



Title	同種異系脾島移植におけるc-Fos/Activator protein-1阻害による免疫抑制効果に関する研究
Author(s)	吉田, 雅
Description	配架番号 : 2193
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11963号
Issue Date	2015-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11963
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60058
Type	doctoral thesis
File Information	Tadashi_Yoshida.pdf



学 位 論 文

同種異系膵島移植における c-Fos/Activator protein-1 阻害による免疫抑制
効果に関する研究

(Studies on Immunosuppressive Effect of c-Fos/Activator Protein-1
Inhibition on Allogeneic Pancreatic Islet Transplantation)

2015 年 9 月

北 海 道 大 学

吉 田 雅
Yoshida Tadashi

学 位 論 文

同種異系膵島移植における c-Fos/Activator protein-1 阻害による免疫抑制
効果に関する研究

(Studies on Immunosuppressive Effect of c-Fos/Activator Protein-1
Inhibition on Allogeneic Pancreatic Islet Transplantation)

2015 年 9 月

北 海 道 大 学

吉 田 雅
Yoshida Tadashi

目 次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・	1 頁
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	2 頁
略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	11 頁
実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	13 頁
実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	39 頁
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	58 頁
総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	63 頁
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	64 頁
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	65 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. Tadashi Yoshida, Kenichiro Yamashita, Masaaki Watanabe, Yasuyuki Koshizuka, Daisuke Kuraya, Masaomi Ogura, Yoh Asahi, Hitoshi Ono, Shin Emoto, Tatsuzo Mizukami, Nozomi Kobayashi, Susumu Shibasaki, Utano Tomaru, Hirofumi Kamachi, Michiaki Matsushita, Shunichi Shiozawa, Shuichi Hirono, and Satoru Todo. The Impact of c-Fos/Activator Protein-1 Inhibition on Allogeneic Pancreatic Islet Transplantation. *American Journal of Transplantation*. DOI: 10.1111/ajt.13338 (2015 in press).

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. Tadashi Yoshida, Kenichiro Yamashita, Masaaki Watanabe, Yasuyuki Koshizuka, Daisuke Kuraya, Masaomi Ogura, Ryoichi Goto, Kenji Wakayama, Susumu Shibasaki, Masaaki Zaitzu, Yusuke Tsunetoshi, Rumi Igarashi, Hirofumi Kamachi, Michitaka Ozaki, Michiaki Matsushita, Shunichi Shiozawa, Shuichi Hirono, and Satoru Todo. Immunosuppressive Effect of T-5224, a Novel AP-1 Inhibitor, on Allogeneic Islet Transplantation in Mice. American Transplant Congress, April 30- May 4, 2011, Philadelphia, U.S.A.

2. 吉田雅, 山下健一郎, 渡辺正明, 腰塚靖之, 蔵谷大輔, 小倉正臣, 後藤了一, 若山顕治, 柴崎晋, 蒲池浩文, 尾崎倫孝, 松下通明, 藤堂省. マウス膵島移植における新規 AP-1 阻害剤 T-5224 の免疫抑制効果. 第 111 回日本外科学会定期学術集会. 2011 年. (東日本大震災の為) 紙上開催.

3. 吉田雅, 山下健一郎, 渡辺正明, 腰塚靖之, 蔵谷大輔, 小倉正臣, 後藤了一, 若山顕治, 柴崎晋, 財津雅昭, 常俊雄介, 蒲池浩文, 尾崎倫孝, 松下通明, 塩沢俊一, 広野修一, 藤堂省. マウス膵島移植における新規 AP-1 阻害剤 T-5224 の免疫抑制効果. 第 38 回膵・膵島移植研究会. 2011 年 3 月 5 日, 奈良市.

緒言

《糖尿病》

糖尿病は、インスリンの分泌能、動態異常から生じる慢性的な高血糖状態に特徴づけられる代謝性疾患である。食生活や生活環境の変化に伴い、発展途上国を中心とした糖尿病患者数の増加が顕著であり、2000年現在、世界の糖尿病人口は約1億7100万人と推計され、2030年には3億6600万人へ達すると予想されている¹。糖尿病は、自己免疫疾患である1型と生活習慣などによる耐糖能障害を背景とした2型に分類される。糖尿病の大部分は、2型糖尿病であり、1型糖尿病の罹患数は全世界で約1800万人と推計される²。また、本邦における1型糖尿病の罹患数は不明であるが、0-14歳の人口10万人当たりの年間発症数は2.37人(1998-2001年)と報告される³。

1型糖尿病の多くは小児期に発症するが、成人発症例も少数ながら存在する。自己免疫学的機序により、T細胞が膵ランゲルハンス島β細胞を破壊すると考えられており、その原因として Human Leukocyte Antigen 型やウイルス感染症などの環境因子などの種々の誘因が考えられているが、解明されていない点も数多く存在する^{3,4}。1型糖尿病を発症すると、インスリンの分泌不全が終生持続する為、インスリン投与による厳格な血糖コントロールが生涯にわたって重要であるが⁵、インスリン投与による低血糖発作、神経症、腎症、網膜症、心血管障害といった糖尿病性合併症を発症することが1型糖尿病患者の社会生活の上で大きな支障となっている。

《糖尿病の歴史》

糖尿病の歴史は17世紀まで遡る。1674年、Thomas Willisによって、「甘い尿をもった病期」として発見され、Diabetes-mellitus と命名された。一方で、1889年に Mering, Minkowski らによって、膵臓を摘出したイヌが重度の糖尿病を発症したことから、初めて膵臓と糖尿病の関連が報告された⁶。その知見を基に、1894年に William らは、重度の糖尿病である15歳の少年の皮下にスライスした羊の膵臓を移植した。少年は数日間血糖値が改善したが、その後全身状態が悪化して死亡した⁷。1924年には、Pybus らによって、スライスしたヒト(死体)の膵臓を皮下へ移植する同種移植を複数回施行した症例が報告されたが、数年後に患者の症状は術前と同様に悪化したと記載されている⁸。1922年、

Banting と Best らによってインスリンが発見され、糖尿病患者に対する合成インスリン療法が開始された⁹。この発見により、糖尿病患者の血糖コントロールの手段を得られたが、糖尿病の根治的治療とはならない為、合併症の併発を完全に抑制するには至らなかった。

糖尿病に対する移植医療としては、1924 年の Pybus らの死体ドナーからの膵臓移植が最初に報告されたが⁸、有効な免疫抑制療法が無かった為に、グラフトは拒絶され、患者は術前と同様に悪化した。1963 年に Murray らによって、腎移植における azathioprine を用いた新たな免疫抑制療法が報告されて¹⁰ から、臓器移植医療が広がり、1966 年に Minnesota 大学で初の膵臓移植(whole pancreas transplantation)が施行された¹¹。しかしながら、当時の膵臓移植は合併症、死亡率が高く、グラフト生着期間も短く、施行数も非常に少なかった為、より低侵襲な治療法が模索されるようになった¹²。

《膵島移植の歴史》

1965 年に Moskalewski らは、ブタ(guinea pig)からコラゲナーゼによる膵臓消化法によって、膵島を分離することに成功した¹³。その後、Lacy と Kostianovski によって、ラットの主膵管へコラゲナーゼを注入し、大量の膵島を単離する方法が報告された¹⁴。これにより、rodent model を用いた膵島移植モデルが確立され、Ballinger と Lacy らによって、膵島移植が糖尿病治療法の一つになり得ることが報告された^{15,16}。そして、1977 年にヒトに対する初めての同種膵島移植が Minnesota 大学で行われ¹⁷、膵島移植は糖尿病による合併症を予防できる有用な手段であると考えられた¹⁸。しかしながら、当時の方法では、膵島の収量や純度、活性度が悪く、インスリン離脱は実現出来なかった。その後、膵島単離法の改良がなされ、1988 年に Ricordi らによって、オートメーション化したヒトの膵島単離装置が開発され¹⁹、飛躍的に膵島単離・純化技術が向上した。これは、コラゲナーゼを主膵管内へ注入し、膵臓消化後に比重遠心分離で膵島を閉鎖回路内で回収する方法であり、Ricordi 法と呼ばれた。Ricordi 法は、臨床でのヒトの膵島分離にも応用され、初めてのヒトでのインスリン離脱症例が報告された^{20,21}。

膵島移植に対する免疫抑制療法は、1970 年代は azathioprine と steroid が中心であったが、インスリン離脱を達成することは出来なかった。Giessen のグループは免疫抑制剤として steroid と azathioprine, cyclosporine A を用い、更に周術期に抗胸腺グロブリンとインスリンを

併用することで、移植患者の 30%でインスリン離脱を達成した^{22,23}。また、Milan のグループは、腎移植後の膵島移植において、35%のインスリン離脱を達成し²⁴、世界的にも種々の免疫抑制療法が発表された。1998 年から 2000 年にかけて、cyclosporine A, mycophenolate mofetil, steroid による併用療法に、basiliximab を導入療法に用いる新しいプロトコルが報告された。これは、抗 interleukin (IL)-2 レセプターへのモノクローナル抗体を膵島移植に初めて用いた方法であった^{25,26}。これらの報告で代表される様に、1990 年代には、steroid, cyclosporine A の併用療法が主流であった。

しかしながら、1990 年代までにヒトに対する膵島移植が 400 例以上施行されたが、その移植成績は満足得られるものでは無かった。1999 年の International Islet Transplant Registry によれば、1990 年以降に行われた 267 例の同種膵島移植の中で、7 日間以上のインスリン離脱を達成したのは 12.4%であり、1 年以上では僅か 8.2%であった²⁷。また、インスリン離脱を達成する為には、①膵臓保存時間は 8 時間以内、②移植される膵島総量は、6000 islet equivalents (IEQ)/ kg/ body weight (BW) (1 IEQ = 150-200 μ m)^{28,29}以上に設定、③経門脈的に肝内へ移植、④モノクローナル、或いはポリクローナル T 細胞抗体を免疫抑制誘導に用いることが重要とされたが²⁷、膵島グラフトの質・収量、拒絶反応などの問題点が浮き彫りとなった。これらの問題点を解決すべく、膵島移植の大きな転換点となったのが Edmonton Protocol である³⁰。

《Edmonton Protocol》

Edmonton Protocol とは、2000 年に Shapiro らによって Canada の Alberta 大学から発表され、膵島移植の成績を劇的に改善させたプロトコルである³⁰。Edmonton Protocol の要旨は、以下の通りである。①免疫抑制療法には、Sirolimus (a mammalian target of rapamycin inhibitor)、低用量の Tacrolimus [nuclear factor of activated T cells (NFAT) inhibitor] を維持療法に、Daclizumab [anti-cluster of differentiation (CD)25 monoclonal antibody (mAb)] を導入療法に使用する。また、steroid は使用しない。②質が高く、(複数のドナーから)十分量の膵島(10000 IEQ/kg/BW 以上)を移植する。③レシピエントは、腎機能が正常でインスリン必要量が少ない(0.7 Units/ kg/ BW 以下)1 型糖尿病患者とする³⁰。この方法を 7 人の 1 型糖尿病患者に適用し、1 年後のインスリン離脱率 100%を達成した。そもそも、膵島移植のグラフ

ト不全の原因としては、移植部位（肝臓）における炎症反応、拒絶反応、免疫抑制剤によるβ細胞毒性などが考えられている³¹。Edmonton Protocol では、エンドトキシン量の少ないコラゲナーゼを使用し、可及的速やかに膵島単離を行い、平均 800000 IEQ の膵島グラフトを経門脈的に肝内へ移植することによって、これらの諸問題を解決した。

《Edmonton Protocol 後の成績》

Edmonton Protocol の発表後、Immune Tolerance Network を介して、9 施設 (University of Alberta, Edmonton; University of Minnesota, Minneapolis; University of Miami, Miami; University of Washington, Seattle; Washington University, St. Louis; Harvard University, Boston; University of Geneva, Geneva; Justus-Liebig University, Giessen; and University of Milan, Milan) 共同による Edmonton Protocol の追加試験が行われた。36 例の 1 型糖尿病患者に膵島移植が行われたが、1 年後のインスリン離脱率は 44%にとどまり、施設毎の移植経験の差によって移植成績に多大な差が生じた³²。また、2005 年の Ryan らによる追加報告によると、Alberta 大学の Edmonton Protocol による膵島移植後のインスリン離脱率は、術後 1 年目では約 80%に上るものの、術後 5 年目には約 10%まで低下してしまうことが判明した³³。その原因は様々であるが、代表的なものとしては Sirolimus の膵島グラフトへの毒性や膵島の生着・血管新生に対する阻害作用³⁴、Tacrolimus の糖尿病誘発性³⁵などが挙げられる。その後、Collaborative Islet Transplant Registry による 1999-2010 年までの膵島移植 677 例の多施設共同研究が施行された。同報告では、T-cell depleting antibody, anti-tumor necrosis factor (TNF)-α inhibitor, mammalian target of a rapamycin inhibitor, inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor, calcineurin inhibitor 等の新規免疫抑制療法・抗炎症療法が導入された。その結果、2007-2010 年の間に施行された 208 例では、移植 3 年後のインスリン離脱率が 44%まで改善したと報告される³⁶。しかしながら、現在の膵島移植では複数ドナー、複数回移植などに代表される様に、医療資源を多用しているにも関わらず、膵臓移植と比較しても長期成績が十分とは言えない^{32,33,37}。移植成績を向上させる為には、移植膵島の有効性・グラフト生着率・膵島機能の保存効果の改善、効果的な免疫抑制療法の導入などが重要と考えられており³³、膵島移植が 1 型糖尿病の根治的治療法となる為には、種々の課題が山積している。

《拒絶反応》

同種同系以外のドナーの臓器をレシピエントへ移植すると拒絶反応が惹起される．臓器移植後の拒絶反応は，超急性拒絶反応，急性拒絶反応，慢性拒絶反応に大別される．本研究では，T 細胞を中心とした細胞性免疫が主因となる急性拒絶反応について考察する．

《細胞性免疫》

T 細胞は，細胞表面に CD4 及び CD8 という T 細胞特異的蛋白質を発現する．骨髓内で造血幹細胞から派生した pro-T 細胞(CD4⁺CD8⁻)は胸腺へ移動する．pro-T 細胞は，胸腺内に強く発現する IL-7 と c-kit ligand に反応して増殖し，early activation marker の代表である CD25 を発現する³⁸．また，pro-T 細胞の T cell receptor (TCR) β 遺伝子の再構築・発現が生じるが，この時点では α 鎖は発現しておらず，成熟 T 細胞内の $\alpha\beta$ 型 TCR はまだ発現されていない．この様な， β 鎖のみの TCR を pre-TCR 複合体と呼ぶ³⁸．細胞表面に pre-TCR 複合体が発現すると，ligand 刺激が無くても TCR α 鎖遺伝子の再構築，CD4/CD8 分子の発現が惹起され，pro-T 細胞は，成熟 T 細胞型 $\alpha\beta$ 型 TCR を細胞表面に発現した pre-T 細胞(CD4⁺CD8⁺)へ分化する³⁹．pre-T 細胞の TCR $\alpha\beta$ 分子が major histocompatibility complex (MHC) class I, II 分子と相互作用すると，胸腺内での positive selection が惹起され，成熟した T 細胞(CD4⁺CD8⁻ helper T 細胞，或いは CD4⁺CD8⁺細胞障害性 T 細胞)へ変化する⁴⁰．この過程には，Th-POK⁴¹，Runx⁴²と呼ばれる転写因子がそれぞれ，helper T 細胞，細胞障害性 T 細胞への分化に重要な役割を果たすことが報告されている．

胸腺から末梢血中に移動した naïve T 細胞(抗原刺激を受ける前の成熟 T 細胞)は，リンパ節へと移入(homing)することで，免疫応答に関わることとなる⁴³．体内に侵入したタンパク質抗原は，樹状細胞に代表される抗原提示細胞(antigen presenting cell; APC)によって捕捉され，リンパ節や脾臓へ輸送される．そこで，naïve T 細胞は抗原を認識し，抗原-MHC 複合体を形成し，末梢リンパ組織において活性化される⁴⁴．その結果，抗原特異的リンパ球の増加と effector 及び memory T 細胞への分化が惹起される．CD4⁺ effector T 細胞は，マクロファージや B 細胞の MHC class II 分子と結合し，サイトカインを分泌することで，マクロファージを活性化させ，B 細胞分化を誘導し，抗体産生にも寄与している．また，CD8⁺ effector T 細胞(細胞障害性 T 細胞)は，MHC class

I 分子を発現する感染細胞や腫瘍細胞を傷害する。一方、memory T 細胞は、T 細胞が抗原特異的に拡大した細胞集団であり、抗原と接触後早急に effector T 細胞を誘導することによって、抗原を排除する役割を持つ⁴⁵。TCR による、抗原-MHC 複合体の認識は、T 細胞活性化の初期シグナルとなり、その後の T 細胞免疫応答を誘導するが、そのみでは、T 細胞の十分な活性化(full activation)は得られない。T 細胞の活性化には、CD28 などの副刺激経路(second signal)や APC や T 細胞自身によって産生される IL-2 等のサイトカインの関与が必要である⁴⁶。

《T 細胞におけるシグナル伝達》

TCR/CD3 複合体に抗原刺激が樹状細胞などの APC によって提示されることにより、抗原特異的なクローン性増殖と分化が誘導され、更に副刺激経路からの刺激が追加され、T 細胞が活性化する⁴⁶。TCR が抗原-MHC 複合体を認識すると数分から数時間以内に、シグナル伝達経路が活性化し、CD4, CD8 受容体や、CD2, CD28 などの副刺激経路を介し、インテグリンなどが誘導され、細胞周期が G0 から G1 期へ移行して細胞増殖が開始される。一旦このリンパ球幼若化反応が惹起されると、T 細胞と抗原-APC 複合体との結合が強化され、免疫学的シナプスと呼ばれる細胞膜分子と TCR との複合体が蓄積していく⁴⁷⁻⁴⁹。CD3 と TCR ζ 鎖の細胞質内タンパク質には、immunoglobulin receptor family tyrosine-based activation motifs (ITAM)と呼ばれる 9 個の保存ペプチド配列が存在する。ITAM は、Lck (Src family)によってリン酸化され、Syk family (tyrosine kinase)を介して、ZAP-70 と呼ばれる tyrosine kinase の結合部位となる⁵⁰。ZAP-70 は、TCR ζ 鎖のリン酸化チロシンと結合し、Linker of activation of T cells や Growth factor receptor-binding protein 2 等の adaptor protein をリン酸化して、tyrosine kinase を介したシグナル伝達に必要不可欠な役割を持つ。

TCR によって調節される tyrosine kinase は種々のものがあるが、最も代表的であるのが phospholipase (PL) C γ 1 である。PLC γ 1 は、phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate を加水分解することにより、inositol 1,4,5-trisphosphate や diacylglycerol (DAG)を産生する。その結果、T 細胞内のカルシウムイオン(Ca²⁺)濃度や protein kinase C isozyme である serine/threonine kinase family を調節することが可能となる⁵¹。その結果、細胞内 Ca²⁺濃度が上昇し、calcineurin protein phosphatase の活性が高まり、NFAT の脱リン酸化や核内移行が促進

される⁵².

また、免疫学的シナプ스에隣接した DAG と Ca^{2+} が蓄積すると、Ras-GRP guanine nucleotide binding protein である p21ras を活性化させるカスケードが惹起される⁵³. Ras 分子は選択的にグアノシン三リン酸(guanosine triphosphate; GTP)へ結合し、Raf-1 (serine/threonine kinase)を介して下流の extracellular signal-regulated kinase (ERK), mitogen-activated protein kinases (MAPK), MEK (MAPK/ERK) 1, を活性化させる⁵⁴. p21ras-GTP 複合体活性化の程度は、GTP の加水分解などの要因によって規定される. p21^{ras} の活性化は、p120-GAP や neurofibromin などの GTPase activating protein によって調整される. TCR からの p21^{ras} へのシグナル伝達は、Sos に代表される guanine nucleotide exchange protein が重要な役割を果たしており^{55,56}, p21^{ras} から核へのシグナル伝達は、ERK1, ERK2 といった MAPK によって調整される⁵⁷.

