

Differential effects of everolimus and cyclosporine A on intimal α -actin-positive cell dynamics of allografts in mice

著者	松本 祐直
発行年	2005-03-15
URL	http://hdl.handle.net/10271/252

doi: 10.1097/01.TP.0000128610.93598.80

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 432号	学位授与年月日	平成17年 3月15日
氏名	松本祐直		
論文題目	Differential effects of everolimus and cyclosporine A on intimal α -actin-positive cell dynamics of allografts in mice (マウス頸動脈同種異系移植片内膜下における α -アクチン陽性細胞動態に対するエベロリムスおよびサイクロスポリンAの異なる効果)		

博士(医学) 松本 祐直

論文題目

Differential effects of everolimus and cyclosporine A on intimal α -actin-positive cell dynamics of carotid allografts in mice

(マウス頸動脈同種異系移植片内膜下における α -アクチン陽性細胞動態に対するエベロリムスおよびサイクロスポリンAの異なる効果)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

近年、我々はマウス頸動脈同種異系移植モデルを用いて、ドナー中膜血管平滑筋細胞が平滑筋細胞マーカーの一つであるSMA (smooth muscle α -actin)を発現するレシピエント由来の細胞に置き換わることを報告した。本研究では、上記モデルを用いて、移植後の新生内膜下におけるドナーとレシピエントの細胞動態に対する免疫抑制薬のサイクロスポリンAと増殖因子抑制薬のエベロリムスの効果を検討した。さらに、上記2つの薬物のマウス心臓移植片生着に対する効果の検討も行った。

〔材料ならびに方法〕

実験動物には、雌性マウス(C57BL/6[B6]、BALB/c[B/c])あるいは、全身にマーカー遺伝子である緑色蛍光タンパク (green fluorescent protein [GFP])を発現するB/cマウス(GFP-B/c)をドナーあるいはレシピエントとして用いた。心臓移植は、B6およびB/cマウスを用いて異所性(腹部大動静脈)に行い、移植片の拍動は触診により評価した。頸動脈移植はB6およびGFP-B/cマウスを用いて同所性に行った。プラセボ、サイクロスポリンA(20mg/kg per day)または、エベロリムス(1.0mg/kg per day)を移植直後から、浸透圧性のミニホンプを用いて8週間皮下投与した。2,4,8週間後、頸動脈移植片を摘出、凍結切片作製、(免疫)染色した後、組織評価を行った。

〔結果〕

プラセボ投与群の頸動脈移植片(GFP-B/c \rightarrow B6)において、新生内膜は経時的に増大した。SMA陽性レシピエント細胞は4週間後からみとめられ、8週間後においては、約50%がSMA陽性レシピエント細胞であった。エベロリムス投与群における新生内膜形成、SMA陽性レシピエント細胞の蓄積は、プラセボ投与群と比較すると有意に抑制されたが、サイクロスポリンA投与の効果はみとめられなかった。このマウスの組み合わせを用いた心臓移植片において、エベロリムス、サイクロスポリンAのいずれも、十分な生着延長効果を示さなかった。

ドナーとレシピエントを入れ替えた頸動脈移植片(B6 \rightarrow GFP-B/c)のプラセボ投与群では、GFP-B/c \rightarrow B6のプラセボ群とほぼ同様の結果が得られた。エベロリムス、サイクロスポリンA共に、新内膜形成を抑制し、SMA陽性レシピエント細胞の蓄積を完全に抑制した。また、両薬物は心臓移植片の生着を大きく延長させた。

また、両方の組み合わせ(GFP-B/c \rightarrow B6、B6 \rightarrow GFP-B/c)の全て群において、SMAを発現するドナー由来の細胞はみとめられなかった。

〔考察〕

近年において、移植後の急性拒絶反応は、より効果的な免疫抑制薬の開発や手術技術の向上などにより飛躍的に抑えられるようになったものの、移植後の慢性拒絶反応は、未だあまり改善されないままである。後者の主な原因は、移植後動脈硬化によるといわれており、その病態は“一般的な動脈硬化”と類似している。すなわち、新生内膜における血管平滑筋細胞の過増殖による血管閉塞である。従来、新生内膜にみられる平滑筋様細胞は、ドナーの血管中膜に由来すると考えられてきた。しかし、少なくとも我々のモデルでは、頸動脈移植片において、SMAを発現するドナー由来の細胞は全く認められず、それらの細胞は全てレシピエント由来であった。また、マウス心臓移植片冠動脈の新生内膜において、レシピエント由来骨髄細胞の関与を示唆する論文も報告されている。これらのことから、従来の概念(ドナー中膜由来平滑筋細胞の関与)とは全く相反することが示唆された。

エベロリムスは両方の組み合わせ(GFP-B/c→B6、B6→GFP-B/c)の頸動脈移植片において、新生内膜形成・SMA陽性レシピエント細胞の蓄積を抑制したが、サイクロスポリンAは一つの組み合わせ(B6→GFP-B/c)、即ち、心臓移植片の生着を大きく延長した組み合わせにおいてのみ、新生内膜形成・SMA陽性レシピエント細胞の蓄積を抑制した。このことから、新生内膜形成・SMA陽性レシピエント細胞の出現と拒絶抑制の程度は、関連していると推察された。

