Image J を用いて計算した。グラフト血管は直径 80 μm 以上のものを対象とし、それぞれ 200 μm 以上離れたレベルで、4 切片から得られる平均の動脈内腔狭窄率：{ (内弾性版内の動脈腔面積 - 動脈内腔開存面積) / 内弾性版内の動脈腔面積 } を計算した。また、免疫組織化学のため心臓グラフトを optimal cutting temperature compound (Sakura Finetek Inc) で包埋し、凍結切片として Anti-mouse CD4 (Santa Cruz Biotechnology Inc), CD8 (Chemicon International Inc), F4/80 (Serotec) モノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。グラフト浸潤細胞数は強拡大 (x400) で 3 つの離れた切片からそれぞれランダムに 8 視野選びカウントした。データは mean±SE で表記した。

(8) フローサイトメトリー：BD Pharminge の抗体 anti-CD4-PerCP, anti-CD154-PE 抗体, anti-CD25-FITC 抗体, anti- forkhead box P3 (FoxP3)-PE 抗体, anti-BrdU-FITC 抗体および 7-amino-actinomycin D (7-AAD) を用いて細胞を染色し、FACS Calibur (BD Bioscience) を用いて解析した。ドナー抗原特異的な T 細胞を検出するために、レシピエントの脾細胞は 30 Gy で照射されたドナーの脾細胞および 1 μ g/ml の CD28 モノクローナル抗体 (BD Pharmingen) を加えて再刺激し 6 時間培養した。細胞回収 4 時間前に 5 μ g/ml の Breferdin A (Sigma-Aldrich Inc) を添加した。インキュベートした細胞を回収後、細胞表面を anti-CD4 で染色し、細胞内染色で anti-CD154 を染色した。データは mean $\pm$ SD で表記した。

制御性 T 細胞の染色はレシピエントの脾細胞をそのまま anti-CD4 および anti-CD25 抗体で細胞表面を染色し、fixation permeabilization buffer で細胞を固定後、anti-FoxP3 抗体にて細胞内染色を行った。データは mean $\pm$ SD で表記した。

血管平滑筋細胞の細胞周期の評価は FACSCanto™ II (BD Bioscience) を用いて解析した。血清飢餓状態の平滑筋細胞に 1mM の bromodeoxyuridine (BrdU) と growth factor である b-FGF (20 ng/ml) を添加し培養した。回収した血管平滑筋細胞は BrdU Flow kit (BD Pharmingen) で染色後解析を行った。データは mean $\pm$ SE で表記した。

(9) Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) assay：レシピエントの C57BL/6 マウスの脾細胞 (5×10^5 cells/well) と 30 Gy で照射したドナーの B6. CH-2^{bm12} マウスの脾細胞 (5×10^5 cells/well) を IFN- γ capture 抗体がコートされた ELISPOT プレートで 48 時間共培養した。培養終了後は洗浄した後、検出用のビオチン標識の IFN- γ 抗体を添加しインキュベートした。最後に酵素標識ストレプトアビジンを添加後、基質を加え酵素反応で発色させた。ELISPOT リーダーを用いてスポットをカウントした。データは mean $\pm$ SE で表記した。

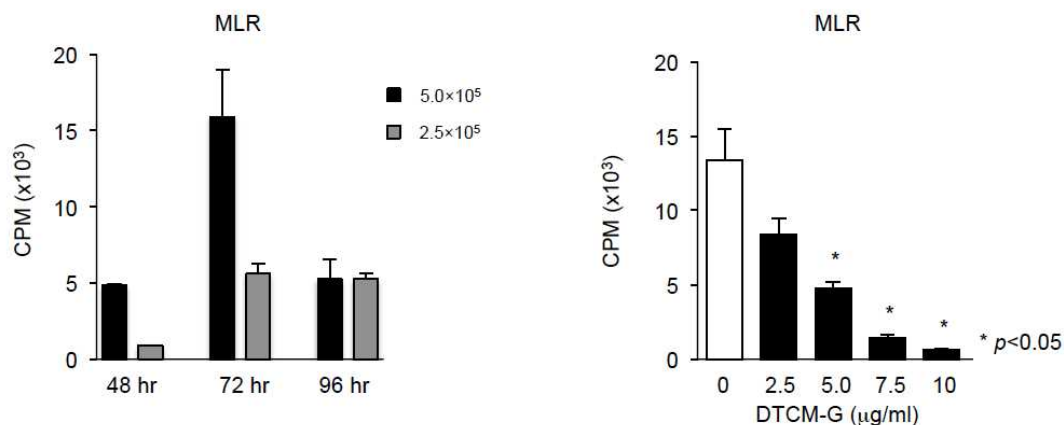
(10) Immunoblot assay：培養終了した血管平滑筋細胞に、氷冷した radioimmunoprecipitation (RIPA) バッファーにプロテアーゼ阻害剤とフォスファターゼ阻害剤と共に加えて細胞を溶解した。10 μ g の全細胞溶解液を 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel (Bio-Rad laboratories Inc) に流し込み電気泳動し、polyvinylidene difluoride membranes (Life Technologies Corporation) に蛋白質をトランスファーした。5 % bovine serum albumin で非特異的な結合をブロックした後、メンブレンに一次抗体を加えオーバーナイトでインキュベートした。HRP 標識の二次抗体を加えインキュベートした。最後に化学発光ルミノール試薬を用いて蛋白を可視化した。データは mean $\pm$ SD で表記した。

実験結果

(1) リンパ球混合試験 mixed lymphocyte reaction (MLR)

まず初めに、DTCM-G の免疫抑制効果について *in vitro* にて評価した。Responder である C57BL/6 マウスの脾細胞と 30 Gy で照射した Stimulator である B6.CH-2^{bml2} マウスの脾細胞の共培養の条件検討を行った。Stimulator と Responder をそれぞれ 5.0×10^5 cells/well もしくは 2.5×10^5 cells/well で 48, 72, 96 時間培養を行い細胞増殖を評価したところ、 5.0×10^5 cells/well で 72 時間培養した細胞が最もよく増殖していた。同条件下にて DTCM-G を加えて増殖抑制試験を行ったところ、DTCM-G は濃度依存性に細胞増殖を抑制した (図 1)。以上により *in vitro* の実験において、DTCM-G の免疫抑制効果が示唆された。

図 1 : DTCM-G はリンパ球細胞増殖を抑制



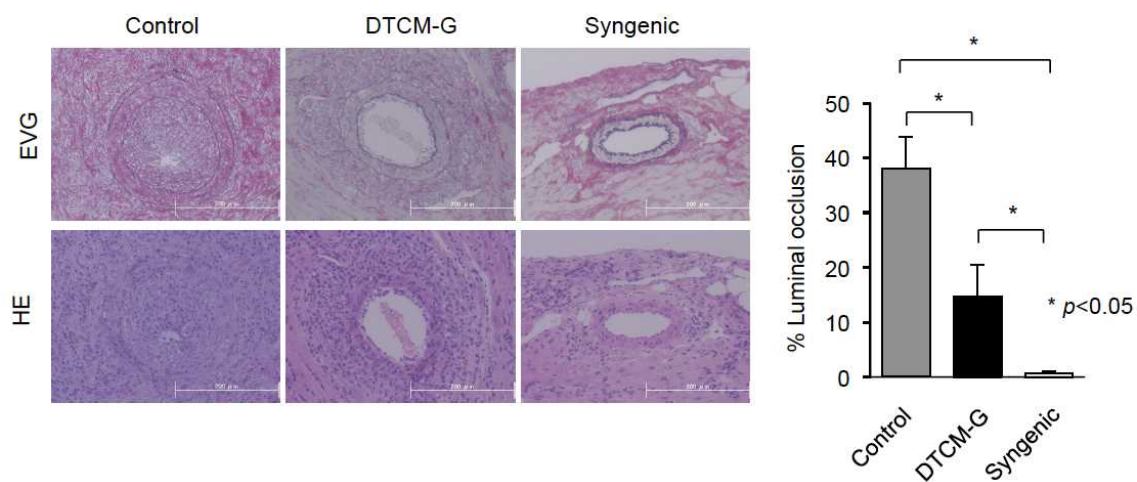
(左) MLR の条件検討 ($n=1$)。 5.0×10^5 cells/well、72 時間培養で効果的な増殖を確認した。データは $\text{mean} \pm \text{SD}$ で表記した。(右) 細胞増殖抑制試験 ($n=3$)。 $5 \mu\text{g/ml}$ から DTCM-G は有意な増殖抑制効果を得た。データは $\text{mean} \pm \text{SE}$ で表記した。(Transplantation. 2015 May;99(5):948-56)

(2) 移植後動脈硬化症の抑制効果の検討

In vitro のリンパ球混合試験において、DTCM-G がリンパ球の細胞増殖の抑制が確認できたため、次に *In vivo* における DTCM-G の効果について検討した。ドナーの B6.CH-2^{bml2} マウスの心臓グラフトをレシピエントの C57BL/6 マウスの腹部に異所性心移植を行った。レシピエントの C57BL/6 マウスは移植後より毎日 DTCM-G もしくは 0.5% carboxymethyl cellulose 溶媒を腹腔内注入した。移植後 28 日にグラフトを採取し、移植後動脈硬化症の程度を組

組織学的に評価した。DTCM-G は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 %, $n=8$, $P<0.05$) (図2)。