他のシグナル伝達経路として重要なのは、CD28 を介した副刺激経路である. リガンドである B7-1 と B7-2 が CD28 と結合すると、TCR からの刺激と共同で T 細胞の活性化を促進させる.

その結果、Rac/Rat GTP cascade や PLC cascade の活性化によって、activator protein-1 (AP-1), nuclear factor κ B (NF κ B), NFAT 等に代表とされる転写因子の転写が開始される⁵⁸.

《AP-1》

AP-1 は、1987 年に Angel らや Lee らによって転写因子として初めて同定されたが^{59,60}, その構成要素を含んだレトロウイルスの同族体は、より以前にも報告されていた⁶¹. その後、AP-1 に関して種々の報告がされているが、その生物学的特性や生理学的特徴は解明されていない点も多い.

AP-1 は様々な細胞に発現している転写因子の一つであり、TREs (phorbol 12-O-tetradecanoate-13-acetate response elements)として知られる AP-1 site を含んだ遺伝子の活動をコントロールしている. AP-1 は growth factor⁶², oncoprotein⁶³, proinflammatory cytokine^{64,65}, ultra violet radiation⁶⁶ などの種々の刺激によって活性化される. 構造としては、basic region-leucine zipper (bZIP) protein の homo-dimer か hetero-dimer で形成される. bZIP protein は、主に Fos family (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2), Jun family (c-Jun, JunB, JunD), activating

transcriptional factor (ATFa, ATF-2, ATF-3)や Jun dimerization partners (JDP1, JDP2)などの subfamily に分類される^{63,67-70}. AP-1 の subunit の中でも, c-Fos, c-Jun, FosB の転写活性は強力であるが, JunB, JunD, Fra-1, Fra-2 は弱く, それらの組み合わせによっては二量体の機能が異なる. 通常, AP-1 は転写を促進する因子として機能するが, 一定の環境下では, 抑制因子として機能する場合もあると報告される⁷¹. Jun protein は安定した homo-dimer を形成し, DNA 認識部位である TREs に結合して, 転写誘導を調節する⁵⁹. 一方で, Fos protein は安定した homo-dimer を形成する事が出来ないものの, Jun protein と hetero-dimer を形成して DNA に結合する事が可能であり, その hetero-dimer は Jun-Jun dimer よりも強固な結合力を有するだけでなく, 複合体の半減期も長い⁷². 一方, ATF protein は Jun protein との hetero-dimer を形成し, cAMP 反応部位に結合する. すると c-Jun が最も強い活性を発揮し, Jun protein の DNA 結合親和性や転写促進能力が大きく変化する⁷³. 反対に, JunB と hetero-dimer を形成すると, 転写活性を抑制する性質を有するようになる事が知られている⁷⁴. この様に種々の subunit の組み合わせによって性質が変化する事が AP-1 の特徴である. そして, AP-1 はリン酸化されることによって活性化し, 様々な細胞外刺激を受容し, 転写活性を調節するようになると考えられている⁷⁵. その結果, AP-1 は種々の細胞増殖, アポトーシス, 炎症, 創傷治癒, 腫瘍形成能などに関与している. IL-2^{76,77}, IL-4⁷⁸, IL-10⁷⁷, IL-13⁷⁹, IL-17⁸⁰, interferon (IFN)- γ ⁷⁷ などの転写が促進される事が報告されており, AP-1 が自然免疫に関わっている事が示唆されている.

《AP-1 阻害と免疫抑制》

AP-1 は, 慢性関節リウマチ^{79,81,82}, 乾癬⁸², 強皮症⁸³ の様な自己免疫炎症性疾患の病勢, 敗血症時の腎機能障害⁸⁴, 肝機能障害⁸⁵ 等に関与していることが報告されているが, 移植後免疫に関する報告はほとんど無い^{86,87}. T 細胞の刺激経路において, AP-1 の下流には, 細胞性免疫における重要なサイトカインである IL-2 が存在している事が知られている⁷⁷. この事実から, AP-1 を阻害すると免疫抑制効果が発揮される事が予想される.

T-5224, 3-{5-[4-(Cyclopentyloxy)-2-hydroxybenzoyl]-2-[(3-hydroxy-1,2-benzisoxazol-6-yl) methoxy]phenyl}propionic acid, は富山化学工業株式会社で開発された新規選択的 AP-1 阻害剤である⁷⁹.

T-5224 は、AP-1-DNA 複合体の結晶構造に基づいた三次元活性基モデルを使用して、設計・合成され、AP-1 以外の転写因子に影響を及ぼすことなく、c-Fos/c-Jun の DNA 結合活性を選択的に阻害する⁷⁹。

選択的 AP-1 阻害剤 T-5224 は、慢性関節リウマチ⁷⁹、強皮症⁸³、腎障害⁸⁴、肝障害⁸⁵、において抗炎症作用を示すことが報告されてきた。しかしながら、T-5224 が T 細胞の機能抑制効果を有するか、移植モデルにおいて免疫抑制効果を有するか否かは、現時点では不明である。

《本研究の目的》

本研究では、新規 c-Fos/AP-1 阻害剤 T-5224 の T 細胞機能抑制効果、並びにマウス同種異系膵島移植モデルにおける免疫抑制効果の有無について検討した。

《本研究の結論》

新規 AP-1 阻害剤 T-5224 は、c-Fos/AP-1 DNA 結合能を阻害することによって T 細胞機能を抑制し、マウス同種異系膵島移植モデルにおいて、アログラフト生着期間を延長させた。また、NFAT 阻害薬 Tacrolimus との併用により、更に強力な免疫抑制効果を発揮した。本研究によって、膵島移植における c-Fos/AP-1 阻害という新たな免疫抑制療法の可能性が示唆された。

略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである.

APC	antigen presenting cell
AP-1	activator protein-1
ATF	activating transcriptional factor
AUC	area under the curve
BW	body weight
bZIP	basic region-leucine zipper
B6	C57BL/6J (H-2 ^b)
CD	cluster of differentiation
DAG	diacylglycerol
dH ₂ O	distilled H ₂ O
DM	diabetes mellitus
DMSO	dimethyl sulfoxide
ELISpot	enzyme-linked immuospot
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FBS	fetal bovine serum
GTP	guanosine triphosphate
HANKS	Hanks' Balanced Salts
H-E	hematoxylin-eosin
HMGB	high mobility group box
HPBCD	2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin
IEQ	islet equivalent
IFN	interferon
IL	interleukin
IPGTT	intraperitoneal glucose tolerance test
ITAM	immunoglobulin receptor family tyrosine-based activation motifs
LPS	lipopolysaccharide
mAb	monoclonal antibody
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MEK	MAPK/ERK
MHC	major histocompatibility complex

MLR	mixed lymphocyte reaction
MST	median survival time
MTS	methyl tetrazolium salt
MTT	methyl thiazolyl tetrazolium
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NF κ B	nuclear factor κ B
OCT	optimal cutting temperature
PBS	phosphate buffered saline
p-c-Jun	phosphorylated-c-Jun
PL	phospholipase
PM	perfect medium
POD	post-operative day
PVP	Polyvinylpyrrolidone
q-PCR	quantitative-polymerase chain reaction
RPM	round per minute
STZ	Streptozotocin
TCR	T cell receptor
Th	helper T
TNF	tumor necrosis factor
TRE	phorbol 12-O-tetradecanoate-13-acetate response elements

実験方法

本研究の実験計画書は、「北海道大学動物実験に関する規定」に則って承認され、同規定に従って施行された。

1) 動物

オスの C57BL/6J (B6: H-2^b) と BALB/c (H-2^d) マウスを第 7～9 週令で日本エスエルシー株式会社 (静岡) より購入し、北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設内で、病原体より隔離された状態で管理した。

2) *In vivo* experiments

① 脾島単離法

(a) 単離前に以下の薬品を調剤する。

準備：

- Hanks' Balanced Salts (HANKS) 原末 (#H1387, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 8.4% メイロン (#873929, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. Tokyo)
- Collagenase type-2 (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA)
- Conray-400 (#010158, Daiichi Sankyo, Tokyo)
- Ficoll® PM-400 40 g (#F4375, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Phenol red (#P5530, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kanamycin (Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Tokyo)
- RPMI-1640 (#R8758, Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- Fetal bovine serum (FBS; #10099-141, Life Technologies Japan, Tokyo)
- Penicillin 100 Units/mL + Streptomycin 100 µg/mL (#P4333, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Amphotericin B 0.25 µg/mL (#A2942, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

手順：

- HANKS 溶液

HANKS 原末 1 V を distilled H₂O (dH₂O) 1000 mL 内に溶解し、オートクレーブ(2 時間, 2 atm, 121°C)で加熱滅菌後, 8.4% メイロン 4.2 mL を追加し, 4°C 冷暗所で保存.

- 0.2%コラゲナーゼ溶液(2 mg/mL)

Collagenase type-2 80 mg + HANKS 溶液 40 mL を混合し, -80°C で保存. 使用する直前に, 37°C の water bath 内で溶解する.

- Ficoll-Conray 液

500 ml ビーカー内に dH₂O 250mL + 10% ブドウ糖溶液 4.8 mL + Conray-400 80 mL を注ぎ、stirrer bar にて攪拌する. そこへ、Ficoll[®] PM-400 40 g を少量ずつ添加し、更に攪拌を続ける. アルミホイルでフタをし、6~8 時間 stirrer bar にて攪拌. 溶媒が十分に溶解した後、溶液総量が 480 mL となる様に dH₂O を追加する(メスシリンダーで計測).十分に攪拌後、比重が 1.095 g/cm³となる様に、dH₂O を添加して微調整する. 溶液をオートクレーブ(2 時間, 2 atm, 121°C)で滅菌し、常温まで冷却後、phenol red 4.8 mL, kanamycin 4.8 mL を添加する. 蒸発による溶液量の減少がある為、総量がオートクレーブ前と同様になる様に dH₂O を追加する. 最後に、8.4%メイロン 2.2 mL を添加して、攪拌し、4°C 冷暗所にて保存する(比重遠心溶液 A と呼ぶ).

- 比重遠心溶液

比重遠心溶液 A と dH₂O を以下の如く混合し、4°C 冷暗所で保存.

A 液:比重遠心溶液 A 原液 (比重 1.095 g/cm³)

B 液:比重遠心溶液 A 35 mL + dH₂O 5 mL (比重 1.084 g/cm³)

C 液:比重遠心溶液 A 30 mL + dH₂O 10 mL (比重 1.072 g/cm³)

D 液:比重遠心溶液 A 20 mL + dH₂O 20 mL (比重 1.048 g/cm³)

- FBS の非動化
凍結されていた FBS を常温で溶解させる． Water bath 内で 56°C, 30 分間静置し，非動化する．その後，分注して-20°C で保存する．
- RPMI-1640 溶液
4°C で保存した RPMI-1640 を室温へ戻す． -20°C で保存した非動化 FBS 50 mL, 抗生剤混合液 5 mL (penicillin 100 Units/mL, streptomycin 100 µg/mL, amphotericin B 0.25 µg/mL) を 37°C water bath 内で溶解する． RPMI-1640 500 mL + 非動化 FBS 50 mL + 抗生剤混合液 5 mL を十分に攪拌し，4°C 冷暗所で保存する．

(b) 臍島単離

準備：

- BALB/c (H-2^d)マウス
- 30-gauge 針(#305107, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lake, NJ, USA)
- PE10 catheter (#42701, Becton Dickinson and Company, Franklin Lake, NJ, USA)
- 0.2% collagenase 溶液 [2)①(a)で作成]
- non-treated dish (#353003, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)
- HANKS 溶液 [2)①(a)で作成]
- 15 mL Falcon tube (#352096, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)
- 比重遠心用液 A, B, C, D [2)①(a)で作成]
- 35 mm dish (#1000-035, IWAKI, Tokyo)

手順：

ドナーマウス BALB/c (H-2^d)から採取された臍島は，24 時間インキュベーター内で培養させる為，臍島単離は移植 24 時間前に行う．ドナーである BALB/c (H-2^d)マウスの頸椎を脱臼し，安楽死させる．

頭側が手前になるように仰臥位で静置し、腹部へ 70%エタノールを噴霧して消毒する。腹部正中切開＋両側肋弓下切開にて開腹し、輪ゴムで上肢と胸部を固定する。小腸と大腸を左側、肝を頭側へ展開する。十二指腸の Vater 乳頭を同定し、モスキートペアンを用いてクランプする。モスキートペアンを尾側に牽引し、総胆管にテンションをかける。顕微鏡下(倍率:×40)に総胆管周囲の結合組織を剥離後、30-gauge 針を用いて総胆管前壁に切開を入れる。PE-10 catheter を総胆管へ逆行性にカニューレーションし、予めシリンジ内に用意した 0.2% collagenase 溶液を約 2 mL 総胆管から主膵管へ向かって注入する。この際、モスキートペアンによる Vater 乳頭のクランプが不十分であると、主膵管へ注入されない。膵の膨隆を確認してから、膵を腸管・脾臓から剥離し、氷上の non-treated dish 上に留置。この作業を 20 分以内に 4 匹分繰り返す。4 匹分終了後、加湿されたインキュベーター内(37°C, 5% CO₂)へ静置する。

20 分後、インキュベーターから取り出し、4°C HANKS 溶液約 4 mL を振りかけて、collagenase を不活性化させる。15 mL Falcon tube へ dish 内容に移し、約 150 回程度ピペティングして攪拌。次に、遠心分離[1400 round per minite (rpm) × 1 分間, 4°C]を行う。上清を破棄し、HANKS 溶液を 2 mL 注ぎ、ピペティングする。ビーカーに茶漉しを乗せ、茶漉しで組織を濾過する。この際、茶漉しやビーカー壁に付着した組織に HANKS 溶液を振りかけて、余分な組織以外をビーカー内に回収する。再度、遠心分離(1400 rpm × 1 分間, 4°C)。パスツールピペットで上清を吸引し、HANKS 溶液を 4 mL 程度追加して pellet を十分に攪拌。更に HANKS 溶液を追加して溶液が約 15 mL 程度になったら遠心分離(1400 rpm × 1 分間, 4°C)。これを 2 回繰り返す。遠心分離後、パスツールピペットで上清を pellet 限界まで吸引する。比重遠心用 A 液を 4 mL、同じピペットに注ぎ、pellet が無くなるまで Vortex Mixer にて必要十分に攪拌。B 液 2 mL, C 液 2 mL, D 液 2 mL の順に、ピペットを壁に密着させて回転させながら、層を破壊しないように慎重に注ぎ、比重遠心分離 (2200 rpm × 10 分間, 4°C)。C と D 層の間に膵島が存在する為、D 層全体を採取する程度に CD 層間の細胞塊を採取する。細胞塊を懸濁するように HANKS 溶液を追加し、遠心分離(1400 rpm × 1 分間, 4°C)。上清を吸引し、再度 HANKS 溶液で攪拌後、遠心分離(1400 rpm × 1 分間, 4°C)する。上清を pellet 限界まで吸引後、RPMI-1640 溶液を pellet と混合する。全体を吸引

し、35 mm dish 上へ静置。培地内には、膵島以外に aciner cell 等の不純物が混合している為、顕微鏡下（倍率: ×40）に不純物を handpick で除去しつつ、RPMI-1640 溶液を追加する。RPMI-1640 溶液内がほぼ膵島のみになったら(purity > 90%), インキュベーター内(37°C, 5 % CO₂)へ静置し、24 時間培養する。

② 糖尿病誘導法

実験動物を糖尿病化させる方法は、膵臓全摘と Streptozotocin (STZ) 投与による膵β細胞の破壊の 2 通りがある。カニクイザル(*Macaca fascicularis*)^{88,89} やアカゲザル(*Macaca mulatta*)⁹⁰ などの霊長類を糖尿病化させる場合には、膵臓全摘を行うこともある。しかしながら、マウスの場合は個体が非常に小さく、総胆管を温存しながら膵臓全摘を行うことは非常に困難である。その為、STZ 投与法が用いられることが多い。STZ は、*Streptomyces achromogenes* を培養することから分離され、元来抗腫瘍効果を持つ抗生物質として開発された⁹¹。膵β細胞破壊作用があることから、膵島腫瘍等の治療に用いられたが⁹²、近年では実験動物の糖尿病誘導目的に使用される⁹³⁻⁹⁶。マウスを用いた膵島移植実験においても STZ は多用されているが、STZ 投与量や投与後の移植待機日数などは報告によって異なる⁹⁷⁻⁹⁹。北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I では、本論文と同一の方法、即ち STZ 180 mg/kg BW を腹腔内投与し、投与 5 日後に膵島移植を施行するモデルを用いた研究報告があり^{94,95}、同方法による実験を施行した。

準備：

- ・ B6 (H-2^b)マウス
- ・ STZ 原末(#S0130, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ・ クエン酸三ナトリウム(#S4641-25G, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ・ クエン酸一水和物(#09106-02, Nacalai Tesque, Kyoto)
- ・ Accu-check active II blood glucose measuring instrument (Roche Diagnostics K. K., Tokyo)
- ・ 手術道具一式

(a) STZ 溶液作成法

STZ 原末は冷暗所(-20℃)に保存する．使用する直前，常温へ約 10 分間静置する．クエン酸三ナトリウム (14.78 mg/mL)，クエン酸一水和物 (9.55 mg/mL)を dH₂O と混和させ，Vortex Mixer にて十分に攪拌する．その後，マウスへ投与する直前に STZ 原末を 8 mg/mL とする様に追加し，優しく攪拌する．

例：dH₂O 5 mL + クエン酸三ナトリウム 73.9 mg + クエン酸一水和物 47.8 mg + STZ 40 mg

(b) 糖尿病誘導の実際

レシピエントとなる B6 マウスの体重を予め測定する．STZ 投与による脱水（多尿による）や移植の侵襲に耐えられるべく，体重概ね 25～30 g の個体を選別する．

移植 5 日前に STZ 180 mg/kg BW を腹腔内投与する．

STZ 投与後のマウスは，概ね投与 2 日後頃から多飲多尿となる．その為，十分量の水分を与えることと，cage 内チップを頻繁に交換することが重要である（多尿によってチップが濡れ，マウスの体温が低下する為）．

Accu-check active II blood glucose measuring instrument を用いて，B6 マウスの尾静脈より採取した血液で血糖を測定する．移植前日と移植当日(STZ 投与 4・5 日後)の随時血糖がいずれも 450 mg/dL 以上であった個体を糖尿病化されたと定義し，レシピエントとして使用する．

③ 膵島移植法

マウスを用いた膵島移植モデルには，経門脈的に肝内へ移植する（門注）モデル⁹⁵と腎被膜下へ移植する（腎被膜下）モデル^{100,101}の 2 種類がある．門注モデルは腎被膜下モデルに比較すると技術的には困難を伴うが，臨床の膵島移植は門脈内投与で施行されており，可能な限り臨床に則した実験を行うという趣旨で，本研究においても門注モデルを採用した．

準備：

- ・ RPMI-1640 溶液 [2①(a)で作成]

- 35 mm dish (#1000-035, IWAKI, Tokyo)
- Eppendorf AG safe lock tube 1.5 mL (#0030 120.086, Eppendorf, Tokyo)
- Low binding pipette (#15281T-1, Nippon Genetics, Tokyo)
- 27-gauge 翼状針付チューブ(#SV-27DL, Terumo, Tokyo)
- ネンブタール注射液(pentobarbital sodium; #116-01051-1, Dainippon Sumitomo Pharma, Osaka)
- キムワイプ S-200 (Crecia, Tokyo)
- Hamilton syringe (1725LT 250ul SYR)
- 手術器具一式
- Glucose 原末(#G5767, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

手順：

(a) 膵島の準備

移植前日に単離された膵島をインキュベーターから取り出し、顕微鏡下（倍率: $\times 40$ ）に膵島の状態を確認する。形状の悪化した膵島は除去し、直径約 150~200 μm で球状の膵島を移植に使用する。

