

移植・外科研究部（移植免疫研究室、実験外科研究室）

（１）概要

当部の研究は臓器移植と再生医療に関連しており、移植免疫制御、遺伝子療法、組織・細胞移植、胎児治療、バイオ人工臓器、ナノメディシンのキーワードで進められている。室長以外の部内メンバーは流動研究員 1 名、ポスドク 6 名、支援員 3 名、研究助手 4 名、学生大学院生 10 名、外部機関所属共同研究者 3 名である。

鈴木盛一部長は 3 月に体調を崩し 5 ヶ月間のがんと闘病の後、逝去した。鈴木部長は平成 4 年 4 月に国立循環器病センター研究所室長から実験外科生体工学研究部長（当時）になり、ライフワークであった臓器移植後の免疫制御に関する研究を柱に、近年は再生医療や人工臓器開発に研究の幅を広げ、現在の移植・外科研究部を作り上げた。

（２）研究内容

再生医療に関する研究

（a）臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究

肝硬変症、代謝性肝疾患、劇症肝炎は移植に替わり、細胞療法で治療できる可能性がある。移植細胞としては肝細胞以外に、胚性幹細胞（ES,EG 細胞）、肝幹細胞、造血幹細胞などが候補と考えられている。臍帯血由来の造血幹細胞が血球系以外の臓器に分化する能力があると言われていることからヒト臍帯血から造血幹細胞の分離システムを確立し、造血幹細胞が肝細胞に分化するための生体内環境を NODSCID マウスへの移植により検討した。

（b）肝細胞移植用チミジンキナーゼトランスジェニックラットの作製

臓器ドナー不足の解決策として動物臓器をドナーとする異種移植が考えられている。我々は同種移植と異種移植の中間的発想として、ヒト肝をブタ体内で構築させるということを目的とし、モデル動物としてアルブミンプロモーター制御により肝で特異的に単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼを発現し、ガンシクロビル（GCV）の投与により肝障害誘発可能なトランスジェニックラットの作製をした。トランスジェニック個体では GCV 濃度依存的な細胞障害性が認められた。今後、本系とヒト由来肝細胞移植を組み合わせ、ヒト肝細胞のラット肝内生着系を確立したい。

（c）同種・異種肝細胞の生着条件の検討

細胞移植は概念的には臓器移植と同様古くから考えられていた。しかしながら、医療への応用はさほど普及していない。その理由の一つに外来移植細胞は宿主組織内から速やかに排除されるということがある。この排除は免疫拒絶反応によるだけでなく、むしろ異物に対する非特異的な排除機構が大いに関わっていると考えられる。そこで細胞周期停止因子として生理的に発現する p21 を導入し、移植細胞の生着・増殖環境の構築を図った。アデノウイルスベクターにてヒト p21 遺伝子を SCID マウス肝に導入後、正常ヒト肝細胞由来 THLE 細胞を脾内に移植したところ多くの生着細胞が観察された。今後、胎児への細胞移植と組み合わせることにより、さらに高い置換率が達成できるのではないかと考えている。

（d）先天代謝異常症に対する幹細胞移植の実験的検討

リソソーム蓄積病の一つであるムコ多糖症 VII 型の中樞神経病変に対する神経幹細胞移植療法を同症マウスである MPSVII を用いて検討した。非ムコ多糖症マウスの受精後 14 日目胎仔脳から神経幹細胞を選択的に培養、移植したところ、神経幹細胞は脳全体に広がった。神経幹細胞の移植療法は極めて有用であると推察された。

（e）肝再生時の細胞内シグナル伝達の解析

STAT-3 は、細胞の分化・増殖に強く関与する転写因子である。HGF、IL-6 などのサイトカインで活性化されることが知られており、特に消化器系の成熟細胞の分裂増殖において重要な役割を果たしている。抗 Fas 抗体投与によるマウス劇症肝炎モデルで STAT3 非誘導群では

数時間で広範な肝細胞のアポトーシスが認められたが、誘導群ではほぼ完全に抑えられ、GOT/GPT、ビリルビンの上昇も有意に低下した。この機構はカスパーゼ介在とレドックス依存性機序による抑制と考えられた。この STAT3 の転写レベルでの遺伝子発現制御機構の詳細は未だ不明である。我々は ChIP 法を用いて新規プロモーター配列を含む断片を同定した。現在、制御遺伝子領域をクロニングし、肝再生における機能を検討中である。