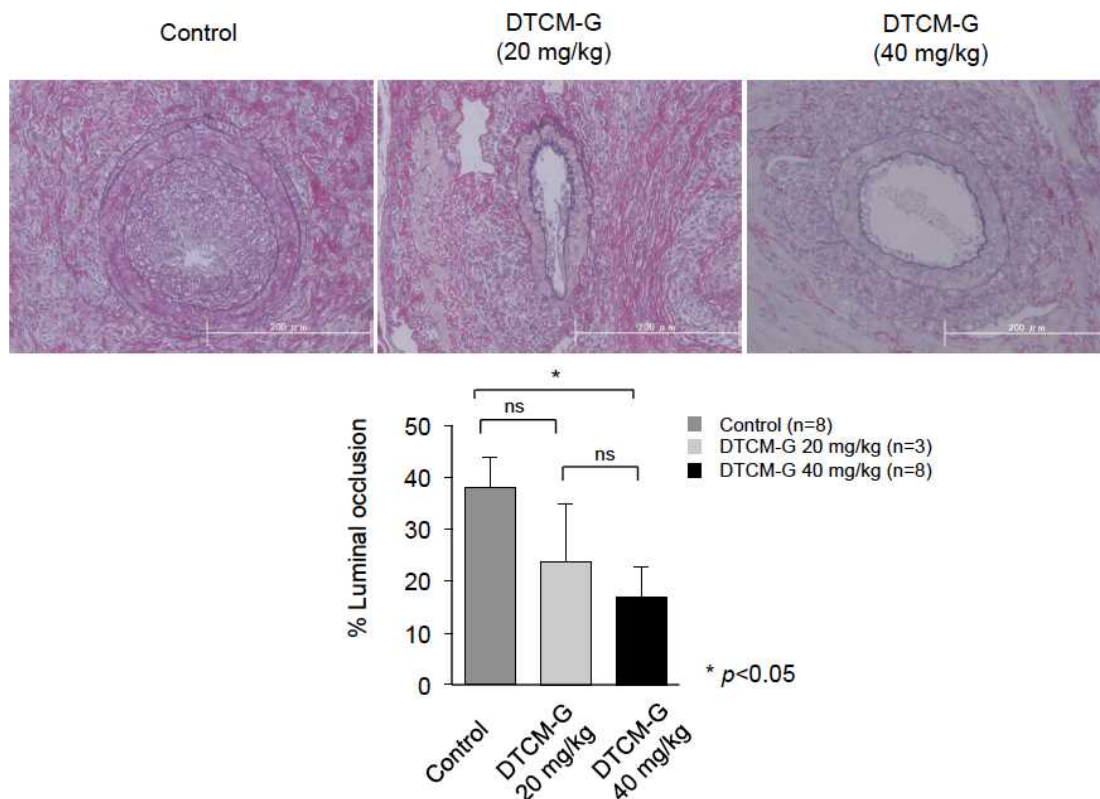
図2 : DTCM-G は移植後動脈硬化症を抑制



(左) 代表的な EVG および HE 染色。(右) グラフト動脈内腔狭窄率($n=8$)。データは $\text{mean} \pm \text{SE}$ で表記した。(Transplantation. 2015 May;99(5):948-56)

DTCM-G の *in vivo* 効果は *in vitro* と同様に濃度依存性に効果があることを確認した (図3)。

図3 DTCM-G は濃度依存性にグラフト動脈内腔狭窄を軽減

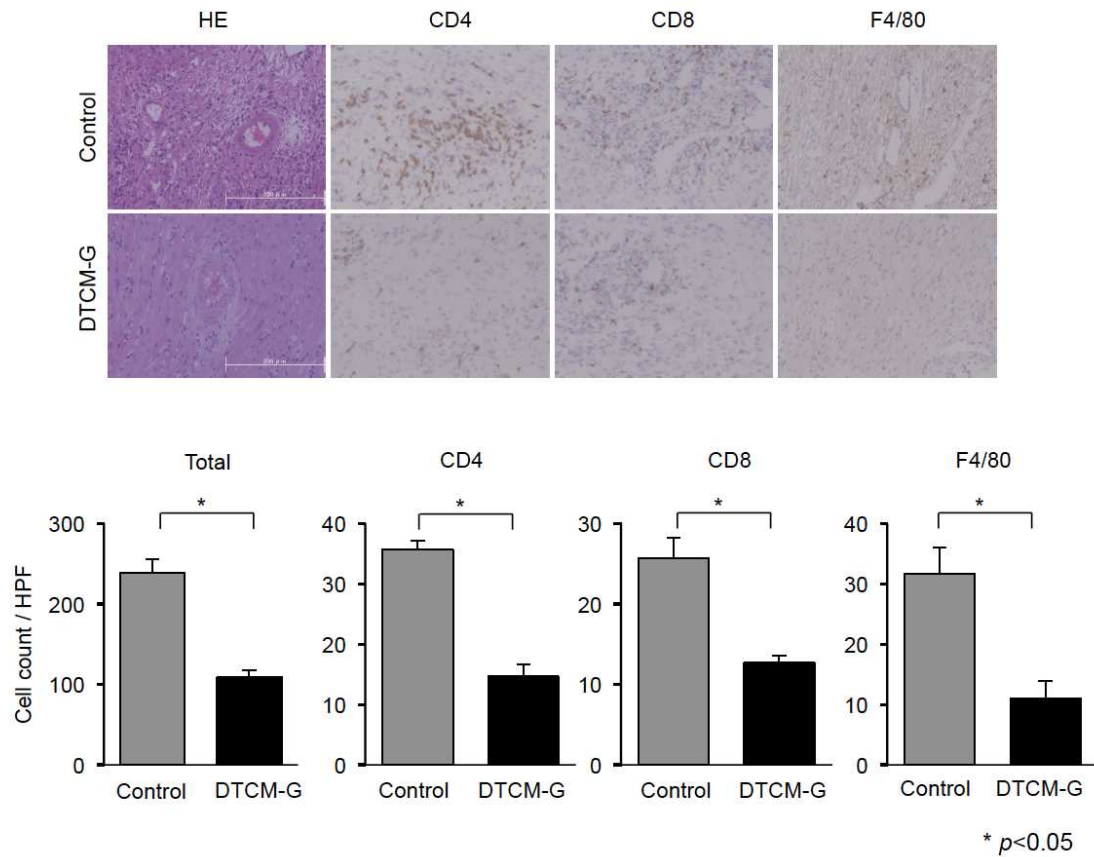


(上) 代表的なEVG染色。(下) グラフト動脈内腔狭窄率。データはmean±SEで表記した。(Transplantation. 2015 May;99(5):948-56)

(3) グラフト浸潤細胞の評価

DTCM-Gが移植後動脈硬化症の抑制効果が確認できたので、次にグラフト内に浸潤している細胞を評価した。Vehicle control群ではグラフト動脈周囲に相当量のCD4, CD8, F4/80陽性細胞の浸潤が確認された。しかし、DTCM-G治療群においては有意に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, $n=3$, $P<0.05$)。以上のことから、DTCM-Gは*in vitro*および*in vivo*においてドナー特異的免疫応答を抑制することで、移植後動脈硬化症を軽減することが示唆された(図4)。

(図4) DTCM-Gはグラフト浸潤細胞を抑制



(上) 代表的な HE 染色および CD4, CD8, F4/80 免疫染色。(下) グラフト浸潤細胞数 (n=6)。データは mean $\pm$ SE で表記した。(Transplantation. 2015 May;99(5):948-56)

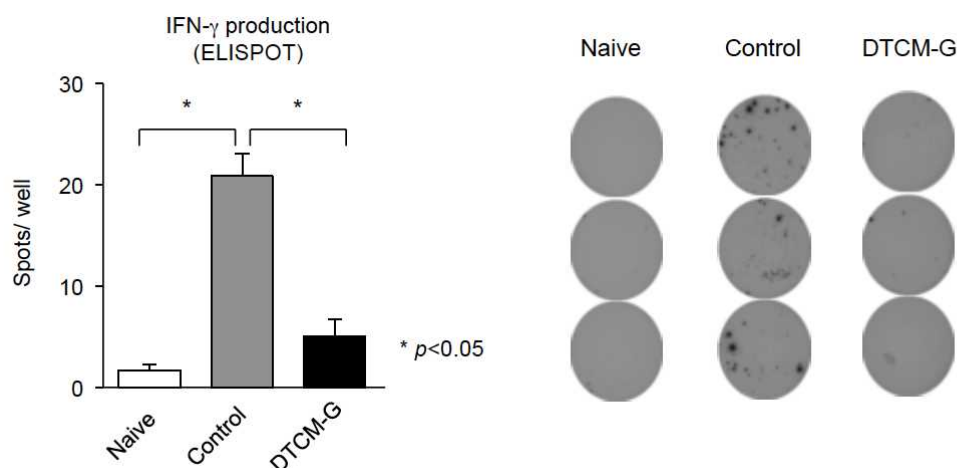
(4) ドナー特異的免疫応答の検討

グラフト浸潤細胞の抑制が確認できたので、ドナー特異的免疫応答を抑制の有無について検討した。ドナー特異的免疫応答の評価するために、ELISPOT assay を用いて IFN- γ 産生細胞を計測およびフローサイトメトリーを用いて CD154 の発現を評価した。IFN- γ および CD40-CD154 シグナルは移植後動脈硬化症の重要な進展因子であり、これらを抑制することで動脈硬化を減弱させることが報告されている^{18, 20, 23, 57, 58}。

移植後 14 日目のレシピエントの C57BL/6 マウスの脾細胞を 30 Gy で照射したドナーの B6.CH-2^{bm12} マウスの脾細胞でアロ抗原にて再刺激を加え、IFN- γ 産生細胞を検出した。Vehicle control 群の脾細胞は抗原暴露していない Naive の脾細胞に比べ IFN- γ 産生を有意な増加がみられた。一方、DTCM-G 治療群は IFN- γ の産生を control 群に比べ有意な抑制が確認された (Control vs. DTCM-G: 20.9 ± 2.2 vs. 5.0 ± 1.7 spots/well, n=3, $P < 0.05$) (図 5)。同様に、移植後 14 日目にドナー細胞で再刺激した CD4⁺細胞で CD154 の発現

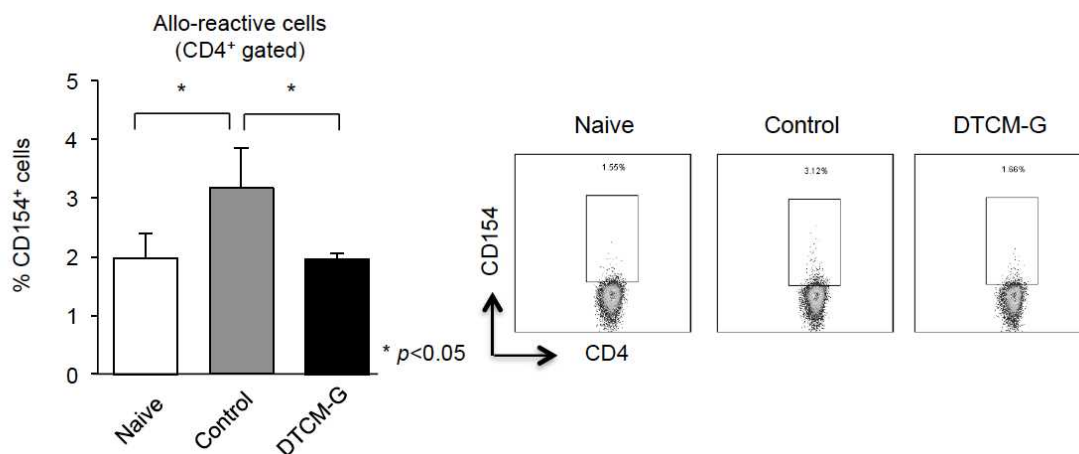
を確認した。IFN- γ 産生と同様に、vehicle control 群に比べ DTCM-G 治療群は有意にドナー特異的 CD154 発現を抑制した (Control vs. DTCM-G: 3.1 ± 0.7 vs. $2.0 \pm 0.1\%$, $n=3$, $P<0.05$) (図 6)。以上のことより、DTCM-G がドナー特異的免疫応答を抑制することが確認できた。