Eppendorf tube 内に HANKS 溶液 300 μL を予め入れておき、100 μL ピペットを用いて、膵島(200, 300, 400, 500, 600 個)を Eppendorf tube 内へ注入する。Low binding pipette を用いて、膵島を HANKS 溶液 100 μL と共に 27-gauge 翼状針付チューブ内に充填し、Hamilton syringe を装着する。

(b) 膵島移植術

STZ で糖尿病を誘導したレシピエント B6 マウスへ、0.5%ネンブタール溶液(dH_2O で希釈)を 50 mg/kg BW となる様に腹腔内投与して麻酔する。仰臥位とし、腹部へ 70%エタノールを噴霧して消毒し、正中切開で開腹する。左側腹部に生理食塩水で湿らせたキムワイプ S-200 を留置し、マウスの腸管をキムワイプ S-200 上に脱転させ、門脈を十分に露出させる。膵島を注入した翼状針を膵上縁付近の門脈へ穿刺し、膵島を経門脈的に肝内へ移植する。この際、針内に膵島が遺残する可能性がある為、門脈血を少量逆流させて flush する。Air が門脈内へ多量に注入されると、肝梗塞によって死亡することがある為十分に留意する。予め準備した綿球で刺入点を圧迫し、約 2 分後に

解除する．3分以上圧迫すると，死亡する危険性が高まる為，十分に注意する．止血を確認後，腸管を静かに腹腔内へ還納し，4-0 ナイロン糸で2層に連続縫合して閉腹する．術後，マウスは容易に低体温で死亡する為，覚醒するまでは十分に保温する．最後に，翼状針内に残存した膵島をカウントし，実際に移植された膵島数を計算する．

(c) 術後管理

マウスには，十分な食餌と水分が常時摂取可能な状況を提供する．術後随時血糖は，以下の如く毎日午前中に測定する．

Post-operative day (POD) 1～7: 毎日

POD 8以降：週3回

なお，拒絶反応が疑われる状況になった場合は，毎日測定とする．

(d) グラフト生着と拒絶の定義

膵島グラフトの生着と拒絶を以下の通り定義する．

生着：随時血糖が2日間連続で200 mg/dL以下となった場合

拒絶：随時血糖が2日間連続で350 mg/dL以上となった場合

(e) 長期グラフト生着症例のグラフト機能評価

長期グラフト生着症例の耐糖能を評価する目的で，POD 60に経腹膜的ブドウ糖負荷試験(intraperitoneal glucose tolerance test: IPGTT)を行う．

イ) レシピエントマウス、naïve B6 マウス, 糖尿病化マウス[diabetes mellitus (DM) control]を6時間絶食とする．

ロ) ブドウ糖原末と dH₂O を混合し，10%ブドウ糖溶液を作成する．

ハ) 10%ブドウ糖溶液を2 g/kg BW となる様に腹腔内投与する．

ニ) 以下の通り，血糖を測定する．

ブドウ糖投与直前，ブドウ糖投与後30分，60分，90分，120分，180分．

ホ) IPGTT に要する9時間(ブドウ糖投与前後)内は，水分の摂取は制限しない．

④ 薬剤作製法

本研究(*in vivo*)で、マウスに投与する薬剤は以下の通りである.

- T-5224:
3-[5-[4-(Cyclopentyloxy)-2-hydroxybenzoyl]-2-[(3-hydroxy-1,2-benzisoxazol-6-yl) methoxy]phenyl]propionic acid)
- PVP : Polyvinylpyrrolidone
- HPBCD: 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin
- Tacrolimus powder (20% granulated formula) : FK506 (Astellas Inc.,Tokyo)

T-5224, PVP, HPBCD は、富山化学工業株式会社より無償で提供を受けた.

(a) 経口投与用 T-5224 投与液調製法(50, 100 mg/kg BW モデル)

準備 :

- T-5224
- PVP
- 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液
- dH₂O

手順 :

- イ) 秤量した T-5224 (0.30 g)を 50 mL Falcon tube に入れる.
 - ロ) 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を 2.4 mL 添加し, 溶解させる.
 - ハ) dH₂O を約 20 mL 添加し, 軽く攪拌する.
- ニ) 秤量した PVP (0.90 g)を添加し, 溶解させる.
 - ホ) dH₂O を加えて 30 mL にメスアップする.

調製後の投与液の保存 : 室温・遮光保存. 調製後 10 日以内に使用.

(b) 経口投与用 T-5224 投与液調製法(250, 500 mg/kg BW モデル)

準備 :

- T-5224
- PVP

- 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液
- dH₂O

手順：

- イ) 秤量した T-5224 (1.5 g)を 50 mL Falcon tube に入れる.
- ロ) 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を 12 mL 添加し，溶解させる.
- ハ) dH₂O を約 10 mL 添加し，軽く攪拌する.
- ニ) 秤量した PVP (4.5 g)を添加し，溶解させる.
- ホ) 遠心(1500 rpm × 30 秒間, 4°C)で，消泡させる.
- ヘ) dH₂O を加えて 30 mL にメスアップする.

調製後の投与液の保存：室温・遮光保存．調製後 10 日以内に使用．

(c) 経口投与用 PVP 投与液調製法

準備：

- PVP
- 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液
- dH₂O

手順：

- イ) PVP を秤量し，ファルコンチューブ(50 mL)に入れる.
- ロ) dH₂O を約 20 mL 添加し，溶解させる.
- ハ) 遠心(1500 rpm × 30 秒間, 4°C)し，消泡させる.
- ニ) 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を 0.4 mL 加える.
- ホ) dH₂O を添加して 30 mL にメスアップする.

調製後の投与液の保存：室温・遮光保存．調製後 10 日以内に使用．

(d) Tacrolimus (FK506)投与調製法

準備：

- Tacrolimus (20% granulated formula, Astellas Inc., Tokyo)
- dH₂O

手順：

- イ) Tacrolimus powder 7.5 mg を秤量し，15 mL Falcon tube へ入れる．
- ロ) dH₂O 10 mL を追加し，攪拌する．

調製後の投与液の保存：常温・遮光保存．調製後 4 日以内に使用．析出しやすい為，使用前には Vortex Mixer にて十分に攪拌する．

⑤ 薬剤投与法

T-5224, PVP : POD 0 (移植直後)から POD 14 までの期間，1 日 1 回毎日午前中に経口ゾンデを用いてマウスの胃内へ強制的に経口投与する．ただし，POD 0 は移植後，完全覚醒が得られた後に投与する．

Tacrolimus : POD 4 から POD 17 までの期間，1 日 1 回毎日午前中にマウスへ腹腔内投与する．

・ T-5224 投与群 (50 mg/kg BW, 100 mg/kg BW)

2)④(a)作製液(T-5224 10 mg/mL)を用いて，レシピエント B6 マウスの胃内へ投与する．

・ T-5224 投与群 (250 mg/kg BW, 500 mg/kg BW)

2)④(b)作製液(T-5224 50 mg/mL)を用いて，レシピエント B6 マウスの胃内へ投与する．本投与量については，毒性試験として naïve B6 マウスへ 14 日間 1 日 1 回投与を行い，随時血糖値・体重を毎日測定．また，14 日目に犠牲死させ，解剖を行って感染症や悪性腫瘍の有無を確認した．

・ PVP 投与群

2)④(c)作製液(PVP 150 mg/mL)を用いて，レシピエント B6 マウスの胃内へ投与する．T-5224 500 mg/kg BW 群と同量の PVP を投与する．

・ Tacrolimus 投与群(1.0 mg/kg BW)

2)④(d)作製液を用いて，レシピエント B6 マウスの腹腔内へ投与する．

⑥ レシピエントマウスの免疫学的機能評価

同種異系膵島移植後の B6 レシピエントマウスにおける免疫学的機能評価を行う。POD 10 に B6 レシピエントマウス[Control (PVP)群, T-5224 500 mg/kg 群], naïve B6 マウスを頸椎脱臼によって犠牲死させる。

以下の protocol に基づいて実施する。

検討項目

- ・ Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)
- ・ IFN- γ Enzyme-linked immuospot (ELISpot) assay
- ・ 病理組織学的検索(Hematoxylin-Eosin; H-E, anti-mouse CD4/CD8 mAb 染色)

POD 9 (犠牲死前日)

準備：

- ・ 10× Phosphate buffered saline (PBS) (#D1408, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ・ Water (#W3500, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ・ Purified anti mouse-IFN- γ capture antibody 1.0 mg/mL (#551881, BD Biosciences, San Diego, CA, USA)
- ・ ELISpot plate (#S2EM004M99, Merck Millipore, Billerica, MA, USA)

手順：

- イ) 1× PBS を作製。
 - ロ) 10× PBS を Water で 10 倍希釈。
 - ハ) Purified anti mouse-IFN- γ capture antibody 1.0 mg/mL を 1× PBS で 200 倍希釈。ELISpot plate へ 100 μ L/well ずつ播種し、4°C で 24 時間静置。
- ニ) 犠牲死 12 時間前に、Control, T-5224 群マウスへそれぞれ、PVP, T-5224 を投与。

POD 10-1 (犠牲死当日)

準備：

- RPMI-1640 溶液[2]①(a)で作製]
- 2-Mercaptoethanol (#19-1335, KATAYAMA CHEMICAL INDUSTRIES, OSAKA)

手順：

イ) Perfect Medium (PM)の作製

RPMI-1640 溶液 50ml + 50 mM 2-Mercaptoethanol 5 μ L を Voltex Mixer で攪拌.

ロ) 細胞播種 2 時間前に, ELISpot plate の coating antibody を破棄し, PM 200 μ L/well 加え, 1 回清潔操作で破棄. 再度 PM 200 μ L/well を入れて室温, 遮光にて 2 時間静置.

POD 10-2

準備：

(a) 動物

- Responder: (600 個臍島移植後: 10 POD)
Naïve B6 マウス
Control 群 B6 マウス
T-5224 (500 mg/kg BW) 群 B6 マウス
- Stimulator:
Naïve BALB/c マウス

(b) 準備物品

- non-treated dish (#353003, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA).
- Falcon 70 μ m cell strainer (#352350, BD Biosciences, San Diego, CA, USA).
- 15mL Falcon tube (#352096, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA).
- 50ml Falcon tube (#352070, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA).
- 肝臓保存用ホルマリン.
- 肝臓保存用 Optimal cutting temperature (OCT) compound.

- 液体窒素.
- HANKS (#H8264, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- ACK lysing buffer (#10-548E, Lonza, Walkersville, ML, USA).
- 1×PBS [2)⑥POD9 作成].
- PM [2)⑥POD10-1 作成].
- Water (#W3500, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- 0.05% Tween20 (#P5927-100ML, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- 1 mL 注射シリンジ(#SS-01ESZ, Terumo, Tokyo).
- 96-well round-bottom plate (#351177, BD Biosciences, San Diego, CA, USA).
- ELISPOT set (Mouse IFN- γ , #551083, BD Biosciences, San Diego, CA).
- ^3H -thymidine (MP Biomedical Inc., Irvine, CA, USA).

手順：

- イ) Responder, stimulator マウスの頸椎を脱臼させ、犠牲死させる。
脾臓を摘出し、氷上の滅菌シャーレに乗せる。レシピエント B6 マウスの肝臓を摘出し、分割してホルマリン、OCT compound へ保存。OCT compound は液体窒素で凍結させた後、 -80°C で保存。
- ロ) 氷上で脾臓を 1 mL 注射シリンジを用いて磨り潰し、HANKS 10 mL と共に 2～3 回 cell strainer で濾過後、15 mL Falcon tube へ回収。
- ハ) 遠心分離(1200 rpm × 5 分間, 4°C)。
- ニ) 上清を吸引。ACK lysing buffer 1 mL 注入し、攪拌。氷上で 3 分間静置後、HANKS 9 mL 追加。
- ホ) 遠心分離(1200 rpm × 5 分間, 4°C)。
- ヘ) 上清を吸引。PM 10 mL を加えて攪拌。浮遊物があれば、70 μm cell strainer にて濾過。
- ト) stimulator (BALB/c)に対し、氷上冷却のまま放射線照射(30 Gy)。
放射線照射条件：管電圧 150 kV, 管電流 20 mA, 焦点-テーブル面距離 450 mm, 遮断版 (0.1Cu、0.5Al)。
- チ) 遠心分離(1200 rpm × 5 分間, 4°C)。
- リ) PM を 10 mL 加えてピペッティング。

- ヌ) Cell Count. 5×10^6 cells/ml に濃度調整. Stimulator は, 10×10^6 cells/ml に調整.
- ル) 96-well round-bottom plate, ELISpot plate の各々へ
Stimulator → Responder の順に各 100 μ L/well ずつ播種. (いずれも triplicate で播種)
- ヲ) ELISpot plate, MLR plate はインキュベーター内(37°C, 5% CO₂)へ静置.

	Stimulator (cells/well)	Responder (cells/well)
ELISpot	1×10^6	5×10^5
MLR	5×10^5	5×10^5

- ・ ELISpot assay: 2)⑥POD10-2 手順ヲ)から 24 時間培養後
 - a) ELISpot plate の液を捨てて water 200 μ L/well で 2 回洗浄. (洗浄中 3~5 分静置し, 十分浸す)
 - b) Wash Buffer-1 (1×PBS+0.05%Tween20) 200 μ L/well で 3 回洗浄.
 - c) Dilution Buffer で 250 倍希釈した IFN- γ Dilute Detection Antibody を 100 μ L/well 追加.
 - d) カバーを閉めて 2 時間室温で静置.
 - e) Detection Antibody solution を破棄, 200 μ L/well の Wash buffer-1 で 3 回洗浄
 - f) HRP Steptavidin 抗体液を Dilution buffer で 100 倍希釈し, 100 μ L/well 播種.
 - g) カバーを閉めて 1 時間室温で静置.
 - h) 反応液を破棄し, Wash Buffer-1 200 μ L/well にて 4 回洗浄.
 - i) Wash Buffer-2 200 μ L/well にて 2 回洗浄.
 - j) Final substrate solution を 100 μ L/well ずつ播種し, スポットが確認できたら water を 100 μ L/well 加えて反応を停止させる. その後すぐに, 反応液を破棄し, water 200 μ L/well を加え, 完全に反応を停止.
 - k) 反応液を捨て, 遮光して室温で 2 時間乾燥.
 - l) スポット数を KS ELISPOT system にてカウント(Carl Zeiss,

Jena, Germany).

・ MLR: 2)⑥POD10-2 手順ヲ)から 48 時間培養後

- a) Harvest の 8 時間前 (つまり, 40 時間培養の時点) に, PM 24 μ L + 3 H-thymidine 1 μ L (1 μ Ci/well)を各 well へ追加播種.
- b) 更に 8 時間インキュベーター内で培養(37°C, 5% CO₂).
- c) counter (PerkinElmer, Boston, MA)にて CPM をカウント.

POD 10-3

手順 :

- イ) 凍結保存した肝臓切片は, 札幌総合病理研究所にて, H-E 染色を施行し, 膵島グラフトを確認.
- ロ) 連続切片を anti-CD4 mAb (GK1.5: Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA), anti-CD8 mAb (KT15: Chemicon International, Temecula, CA, USA)にて免疫染色施行 (avidin-biotin complex method)¹⁰².
- ハ) 膵島グラフト中のリンパ球浸潤を観察(倍率 400 倍).

⑦ 長期生着グラフトの確認

STZ 誘導糖尿病モデルでは, レシピエントマウスの膵臓中に残存した β 細胞が再生することにより, あたかも移植膵島グラフトが機能しているかの様に正常血糖が持続することが有り得る¹⁰³. その為, 長期グラフト生着モデルのマウスを犠牲死させ, 肝臓内のグラフト機能を免疫組織学的染色法を用いて評価した.

手順 :

- イ) 膵島 300 個を移植し, T-5224 と Tacrolimus の併用療法で長期グラフト生着したレシピエント B6 マウスを POD 82 に犠牲死させ, 肝臓をホルマリン溶液に保存.
- ロ) インスリン, シナプトフィジン染色を行い, 肝内のグラフトを観察.
- ハ) Control として, グラフト生着が得られなかったレシピエント B6 マウスを POD 14 に犠牲死させ, 同様の方法で肝内のグラフトを観察.
- ニ) T-5224 と Tacrolimus の併用療法で一旦血糖正常化したものの,

POD 14 にグラフトが拒絶されたレシピエント B6 マウスを同日犠牲死させ、同様の方法で肝内のグラフトを観察.

⑧ 毒性試験

準備 :

- ・ naïve B6 マウス
- ・ T-5224 (経口用)

手順 :

- イ) naïve B6 マウスへ, T-5224 経口用製剤(250, 500 mg/kg BW)を 1 日 1 回 14 日間経口投与する.
- ロ) 毎日随時血糖値と体重を測定する.
- ハ) 14 日目に犠牲死させ, 解剖を行い, 感染症や悪性腫瘍の発生の有無について検討を行う.

3) *In vitro* experiments

① MLR

準備 :

- ・ non-treated dish (#353003, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA).
- ・ Falcon 70 µm cell strainer (#352350, BD Biosciences, San Diego, CA, USA).
- ・ 15ml Falcon tube (#352096, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA).
- ・ HANKS (#H8264, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- ・ ACK lysing buffer (#10-548E, Lonza, Walkersville, ML, USA).
- ・ PM [2)⑥POD10-1 作成].
- ・ Dimethyl sulfoxide (DMSO; #D2650, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ・ T-5224 原末
- ・ 1 mL 注射シリンジ(#SS-01ESZ, Terumo, Tokyo)
- ・ 96-well round-bottom plate (#351177, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)

手順：

- イ) naïve BALB/c マウス, B6 マウスを用いる.
- ロ) 手技は 2)⑥POD10-2 イ)-リ)に準じる(肝臓は摘出しない).
- ハ) 96-well round-bottom plate へ, stimulator (BALB/c), responder (B6)脾細胞を 5×10^5 cells/well/50 μ L ずつ播種.
- ニ) 0.3% DMSO を control として用いるため, 予め PM で希釈した 0.6% DMSO を作成.
- ホ) 0.6% DMSO へ各濃度調整した T-5224 原末を溶解させる.
- ヘ) ハ)項の plate へ 0.6% DMSO, T-5224 (最終濃度 20, 40, 60, 80 μ g/mL)を 100 μ L/well ずつ播種.
- ト) インキュベーター(37°C, 5% CO₂)内に 72 時間静置.
- チ) Harvest の 8 時間前 (つまり, 64 時間培養の時点) に, PM 24 μ L + ³H-thymidine 1 μ L (1 μ Ci/well)を各 well へ追加播種.
- リ) 更に 8 時間インキュベーター内で培養(37°C, 5% CO₂).
- ヌ) counter (PerkinElmer, Boston, MA)にて CPM をカウント.