免疫抑制作用だけを有する薬物では、血管移植後の動脈硬化及び心臓移植後の拒絶反応を十分に抑制できなかったが、細胞増殖抑制作用を有した薬物はそれを可能にした。このことから、免疫反応だけでなく、細胞増殖も同時に抑制することが移植後の動脈硬化抑制には重要であることが示唆された。

〔結論〕

マウス頸動脈移植片の新生内膜において、SMAを発現するドナー由来の細胞は全くみとめられず、それらの細胞は全てレシピエント由来であった。また、免疫を抑制するだけでなく、細胞増殖も抑制することが移植後の動脈硬化を抑制するためには必要であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

臓器移植後の慢性拒絶反応は、急性拒絶反応とは異なり、免疫抑制剤では完全に抑制されないことが知られている。慢性拒絶反応の1つの機序として移植臓器の血管の内膜肥厚・動脈硬化が考えられている。申請者は先にマウス頸動脈同種異系移植モデルを用いて、移植血管の中膜の平滑筋細胞が、平滑筋マーカーのsmooth muscle α -actin(SMA)を発現するレシピエント由来の平滑筋細胞に置き換わることを示している。本研究では、同じモデルを用いて、移植後の新生内膜におけるドナーとレシピエントの細胞動態を調べ、新生内膜の細胞がどちらに由来するかを検討し、更にこれに対する免疫抑制薬のサイクロスポリンAと増殖因子抑制薬のエベロリムスの影響を検討した。また、これらの薬物のマウス心臓移植片生着に対する効果も検討している。

実験動物には、雌性マウス(C57BL/6[B6]、BALB/c[B/c])あるいは、全身に緑色蛍光タンパク(green fluorescent protein [GFP])を発現するB/cマウス(GFP-B/c)をドナーあるいはレシピエントとして用いた。細胞が緑色蛍光を発するか否かによりドナーとレシピエントのどちらに由来するかを判定している。心臓移植は、ドナーの心臓をレシピエントの腹部大動静脈に移植し、拒絶反応は、移植片の拍動の有無を触診により判定している。頸動脈移植は同所性に行った。薬物は移植直後から8週間皮下投与している。

本研究では以下の結果が得られた。

GFP-B/cマウスからB6マウスへの頸動脈移植では、移植血管の新生内膜は経時的に増大し、SMA陽性レシピエント細胞の蓄積が4週間後からみとめられた。エベロリムスは新生内膜形成、SMA陽性レシピエント細胞の蓄積を有意に抑制した。しかし、サイクロスポリンAは抑制しなかった。心臓移植片に対しては、median survival time(MST)に着目した場合、両薬物は生着延長効果は十分ではないものの、個々に検討した場合、エベロリムスで延長効果が認められる例があった。

ドナーとレシピエントを入れ替えた頸動脈移植では、エベロリムス、サイクロスポリンA共に、新生内膜形成・SMA陽性レシピエント細胞の蓄積を抑制し、心臓移植片の生着延長効果を示した。

また、両方の組み合わせ(GFP-B/c→B6、B6→GFP-B/c)の全ての群において、SMAを発現するドナー由来の細胞はみとめられなかった。

以上の結果から、頸動脈移植片において、新生内膜にみられる平滑筋様細胞は、レシピエント由来であると結論している。また、新生内膜形成・SMA陽性レシピエント細胞の出現と拒絶抑制の程度は関連していると推測している。しかし、免疫抑制作用だけを有する薬物は、血管移植後の内膜肥厚及び心臓移植後の拒絶反応を十分に抑制せず、細胞増殖抑制作用を有する薬物はこれらを抑制することから、移植後の内膜肥厚・動脈硬化抑制には、免疫反応だけでなく、細胞増殖も同時に抑制することが重要であるとしている。

本研究で得られた成果は、臓器移植後の慢性拒絶反応の予防法を考える上で、極めて有用な知見であると考えられ、高く評価出来る。上記の申請者の論文の示説に対し、以下の質問を行った。

- 1) これまで、移植後の血管内膜肥厚において、レシピエント由来細胞が関与しているという仮説はあったか
- 2) このモデルで移植した心臓の血液の流れはどのようになっているか
- 3) このモデル作成の成功率はどれくらいか
- 4) Rejectionが起きた場合、心移植片の組織にはどのような変化があるのか
- 5) 移植により血管内皮障害は起こるか
- 6) 同種同系間の移植では内膜肥厚は起こらないのか
- 7) 内膜肥厚はどの程度進行するのか。内皮障害による場合とどのように異なるか
- 8) 他の動物でも移植後の内膜肥厚はみられるのか
- 9) 血管内皮障害による内膜肥厚とは機序が異なるのか
- 10) レシピエントのどこの細胞が蓄積するのか
- 11) エベロリムスは血管内皮障害による内膜肥厚を抑制するか
- 12) GFP-B/cからB6マウスへの頸動脈移植で、8週間後にエベロリムスがレシピエントのSMA陰性細胞を増加させるのはなぜか

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 橋本久邦
副査 浦野哲盟 副査 渡邊裕司