(図 5) DTCM-G はドナー特異的 IFN- γ 産生を抑制 (移植後 14 日目)



IFN- γ 産生細胞 ($n=3$)。データは $\text{mean} \pm \text{SE}$ で表記した。(*Transplantation*. 2015 May;99(5):948-56)

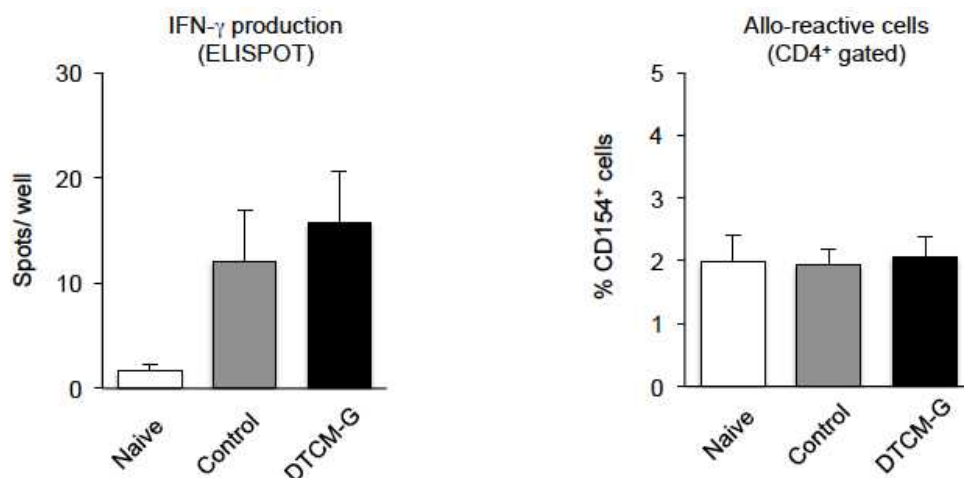
(図 6) DTCM-G はドナー特異的 CD4⁺CD154⁺発現を抑制 (移植後 14 日目)



CD4 陽性細胞中の CD154 発現率 ($n=3$)。データは $\text{mean} \pm \text{SD}$ で表記した。(*Transplantation*. 2015 May;99(5):948-56)

しかし、同様の実験を移植後 28 日目に行ったところ、vehicle control 群と DTCM-G 治療群の間に有意な差は認められなかった (図 7)。

(図 7) ドナー特異的免疫応答 (移植後 28 日目)

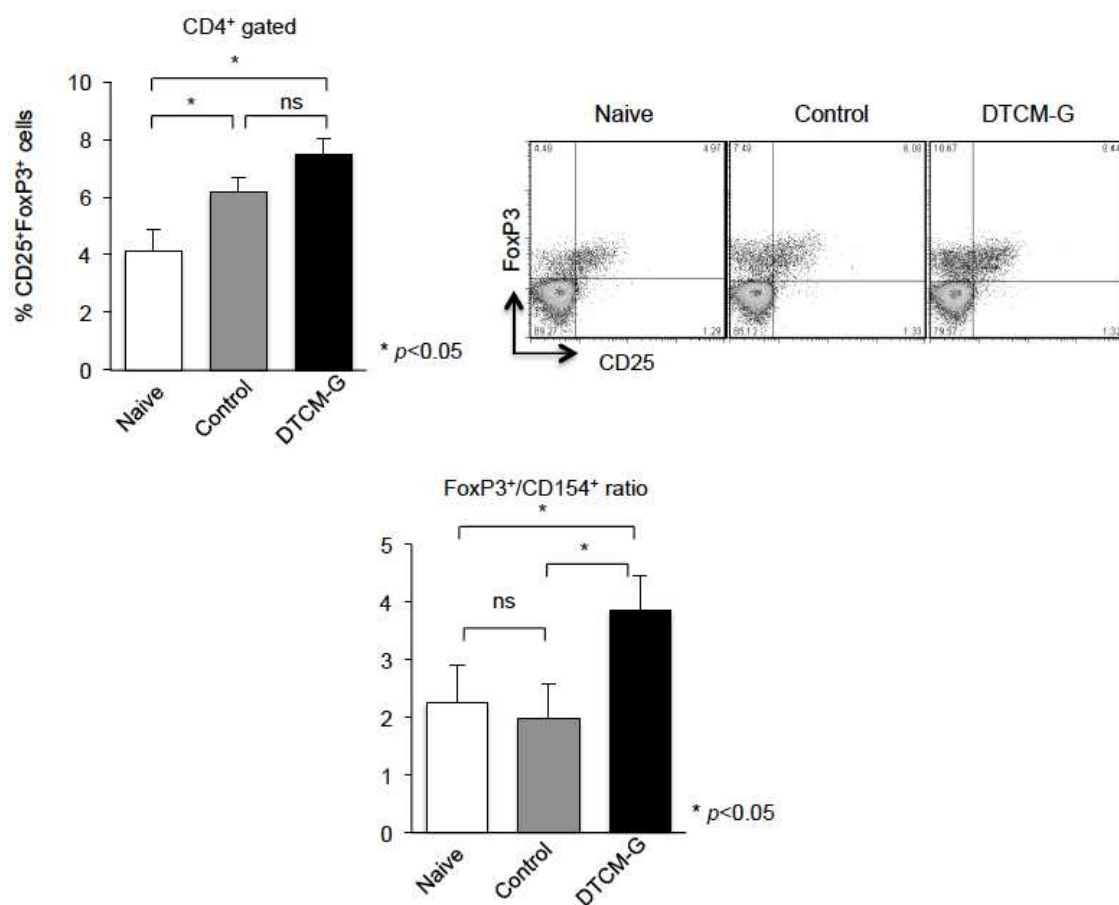


(左) IFN- γ 産生細胞(n=8)。データはmean $\pm$ SE で表記した。(右) CD4 陽性細胞中のCD154 発現率(n=8)。データはmean $\pm$ SD で表記した。(Transplantation. 2015 May;99(5):948-56)

(5) 制御性 T 細胞の検討

DTCM-G がドナー特異的に免疫応答を抑制していたので、免疫応答を抑制する制御性 T 細胞の誘導の有無について検討した。移植後 14 日目の脾細胞において、CD4 陽性細胞内でCD25 およびFoxP3 を発現している細胞を評価したところ、vehicle control 群およびDTCM-G 治療群はNaive 細胞に比して有意な増加が認められた。しかし、vehicle control 群と DTCM-G 治療群の間には有意な差は認められなかった(Naive: $4.1 \pm 0.8\%$, Control: $6.2 \pm 0.5\%$, DTCM-G: $7.5 \pm 0.5\%$, n=3)。次に、CD4 陽性細胞の中で CD25⁺FoxP3⁺を regulatory 細胞とし、CD154⁺を発現している細胞を effector 細胞として regulatory/effector ratio を評価した。Vehicle control 群と Naive 群においては有意な差は認められなかったが、DTCM-G 治療群は vehicle control 群およびnaive 群に比し有意な増加が認められた (Naive: 2.2 ± 0.7 or Control: 2.0 ± 0.6 vs. DTCM-G: 3.9 ± 0.6 , n=3, $P < 0.05$)。つまり、DTCM-G 治療群においては免疫応答のバランスを抑制するようシフトしていることが確認された (図 8)。

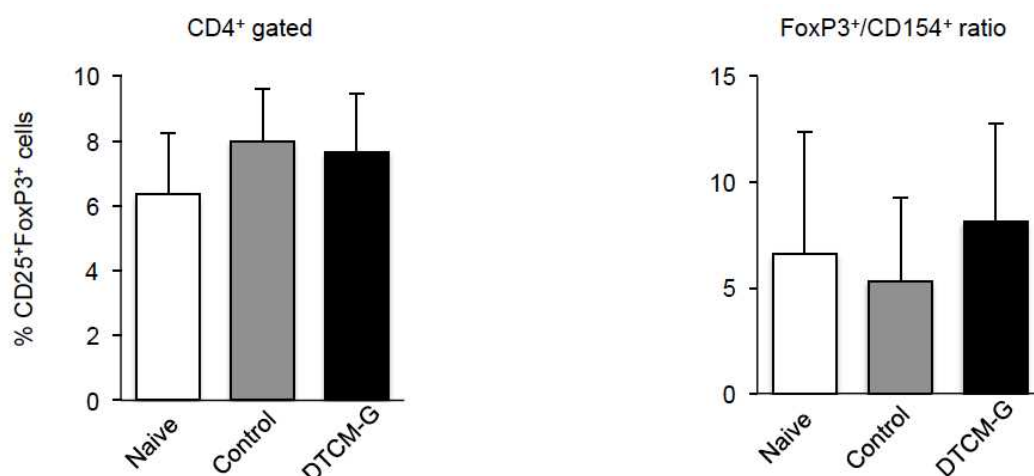
(図 8) 免疫応答のバランス (移植後 14 日目)



(上) CD4 陽性細胞中の CD25⁺FoxP3⁺ 陽性率 (n=3)。データは mean ± SD で表記した。(下) 免疫応答の regulatory/effecter のバランス (n=3)。DTCM-G は免疫応答を抑制する傾向があった。データは mean ± SD で表記した。

同様の実験を、移植後 28 日目においても評価したところ、vehicle control 群と DTCM-G 治療群において有意な差は確認できなかった (図 9)。

(図 9) 免疫応答のバランス (移植後 28 日目)



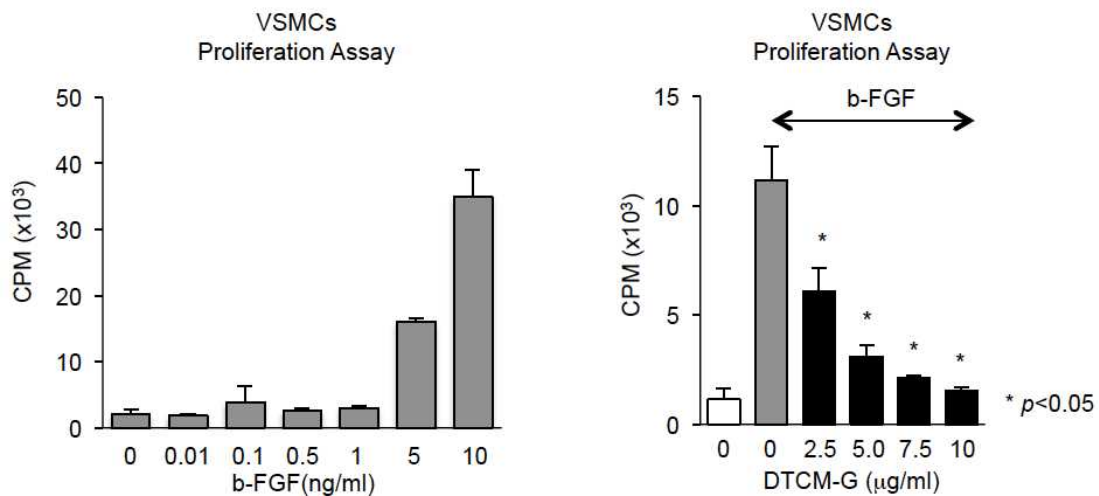
(左) CD4 陽性細胞中の CD25⁺FoxP3⁺ 陽性率。(右) 免疫応答の regulatory/effector のバランス。データは mean ± SD で表記した (n=8)。