② T 細胞増殖能 (Purified T cell proliferation assay)

準備：

- non-treated dish (#353003, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA).
- Falcon 70 μ m cell strainer (#352350, BD Biosciences, San Diego, CA, USA).
- 15ml Falcon tube (#352096, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA).
- HANKS (#H8264, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- ACK lysing buffer (#10-548E, Lonza, Walkersville, ML, USA).
- Water (#W3500, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- PM [2)⑥POD10-1 作製].
- DMSO (#D2650, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- T-5224 原末
- mAb against mouse CD3 (145-2C11, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)
- mAb against mouse CD28 (37.51, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)
- 1 mL 注射シリンジ(#SS-01ESZ, Terumo, Tokyo)

- 96-well flat-bottom plate (#351172, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Mouse T cell Enrichment Columns (#MTCC-500/525, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

手順：

- イ) anti-CD3 mAb の pre-coating を T 細胞抽出の 24 時間前に行う。
96-well flat-bottom plate に 10 $\mu\text{g/mL}$ に調整した anti-CD3 mAb (1 $\times$ PBS で希釈)を 40 $\mu\text{L/well}$ で播種し、4 $^{\circ}\text{C}$ 冷暗所で 24 時間静置。
- ロ) naïve B6 マウス用いる。
- ハ) 手技は 2)⑥POD10-2 イ)-へ)に準じる(肝臓は摘出しない)。
- ニ) 1 $\times$ column wash buffer 1 mL (10 $\times$ buffer を water で 10 倍希釈)に脾細胞を懸濁させ、70 μm cell strainer にて濾過。この後、1 $\times$ column wash buffer 2 mL で共洗いし、cell strainer にて濾過。
- ホ) Mouse T Cell Enrich Column を通過させ、T 細胞を抽出し、15 mL Falcon tube に回収。
- ヘ) 遠心分離(1200 rpm $\times$ 5 分間, 4 $^{\circ}\text{C}$)。
- ト) 細胞 pellet を PM に溶解させ、 10×10^6 cells/mL に細胞調整。
- チ) anti-CD3 mAb が pre-coating された 96-well flat-bottom plate へ 5×10^5 cells/50 $\mu\text{L/well}$ + PM 40 $\mu\text{L/well}$ ずつ播種。
- リ) 各濃度に調整した T-5224, DMSO を 100 $\mu\text{L/well}$ ずつ播種。方法は、3)①ニ)-へ)に準じる。
- ヌ) anti-CD28 mAb (最終濃度 1 $\mu\text{g/mL}$ となる様 PM で希釈)を 10 $\mu\text{L/well}$ ずつ播種。
- ル) インキュベーター(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2)内に 48 時間静置。
- ヲ) F-2)⑥POD 10-2 ヨ)に準じて、CPM をカウント。

③ Early activation marker (CD25)

準備：

- 3)②と同様。
- mAb against mouse PerCP-Cy-5.5-CD4 (#550954, RM4-5) (BD Pharmingen).
- mAb against mouse FITC-CD25 (#553072, 7D4) (BD Pharmingen).

- cell strainer 付 5 mL round tube (#352235, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA).

手順：

- イ) 3)②イ)-ヌ)まで同様.
- ロ) インキュベーター (37°C, 5% CO₂) 内で 12, 24 時間静置.
- ハ) anti-CD28 mAb 刺激 12, 24 時間後, cell strainer 付 5 mL round tube へ細胞を回収.
- ニ) 遠心分離(1200 rpm × 5 分間, 4°C).
- ホ) 上清を破棄.
- ヘ) 抗体を注入. (perCP CD4 1 μL + FITC CD25 1 μL + HANKS 100μL)
- ト) Vortex Mixer で攪拌.
- チ) 4°C, 遮光のまま 20 分間静置.
- リ) HANKS 500 μL 追加.
- ヌ) Vortex Mixer で攪拌.
- ル) 遠心分離(1200 rpm × 5 分間, 4°C).
- ヲ) 上清を破棄し, 2%ホルマリン 200 μL 追加.
- ワ) Vortex Mixer で攪拌し, 4°C, 遮光で保存.
- カ) FACS Calibur (Becton Dickinson, Palo alto, CA, USA)にて測定. CD4 陽性 T 細胞 10000 個中の CD25 発現細胞数を測定.

④ Cytokine production (IL-2, IFN-γ)

準備：

- 3)②と同様.
- Quantikine® Mouse IL-2 Immunoassay (#M2000, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).
- Quantikine® Mouse IFN-γ Immunoassay (#MIF00, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).
- Eppendorf AG safe lock tube 1.5 mL (#0030 120.086, Eppendorf, Tokyo).

手順：

- イ) 3)②イ)-ヌ)まで同様.

- ロ) インキュベーター(37°C, 5% CO₂)内に 48 時間静置.
- ハ) Eppendorf tube に, 上清を採取.
- ニ) Assay kit 付属の 96-well plate に RD1-14 (IFN- γ は RD1-21)を 50 μ L/well 播種.
- ホ) standard, positive control, 検体を 50 μ L/well 播種.
- ヘ) カバーをかけ, 1 分間攪拌後, 2 時間室温に静置.
- ト) well内の反応液を破棄し, 400 μ L/well Wash buffer で5回洗浄.
- チ) mouse IL-2 (IFN- γ) conjugate を 100 μ L/well 播種し, 2 時間室温で静置.
- リ) well内の反応液を破棄し, 400 μ L/well Wash buffer で5回洗浄.
- ヌ) substrate solution を 100 μ L/well 播種し, 30 分間, 遮光のまま室温で静置.
- ル) stop solution を 100 μ L/well 播種し, 攪拌.
- ヲ) 最終反応液の吸光度(波長 450 nm)を Varioskan™ Flash マルチスペクトロマイクロプレートリーダー(Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama)にて測定.

⑤ Quantitative-polymerase chain reaction (q-PCR)

準備 :

- ・ 3)②と同様
- ・ Tacrolimus bulk powder (Astellas Pharma Inc. Tokyo)
- ・ QIAamp® RNA Blood Mini Kit (#52304, Qiagen, Valencia, CA, USA)
- ・ ReverTra Ace kit (#FSK-101, TOYOBO Co., Ltd., Osaka)
- ・ RNase Free DNase set (#79254, Qiagen, Valencia, CA, USA)
- ・ SYBR Premix Ex Taq II (#RR820A, Takara Bio, Ohtsu)
- ・ LightCycler Capillaries (#04929292001, Roche Diagnostics K. K., Tokyo)
- ・ Primer (Web site, Ensembl, [<http://www.ensembl.org/index.html>])のデータベースを用いて設計]

手順 :

- イ) Tacrolimus (bulk powder) 1 mg + 99% ethanol 1 mL を混合し,

- 10 μ L ずつ eppendorf tube へ小分けし, -80°C で保存しておく.
- ロ) イ) で作成した Tacrolimus 溶液(1 mg/mL)を PM で各濃度に溶解.
- ハ) 3)②イ)-チ)まで同様.
- ニ) 各濃度に調整した, T-5224, Tacrolimus, DMSO, PM を 50 μ L ずつ各群に添加.
- ホ) インキュベーター(37°C , 5% CO_2)内で静置.
- ヘ) 6, 12, 18 時間後(本実験は, 12 時間のみ)に plate を取り出し, on ice にて eppendorf tube 内へ T 細胞を回収.
- ト) 遠心分離(10000rpm, 1 分間, 4°C).
- チ) 上清を破棄し, 1 $\times$ PBS 1000 μ L にて十分に洗浄.
- リ) ト), チ)を 2 回繰り返す。
- ヌ) 上清を細胞ペレットぎりぎりまで破棄し, -80°C deep freezer で保管.
- ル) QIAamp® RNA Blood Mini Kit を用いて, T 細胞から RNA を抽出.
- ヲ) ReverTra Ace kit へ oligo (dT) 20 primer を添加して, 1 μ g mRNA を 42°C , 20 分間逆転写.
- ワ) Table 1 の配列の毎く設計した primer と共に SYBR Premix Ex Taq II を用いて q-PCR を行う. PCR サイクルは以下の如く行う.
- IL-2, IL-4, IL-10, IL-13: 95°C 3 分の後, 95°C 20 秒 $\rightarrow$ 60°C 30 秒を 40 サイクル.
- IL-6, IFN- γ , GAPDH: 95°C 3 分の後, 95°C 15 秒 $\rightarrow$ 60°C 20 秒 $\rightarrow$ 72°C 30 秒を 40 サイクル.
- カ) Melting curve analysis を用いて, PCR の特異度をその都度チェック.
- ヨ) データは, Roche LightCycler software を用いて解析.
- タ) 各 mRNA レベルは, GAPDH の発現量を 1 として比をとった.

Gene name	Accession number		Sequence (5' → 3')	Product size (bp)
IL-2	NM_008366	Forward	GAAGATGAACTTGGACCTCTGC	173
		Reverse	TCCACCACAGTTGCTGACTC	
IL-4	NM_021283	Forward	CTCGTCTGTAGGGCTTCCAA	160
		Reverse	TGGACTCATTCATGGTGACG	
IL-6	NM_031168	Forward	CAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG	143
		Reverse	GCCACTCCTTCTGTGACTCC	
IL-10	NM_010548	Forward	CCAAGCCTTATCGGAAATGA	195
		Reverse	TCACTCTTCACCTGCTCCAC	
IL-13	NM_008355	Forward	CAGCATGGTATGGAGTGTGG	181
		Reverse	GTGGGCTACTTCGATTTTGG	
IFN- γ	NM_008337	Forward	ATCTGGAGGAACTGGCAAAA	111
		Reverse	GTTGCTGATGGCCTGATTGT	
GAPDH	NM_008084	Forward	TACACTGAGGACCAGGTTGT	137
		Reverse	CTGTAGCCGTATTCATTGTC	

Table 1. Primers used in q-PCR

文献 104 Supplemental Table S1 より転載¹⁰⁴

⑥ Transcription factor assay

準備：

- 3)②と同様（ただし，T cell enrichment column は 2 本必要）
- 24-well flat-bottom plate (#353047, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)
- 15mL Falcon tube (#352096, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA).
- 50ml Falcon tube (#352070, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA).

- Eppendorf AG safe lock tube 1.5 mL (#0030 120.086, Eppendorf, Tokyo)
- Nuclear Extract kit (#40010, Active Motif, Carlsbad, CA, USA)
- TransAM[®]AP-1 c-Fos (#44096, Active Motif, Carlsbad, CA, USA)
- TransAM[®]AP-1 c-Jun (#46096, Active Motif, Carlsbad, CA, USA)

手順：

- イ) 3)②イ)-ト)まで同様。ただし、 $n = 3$ を作成する為には、マウス 12 匹が必要。その為、plate は 24-well, Falcon tube は 50 mL, T cell enrichment column は 2 本使用する。
- ロ) PM で 10×10^6 cells/mL となる様に細胞濃度調整。
- ハ) 24-well flat-bottom plate へ 4×10^6 cells/400 μ L/well ずつ播種。
- ニ) No treatment 群, Control 群へは 0.6% DMSO 含有 PM 400 μ L/well, T-5224 80 μ g/mL 群へは濃度調整した T-5224 400 μ L/well を追加。(いずれも 0.3% DMSO となる)
- ホ) Control/ T-5224 群へは、最終濃度 1 μ g/mL となる様に濃度調整した anti-CD28 mAb を 40 μ L/well 追加。
- ヘ) インキュベーター (37°C, 5% CO₂) 内で 3 時間静置。
- ト) 細胞を 15 mL Falcon tube へ回収。
- チ) 遠心分離(1200 rpm $\times$ 5 分間, 4°C)。
- リ) 上清を破棄。5% phosphatase inhibitors (Nuclear Extract kit 内の phosphatase inhibitors を 1 $\times$ PBS で 20 倍希釈)を 2 mL/tube 追加し、ピペッティングして攪拌。
- ヌ) 遠心分離(1200 rpm $\times$ 5 分間, 4°C)。
- ル) リ)-ヌ)を 2 回反復後、Eppendorf tube へ回収し、1.4 mL 5% phosphatase inhibitor で攪拌。
- ヲ) 遠心分離(1200 rpm $\times$ 5 分間, 4°C)。
- ワ) 上清を十分にサクション後、-80°C で保存。
- カ) 検体を-20°C で富山化学工業へ送付し、TransAM kit を用いて、c-Fos, phosphorylated-c-Jun (p-c-Jun) DNA binding activity を測定。

⑦ 脾細胞に対する T-5224 毒性試験

MTT (methyl thiazolyl tetrazolium) assay

準備：

- ・ 3)①と同様（ただし，plate は以下の物を用いる）
- ・ 96-well flat-bottom plate (#351172, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)
- ・ MTT 原末(#M5655, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ・ 1×PBS [2)⑥POD9 作製]

手順：

- イ) naïve B6 マウスを用いる.
- ロ) 手技は F-2)⑥POD10-2 イ)-ヌ)に準じる(肝臓は摘出しない)
(BALB/c マウスは用いない).
- ハ) 96-well flat-bottom plate へ，PM 50 μ L/well を播種.
- ニ) 脾細胞を 5×10^5 cells/well/100 μ L ずつ播種.
- ホ) PM に溶解した 0.6% DMSO (最終濃度 0.3%), T-5224 (20, 40, 60, 80, 100 μ g/mL)を 50 μ L/well ずつ播種.
- ヘ) インキュベーター (37°C, 5% CO₂) 内で，6 時間静置.
- ト) 脾細胞を吸わない様に，上清を可及的に吸引.
- チ) 1×PBS に溶解した MTT 溶液(1 mg/mL)を 200 μ L/well ずつ播種.
- リ) インキュベーター (37°C, 5% CO₂) 内で，1 時間静置.
- ヌ) 脾細胞を吸わない様に，上清を可及的に吸引.
- ル) DMSO 原液を 200 μ L/well ずつ播種.
- ヲ) plate のまま，Vortex Mixer にて攪拌.
- ワ) 最終反応液の吸光度(波長 570 nm)を Varioskan™ Flash マルチスペクトロマイクロプレートリーダー(Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama)にて測定.

⑧ 腭島に対する T-5224 毒性試験

MTS (The colorimetric methyl tetrazolium salt) assay

準備：

- ・ 腭島（単離の項に準ずる）
- ・ 96-well flat-bottom plate (#351172, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)
- ・ CellTiter96® AQueous One Solution Reagent (Promega, Madison, WI, USA)

手順：

- イ) 2)①(b)に従い，BALB/c マウスから腭島を単離する．
- ロ) インキュベーター（37°C, 5% CO₂）内で，腭島を 24 時間静置．
- ハ) 直径 150 μm をピペットで採取し，96-well flat-bottom plate へ 30 個/100μL/well ずつ播種．
- ニ) 手順 2)①(a)作製 RPMI-1640 溶液で各濃度に調整した T-5224 (0, 20, 40, 60, 80 μg/mL)を 100 μL/well 追加．
- ホ) CellTiter96® AQueous One Solution Reagent (Promega, Madison, WI, USA)を 40 μL/well ずつ添加．
- ヘ) インキュベーター（37°C, 5% CO₂）内で，2 時間静置．
- ト) Varioskan™ Flash マルチスペクトロマイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama)を用いて，波長 490 nm の吸光度を測定．

4) 統計学的解析

- ・ 測定結果は，平均値 ± 標準誤差（或いは，標準偏差）で標記した．
- ・ グラフト生着曲線は，Kaplan-Meier 法を用いて記載した．
- ・ グラフト生着期間は，log-rank test を用いて，比較検討した．
- ・ 独立した 2 群間の比較検討には，Student's *t*-test を使用した．
- ・ *p* value < 0.05 の場合を統計学的に有意差ありと判定した．
- ・ 全ての統計学的処理は，StatView J-5.0 (Abacus Concept, Berkeley, CA, USA)を用いて計算した．

実験結果

- ① T-5224 は、培養液中濃度 80 $\mu\text{g/mL}$ 以下で B6 マウス由来の脾細胞と単離脾島に対し、毒性を示さなかった。本結果から、マウス脾細胞や脾島を用いた *in vitro* の実験系では、T-5224 濃度を 80 $\mu\text{g/mL}$ 以下で施行する事とした。

【目的】マウス脾細胞、脾島に対する新規 c-Fos/AP-1 阻害剤 T-5224 の薬理作用を検討するにあたり、毒性を呈する濃度を予め測定することは必須事項である。その為、マウス脾細胞への毒性を MTT assay, マウス脾島への毒性を MTS assay を用いて検討した。

【結果】

- (ア) T-5224 は、濃度 80 $\mu\text{g/mL}$ 以下ではマウス脾細胞に対して毒性を示さないことを、MTT assay を用いて確認した。

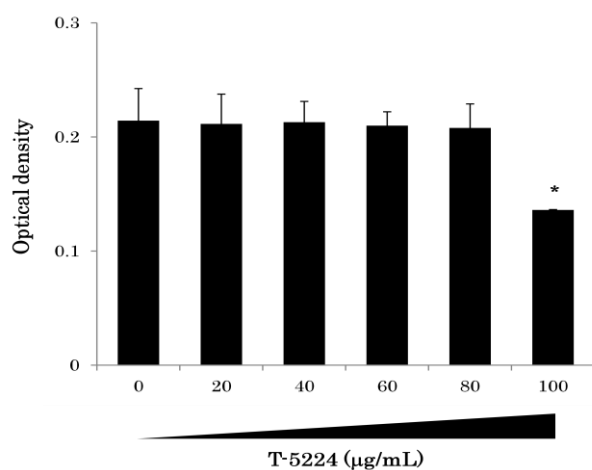
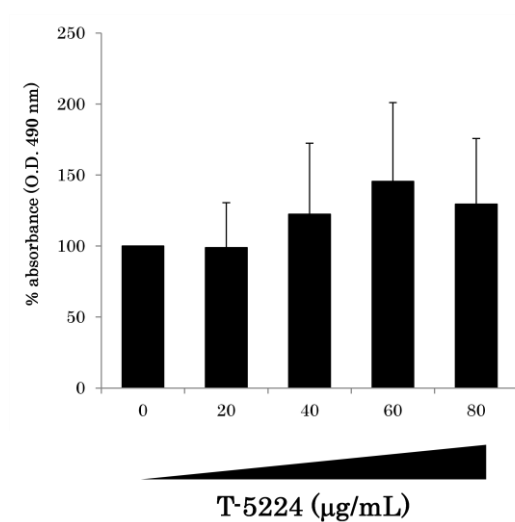


Figure 1

B6 マウス由来の脾細胞を 6 時間 T-5224 と共に培養し、MTT assay を用いて吸光度を測定した。T-5224 濃度 80 $\mu\text{g/mL}$ 以下では、吸光度の低下は認めなかったが、100 $\mu\text{g/mL}$ で control と比して有意に低下した。よって、T-5224 は濃度 80 $\mu\text{g/mL}$ 以下では、脾細胞に対し毒性を有しないと判断した ($n = 3$, *, $p < 0.05$: vs. control)。

(イ) T-5224 は、濃度 80 $\mu\text{g/mL}$ 以下ではマウス脾臓に対して毒性を示さないことを、MTS assay を用いて確認した。



文献 104 Supplemental Figure
S1 より転載

Figure 2

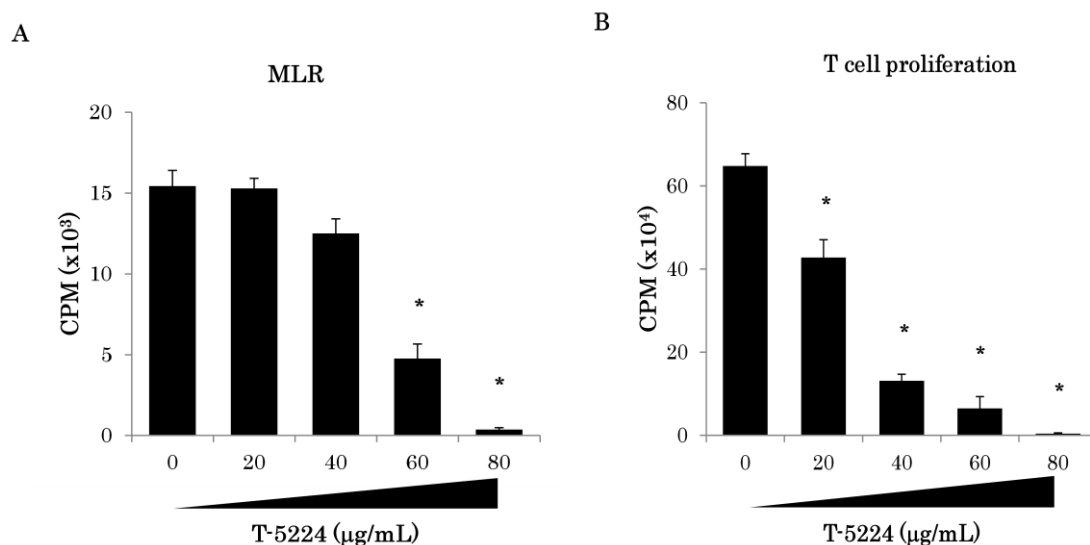
BALB/c マウス由来の単離脾臓 30 個を T-5224 と共に 2 時間培養し、MTS assay を用いて吸光度を測定した。Control と比較し、T-5224 80 $\mu\text{g/mL}$ 以下では、吸光度に有意な変化は認められなかった($n = 6$)。よって、T-5224 は、80 $\mu\text{g/mL}$ 以下において、単離脾臓の viability に毒性を示さないと考えられた¹⁰⁴。

- ② T-5224 は、c-Fos の DNA 結合活性を阻害することで、混合リンパ球反応(MLR), T 細胞増殖能, サイトカイン産生能(IL-2, IFN- γ), early activation marker (CD25) 発現を抑制した.

【目的】 T-5224 は、選択的 c-Fos/AP-1 阻害剤として開発された. AP-1 DNA 複合体の結晶構造に結合する様に三次元構造がデザインされている⁷⁹. T-5224 の T 細胞 (脾細胞) における免疫抑制効果を検討するにあたり, MLR, Purified T cell proliferation, cytokine production (IL-2, IFN- γ), early activation marker (CD25) up-regulation assay を施行した. また, T-5224 の T 細胞における AP-1 阻害作用を確認する目的で, c-Fos, p-c-Jun DNA binding activity 抑制効果も検討した.

【結果】

(ア) T-5224 は、ドナー抗原、或いは抗体刺激によるリンパ球増殖能を濃度依存性に抑制した.



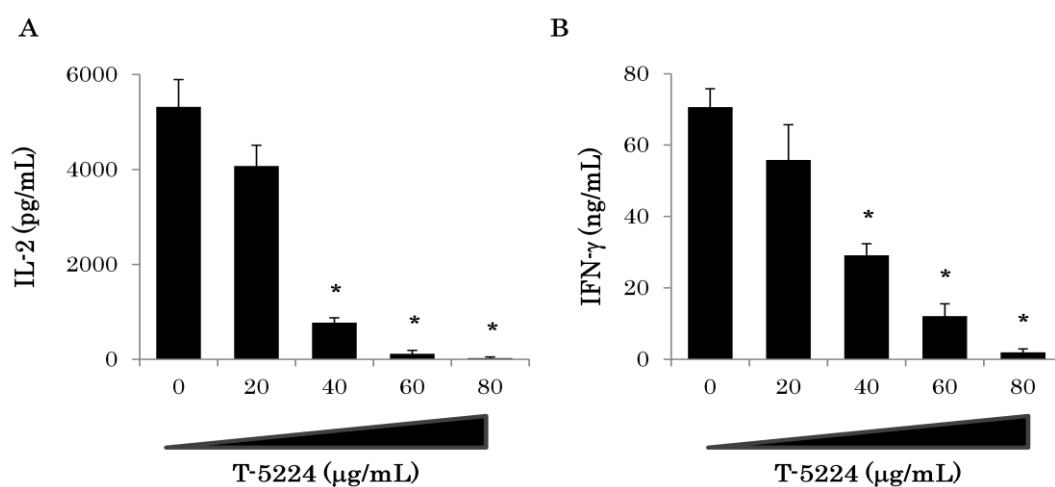
文献 104 Figure 1 から転載

Figure 3

- (A) T-5224 は、放射線照射後の BALB/c 由来脾細胞と 72 時間共培養された B6 由来脾細胞の増殖能を濃度依存性に抑制した ($n = 3$). T-5224 濃度 60 $\mu\text{g/mL}$ 以上で有意な抑制効果を示した (*, $p < 0.05$: vs. control).
- (B) T-5224 は、 $\alpha\text{CD}3 + \alpha\text{CD}28$ mAb にて 48 時間刺激された B6

由来 T 細胞の増殖能を濃度依存性に抑制した ($n = 3$). T-5224 濃度 20 $\mu\text{g/mL}$ 以上で有意であった. (*, $p < 0.05$: vs. control)¹⁰⁴.

(イ) T-5224 は, B6 マウス由来 T 細胞からのサイトカイン(IL-2, IFN- γ) 産生を抑制した.

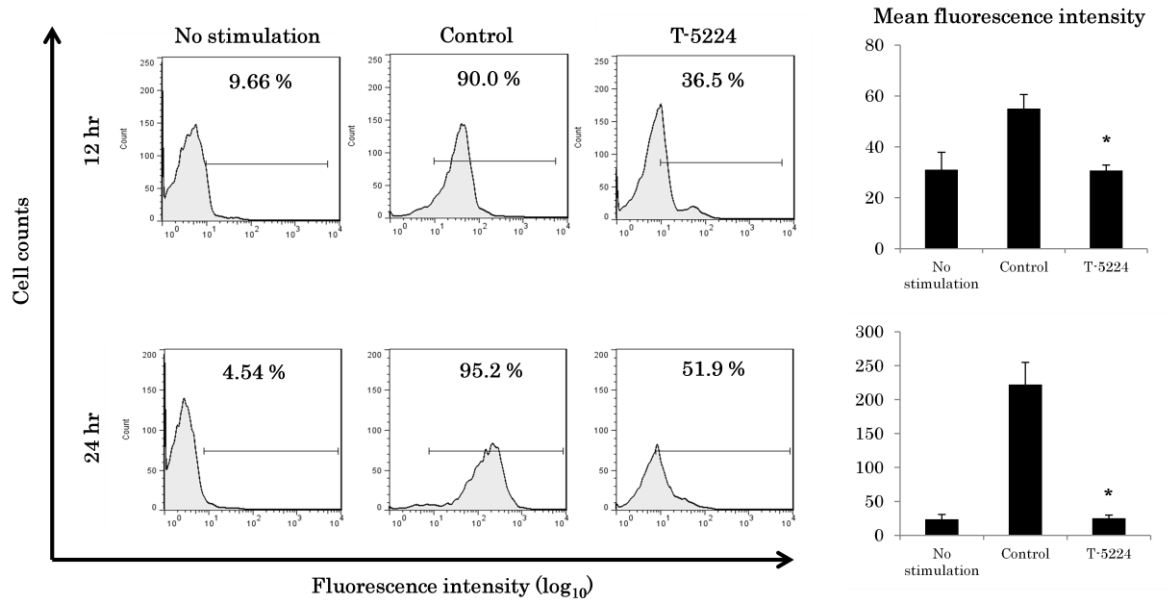


文献 104 Figure 2-A, -B より転載

Figure 4

T-5224 は, $\alpha\text{CD3}+\alpha\text{CD28}$ mAb にて 48 時間刺激された B6 マウス由来 T 細胞からの IL-2 (A), IFN- γ (B)産生を濃度依存性に抑制した. いずれも T-5224 濃度 40 $\mu\text{g/mL}$ 以上で有意であった($n = 3$, *, $p < 0.05$: vs. control)¹⁰⁴.

(ウ) T-5224 は、CD4 陽性 T 細胞における CD25 発現を抑制した。

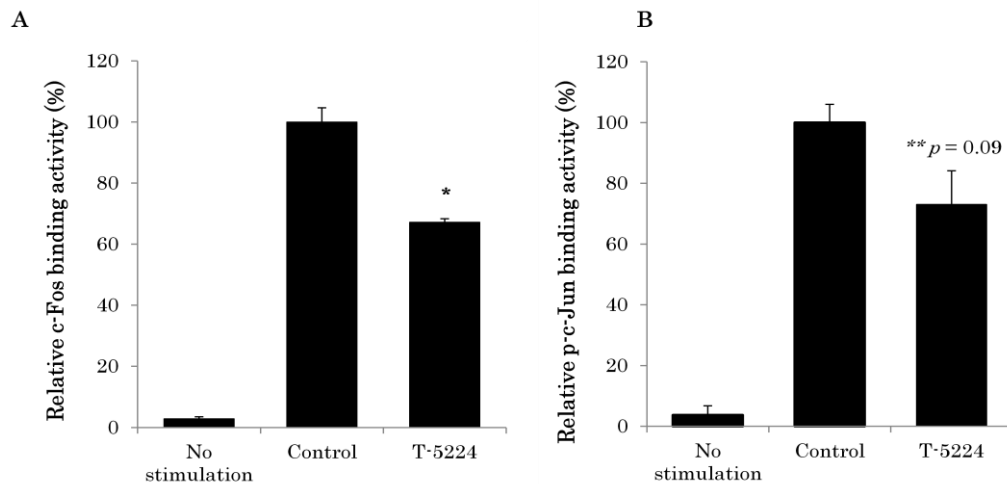


文献 104 Figure 2-C より一部転載

Figure 5

T-5224 (80 $\mu\text{g/mL}$)は、 $\alpha\text{CD3}+\alpha\text{CD28}$ mAb で 12, 24 時間刺激された B6 マウス由来 CD4 陽性 T 細胞における CD25 発現を有意に抑制した。代表的な histogram と mean fluorescence intensity を示す (12hr; 91 ± 1.8 vs. $26\pm 11\%$, 24hr; 222 ± 33 vs. $25\pm4.8\%$, $n = 3$, *, $p < 0.01$: vs. control)¹⁰⁴.

(エ) T-5224 は, α CD3+ α CD28 mAb 刺激下 B6 マウス由来 T 細胞における c-Fos DNA 結合能を有意に抑制した.



文献 104 Figure 2-D より転載

Figure 6

B6 マウス由来 T 細胞を α CD3+ α CD28 mAb で 3 時間刺激し, 核内の c-Fos, p-c-Jun の DNA 結合活性を検討した. 核内 c-Fos, p-c-Jun 活性は TransAM kit を用いて測定した. T-5224 は, 濃度 80 μ g/mL において c-Fos の DNA 結合能を有意に抑制し(A; $n = 3$, *, $p < 0.01$: vs. control), p-c-Jun の DNA 結合能を抑制する傾向を認めた(B; $n = 3$, **, $p = 0.09$: vs. control)¹⁰⁴.

- ③ 経口投与による T-5224 は、マウス同種異系膵島移植におけるアログラフト生着期間を濃度依存性に延長した。また、*in vivo*における同種免疫反応を抑制した。

【目的】 マウスを用いた *in vitro* study において、T-5224 は c-Fos DNA 結合を阻害することによって、T 細胞の増殖能やサイトカイン産生能を抑制し、免疫抑制効果を有する可能性が示唆された。

マウス同種異系膵島移植モデルを確立後、*in vivo*での c-Fos/AP-1 阻害による T-5224 の免疫抑制効果の有無を検討した。

【結果】

(ア) T-5224 の免疫抑制効果を検討する為のマウス同種異系膵島移植モデルの至適移植膵島量は、600 個と判断した(*pilot study*)。

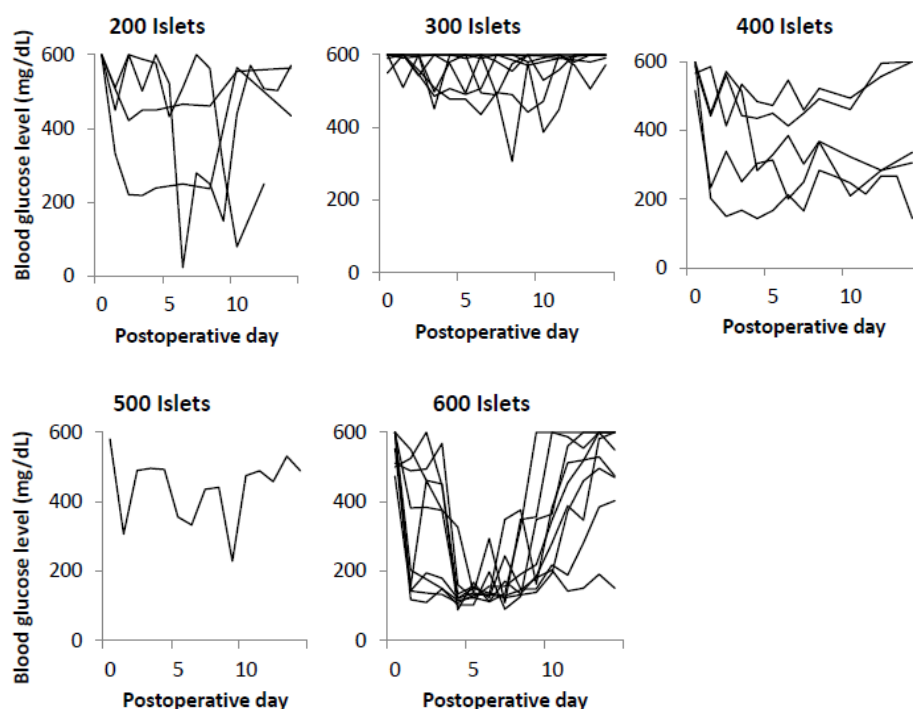


Figure 7

BALB/c マウスから単離した膵島 200 ($n = 4$), 300 ($n = 8$), 400 ($n = 5$), 500 ($n = 1$), 600 ($n = 9$)個を STZ 誘導糖尿病 B6 マウスの肝内へ経門脈的に移植した。200, 300, 400, 500 個モデルでは、400 個移植

の 1 例を除き，血糖正常化を達成したマウスは認めなかった．一方，600 個移植モデルでは全例が血糖正常化し，移植後 14 日以内に全例が拒絶された．

(イ) T-5224 (500 mg/kg BW 以下)は，naïve B6 マウスへの 14 日間経口投与で，明らかな毒性を示さなかった．

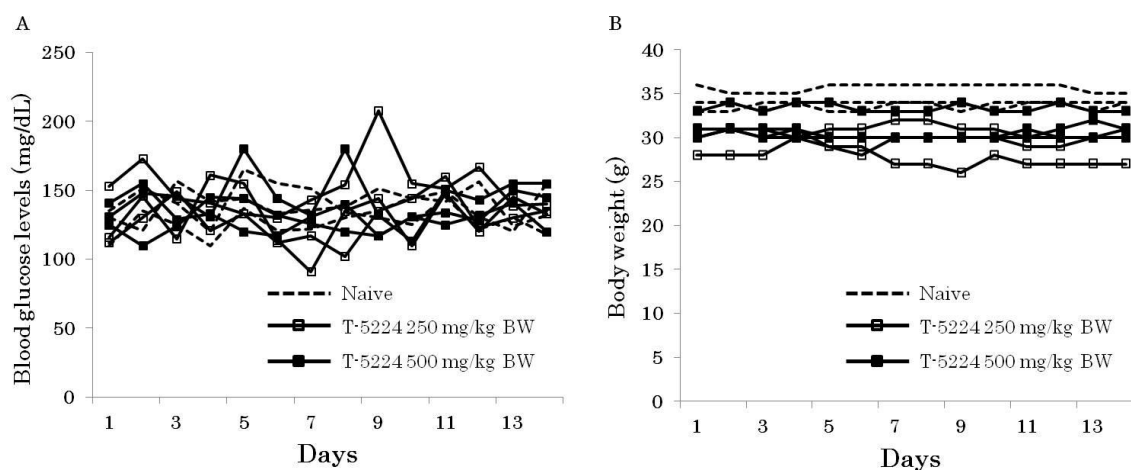
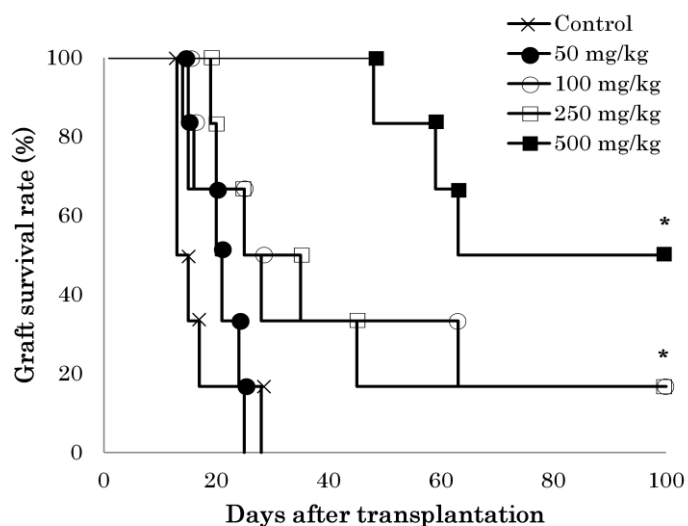


Figure 8

Naïve B6 マウスへ T-5224 (250, 500 mg/kg/BW)を 14 日間 1 日 1 回内服させ，随時血糖値と体重を測定した ($n = 3$)．T-5224 は，500 mg/kg/BW 以下で随時血糖値(A)と体重(B)に影響を及ぼさなかった．

(ウ) マウス同種異系膵島移植モデルにおいて、T-5224 はアログラフト生着期間を濃度依存性に延長させた。

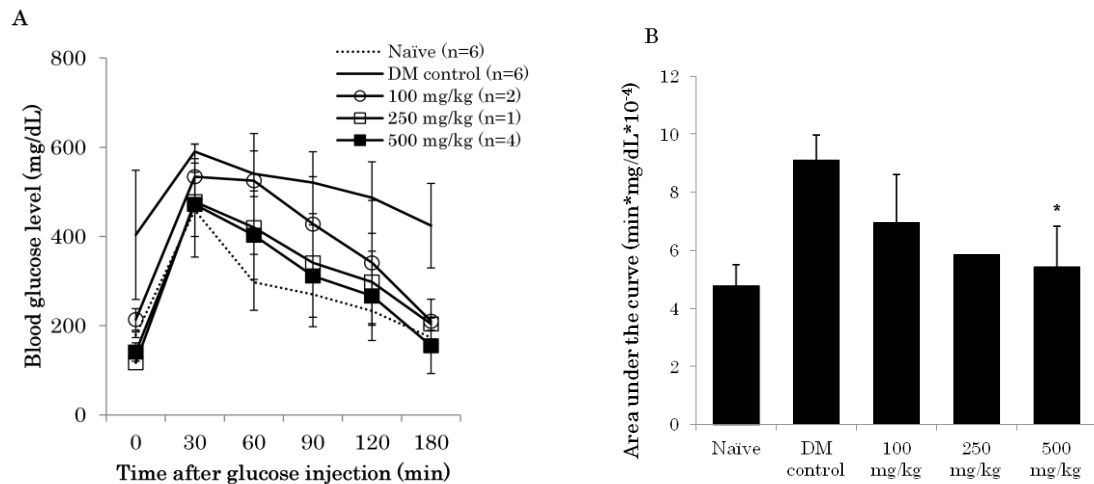


文献 104 Figure 3-A より転載

Figure 9

BALB/c マウスから単離した 600 個の膵島グラフトを、STZ 誘導糖尿病 B6 マウスの肝内へ経門脈的に移植し、グラフト生着期間を検討した。Control (Vehicle) 群のグラフト生着期間中央値 (graft median survival time; MST) は 15 日 ($n = 6$) であった。一方、T-5224 内服投与群 (50, 100, 250, 500 mg/kg BW) の MST は、それぞれ 20.5 ($n = 6$, $p = 0.60$), 28 ($n = 6$, $p = 0.06$), 30 ($n = 6$, *, $p = 0.01$), 101.5 日 ($n = 6$, *, $p = 0.004$) であった¹⁰⁴。

(エ) 長期グラフト生着例に対し、POD 60 にブドウ糖負荷試験 (IPGTT) を施行した。T-5224 投与群では、概ね naïve B6 マウスに似通った血糖の推移を示し、耐糖能障害が改善されていることが示唆された。