(6) 血管平滑筋細胞への効果の検討

DTCM-G は移植後早期のドナー特異的免疫応答を抑制することは確認されたが、移植後 28 日目まで持続的に抑制したわけではないことがわかった。そこで、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することにした。B6. CH-2^{bm12} マウスの胸部大動脈から explant 法を用いて血管平滑筋細胞を単離して 5-10 継代の間で実験を行った。血管平滑筋細胞がプレートに接着するのを確認した後、0.2% FCS を加えた DMEM 培養液で 48 時間血清飢餓状態にさせ細胞周期を同調させた。その後、growth factor である b-FGF を添加し細胞増殖試験を行った。まず初めに、growth factor の濃度の検討を行った。血管平滑筋細胞は 5 ng/ml 以上の b-FGF の刺激で増殖することが確認できた。最終的には Immunoblot assay の蛋白抽出濃度の兼ね合いにより b-FGF 20 ng/ml の刺激にて実験を行った。

次に、DTCM-G が血管細胞増殖を抑制するか検討したところ、2.5 μg/ml から濃度依存性に増殖を抑える事が確認された (図 10)。

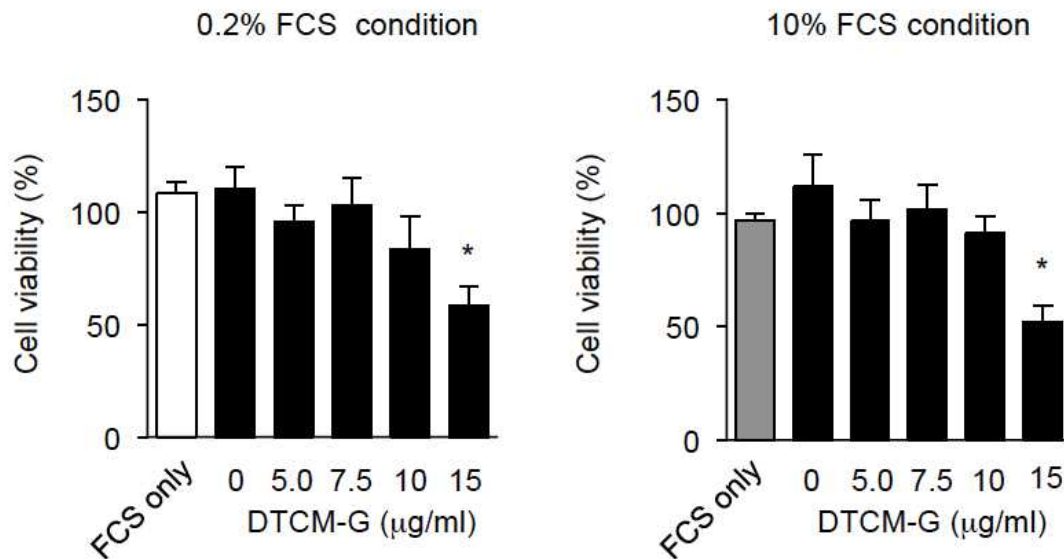
(図 10) DTCM-G は血管平滑筋細胞の増殖を抑制



(左) 血管平滑筋細胞の条件検討($n=1$)。b-FGF 5 ng/ml 以上から細胞増殖効果が示された。データは mean $\pm$ SD で表記した。(右) 細胞増殖抑制試験を行った($n=3$)。2.5 μ g/ml から DTCM-G は有意な増殖抑制効果を得た。データは mean $\pm$ SE で表記した。(Transplantation. 2015 May;99(5):948-56)

同時に、DTCM-G の細胞毒性試験も行った。DTCM-G は 15 μ g/ml 以上から細胞生存率に有意な差がでることが確認された (図 1 1)。

(図 1 1) 細胞毒性試験

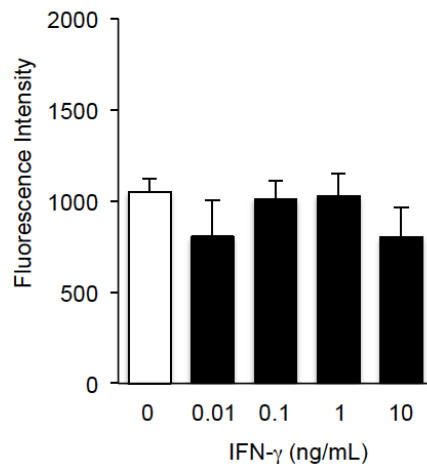


細胞毒性を 0.2% (左) もしくは 10% FCS (右) を加えた DMEM 培養液上で評価した。DTCM-G 15 μ g/ml から細胞毒性が出現した。データは mean $\pm$ SE で表記した ($n=3$)。(Transplantation. 2015 May;99(5):948-56)

In vitro の条件をより *in vivo* の条件を模倣した状況で検討を加えた。

まず、IFN- γ のみの刺激にて細胞増殖試験を行ったが、血管平滑筋の増殖は確認できなかった（図 1 2）。

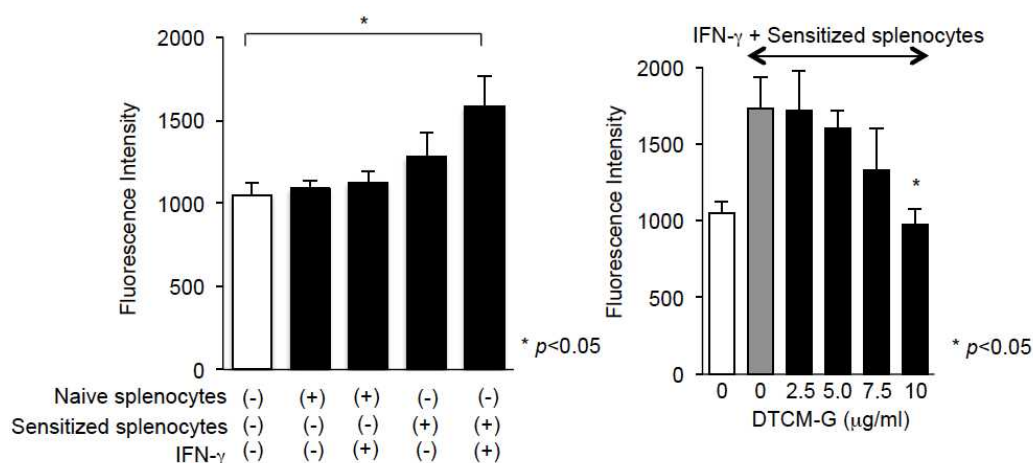
（図 1 2） IFN- γ による血管平滑筋細胞増殖の検討



細胞増殖試験 (n=1)。IFN- γ のみの刺激では血管平滑筋は増殖しなかった。データはmean $\pm$ SD で表記した。
(Transplantation. 2015 May;99(5):948-56)

次に、血管平滑筋細胞と脾細胞の共培養を行った。レシピエントの Naive 脾細胞と共培養した血管平滑筋細胞は IFN- γ の刺激の有無に関わらず、増殖は確認できなかった。移植後 14 日目のレシピエントの脾細胞と血管平滑筋細胞を共培養すると軽度の増殖が確認された。一方、IFN- γ により活性化された血管平滑筋細胞と移植後 14 日目のレシピエントの脾細胞を共培養すると有意な増殖が確認された。その条件において DTCM-G の細胞増殖抑制試験を行ったところ、DTCM-G は濃度依存性に細胞増殖を抑制することが確認できた（図 1 3）。

（図 1 3） 血管平滑筋細胞のリンパ球との共培養および増殖抑制試験



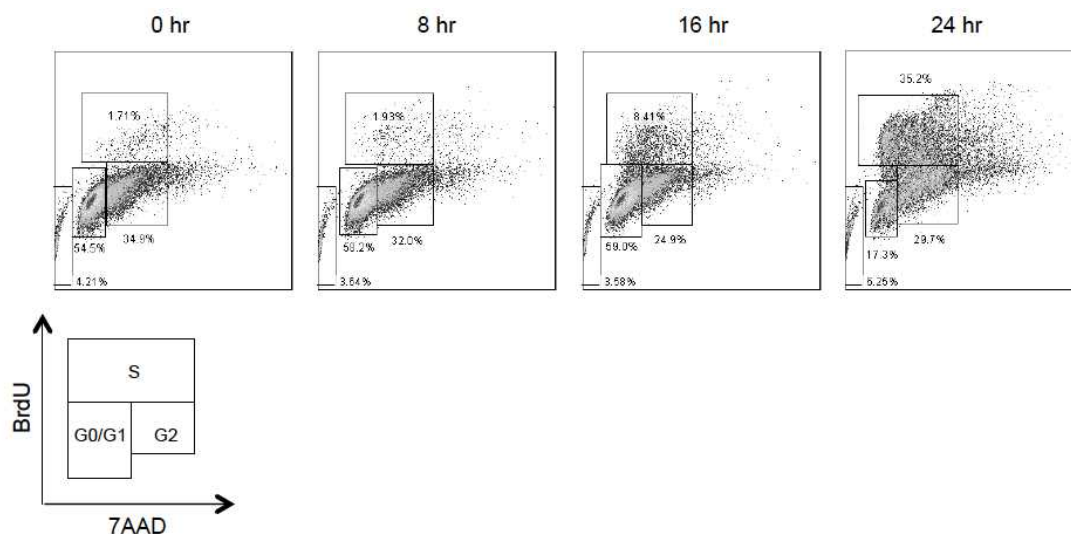
(左) リンパ球と共培養した血管平滑筋細胞増殖試験(n=3)。INF- γ で活性化した血管平滑筋細胞はドナー抗原に暴露したリンパ球刺激によって増殖促進する。データは mean $\pm$ SE で表記した。(右) 細胞増殖抑制試験(n=3)。10 $\mu\text{g/ml}$ で DTCM-G は有意な増殖抑制効果を得た。データは mean $\pm$ SE で表記した。
(Transplantation. 2015 May;99(5):948-56)