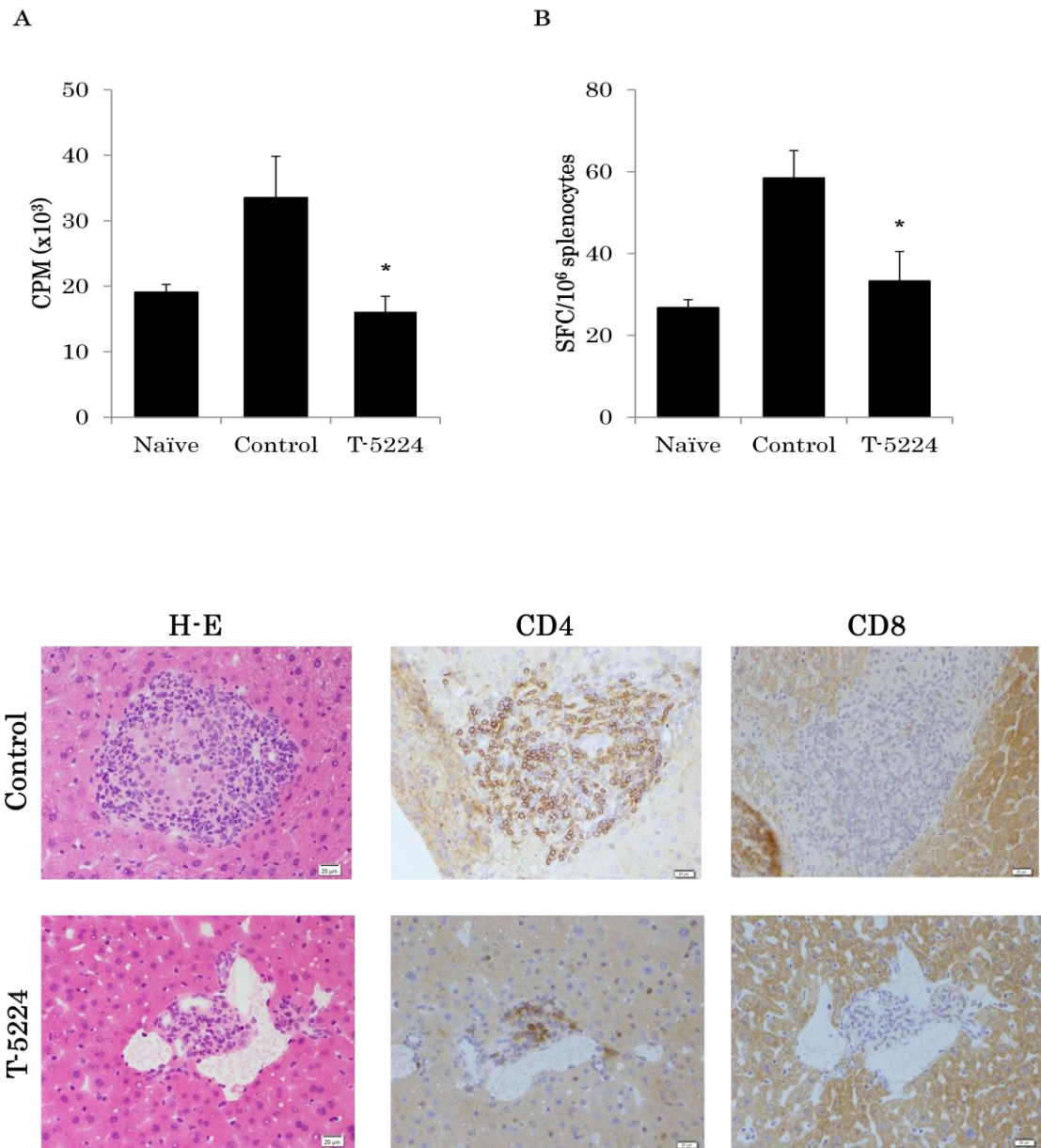


文献 104 Figure 3-B より転載

Figure 10

長期グラフト生着例に対し、POD 60 にブドウ糖負荷試験 (IPGTT) を施行した (A)¹⁰⁴。T-5224 (500 mg/kg BW) 群では、DM control 群に比して有意に AUC (Area Under the Curve) of blood glucose を減少させた (B; *, $p < 0.05$: vs. DM control)。

(オ) T-5224 は、マウス同種異系膵島移植後のレシピエントのアロ免疫反応を抑制した。



(倍率: ×400)

文献 104 Supplemental Figure S2 より転載

Figure 11

(A) 同種異系膵島移植後の B6 レシピエントマウスを POD 10 に犠牲死させ、その脾細胞を responder cell, 放射線照射後の BALB/c マウスの脾細胞を donor-antigen cell として 48 時間共培養した。

T-5224 投与群(500 mg/kg BW)は, Control (Vehicle 投与)群に比して, 有意に MLR を抑制した($n = 4$, *, $p = 0.0126$ vs. control).

(B) 同時に施行した ELISpot assay においても, T-5224 投与群は, Control 群に比して IFN- γ 産生細胞数を有意に抑制した($n = 4$, *, $p = 0.02$ vs. control).

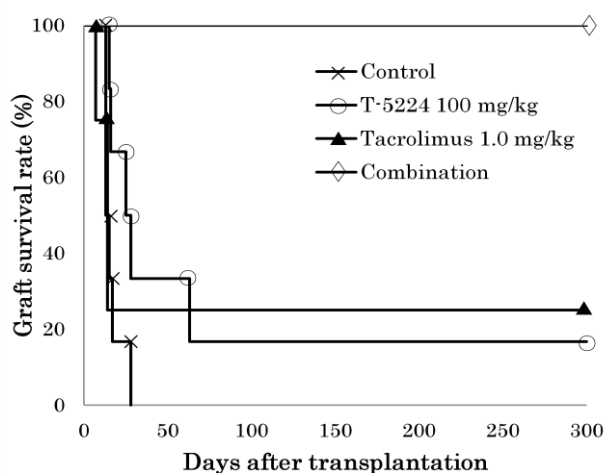
(C) POD 10 に犠牲死させた B6 レシピエントマウスの肝臓を採取し, 肝臓内の脾島グラフト中のリンパ球浸潤を検討した. Control (Vehicle)群では, グラフト内に CD4, CD8 陽性リンパ球が多数浸潤しているが, T-5224 投与群では, リンパ球浸潤が減少した¹⁰⁴.

- ④ **T-5224** は **Tacrolimus** との併用によって、マウス同種異系膵島移植後のグラフト生着期間を著明に延長した。

【目的】 **T-5224** は、同種異系膵島移植後のアログラフト生着期間を延長させたが、拒絶反応を完全に抑制することは困難である。NFAT と AP-1 は、T 細胞の活性化に深く関わっており、NFAT は AP-1 と相乗的に関係すると報告されている⁷⁶。その為、NFAT 阻害薬である **Tacrolimus** と **T-5224** を併用することにより、免疫抑制効果の増強が期待される。マウス同種異系膵島移植モデルを用いて、**T-5224** と **Tacrolimus** の併用効果を検討した。

【結果】

(ア) **T-5224** と **Tacrolimus** の併用によって、膵島グラフト生着期間が著明に延長した。



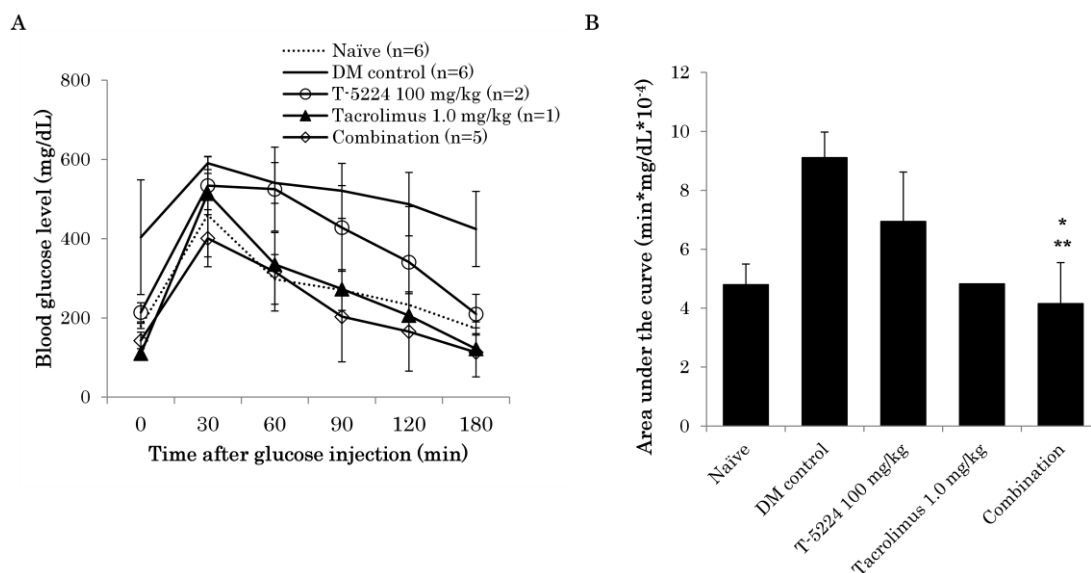
文献 104 Figure 4-A より転載

Figure 12

BALB/c マウスから単離した 600 個の膵島グラフトを、STZ 誘導糖尿病化 B6 マウスの肝内へ経門脈的に移植し、グラフト生着期間を検討した。Control (Vehicle)群の MST は 15 日 ($n = 6$)であった。また、**T-5224** 単独群(100 mg/kg BW)と **Tacrolimus** 単独群(1.0 mg/kg BW)では、MST はそれぞれ 28 日 ($n = 6$, $p = 0.06$), 14 日 ($n = 4$, $p =$

0.71 vs. control)であり，グラフト生着期間の延長は認められなかった．一方，T-5224 (100 mg/kg BW)と Tacrolimus (1.0 mg/kg BW)の併用群では，全例でグラフト生着期間が 300 日を超えた($n = 5$)¹⁰⁴．

(イ) 長期グラフト生着例に対し，POD 60 にブドウ糖負荷試験 (IPGTT)を施行した．T-5224 と Tacrolimus 併用群では，概ね naïve B6 マウスに似通った血糖の推移を示し，耐糖能障害が改善されていることが示唆された．

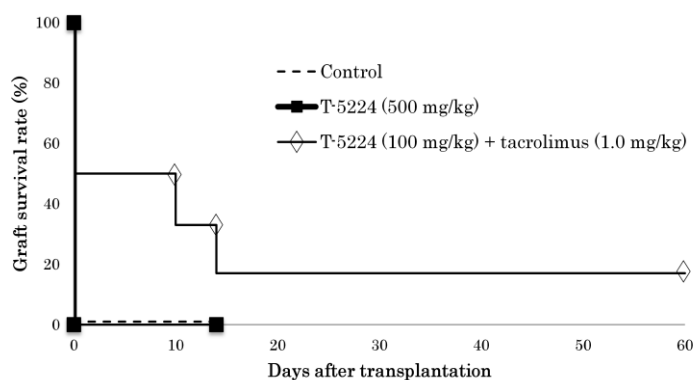


文献 104 Figure 4-B から転載

Figure 13

長期グラフト生着例に対し，POD 60 にブドウ糖負荷試験 (IPGTT)を施行した(A)¹⁰⁴．T-5224 と Tacrolimus 併用群では，DM control 群，T-5224 単独群に比して有意に AUC を減少させた(B; $n = 4$, *, $p < 0.01$: vs. DM control, **, $p < 0.05$: vs. T-5224 100 mg/kg)．

(ウ) T-5224 と Tacrolimus の併用療法は、移植膵島を 300 個へ減少させたマウス同種異系膵島移植モデルにおいても強力な免疫抑制効果を発揮した。



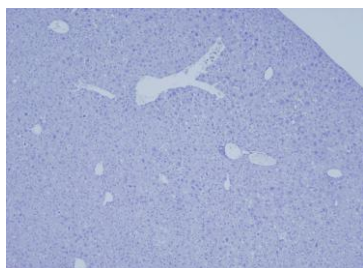
文献 104 Figure 5 より転載

Figure 14

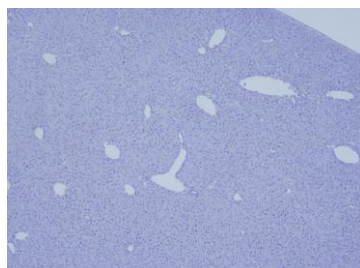
BALB/c マウスより単離した膵島 300 個を STZ 誘導糖尿病化マウスの肝内へ経門脈的に移植した。Control (Vehicle) 群, T-5224 (500 mg/kg BW) 群では、血糖正常化したマウスは認めなかった ($n = 6$)。一方, T-5224 (100 mg/kg BW) と Tacrolimus (1.0 mg/kg BW) 併用群は、3 例(50%)が血糖正常化し、グラフト生着期間は 10, 14, <60 日であった ($n = 6$)¹⁰⁴。

(エ) T-5224 と Tacrolimus 併用群の長期血糖正常化マウスへの移植膵島グラフトは、インスリン, シナプトフィジン染色共に陽性であり、グラフトがインスリン産生機能を維持している事が確認された。

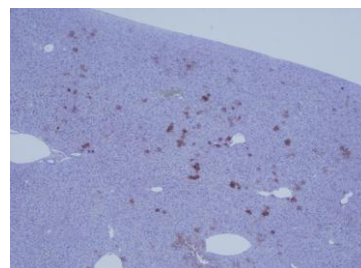
(A-1)



(A-2)

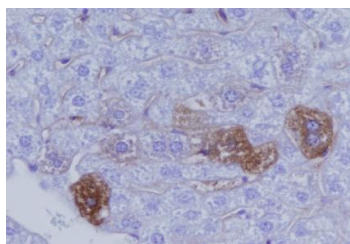


(A-3)



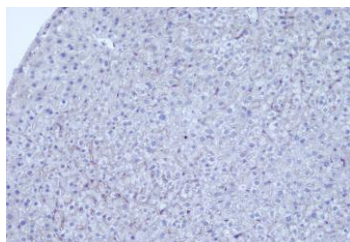
(倍率 : ×40)

(A-4)

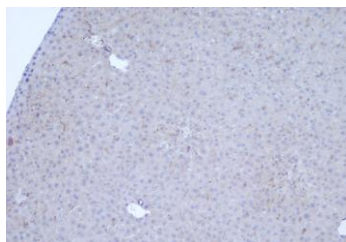


(倍率 : ×200)

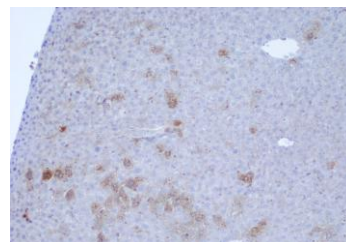
(B-1)



(B-2)



(B-3)



(倍率:×100)

Figure 15

BALB/c 由来の膵島 300 個を肝内へ移植した B6 レシピエントマウスの肝組織のインスリン(A)とシナプトフィジン(B)染色像を示す. (A-1, B-1) Control (Vehicle)群を 14 POD, (A-2, B-2) T-5224 (100mg/kg BW)+Tacrolimus (1.0 mg/kg BW)併用群を拒絶直後(POD 14)に犠牲死させた. 肝組織内にインスリン, シナプトフィジン陽性細胞はいずれも認めなかった. (A-3, A-4, B-3) T-5224 (100 mg/kg BW)+Tacrolimus (1.0 mg/kg BW)併用群の長期血糖正常化した B6 マウスを血糖正常化を維持したままで POD 82 に犠牲死させた. 肝組織内にインスリン, シナプトフィジン陽性細胞を多数認め, グラフト機能が維持されている事が確認された.

- ⑤ T-5224 は IL-6, IL-10, IFN- γ mRNA 発現を抑制し, Tacrolimus は IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ mRNA 発現を抑制した. また, 両者を併用すると T-5224 単独群に比較し, 有意に IFN- γ mRNA 発現を抑制した.

【目的】 *in vivo* における T-5224 と Tacrolimus の併用効果のメカニズムを q-PCR を用いて検討した. T-5224, Tacrolimus いずれも転写因子の阻害剤の為, その効果を最も鋭敏に評価する為には, AP-1, NFAT のシグナルカスケードの下流に位置するサイトカインの mRNA 発現の抑制効果を検討する事が適切と考えた. サイトカインは, helper T (Th)1 系として, IL-2, IL-6, IFN- γ , Th2 系として IL-4, IL-10, IL-13 を選択した. なお, naïve B6 マウスの脾細胞から抽出した T 細胞に対する, α CD3+ α CD28 mAb の適切な刺激時間を決定する為に, pilot study を施行した. その際, CD4 陽性 T 細胞からの IL-2, IFN- γ mRNA 発現が, 16 時間の α CD3+ α CD28 抗体刺激で最大値となった報告¹⁰⁵を参考に, 6, 12, 18 時間での mRNA 発現を検討した.

【結果】

(ア) IL-4, IL-10, IL-13 の mRNA 発現が抗体刺激 12 時間後にピークアウトした． IL-2, IL-6 は 12 時間ではピークアウトしていないが，発現量は十分と判断した． よって， T-5224 と Tacrolimus のサイトカイン抑制効果を判定する為の抗体刺激時間を 12 時間と決定した．

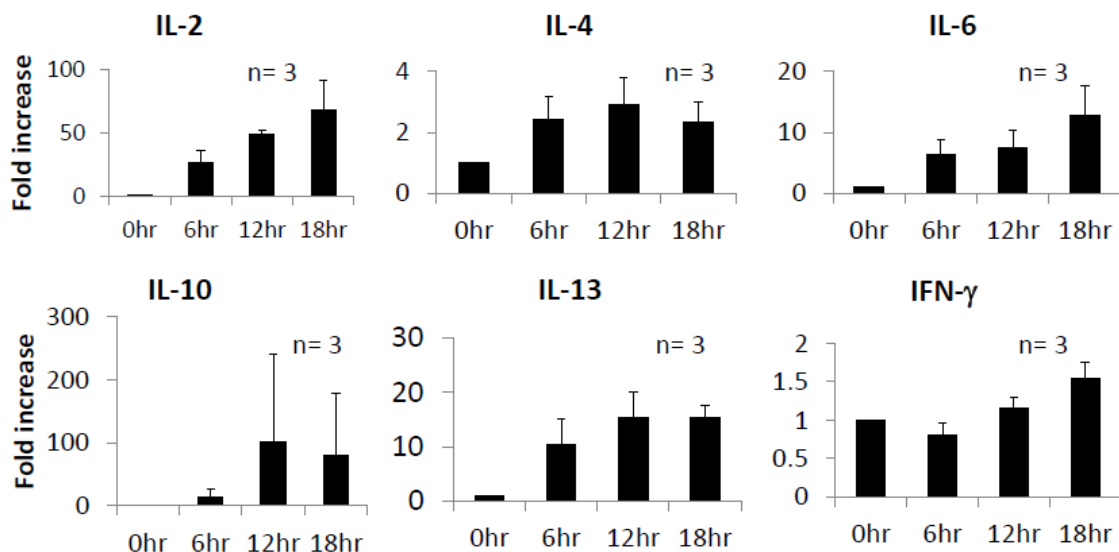
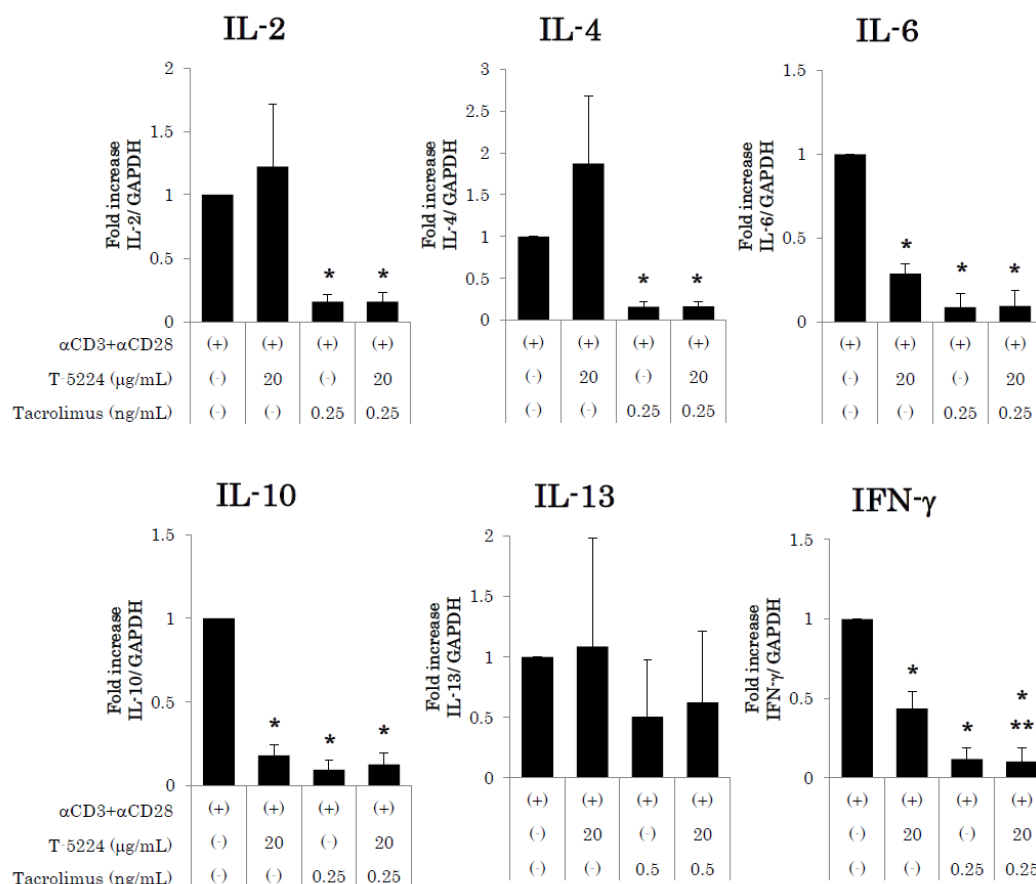