以上より、DTCM-G が直接血管細胞増殖を抑制していることが示唆された。

(7) 血管平滑筋細胞周期の評価

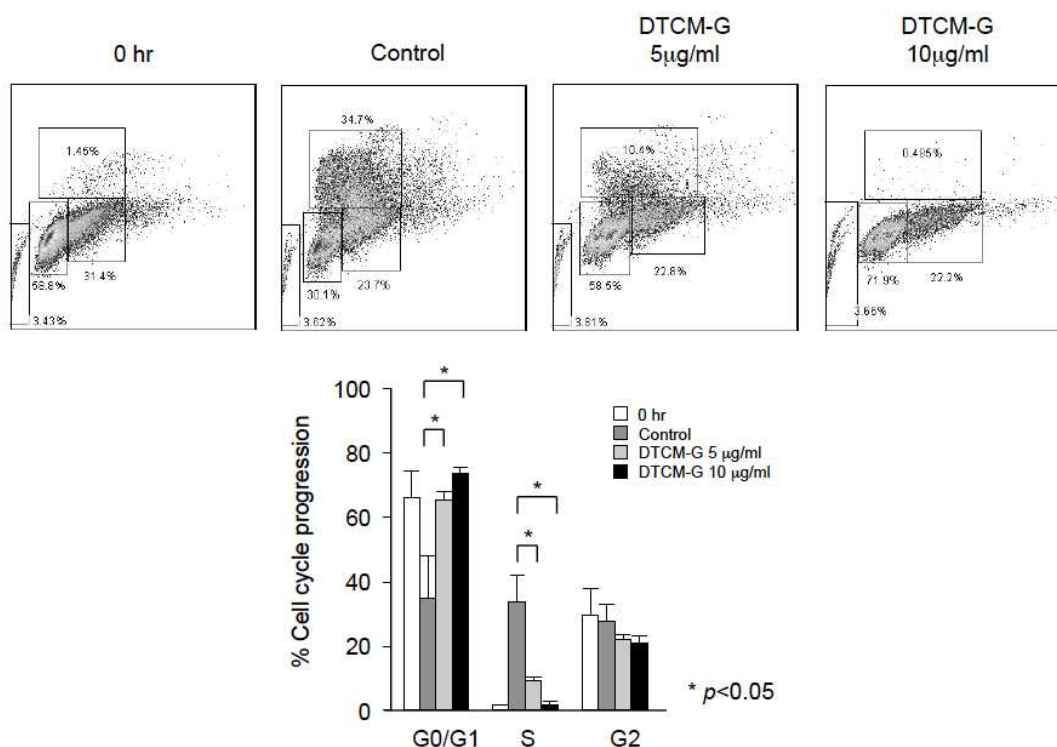
DTCM-G の血管平滑筋細胞増殖抑制効果の機序を解明する足がかりとして、血管平滑筋細胞の細胞周期を評価した。血清飢餓で同調させた血管平滑筋細胞に b-FGF (20 ng/ml) と BrdU で刺激し、BrdU Flow kit で細胞周期を評価した。8, 16, 24 時間とインキュベートした結果を以下に示した (図 1 4)。

(図 1 4) 血管平滑筋細胞の細胞周期の経時的変化



次に、DTCM-G を加えて 24 時間培養した結果、DTCM-G は血管平滑筋細胞の G0/G1 から S 期の移行を抑制していることが確認できた (図 1 5)。

(図 1 5) DTCM-G は細胞周期の G0/G1 から S 期の移行を抑制

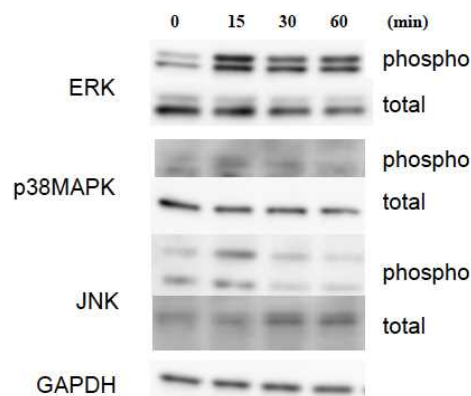


細胞周期の評価(n=3)。データはmean±SD で表記した。(Transplantation. 2015 May;99(5):948-56)

(8) Immunoblot assay

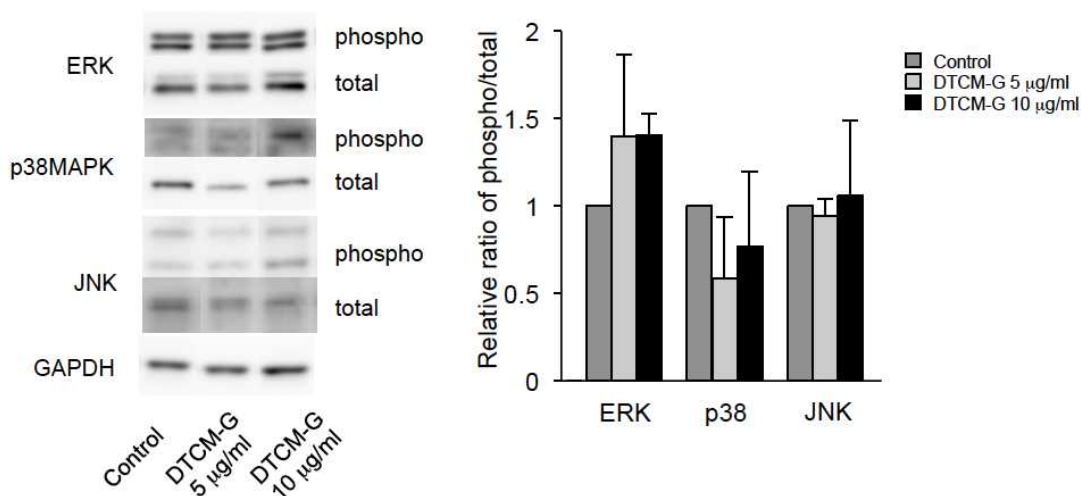
G0/G1-S 期に関連する蛋白の評価を immunoblot assay で評価した。Growth factor のシグナルを受けた細胞は mitogen-activated protein kinase (MAPK) が活性化される。そこで、b-FGF (20 ng/ml) で刺激した血管平滑筋細胞の MAPK である extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK), p38 MAPK のリン酸化を評価した。刺激後 15 分後には ERK のリン酸化は確認できたが、p38 MAPK および JNK のリン酸化は ERK に比べると非常に軽度であった (図 1 6)。

(図 1 6) b-FGF 刺激による血管平滑筋細胞の MAPK のリン酸化の経時的変化



次に、DTCM-G を加えて刺激後 30 分後の評価したところ、特に DTCM-G は MAPK のリン酸化の抑制効果は確認されなかった (図 1 7)。

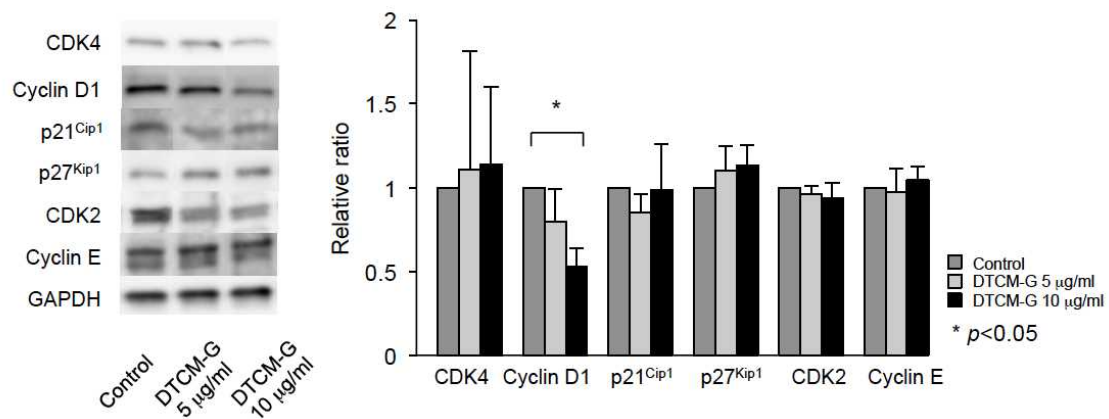
(図 1 7) DTCM-G は MAPK のリン酸化を阻害せず



(左) 代表的な実験結果。(右) 相対的なリン酸化量 ($n=3$)。データは $mean \pm SD$ で表記した。
(Transplantation. 2015 May;99(5):948-56)

次に、MAPK の下流にある cyclin, cyclin dependent kinase (CDK) および CDK inhibitor の評価を行った。b-FGF 刺激後 16 時間において、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 (図 1 8)。

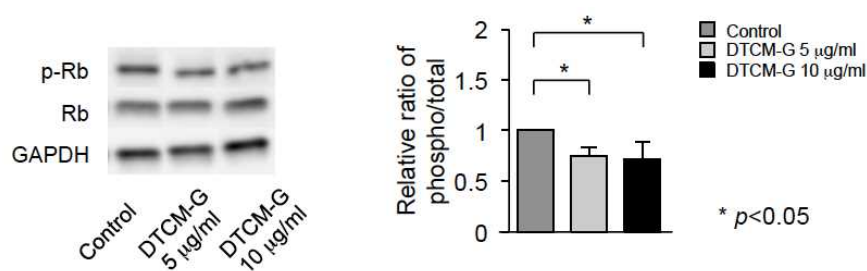
(図 1 8) DTCM-G は cyclin D1 の発現を抑制



(左) 代表的な実験結果。(右) 蛋白量(n=3)。データはmean±SD で表記した。(Transplantation. 2015 May;99(5):948-56)

S期の直前に cyclin-CDK 複合体が活性化すると、次に retinoblastoma (Rb) 蛋白をリン酸化される。Rb は転写因子 E2F と結合しその働きを抑制されているが、Rb がリン酸化されると E2F を遊離し、E2F が S 期の初期遺伝子群を活性化させる^{59,60}。そこで、Rb のリン酸化を評価したところ、DTCM-G は有意に Rb のリン酸化を抑制していた (図 19)。

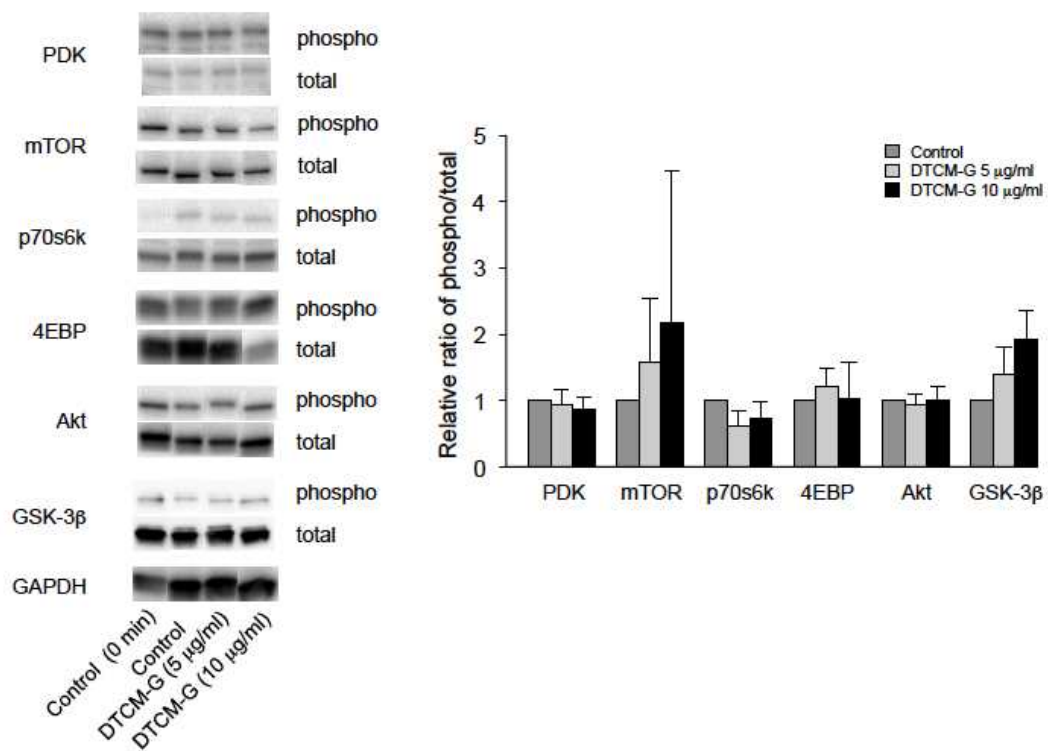
(図 19) DTCM-G は Rb リン酸化を抑制



(左) 代表的な実験結果。(右) 相対的なリン酸化量(n=3)。データは mean±SD で表記した。(Transplantation. 2015 May;99(5):948-56)

Cyclin D1 の発現には mTOR シグナルの下流にある p70s6 kinase から部分的に制御されているため⁶¹、mTOR シグナルに関連する蛋白の評価を追加したが、有意な p70s6 kinase の抑制は確認されなかった (図 20)。以上のことから、DTCM-G は血管平滑筋細胞の cyclin D1 の発現を抑制することで、G0/G1 から S 期への移行を抑制したと考えられた。

(図 2 0) DTCM-G は mTOR 経路のシグナルを阻害せず



(左) 代表的な実験結果。(右) 相対的なリン酸化量 ($n=3$)。データは $mean \pm SD$ で表記した。
(*Transplantation*. 2015 May;99(5):948-56)

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 の有用性が示された。本実験で用いた B6. CH-2^{bm12} マウスから C57BL/6 マウスへの MHC class II ミスマッチモデルでは 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。このモデルにおいて、CD4⁺T 細胞⁶² もしくは CD40 シグナル^{18, 63} は移植後動脈硬化症の重要な増悪因子である。さらに、移植後後期のグラフト動脈内腔狭窄の進行には自己抗体の関与も示唆され、グラフト生存期間中央値は約 95 日であるが⁶⁴、移植後 4 週間までは B 細胞欠損マウスと wild type マウスの間に移植後動脈硬化症の進行の違いは認められていない^{18, 62}。つまり、移植後 4 週間までのグラフト動脈内腔狭窄の進行に、アロ抗体および自己抗体の影響は受けてないと考えられる。以前、我々はマウスの MHC full ミスマッチモデルで *in vitro* および *in vivo* において DTCM-G が T 細胞の p70s6k のリン酸化を阻害することでアロ免疫応答を抑制すること、またタクロリムスとの併用にて相加効果あることを示したが⁵⁶、この移植後動脈硬化モデルにも同様の効果が得られるか確認した。以前の結果と矛盾なく、DTCM-G は H-2^{bm12} 抗原に対する H-2^b T 細胞の増殖を *in vitro* の実験では濃度依存性に抑制し (図 1)、*in vivo* においては H-2^{bm12} 抗原で再刺激による H-2^b T 細胞の IFN- γ 産生を抑制した (図 5)。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⁶⁵ のグラフト浸潤を抑制していることから確認が得られた (図 4)。

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^{4, 27}。この血管内腔の再構築の期間は、IFN- γ が重要な役割を担う。IFN- γ は自然免疫応答の増強および獲得免疫の制御するサイトカインとしてよく知られている⁶⁶。しかし、IFN- γ は T 細胞⁶⁷ やマクロファージ⁶⁸ を活性化するだけでなく、血管平滑筋細胞や内皮細胞の接着因子である MHC-class II、vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) や intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) を活性化させる^{22, 28, 69, 70}。抗 VCAM-1 抗体や抗 ICAM-1 抗体の治療により長期のグラフト生着が得られることから^{71, 72}、これらの接着因子の発現はアログラフト拒絶反応において重要であると考えられる。本実験と同じ H-2^{bm12} から H-2^b マウスの心移植実験において H-2^b レシピエントマウスの INF- γ ノックアウトしたモデルでは、グラフト実質への拒絶反応は抑制されなかったものの、移植後動脈硬化症の有意な改善が得られている²⁰。また、移植直後の短期のアロ免疫応答だけでも移植後動脈硬化症が惹起されるが、INF- γ ノックアウトしたレシピエントにはこの進行が抑制されることが確認されている²²。これらの結果を踏まえ、本実験では IFN- γ に注目し、また、DTCM-G が IFN- γ 産生を抑制できるか評価した。アロ抗原の再刺激により得られる INF- γ 産生細胞数は

DTCM-G 治療群では移植後 14 日目では有意に抑制されたが (図 5)、移植後 28 日目には vehicle control 群の $\text{INF-}\gamma$ 産生細胞数も減少し有意な抑制効果は認められなかった (図 7)。H-2^{bm12} から H-2^b マウスの心移植モデルにおいて $\text{INF-}\gamma$ の産生は一過性であり、移植後 7 日目以降から減少していくことは以前の研究で示唆されていることから⁷³、本実験結果と矛盾しないと考えられる。組織病理学の結果も踏まえて (図 4)、DTCM-G は移植直後の T 細胞介在性アロ免疫応答を抑制したと考えられる。

制御性 T 細胞である $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ 細胞は免疫応答を抑制し、免疫寛容を導く重要な細胞として注目されている⁷⁴⁻⁷⁸。また、制御性 T 細胞による細胞治療で移植後動脈硬化症を抑制できることが確認されている^{79,80}。そこで、DTCM-G が制御性 T 細胞を誘導するかについて検討した。移植後 14 日目の CD4^+ 細胞内の制御性 T 細胞の割合は DTCM-G 治療群では増加する傾向は認められたが有意な差とはならなかった。しかし、regulatory/effector ratio で免疫応答のバランスを評価したところ、DTCM-G は免疫応答を制御するようにシフトしていたことが確認された (図 8)。アロ免疫応答が弱まった移植後 28 日目にはその傾向は消失していた (図 9)。以上のことから、DTCM-G は制御性 T 細胞を有意に誘導することはなかったが、regulatory/effector のバランスを regulatory response を強くするように傾けて、アロ免疫応答を抑制していることが確認できた。

移植後動脈硬化症の進行には血管平滑筋細胞も深く関わっているため⁸¹、T 細胞介在性アロ免疫応答だけでなく血管平滑筋細胞に対する DTCM-G の効果についても検討を加えた。血管平滑筋細胞増殖の刺激となる増殖因子の b-FGF はラットの心移植^{7,82}やヒトの肺⁸³、小腸⁶移植後の慢性拒絶反応時に発現が増加していることが報告されている。DTCM-G は b-FGF 刺激された血管平滑筋細胞の増殖を濃度依存性に抑制した (図 10)。さらに、移植後の *in vivo* の条件により近付けるため、 $\text{INF-}\gamma$ とアロ抗原細胞で刺激した血管平滑筋細胞増殖試験を追加した。 $\text{INF-}\gamma$ のみで刺激した血管平滑筋細胞の増殖は確認ができなかったが、これは以前 Hansson 等により報告された結果と矛盾はなかった⁸⁴。 $\text{INF-}\gamma$ で刺激した血管平滑筋細胞は、アロ抗原に暴露された脾細胞の刺激により増殖することが確認できたが、Naive な脾細胞の刺激には増殖反応は示さなかった (図 13)。また、 $\text{INF-}\gamma$ 刺激を加えなかった血管平滑筋細胞はアロ抗原暴露した脾細胞の刺激を加えても増殖しなかったことから (図 13)、この *in vitro* の条件に $\text{INF-}\gamma$ の刺激は必要であると考えられた。 $\text{INF-}\gamma$ のみの刺激では血管平滑筋細胞は増殖しなかった (図 12)、 $\text{INF-}\gamma$ は血管平滑筋細胞の接着因子や CD40 の発現の促進に関与^{85,86}していることが疑われた。このモデルにおいて $\text{INF-}\gamma$ を主に産生するのは主に CD4^+ T 細胞と考えられている。また、アロ抗原に暴露された CD4^+ T 細胞に発現している CD154 が血管平滑筋細胞に発現している CD40 にシグナル送り、血管平滑筋細胞が増殖因子を産生したのではないかと推察した。さらに、 $\text{INF-}\gamma$ は白血球がない状態でも

platelet-derived growth factor (PDGF)により血管平滑筋細胞を増殖させグラフト動脈閉塞を惹起することが報告されている²³。その他、IFN- γ および IFN- γ induced protein 10 (IP-10)などが血管平滑筋細胞増殖を促進させることが報告されている^{31, 87}。これらの実験結果は、移植後動脈硬化症の進行においてアロ免疫応答、特に血管再構築のトリガーもしくはブースターになる IFN- γ の重要性が示されている。そして、DTCM-G が b-FGF 刺激だけでなく IFN- γ 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を示したことは注目に値する(図 1 3)。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。しかし、これらの効果は DTCM-G の効果の一面であるとも考えられる。なぜなら、本実験では評価しなかったが血管平滑筋細胞や内皮細胞の接着因子の発現を DTCM-G が抑制している可能性も除外できないからである。