Figure 16

Naïve B6 マウスを犠牲死させ，脾細胞から T 細胞を抽出． α CD3+ α CD28 mAb で， 6, 12, 18 時間刺激し， IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- γ の mRNA 発現を測定した ($n = 3$)． 全てのサイトカインで mRNA は抗体刺激によって発現が増強し， IL-4, IL-10, IL-13 は， 12 時間で最大値を取った． なお， mRNA 発現は， GAPDH の発現量を 1 とした時の比で表示した．

(イ) T-5224 は主に Th1 系サイトカインの mRNA 発現を抑制し，Tacrolimus は Th1/2 系サイトカインを共に抑制した．また，両者を併用すると T-5224 単独群に比較し，有意に IFN- γ mRNA の発現を抑制した．



文献 104 Figure 6 より転載

Figure 17

Naïve B6 マウスを犠牲死させ，脾細胞から T 細胞を抽出した． α CD3+ α CD28 mAb で，12 時間刺激し，IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- γ の mRNA 発現を測定した ($n = 3$)．T-5224 (20 μ g/mL) は，IL-6, IL-10, IFN- γ の mRNA 発現を抑制し，Tacrolimus (0.25, 0.5 ng/mL) は，IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ の mRNA 発現を抑制した．また，両者を併用すると T-5224 単独群に比して IFN- γ の mRNA 発現を有意に抑制した¹⁰⁴．

考察

本研究では，新規 AP-1 阻害剤 T-5224 は， α CD3+ α CD28 mAb によって刺激を受けたマウス T 細胞の増殖(Figure 3)，サイトカイン(IL-2/IFN- γ)産生(Figure 4)，early activation marker (CD25) (Figure 5) 発現を抑制することを証明した．また，T-5224 は，抗体刺激下のマウス T 細胞においても c-Fos の DNA 結合能を有意に抑制し，p-c-Jun の DNA 結合能を抑制する傾向のある事が確認された(Figure 6)．これらの *in vitro* 実験系は，pilot study として施行した MTT assay の結果(Figure 1. 80 μ g/mL 以下では毒性無し)を基に，T-5224 の細胞毒性では無い事を確認している．従って，T-5224 は c-Fos の DNA 結合能を阻害する事によって，マウス T 細胞の機能を抑制すると考えられた．本研究結果は，選択的 MEK 1/2 阻害剤である U0126 を用いた Bendfeldt らの報告からも裏付けられる．同報告によると，MEK 1/2 は T 細胞のシグナル伝達カスケードでは c-Fos の上流に位置している．抗体刺激下の T 細胞の *de novo* c-Fos 合成を U0126 で阻害すると，NFATc2 の発現には影響を与えずに，ヒトメモリー T 細胞中の IL-2 産生細胞の割合を有意に減少させたとされ，T 細胞における c-Fos 阻害による IL-2 産生抑制効果の可能性を示唆している¹⁰⁶．

In vitro での実験結果を基に，c-Fos/AP-1 阻害によってアロ反応性 T 細胞機能を抑制すれば，*in vivo* 移植モデルにおいて急性拒絶反応を抑制出来るのではないかと仮説を立て，マウス同種異系膵島移植モデルを用いて検証することとした．BALB/c マウスから単離した膵島を STZ 誘導糖尿病 B6 マウスの肝内へ移植した，完全 MHC ミスマッチ膵島移植モデルにおいて，T-5224 は濃度依存性にアログラフト生着期間を延長させた(Figure 9)．なお，投与量 250 mg/kg BW/day 以上で Control 群と比較して有意差を認めた．また，POD 10 にレシピエント B6 マウスを犠牲死させてアロ反応の抑制能を検討した．T-5224 投与群は，アロ抗原刺激下の脾細胞増殖能，IFN- γ 産生細胞数が有意に抑制され，膵島グラフト内の CD4, CD8 陽性細胞浸潤も減少しており，レシピエント B6 マウス中のアロ反応性が抑制されている事が確認された(Figure 11)．これまで，AP-1 阻害による免疫抑制効果の報告例は少なく，渉猟し得た限りでは以下の 2 編のみである．Hölschermann らは，AP-1 decoy oligonucleotide 溶液を灌流させた Wistar-Furth ラットの心グラフトを Lewis ラットへ移植

するとアログラフト生着期間が 5.6 から 7.8 日へ延長したと報告した⁸⁷。また、Tabata らは、Brown-Norway ラットの心グラフトを Lewis ラットへ移植し、c-Jun N-terminal kinase 阻害剤である SP600125 を投与すると、アログラフト生着期間が 7 から 20 日へ延長したと報告している⁸⁶。これらの既報告例と比較すると、動物種、グラフト臓器や使用薬剤の違いを考慮しても、本研究における AP-1 阻害剤 T-5224 のアログラフト生着期間延長効果は著しいと考えられる。恐らく、このグラフト保護効果は、T-5224 の免疫抑制効果のみならず、ある一定の割合、T-5224 の抗炎症効果に起因する可能性も考慮される。脾島移植では、単離された脾島グラフトがレシピエントの肝内へ経門脈的に移植されると、血小板が凝集し、凝固・補体系のカスケードが活性化されるといった非特異的炎症反応が惹起される^{107,108}。これらの反応が惹起されると、TNF- α ^{109,110} や high mobility group box (HMGB)-1¹¹⁰ 等のメディエーターによって炎症反応や移植後早期の自然免疫応答が活性化される。マクロファージは、IL-1 β , IL-6, TNF- α , INF- γ などの炎症性サイトカインを産生し、これらの過程において中心的な役割を果たしている¹¹¹。一方、c-Fos/AP-1 は、IL-1 β , IL-6, TNF- α 等の遺伝子のプロモーター領域に存在する AP-1 motif に直接結合する事により、これら炎症性サイトカインの発現を制御し、細胞の炎症反応においても重要な転写因子である¹¹²。T-5224 は、c-Fos/AP-1 を阻害する事により、lipopolysaccharide (LPS)誘導敗血症性急性腎不全モデルで IL-1 β , IL-6, TNF- α ⁸⁴ を、LPS 誘導敗血症肝不全モデルでは TNF- α , HMGB-1 等の炎症性サイトカイン産生を抑制する⁸⁵と報告される。一方、当研究室では、移植後早期の自然免疫と炎症反応を NF- κ B 阻害剤 dehydroxymethylepoxyquinomicin を用いて阻害すると、その後の適応免疫反応を抑制し、アログラフト生着期間を延長することをマウス脾島移植モデルを用いて報告した^{95,113}。これらの知見を基に、本研究の同種異系マウス脾島移植モデルにおけるアログラフト生着期間延長効果は、T-5224 の免疫抑制効果のみならず、抗炎症効果にも起因しているものと推察される。

T-5224 は、脾島アログラフト生着期間を延長させたが、完全に拒絶反応を抑制することは困難である。そこで、AP-1 と密接な関係にある NFAT 阻害薬である Tacrolimus に着目し、*in vivo* での併用効果を検討したところ、グラフト生着期間の著明な延長効果が認められた(Figure 12)。

T 細胞の活性化は、AP-1 と NFAT との間の密接なクロストークによっ

て影響を受けている^{114,115}. AP-1の中には多数の subfamily が存在するが, Fos と Jun family は T 細胞の核内で NFAT と共に複合体を形成し, NFAT 結合部位の近位部に結合する事によって, Th1 系の主要なサイトカインである IL-2 や IFN- γ の産生を促進すると報告される^{76,114,116,117}. 本研究では, AP-1 と NFAT の同時阻害効果を T-5224 と Tacrolimus を用いて検討した. B6 マウス由来の T 細胞を α CD3+ α 28 mAb にて刺激し, 12 時間後のサイトカイン mRNA 発現抑制効果を q-PCR にて測定した. この検討の際, T-5224 と Tacrolimus の相加・相乗効果を検討する為, それぞれの薬剤は sub-optimal dose で使用した. T-5224 の濃度は, マウス T 細胞からの IL-2, IFN- γ 産生抑制効果(Figure 4)の検討から 20 μ g/mL とした. また, Tacrolimus は, 当研究室の過去のマウス T 細胞を用いたサイトカイン抑制効果検討結果から 0.25 ng/mL (IL-13 のみ 0.5 ng/mL) と設定した^{118,119}. T-5224 単独では Control 群と比較して IL-6, IL-10, IFN- γ のみ抑制効果を認めたが, Tacrolimus と併用すると IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ の mRNA レベルを有意に抑制し, 特に INF- γ においては T-5224 単独群と比較しても有意に mRNA 発現を抑制した(Figure 17). この *in vitro* の実験結果から, AP-1 と NFAT 阻害剤を併用することによりアロ免疫反応抑制効果が増強され, 特に Th1 系において顕著であることが示唆され, *in vivo* の脾臓アログラフトの著明な生着期間延長効果が裏付けられたものと考えられた.

Tacrolimus は, 臨床の脾臓移植でも使用されている非常に有用な免疫抑制剤であるが, 重大な副作用の一つとして脾臓細胞への毒性が挙げられる³⁵. その為, 脾臓移植術後の免疫抑制療法においては Tacrolimus の濃度を可能な限り減少させる事が必要である. その為, 本研究では, 薬剤による脾臓細胞への毒性を極力排除しつつ, 強力な免疫抑制効果を得る為に, T-5224 と Tacrolimus を sub-optimal dose で併用した. 当研究室では, 以前に本研究と全く同様の同種異系マウス脾臓移植モデルを用いて, Tacrolimus 1.5 mg/kg BW/day を術後 14 日間投与し, MST が 69 日まで著明に延長した事を報告した⁹⁵. その報告を基として, Tacrolimus の濃度を 1.0 mg/kg BW/day に設定した. また, T-5224 の濃度は, Figure 9 の結果を基に 100 mg/kg BW/day と設定した. 結果, Tacrolimus 単独群では, MST が 14 日と Control 群と比較して延長は認めなかったが(Figure 12), T-5224 (100 mg/kg BW/day) と併用することにより, 5 例全例で著明なグラフト生着期間延長効果を呈した.

本研究において、T-5224 と Tacrolimus の併用療法は、移植膵島が 600 個では著明なグラフト生着期間延長効果を呈した。移植後の免疫抑制療法の効果を判定するにおいて、ドナー特異的免疫寛容を達成の可否を判断する事は重要である。

一般的に、経門脈的に膵島を移植すると非特異的な炎症反応が惹起され、移植 72 時間以内に約 50～70%の膵島が破壊される為、肝内移植モデルは「厳しい条件下のモデル」であると考えられる^{97,120,121}。本研究での移植膵島数を 600 個とした理由は、「200, 300, 400, 500 個移植モデルでは、400 個移植の 1 例を除き、血糖正常化を達成したマウスは認めなかったが、600 個移植モデルでは全例が血糖正常化し、移植後 14 日以内に全例が拒絶された」事である(Figure 7)。

一方、これまで 450 個等の移植膵島が少ないモデルも報告されている⁹⁷。T-5224 と Tacrolimus の併用効果を厳密に検討する為には、移植膵島数を減少させたモデルでの検討も必要であると考え、移植膵島を 300 個へ減少させた。その結果、T-5224 と Tacrolimus を併用しても、6 匹中 3 匹しか血糖正常化せず、MST も 14 日へ短縮した(Figure 14)。グラフトが拒絶された直後にレシピエント B6 マウスを犠牲死させて肝臓を組織学的に観察すると、インスリン・シナプトフィジン染色陽性細胞は全く認められなかった(Figure 15-A-2 and -B-2)。膵島 600 個を移植した場合と比較し、何故これ程までにグラフト生着期間に乖離が生じるかの直接的な証拠となるデータは無い。しかしながら、移植膵島が「過剰」に移植されれば、それらが「インスリン分泌の蓄え」として機能し、グラフト生着期間が延長される傾向が強まると推測される¹²²。Keymeulen らの報告によると、膵島移植後に長期間正常血糖を維持する為には、血糖値以外にも血清中フルクトサミンやインスリン濃度などの全てのパラメーターを正常化する事が重要であり、その為には十分量のβ細胞が移植される事が必要である¹²³。また、膵島グラフトが高血糖状態に曝されるとβ細胞機能が低下し¹²⁴、マウスを用いた膵島移植モデルでも術前の高血糖状態がグラフト生着期間の短縮に繋がると報告されている¹⁰³。実際、臨床の膵島移植でも、周術期にヘパリンと共にインスリンを投与して正常血糖を維持する事によって、移植成績が向上するとの報告がある¹²⁵。

これらの知見や本研究の膵島 300 個移植モデルの結果を考慮すると、T-5224 と Tacrolimus の併用効果は、600 個移植モデルでは正常血糖を長期にわたって維持出来たが、これはドナー特異的免疫寛容を達成したわけではなく、更に観察を続けた場合には、ある一定の割合で「蓄え」として機

能した膵島グラフトが徐々に拒絶されていく可能性が高いと考えられた。しかしながら、T-5224 と Tacrolimus との併用療法がドナー特異的免疫寛容を達成したか否かを正確に検討する為には、長期グラフト生着レシピエントへの皮膚移植(skin challenge test)や、グラフト内やリンパ組織中の制御性 T 細胞の flowcytometry による解析などが必要であり、これは今後の検討課題である。

T-5224 の臨床応用を検討するにあたり、その副作用に関する情報は非常に重要である。Pilot study として、naïve B6 マウスに T-5224 250, 500, mg/kg BW を 1 日 1 回 14 日間経口投与した($n = 3$)。250, 500 mg/kg BW 群では、随時血糖の上昇や体重の変化は認めず(Figure 8)、14 日目に犠牲死させて解剖したが、腫瘍性病変や日和見感染症の所見は認めなかった(data not shown)。この pilot study の結果から、本研究の *in vivo* における T-5224 投与経路と濃度は、経口投与で 500mg/kg BW/day 以下では問題無いと判断した。また、Aikawa らによるとラットとカニクイザルへ、T-5224 を 1 ヶ月間それぞれ 150, 750 mg/kg の濃度で投与しても、理学的所見、血液学的所見、剖検所見のいずれにおいても副作用は認めなかったと報告される⁷⁹。一方、本研究においては、T-5224 は、80 µg/mL 以下では膵島に対する毒性の無い事も MTS assay を用いて確認した(Figure 2)。これらの実験結果や報告によると膵島移植において T-5224 は概ね安全性の高い薬剤と考えられるが、臨床応用を考慮すると、マージナルモデルを用いた糖尿病誘発試験やβ細胞増殖能抑制性、β細胞アポトーシス誘導性試験などが今後必要となると考えられる。

結論として、T-5224 による c-Fos/AP-1 阻害法は、膵島移植において非常に有望な免疫抑制療法と考えられる。この治療戦略は、膵島移植以外の細胞・臓器移植や自己免疫性疾患に対しても効果的である可能性を有している。

総括及び結論

①本研究全体から得られた新知見

- ・ 新規 AP-1 阻害剤 T-5224 は, マウス T 細胞において c-Fos/AP-1 DNA 結合能を阻害する.
- ・ c-Fos/AP-1 阻害は, マウス T 細胞の増殖能を抑制する.
- ・ c-Fos/AP-1 阻害は, マウス CD4 陽性 T 細胞の early activation marker (CD25) 発現を抑制する.
- ・ c-Fos/AP-1 阻害は, マウス T 細胞からのサイトカイン (IL-2, IFN- γ) 産生を抑制する.
- ・ c-Fos/AP-1 阻害は, マウス同種異系膵島移植モデルにおいてアログラフト生着期間を延長する.
- ・ c-Fos/AP-1 と NFAT を同時阻害すると, マウス同種異系膵島移植モデルにおいてアログラフト生着期間を著明に延長するが, ドナー特異的免疫寛容は誘導出来ない可能性が高い.
- ・ c-Fos/AP-1 と NFAT を同時阻害すると, マウス T 細胞の IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ mRNA 発現を抑制する.

②新知見の意義

膵島移植術後のインスリン離脱率は低率であり, 拒絶反応抑制法の開発は急務である. 本研究は, 今までに報告の無い c-Fos/AP-1 阻害という全く新しい刺激経路を遮断することによって免疫抑制効果を発揮する事を示したという点で意義があると考えられる. また, 既に臨床応用されている Tacrolimus と併用することにより, 更に強力な免疫抑制効果を期待出来る事を示した点も特筆すべき事項である.

③今後の研究展開と課題

膵島移植における使用を具体化してするにあたり, 大動物を用いた T-5224 の免疫抑制効果や毒性試験は必須である. また, マージナルモデルを用いた糖尿病誘発性や β 細胞増殖能抑制性, β 細胞アポトーシス誘導性試験などが検討されるべきである. また, T-5224 と Tacrolimus の併用によるドナー特異的免疫寛容の導入療法は非常に有用な免疫抑制療法となり得る為, 更なる詳細な検討が望まれる.