DTCM-G の血管平滑筋細胞増殖抑制効果の機序を解明するために、b-FGF で刺激した血管平滑筋細胞の細胞周期の検討を行い、G1-S 期の移行を抑制することがわかった

(図 1 5)。G1-S 期において、増殖刺激により CDK4 から CDK2 へと cyclin D-CDK4 複合体および cyclin E-CDK2 複合体を形成しながら連続して活性化されていく⁸⁸。次いで Rb がリン酸化され、Rb と結合していた転写因子 E2F が遊離し、cyclin E や S 期進行に必要な遺伝子群の発現が誘導される。Cyclin D1 は血管疾患や血管平滑筋細胞の増殖に重要な分子である⁸⁹⁻⁹²。DTCM-G は cyclin D1 発現のみを抑制し、CDK4, CDK2, cyclin E および CDK inhibitor である p21 と p27 には影響がなかった(図 1 8)。そして、DTCM-G は Rb のリン酸化を濃度依存性に抑制していた(図 1 9)。さらに、cyclin D1 の発現には p70s6 kinase が一部関与しており⁶¹、p70s6 kinase は T 細胞⁹³や血管平滑筋細胞⁹⁴の活性化や増殖に関与しているため、PI3K/Akt/mTOR pathway⁹⁵⁻⁹⁹の評価も行った。しかし、DTCM-G は mTOR pathway に対して影響を与えなかった(図 2 0)。

G1 静止期には cyclin-CDK 複合体の上流にある MAPK である ERK1/2^{100, 101}や p38 MAPK¹⁰²の関与も確認されている。しかし、DTCM-G は ERK1/2, p38 MAPK, JNK のリン酸化を抑制していなかった(図 1 7)。以上の結果、DTCM-G は血管平滑筋細胞の cyclin D1 の発現を抑制することを解明した。しかし、これらの実験で得られた結果を一般化するには、さらに様々な細胞を用いて DTCM-G の詳細な標的分子の同定することが必要であると思われる。

総括および結論

マウスの移植後動脈硬化症モデルにおいて、DTCM-G はドナー特異的な IFN- γ の産生および CD4⁺CD154⁺細胞の発現を抑え、アロ免疫応答を抑制した。また、DTCM-G は血管

平滑筋細胞の cyclin D1 の発現を抑えることで細胞周期の G1-S 期の移行阻害し、血管平滑筋細胞増殖を抑制した。つまり、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可能性が示された。

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、多くのご支援とご指導を賜りました。特に本研究の遂行から論文作成にいたるまで、手取り足とりご指導していただいた北海道大学大学院医学研究科・移植外科学講座・特任教授 山下健一郎 教授に深く感謝しております。時に応じて、厳しくご指導していただいたこと、また問題に直面した時に励まして勇気づけていただいたこと、ここに感謝の意を表します。また、博士課程前期で温かく見守ってくださった指導教官である北海道大学大学院医学研究科・外科学講座・消化器外科分野Ⅰ 藤堂省 教授、博士課程後期から同様に温かく見守ってくださった指導教官である北海道大学大学院医学研究科・外科学講座・消化器外科分野Ⅰ 武富紹信 教授に深く感謝しております。最後に、同時期に博士課程に入学し、日常の議論を通じて多くの知識を共有できかつ研究を手伝っていただいた北海道大学大学院医学研究科・外科学講座・消化器外科分野Ⅰの皆様に感謝します。

引用文献

- 1 Lodhi, S. A., Lamb, K. E. & Meier-Kriesche, H. U. Solid organ allograft survival improvement in the United States: the long-term does not mirror the dramatic short-term success. *Am. J. Transplant.* **11**, 1226-1235 (2011).
- 2 Shimizu, K. *et al.* Host CD40 ligand deficiency induces long-term allograft survival and donor-specific tolerance in mouse cardiac transplantation but does not prevent graft arteriosclerosis. *J. Immunol.* **165**, 3506-3518 (2000).
- 3 Libby, P. & Pober, J. S. Chronic rejection. *Immunity* **14**, 387-397 (2001).
- 4 Mitchell, R. N. Graft vascular disease: immune response meets the vessel wall. *Annu. Rev. Pathol.* **4**, 19-47 (2009).
- 5 Klagsbrun, M. & Edelman, E. R. Biological and biochemical properties of fibroblast growth factors. Implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Arteriosclerosis* **9**, 269-278 (1989).
- 6 Kouwenhoven, E. A. *et al.* Upregulation of basic fibroblast growth factor during chronic intestinal rejection. *Transplant. Proc.* **31**, 590 (1999).
- 7 Pilmore, H. L. *et al.* Time course of upregulation of fibrogenic growth factors and cellular infiltration in a rodent model of chronic renal allograft rejection. *Transpl. Immunol.* **10**, 245-254 (2002).
- 8 Isobe, M., Kosuge, H. & Suzuki, J. T cell costimulation in the development of cardiac allograft vasculopathy: potential targets for therapeutic interventions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1447-1456 (2006).
- 9 Sayegh, M. H. & Turka, L. A. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1813-1821 (1998).
- 10 Russell, M. E. *et al.* Chronic cardiac rejection in the LEW to F344 rat model. Blockade of CD28-B7 costimulation by CTLA4Ig modulates T cell and macrophage activation and attenuates arteriosclerosis. *J. Clin. Invest.* **97**, 833-838 (1996).
- 11 Azuma, H. *et al.* Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 12439-12444 (1996).
- 12 Larsen, C. P. *et al.* Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* **381**, 434-438 (1996).
- 13 Kirk, A. D. *et al.* CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 8789-8794 (1997).

- 14 Shi, C. *et al.* Immunologic basis of transplant-associated arteriosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 4051-4056 (1996).
- 15 Ensminger, S. M. *et al.* Indirect allorecognition can play an important role in the development of transplant arteriosclerosis. *Transplantation* **73**, 279-286 (2002).
- 16 Szeto, W. Y. *et al.* Depletion of recipient CD4+ but not CD8+ T lymphocytes prevents the development of cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation* **73**, 1116-1122 (2002).
- 17 Chen, Y., Demir, Y., Valujskikh, A. & Heeger, P. S. Antigen location contributes to the pathological features of a transplanted heart graft. *Am. J. Pathol.* **164**, 1407-1415 (2004).
- 18 Fischbein, M. P. *et al.* CD40 signaling replaces CD4+ lymphocytes and its blocking prevents chronic rejection of heart transplants. *J. Immunol.* **165**, 7316-7322 (2000).
- 19 Russell, P. S., Chase, C. M., Winn, H. J. & Colvin, R. B. Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. III. Effects of recipient treatment with a monoclonal antibody to interferon-gamma. *Transplantation* **57**, 1367-1371 (1994).
- 20 Nagano, H. *et al.* Interferon-gamma deficiency prevents coronary arteriosclerosis but not myocardial rejection in transplanted mouse hearts. *J. Clin. Invest.* **100**, 550-557 (1997).
- 21 Poher, J. S., Ma, W., Biedermann, B. & Libby, P. Vascular cells have limited capacities to activate and differentiate T cells: implications for transplant vascular sclerosis. *Transpl. Immunol.* **5**, 251-254 (1997).
- 22 Nagano, H. *et al.* Coronary arteriosclerosis after T-cell-mediated injury in transplanted mouse hearts: role of interferon-gamma. *Am. J. Pathol.* **152**, 1187-1197 (1998).
- 23 Tellides, G. *et al.* Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes. *Nature* **403**, 207-211 (2000).
- 24 Wang, Y. *et al.* Interferon-gamma plays a nonredundant role in mediating T cell-dependent outward vascular remodeling of allogeneic human coronary arteries. *FASEB J.* **18**, 606-608 (2004).
- 25 Yi, T. *et al.* Human allograft arterial injury is ameliorated by sirolimus and cyclosporine and correlates with suppression of interferon-gamma. *Transplantation* **81**, 559-566 (2006).

- 26 Cuffy, M. C. *et al.* Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in vascular smooth muscle cells by interferon-gamma contributes to medial immunoprivilege. *J. Immunol.* **179**, 5246-5254 (2007).
- 27 Tellides, G. & Pober, J. S. Interferon-gamma axis in graft arteriosclerosis. *Circ. Res.* **100**, 622-632 (2007).
- 28 Wang, Y. *et al.* Interferon-gamma induces human vascular smooth muscle cell proliferation and intimal expansion by phosphatidylinositol 3-kinase dependent mammalian target of rapamycin raptor complex 1 activation. *Circ. Res.* **101**, 560-569 (2007).
- 29 Lebastchi, A. H. *et al.* Transforming growth factor beta expression by human vascular cells inhibits interferon gamma production and arterial media injury by alloreactive memory T cells. *Am. J. Transplant.* **11**, 2332-2341 (2011).
- 30 Min, W. & Pober, J. S. AIP1 in graft arteriosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* **21**, 229-233 (2011).
- 31 Yu, L. *et al.* AIP1 prevents graft arteriosclerosis by inhibiting interferon-gamma-dependent smooth muscle cell proliferation and intimal expansion. *Circ. Res.* **109**, 418-427 (2011).
- 32 Hafizi, S. *et al.* Differential effects of rapamycin, cyclosporine A, and FK506 on human coronary artery smooth muscle cell proliferation and signalling. *Vascul. Pharmacol.* **41**, 167-176 (2004).
- 33 Poston, R. S. *et al.* Rapamycin reverses chronic graft vascular disease in a novel cardiac allograft model. *Circulation* **100**, 67-74 (1999).
- 34 Jolicoeur, E. M. *et al.* Combination therapy of mycophenolate mofetil and rapamycin in prevention of chronic renal allograft rejection in the rat. *Transplantation* **75**, 54-59 (2003).
- 35 Gao, R. *et al.* The effects of different immunosuppressants on chronic allograft nephropathy by affecting the transforming growth factor-beta and Smads signal pathways. *Transplant. Proc.* **38**, 2154-2157 (2006).
- 36 Poon, M. *et al.* Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *J. Clin. Invest.* **98**, 2277-2283 (1996).
- 37 Ikonen, T. S. *et al.* Sirolimus (rapamycin) halts and reverses progression of allograft vascular disease in non-human primates. *Transplantation* **70**, 969-975 (2000).
- 38 Waller, J. R. *et al.* Effects of the combination of rapamycin with tacrolimus