謝辞

本博士論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I 博士課程在学中において行った研究をまとめたものです。研究計画の立案から、基礎論文、博士論文作成の全ての過程に至るまで、終始厳しくも温かく御指導御鞭撻を賜りまし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先生へ心より感謝申し上げます。本研究を遂行し、基礎論文を作成するにあたり、御指導を賜りました前北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I 教授藤堂省先生へ深く感謝申し上げます。また、学位論文を作成するにあたり、多大なる御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I 教授武富紹信先生へ深謝致します。また、研究遂行への御助言を賜りました前北海道大学大学院保健科学研究院教授松下通明先生、北海道大学病院消化器外科 I 講師蒲池浩文先生へ感謝申し上げます。病理学の観点から貴重な御助言を賜りました北海道大学大学院医学研究科分子病理学分野准教授外丸詩野先生に深く感謝致します。T-5224 等の試薬を御提供下さった富山化学工業株式会社総合研究所薬理研究部相川幸彦様、T-5224 の開発に携わって下さった九州大学病院共同研究部門リウマチ膠原病内科学特任教授塩澤俊一先生、北里大学薬学部創薬物理化学教室教授広野修一先生へ感謝申し上げます。最後に、実験を共に手伝って下さり、論文作成にも多大なる御助言を頂きました北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I 後藤了一先生、渡辺正明先生、腰塚靖之先生、蔵谷大輔先生、柴崎晋先生、若山顕治先生、小倉正臣先生、財津雅昭先生、常俊雄介先生、旭火華先生、小野仁先生、江本慎先生、水上達三先生、小林希様、五十嵐瑠美様、堀米正敏様、研究室の後輩の皆様方に心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1 Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., & King, H., Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047-1053 (2004).
- 2 Lefebvre, P. & Pierson, A., The global challenge of diabetes. *World Hosp. Health Serv.* 40, 42 (2004).
- 3 Kawasaki, E., Matsuura, N., & Eguchi, K., Type 1 diabetes in Japan. *Diabetologia* 49, 828-836 (2006).
- 4 Seino, Y. *et al.*, Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *J. Diabetes Investig.* 1, 212-228 (2010).
- 5 The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N. Engl. J. Med.* 329, 977-986 (1993).
- 6 von Mering, J. & Minkowski, O., Diabetes Mellitus after pancreas extirpation. *Arch. Fur. Exper. Path. Pharmacol.* 26, 111 (1889).
- 7 Watson-Williams, P., Notes on Diabetes Treated with Extract and by Grants of Sheep's Pancreas. *British Medical Journal* 1303 (1894).
- 8 Pybus, F., Notes on suprarenal and pancreatic grafting. *Lancet* ii, 550-551 (1924).
- 9 Banting, F.G., Best, C.H., Collip, J.B., Campbell, W.R., & Fletcher, A.A., Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can. Med. Assoc. J.* 12, 141-146 (1922).
- 10 Murray, J.E., Merrill, J.P., Harrison, J.H., Wilson, R.E., & Dammin, G.J., Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *N. Engl. J. Med.* 268, 1315-1323 (1963).
- 11 Kelly, W.D., Lillehei, R.C., Merkel, F.K., Idezuki, Y., & Goetz, F.C., Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery* 61, 827-837 (1967).
- 12 Sutherland, D.E. *et al.*, Lessons learned from more than 1,000 pancreas transplants at a single institution. *Ann. Surg.* 233,

- 463-501 (2001).
- 13 Moskalewski, S., Isolation and Culture of the Islets of Langerhans of the Guinea Pig. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44, 342-353 (1965).
 - 14 Lacy, P.E. & Kostianovsky, M., Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16, 35-39 (1967).
 - 15 Ballinger, W.F. & Lacy, P.E., Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 72, 175-186 (1972).
 - 16 Ballinger, W.F., Lacy, P.E., Scharp, D.W., Kemp, C.B., & Knight, M., Isografts and allografts of pancreatic islets in rats. *Br. J. Surg.* 60, 313 (1973).
 - 17 Najarian, J.S. *et al.*, Human islet transplantation: a preliminary report. *Transplant. Proc.* 9, 233-236 (1977).
 - 18 Lacy, P.E., Workshop on Pancreatic Islet Cell Transplantation in Diabetes sponsored by the National Institute of Arthritis, Metabolism, and Digestive Diseases and held at the National Institutes of Health in Bethesda, Maryland, on November 29 and 30, 1977. *Diabetes* 27, 427-429 (1978).
 - 19 Ricordi, C., Lacy, P.E., Finke, E.H., Olack, B.J., & Scharp, D.W., Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37, 413-420 (1988).
 - 20 Scharp, D.W. *et al.*, Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patient. *Diabetes* 39, 515-518 (1990).
 - 21 Ricordi, C. *et al.*, Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. *Transplantation* 53, 407-414 (1992).
 - 22 Hering, B.J. *et al.*, New protocol toward prevention of early human islet allograft failure. *Transplant. Proc.* 26, 570-571 (1994).
 - 23 Bretzel, R.G. *et al.*, Improved survival of intraportal pancreatic islet cell allografts in patients with type-1 diabetes mellitus by refined peritransplant management. *J. Mol. Med. (Berl)*. 77, 140-143 (1999).
 - 24 Secchi, A. *et al.*, Islet transplantation in IDDM patients. *Diabetologia* 40, 225-231 (1997).
 - 25 Oberholzer, J. *et al.*, Human islet transplantation: lessons from 13

- autologous and 13 allogeneic transplantations. *Transplantation* 69, 1115-1123 (2000).
- 26 Oberholzer, J. *et al.*, Human islet allotransplantation with Basiliximab in type I diabetic patients with end-stage renal failure. *Transplant. Proc.* 34, 823-825 (2002).
- 27 Brendel, M., Hering, B.J., Schulz, A., & Bretzel, R.G., International Islet Registry Report (1999).
- 28 Ricordi, C. *et al.*, Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol. Lat.* 27, 185-195 (1990).
- 29 Ricordi, C., Quantitative and qualitative standards for islet isolation assessment in humans and large mammals. *Pancreas* 6, 242-244 (1991).
- 30 Shapiro, A.M. *et al.*, Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.* 343, 230-238 (2000).
- 31 Robertson, R.P., Davis, C., Larsen, J., Stratta, R., & Sutherland, D.E., Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. *Diabetes Care* 23, 112-116 (2000).
- 32 Shapiro, A.M. *et al.*, International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N. Engl. J. Med.* 355, 1318-1330 (2006).
- 33 Ryan, E.A. *et al.*, Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54, 2060-2069 (2005).
- 34 Bell, E. *et al.*, Rapamycin has a deleterious effect on MIN-6 cells and rat and human islets. *Diabetes* 52, 2731-2739 (2003).
- 35 Drachenberg, C.B. *et al.*, Islet cell damage associated with tacrolimus and cyclosporine: morphological features in pancreas allograft biopsies and clinical correlation. *Transplantation* 68, 396-402 (1999).
- 36 Barton, F.B. *et al.*, Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. *Diabetes Care* 35, 1436-1445 (2012).
- 37 White, S.A., Shaw, J.A., & Sutherland, D.E., Pancreas transplantation. *Lancet* 373, 1808-1817 (2009).
- 38 Anderson, G., Moore, N.C., Owen, J.J., & Jenkinson, E.J., Cellular interactions in thymocyte development. *Annu. Rev. Immunol.* 14,

- 73-99 (1996).
- 39 Groettrup, M. & von Boehmer, H., A role for a pre-T-cell receptor in T-cell development. *Immunol. Today* 14, 610-614 (1993).
- 40 von Boehmer, H., Teh, H.S., & Kisielow, P., The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol. Today* 10, 57-61 (1989).
- 41 Setoguchi, R. *et al.*, Repression of the transcription factor Th-POK by Runx complexes in cytotoxic T cell development. *Science* 319, 822-825 (2008).
- 42 Taniuchi, I. *et al.*, Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* 111, 621-633 (2002).
- 43 von Andrian, U.H. & Mempel, T.R., Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 867-878 (2003).
- 44 Banchereau, J. & Steinman, R.M., Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252 (1998).
- 45 Lanzavecchia, A. & Sallusto, F., Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290, 92-97 (2000).
- 46 Schwartz, R.H., A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248, 1349-1356 (1990).
- 47 Davis, S.J., Ikemizu, S., Wild, M.K., & van der Merwe, P.A., CD2 and the nature of protein interactions mediating cell-cell recognition. *Immunol. Rev.* 163, 217-236 (1998).
- 48 Shaw, A.S. & Dustin, M.L., Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* 6, 361-369 (1997).
- 49 Grakoui, A. *et al.*, The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227 (1999).
- 50 Straus, D.B., Chan, A.C., Patai, B., & Weiss, A., SH2 domain function is essential for the role of the Lck tyrosine kinase in T cell receptor signal transduction. *J. Biol. Chem.* 271, 9976-9981 (1996).
- 51 Cantrell, D., T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 259-274 (1996).

- 52 Jain, J. *et al.*, The T-cell transcription factor NFATp is a substrate
for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* 365,
352-355 (1993).
- 53 Ebinu, J.O. *et al.*, RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras.
Blood 95, 3199-3203 (2000).
- 54 Owaki, H. *et al.*, Raf-1 is required for T cell IL2 production. *EMBO*.
J. 12, 4367-4373 (1993).
- 55 McCormick, F., Signal transduction. How receptors turn Ras on.
Nature 363, 15-16 (1993).
- 56 McCormick, F., Activators and effectors of ras p21 proteins. *Curr.*
Opin. Genet. Dev. 4, 71-76 (1994).
- 57 Cooper, J.A., MAP kinase pathways. Straight and narrow or
tortuous and intersecting? *Curr. Biol.* 4, 1118-1121 (1994).
- 58 Acuto, O. & Cantrell, D., T cell activation and the cytoskeleton.
Annu. Rev. Immunol. 18, 165-184 (2000).
- 59 Angel, P. *et al.*, Phorbol ester-inducible genes contain a common
cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor.
Cell 49, 729-739 (1987).
- 60 Lee, W., Mitchell, P., & Tjian, R., Purified transcription factor
AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 49,
741-752 (1987).
- 61 van Straaten, F., Muller, R., Curran, T., Van Beveren, C., & Verma,
I.M., Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene:
deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc.*
Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80, 3183-3187 (1983).
- 62 Quantin, B. & Breathnach, R., Epidermal growth factor stimulates
transcription of the c-jun proto-oncogene in rat fibroblasts. *Nature*
334, 538-539 (1988).
- 63 Angel, P. & Karin, M., The role of Jun, Fos and the AP-1 complex
in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta.*
1072, 129-157 (1991).
- 64 Brenner, D.A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M., & Karin, M.,
Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour
necrosis factor-alpha. *Nature* 337, 661-663 (1989).
- 65 Goldgaber, D. *et al.*, Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid

- beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 7606-7610 (1989).
- 66 Karin, M., The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 270, 16483-16486 (1995).
- 67 Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S.J., & Karin, M., Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3094-3102 (1997).
- 68 Karin, M., Liu, Z., & Zandi, E., AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9, 240-246 (1997).
- 69 Liebermann, D.A., Gregory, B., & Hoffman, B., AP-1 (Fos/Jun) transcription factors in hematopoietic differentiation and apoptosis. *Int. J. Oncol.* 12, 685-700 (1998).
- 70 Wisdom, R., AP-1: one switch for many signals. *Exp. Cell. Res.* 253, 180-185 (1999).
- 71 Hess, J., Angel, P., & Schorpp-Kistner, M., AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J. Cell. Sci.* 117, 5965-5973 (2004).
- 72 Halazonetis, T.D., Georgopoulos, K., Greenberg, M.E., & Leder, P., c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 55, 917-924 (1988).
- 73 Ryseck, R.P. & Bravo, R., c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene* 6, 533-542 (1991).
- 74 Chiu, R., Angel, P., & Karin, M., Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell* 59, 979-986 (1989).
- 75 Karin, M., Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 851, 139-146 (1998).
- 76 Macian, F., Lopez-Rodriguez, C., & Rao, A., Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20, 2476-2489 (2001).
- 77 Schafer, P.H. *et al.*, Enhancement of cytokine production and AP-1 transcriptional activity in T cells by thalidomide-related immunomodulatory drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 1222-1232 (2003).
- 78 Burke, T.F., Casolaro, V., & Georas, S.N., Characterization of P5, a

- novel NFAT/AP-1 site in the human IL-4 promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 1016-1023 (2000).
- 79 Aikawa, Y. *et al.*, Treatment of arthritis with a selective inhibitor of c-Fos/activator protein-1. *Nat. Biotechnol.* 26, 817-823 (2008).
- 80 Liu, X.K., Clements, J.L., & Gaffen, S.L., Signaling through the murine T cell receptor induces IL-17 production in the absence of costimulation, IL-23 or dendritic cells. *Mol. Cells* 20, 339-347 (2005).
- 81 Goronzy, J.J. & Weyand, C.M., T-cell regulation in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 16, 212-217 (2004).
- 82 Johansen, C., Kragballe, K., Rasmussen, M., Dam, T.N., & Iversen, L., Activator protein 1 DNA binding activity is decreased in lesional psoriatic skin compared with nonlesional psoriatic skin. *Br. J. Dermatol.* 151, 600-607 (2004).
- 83 Avouac, J. *et al.*, Inhibition of activator protein 1 signaling abrogates transforming growth factor beta-mediated activation of fibroblasts and prevents experimental fibrosis. *Arthritis. Rheum.* 64, 1642-1652 (2012).
- 84 Miyazaki, H. *et al.*, The effects of a selective inhibitor of c-Fos/activator protein-1 on endotoxin-induced acute kidney injury in mice. *BMC Nephrol.* 13, 153 (2012).
- 85 Izuta, S. *et al.*, T-5224, a selective inhibitor of c-Fos/activator protein-1, attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury in mice. *Biotechnol. Lett.* 34, 2175-2182 (2012).
- 86 Tabata, A. *et al.*, Suppression of alloreactivity and allograft rejection by SP600125, a small molecule inhibitor of c-Jun N-terminal kinase. *Transplantation* 83, 1358-1364 (2007).
- 87 Holschermann, H. *et al.*, STAT-1 and AP-1 decoy oligonucleotide therapy delays acute rejection and prolongs cardiac allograft survival. *Cardiovasc. Res.* 71, 527-536 (2006).
- 88 Yoshida, T. *et al.*, Induction of insulin-dependent diabetes mellitus by total pancreatectomy for pancreatic islet transplantation in cynomolgus monkeys. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* 19, 661-666 (2011).
- 89 Ericzon, B.G., Wijnen, R.M., Kubota, K., vd Bogaard, A., &

- Kootstra, G., Diabetes induction and pancreatic transplantation in the cynomolgus monkey: methodological considerations. *Transpl. Int.* 4, 103-109 (1991).
- 90 Hirshberg, B. *et al.*, Pancreatic islet transplantation using the nonhuman primate (rhesus) model predicts that the portal vein is superior to the celiac artery as the islet infusion site. *Diabetes* 51, 2135-2140 (2002).
- 91 Evans, J.S., Gerritsen, G.C., Mann, K.M., & Owen, S.P., Antitumor and hyperglycemic activity of streptozotocin (NSC-37917) and its cofactor, U-15,774. *Cancer Chemother. Rep.* 48, 1-6 (1965).
- 92 Moertel, C.G., Hanley, J.A., & Johnson, L.A., Streptozocin alone compared with streptozocin plus fluorouracil in the treatment of advanced islet-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 303, 1189-1194 (1980).
- 93 Like, A.A. & Rossini, A.A., Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 193, 415-417 (1976).
- 94 Kuraya, D. *et al.*, Efficacy of DHMEQ, a NF-kappaB inhibitor, in islet transplantation: I. HMGB1 suppression by DHMEQ prevents early islet graft damage. *Transplantation* 96, 445-453 (2013).
- 95 Watanabe, M. *et al.*, Efficacy of DHMEQ, a NF-kappaB inhibitor, in islet transplantation: II. Induction DHMEQ treatment ameliorates subsequent alloimmune responses and permits long-term islet allograft acceptance. *Transplantation* 96, 454-462 (2013).
- 96 Takahashi, T. *et al.*, Donor pretreatment with DHMEQ improves islet transplantation. *J. Surg. Res.* 163, e23-34 (2010).
- 97 Melzi, R. *et al.*, Intrahepatic islet transplant in the mouse: functional and morphological characterization. *Cell Transplant.* 17, 1361-1370 (2008).
- 98 Emamaullee, J.A., Stanton, L., Schur, C., & Shapiro, A.M., Caspase inhibitor therapy enhances marginal mass islet graft survival and preserves long-term function in islet transplantation. *Diabetes* 56, 1289-1298 (2007).
- 99 Schroppel, B. *et al.*, Role of donor-derived monocyte

- chemoattractant protein-1 in murine islet transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 444-451 (2005).
- 100 Deng, R. *et al.*, Anti-TCR mAb induces peripheral tolerance to alloantigens and delays islet allograft rejection in autoimmune diabetic NOD mice. *Transplantation* 97, 1216-1224 (2014).
- 101 Bi, E.G. *et al.*, IL-12p40 is not required for islet allograft rejection. *Acta Pharmacol. Sin.* 27, 1065-1070 (2006).
- 102 Nomura, M. *et al.*, Induction of donor-specific tolerance by adenovirus-mediated CD40Ig gene therapy in rat liver transplantation. *Transplantation* 73, 1403-1410 (2002).
- 103 Melzi, R., Battaglia, M., Draghici, E., Bonifacio, E., & Piemonti, L., Relevance of hyperglycemia on the timing of functional loss of allogeneic islet transplants: implication for mouse model. *Transplantation* 83, 167-173 (2007).
- 104 Yoshida, T. *et al.*, The Impact of c-Fos/Activator Protein-1 Inhibition on Allogeneic Pancreatic Islet Transplantation. *Am. J. Transplant.* (2015 in press).
- 105 Pioli, C., Pucci, S., Barile, S., Frasca, D., & Doria, G., Role of mRNA stability in the different patterns of cytokine production by CD4+ cells from young and old mice. *Immunology* 94, 380-387 (1998).
- 106 Bendfeldt, H. *et al.*, Stable IL-2 decision making by endogenous c-Fos amounts in peripheral memory T-helper cells. *J. Biol. Chem.* 287, 18386-18397 (2012).
- 107 Bennet, W. *et al.*, Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans: a finding with implications for clinical intraportal islet transplantation? *Diabetes* 48, 1907-1914 (1999).
- 108 Titus, T.T. *et al.*, Adverse outcome of human islet-allogeneic blood interaction. *Transplantation* 75, 1317-1322 (2003).
- 109 Satoh, M. *et al.*, Successful islet transplantation to two recipients from a single donor by targeting proinflammatory cytokines in mice. *Transplantation* 83, 1085-1092 (2007).
- 110 Matsuoka, N. *et al.*, High-mobility group box 1 is involved in the initial events of early loss of transplanted islets in mice. *J. Clin.*

- Invest.* 120, 735-743 (2010).
- 111 Bottino, R. *et al.*, Transplantation of allogeneic islets of
Langerhans in the rat liver: effects of macrophage depletion on
graft survival and microenvironment activation. *Diabetes* 47,
316-323 (1998).
- 112 Kyriakis, J.M., Activation of the AP-1 transcription factor by
inflammatory cytokines of the TNF family. *Gene Expr.* 7, 217-231
(1999).
- 113 Kuraya, D. *et al.*, Efficacy of DHMEQ, a NF-kappaB inhibitor, in
islet transplantation: I. HMGB1 suppression by DHMEQ prevents
early islet graft damage. *Transplantation* 96, 445-453.
- 114 Flanagan, W.M., Corthesy, B., Bram, R.J., & Crabtree, G.R.,
Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by
FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 352, 803-807 (1991).
- 115 Ghosh, S. & Karin, M., Missing pieces in the NF-kappaB puzzle.
Cell 109, S81-96 (2002).
- 116 Jain, J., McCaffrey, P.G., Valge-Archer, V.E., & Rao, A., Nuclear
factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* 356,
801-804 (1992).
- 117 McCaffrey, P.G., Perrino, B.A., Soderling, T.R., & Rao, A., NF-ATp,
a T lymphocyte DNA-binding protein that is a target for
calcineurin and immunosuppressive drugs. *J. Biol. Chem.* 268,
3747-3752 (1993).
- 118 Ueki, S. *et al.*, Control of allograft rejection by applying a novel
nuclear factor-kappaB inhibitor,
dehydroxymethylepoxyquinomicin. *Transplantation* 82, 1720-1727
(2006).
- 119 Shibasaki, S. *et al.*, Immunosuppressive effects of DTCM-G, a
novel inhibitor of the mTOR downstream signaling pathway.
Transplantation 95, 542-550 (2013).
- 120 Contreras, J.L. *et al.*, Activated protein C preserves functional
islet mass after intraportal transplantation: a novel link between
endothelial cell activation, thrombosis, inflammation, and islet
cell death. *Diabetes* 53, 2804-2814 (2004).
- 121 Yin, D. *et al.*, Liver ischemia contributes to early islet failure

- following intraportal transplantation: benefits of liver ischemic-preconditioning. *Am. J. Transplant.* 6, 60-68 (2006).
- 122 Montana, E., Bonner-Weir, S., & Weir, G.C., Beta cell mass and growth after syngeneic islet cell transplantation in normal and streptozocin diabetic C57BL/6 mice. *J. Clin. Invest.* 91, 780-787 (1993).
- 123 Keymeulen, B. *et al.*, Effect of donor islet mass on metabolic normalization in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 35, 719-724 (1992).
- 124 Korsgren, O., Jansson, L., & Andersson, A., Effects of hyperglycemia on function of isolated mouse pancreatic islets transplanted under kidney capsule. *Diabetes* 38, 510-515 (1989).
- 125 Koh, A. *et al.*, Insulin-heparin infusions peritransplant substantially improve single-donor clinical islet transplant success. *Transplantation* 89, 465-471 (2010).