- or cyclosporin on experimental intimal hyperplasia. *Br. J. Surg.* **89**, 1390-1395 (2002).
- 39 Patel, J. K. & Kobashigawa, J. A. Everolimus for cardiac allograft vasculopathy--every patient, at any time? *Transplantation* **92**, 127-128 (2011).
- 40 Waller, J. R. *et al.* Mycophenolate mofetil inhibits intimal hyperplasia and attenuates the expression of genes favouring smooth muscle cell proliferation and migration. *Transplant. Proc.* **37**, 164-166 (2005).
- 41 Fukuda, D., Sata, M., Tanaka, K. & Nagai, R. Potent inhibitory effect of sirolimus on circulating vascular progenitor cells. *Circulation* **111**, 926-931 (2005).
- 42 Eisen, H. J. *et al.* Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **349**, 847-858 (2003).
- 43 Glysing-Jensen, T., Raisanen-Sokolowski, A., Sayegh, M. H. & Russell, M. E. Chronic blockade of CD28-B7-mediated T-cell costimulation by CTLA4Ig reduces intimal thickening in MHC class I and II incompatible mouse heart allografts. *Transplantation* **64**, 1641-1645 (1997).
- 44 Kim, K. S. *et al.* CD28-B7-mediated T cell costimulation in chronic cardiac allograft rejection: differential role of B7-1 in initiation versus progression of graft arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.* **158**, 977-986 (2001).
- 45 Koga, N. *et al.* Blockade of the interaction between PD-1 and PD-L1 accelerates graft arterial disease in cardiac allografts. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 2057-2062 (2004).
- 46 Saiki, H. *et al.* Blockade of the 4-1BB pathway attenuates graft arterial disease in cardiac allografts. *Int. Heart J.* **49**, 105-118 (2008).
- 47 Yang, J. *et al.* Critical role of donor tissue expression of programmed death ligand-1 in regulating cardiac allograft rejection and vasculopathy. *Circulation* **117**, 660-669 (2008).
- 48 Kosuge, H. *et al.* Attenuation of graft arterial disease by manipulation of the LIGHT pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1409-1415 (2004).
- 49 Yun, J. J. *et al.* Combined blockade of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 attenuates chronic rejection. *Circulation* **109**, 932-937 (2004).
- 50 Mukundan, L., Milhorn, D. M., Matta, B. & Suttles, J. CD40-mediated activation of vascular smooth muscle cell chemokine production through a

- Src-initiated, MAPK-dependent pathway. *Cell. Signal.* **16**, 375-384 (2004).
- 51 Richter, M. H., Richter, H. R., Olbrich, H. G. & Mohr, F. W. Two good reasons for an angiotensin-II type 1 receptor blockade with losartan after cardiac transplantation: reduction of incidence and severity of transplant vasculopathy. *Transpl. Int.* **16**, 26-32 (2003).
- 52 Suzuki, J. *et al.* Pitavastatin suppresses acute and chronic rejection in murine cardiac allografts. *Transplantation* **83**, 1093-1097 (2007).
- 53 Yamakawa, T. *et al.* Pitavastatin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by inactivating extracellular signal-regulated kinases 1/2. *J Atheroscler Thromb* **10**, 37-42 (2003).
- 54 Ishikawa, Y. *et al.* Synthesis and biological evaluation on novel analogs of 9-methylstreptimidone, an inhibitor of NF-kappaB. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 1726-1728 (2009).
- 55 Takeiri, M. *et al.* Inhibition of macrophage activation and suppression of graft rejection by DTCM-glutarimide, a novel piperidine derived from the antibiotic 9-methylstreptimidone. *Inflamm. Res.* **60**, 879-888 (2011).
- 56 Shibasaki, S. *et al.* Immunosuppressive effects of DTCM-G, a novel inhibitor of the mTOR downstream signaling pathway. *Transplantation* **95**, 542-550 (2013).
- 57 Chai, H., Aghaie, K. & Zhou, W. Soluble CD40 ligand induces human coronary artery smooth muscle cells proliferation and migration. *Surgery* **146**, 5-11 (2009).
- 58 Frentsch, M. *et al.* Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat. Med.* **11**, 1118-1124 (2005).
- 59 Bartek, J., Bartkova, J. & Lukas, J. The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 805-814 (1996).
- 60 Petkova, V. *et al.* Interaction between YY1 and the retinoblastoma protein. Regulation of cell cycle progression in differentiated cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 7932-7936 (2001).
- 61 Espeillac, C. *et al.* S6 kinase 1 is required for rapamycin-sensitive liver proliferation after mouse hepatectomy. *J. Clin. Invest.* **121**, 2821-2832 (2011).
- 62 Fischbein, M. P. *et al.* CD8+ lymphocytes augment chronic rejection in a MHC class II mismatched model. *Transplantation* **71**, 1146-1153 (2001).
- 63 Mach, F. *et al.* Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40

- signalling. *Nature* **394**, 200-203 (1998).
- 64 Win, T. S. *et al.* Donor CD4 T cells contribute to cardiac allograft vasculopathy by providing help for autoantibody production. *Circ. Heart Fail.* **2**, 361-369 (2009).
- 65 Furukawa, Y. *et al.* Wild-type but not interferon-gamma-deficient T cells induce graft arterial disease in the absence of B cells. *Cardiovasc. Res.* **63**, 347-356 (2004).
- 66 Hu, X. & Ivashkiv, L. B. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity* **31**, 539-550 (2009).
- 67 Gajewski, T. F. & Fitch, F. W. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J. Immunol.* **140**, 4245-4252 (1988).
- 68 Nathan, C. F., Murray, H. W., Wiebe, M. E. & Rubin, B. Y. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* **158**, 670-689 (1983).
- 69 Hansson, G. K. *et al.* Gamma-interferon regulates vascular smooth muscle proliferation and Ia antigen expression in vivo and in vitro. *Circ. Res.* **63**, 712-719 (1988).
- 70 Braun, M., Pietsch, P., Felix, S. B. & Baumann, G. Modulation of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 on human coronary smooth muscle cells by cytokines. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**, 2571-2579 (1995).
- 71 Isobe, M., Yagita, H., Okumura, K. & Ihara, A. Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science* **255**, 1125-1127 (1992).
- 72 Orosz, C. G. *et al.* Treatment with anti-vascular cell adhesion molecule 1 monoclonal antibody induces long-term murine cardiac allograft acceptance. *Transplantation* **56**, 453-460 (1993).
- 73 Nozaki, T. *et al.* CCR5 is required for regulation of alloreactive T-cell responses to single class II MHC-mismatched murine cardiac grafts. *Am. J. Transplant.* **9**, 2251-2261 (2009).
- 74 Sakaguchi, S. & Sakaguchi, N. Organ-specific autoimmune disease induced

- in mice by elimination of T cell subsets. V. Neonatal administration of cyclosporin A causes autoimmune disease. *J. Immunol.* **142**, 471-480 (1989).
- 75 Sakaguchi, S. *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155**, 1151-1164 (1995).
- 76 Sakaguchi, S. *et al.* Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* **182**, 18-32 (2001).
- 77 Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 330-336 (2003).
- 78 Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061 (2003).
- 79 Warnecke, G., Bushell, A., Nadig, S. N. & Wood, K. J. Regulation of transplant arteriosclerosis by CD25+CD4+ T cells generated to alloantigen in vivo. *Transplantation* **83**, 1459-1465 (2007).
- 80 Nadig, S. N. *et al.* In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo-expanded human regulatory T cells. *Nat. Med.* **16**, 809-813 (2010).
- 81 Kibbe, M., Billiar, T. & Tzeng, E. Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. *Cardiovasc. Res.* **43**, 650-657 (1999).
- 82 Koskinen, P. K., Kovanen, P. T., Lindstedt, K. A. & Lemstrom, K. B. Mast cells in acute and chronic rejection of rat cardiac allografts--a major source of basic fibroblast growth factor. *Transplantation* **71**, 1741-1747 (2001).
- 83 Tiriveedhi, V., Angaswamy, N., Weber, J. & Mohanakumar, T. Lipid raft facilitated ligation of K-alpha1-tubulin by specific antibodies on epithelial cells: Role in pathogenesis of chronic rejection following human lung transplantation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **399**, 251-255 (2010).
- 84 Hansson, G. K. *et al.* Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. *J. Exp. Med.* **170**, 1595-1608 (1989).
- 85 Mulhaupt, F. *et al.* Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) reduce CD40 expression in human vascular cells. *Cardiovasc. Res.* **59**, 755-766 (2003).
- 86 Peng, Y. D. *et al.* The role of RANTES as a crucial downstream cytokine in

- calcineurin-dependent VSMC apoptosis stimulated by INFgamma and CD40L. *Cell Biol. Int.* **34**, 447-453 (2010).
- 87 Wang, X. *et al.* Interferon-inducible protein-10 involves vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and inflammatory response. *J. Biol. Chem.* **271**, 24286-24293 (1996).
- 88 Sriram, V. & Patterson, C. Cell cycle in vasculoproliferative diseases: potential interventions and routes of delivery. *Circulation* **103**, 2414-2419 (2001).
- 89 Nomiya, T. *et al.* Deficiency of the NR4A neuron-derived orphan receptor-1 attenuates neointima formation after vascular injury. *Circulation* **119**, 577-586 (2009).
- 90 Diehl, J. A., Zindy, F. & Sherr, C. J. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* **11**, 957-972 (1997).
- 91 Braun-Dullaeus, R. C., Mann, M. J. & Dzau, V. J. Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease. *Circulation* **98**, 82-89 (1998).
- 92 Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F. & Sherr, C. J. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* **12**, 3499-3511 (1998).
- 93 Pai, S. Y., Calvo, V., Wood, M. & Bierer, B. E. Cross-linking CD28 leads to activation of 70-kDa S6 kinase. *Eur. J. Immunol.* **24**, 2364-2368 (1994).
- 94 Giasson, E. & Meloche, S. Role of p70 S6 protein kinase in angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 5225-5231 (1995).
- 95 Cross, D. A. *et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785-789 (1995).
- 96 Marx, S. O., Jayaraman, T., Go, L. O. & Marks, A. R. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **76**, 412-417 (1995).
- 97 Treinies, I. *et al.* Activated MEK stimulates expression of AP-1 components independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal To stimulate DNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 321-329 (1999).
- 98 Liang, J. & Slingerland, J. M. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt)

- pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* **2**, 339-345 (2003).
- 99 Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471-484 (2006).
- 100 Moon, S. K. *et al.* Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 1069-1078 (2003).
- 101 Lee, J. Y. *et al.* A novel function of benzyl isothiocyanate in vascular smooth muscle cells: the role of ERK1/2, cell cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9. *J. Cell. Physiol.* **203**, 493-500 (2005).
- 102 Moon, S. K. *et al.* PDTC, metal chelating compound, induces G1 phase cell cycle arrest in vascular smooth muscle cells through inducing p21Cip1 expression: involvement of p38 mitogen activated protein kinase. *J. Cell. Physiol.* **198**, 310-323 (2004).