一方 STAT-1 は、心筋などの虚血に際し誘導され、一般に虚血後の細胞死を誘導すると考えられている。我々は、ラット肝細胞における低酸素再酸素培養系で、STAT1 は処置直後の細胞死を若干誘導するものの、24 時間以降は障害からの細胞生存を強く促すことを確かめた。STAT 1 下流には、HSP70 などの存在が示されているが、STAT1 は、虚血再灌流後の肝細胞死よりも、むしろ生存維持に重要であると考えられた。

(f) 生物材料の特性を生かしたバイオ血液浄化システムの開発

血液濾過透析や血漿交換を組み合わせた血液浄化法は 1980 年代の中空系カラムの出現により急速に発展し、現在も劇症肝炎をはじめ様々な疾患に対する治療法の基幹をなしている。しかしながら、ひとりの患者に対し大量の血漿が必要であることや亜急性劇症肝炎では昏睡からの一時的な覚醒効果はみられるものの最終的な救命率の向上は得られないなど問題点も多い。このような現行の血液浄化法の限界の背景には、中空系カラムによる血中物質の除去が単に膜の孔径にのみ依存し、生体にとって要不要の別なく排除してしまうという原因が考えられる。病期の体液には有害性物質だけでなく疾患に反応して治癒を促す物質も存在し、これらも透析・濾過によって排除されてしまう。理想的な血液浄化は生体が行っているように毒性物質のみを選択的に取り除くシステムである。

工学的手法を補う目的で肝細胞あるいは腎細胞を利用したバイオ人工肝・人工腎の開発がなされ、欧米では既に総計 100 例近い臨床試験も報告されている。しかし、生きた細胞を用いる場合、医療機器としての品質管理や安全性確保が難しく一般的な治療として普及するには多大な困難が予想される。そこで、我々は細胞全体から、バイオ人工臓器の構成に必要な機能だけを選択・抽出し、ナノメータースケールの人工膜上に生理機能を構築するという戦略を考えている

すなわち、細胞表面に存在し細胞内外の物質輸送を行うトランスポーター分子を人工膜に固定化するという新規な発想による血液浄化システムを検討している。これらの機能性タンパクは、それぞれ異なった基質特異性を有するので肝・腎不全の病態を改善するために必要な分子種を選び出すことができる。こうして再構成された人工合成膜により生きた細胞のように統合した選択的・能動輸送を実現させることが我々の計画の目標である。一方、エネルギーに依存しないタンパク性のアフィニティー利用がある。メガリンは腎近位尿細管等に発現するレセプタータンパクでアルブミンなど比較的大きなタンパク質の異化を行っている。特に生理学的な重要性としては β -2-ミクログロブリンの再吸収を行っていることである。維持透析時に除去しきれない血中 β -2-ミクログロブリンが徐々に関節などに蓄積しアミロイド化する透析アミロイドシスの防止など、タンパクの有するアフィニティーを最大限に利用し、不要物質の除去という機能を現在の工学的装置に組み入れたいと考えている。

移植免疫領域の研究

(a) 新規免疫抑制療法の開発

新規の免疫抑制剤や遺伝子導入療法を駆使することにより臨床応用可能な新たな拒絶反応制御技術を開発することを目的とし、抗 ICOS 抗体およびアデノウイルスベクターによる CTLA4Ig 強制発現により ICOS/B7h 経路、CD28-CTLA4/B7 経路を選択的に阻害することにより、補助シグナル経路の臓器特性を解析し、移植臓器に対する拒絶反応阻止効果、免疫寛容導入・維持とその作用機序についてラット肝移植、心移植系で検討した。この結果、両

者併用により明らかな臓器生着延長が確認された。

(b)移植免疫寛容の成立に関連する新規遺伝子の探索

移植免疫寛容状態を作り出す一連の遺伝子の発現について、生体部分肝移植後寛容誘導できた臨床症例及び腎移植長期安定レシピエントの末梢血リンパ球で調べた。肝移植レシピエントで非移植者に対し 2 以上の増加、0.5 以下の減少を示した遺伝子を抽出したところ、前者は 120、後者は 169 遺伝子であった。一方腎移植ではさらに詳細に検討を進め、抗原提示細胞から T 細胞活性化への過程で、ICAM1、B7/7.2、CD28、CD3 が発現低下、MAP キナーゼを抑制する hVH-5 の発現増加が見られ、レシピエントが免疫抑制状態であることが検証された。一般に移植の予後管理では臨床検査データの推移により免疫抑制剤の増減を行ってきたが、本研究ではさらに直接的な方法でレシピエント免疫系の分子動態を調べることができた。今回用いた GeneChip は一般仕様であるが、免疫系解析の為に遺伝子数を限定したチップを作成することにより、多くの症例を比較的短時間かつ低コストで解析し、予後と免疫系の状態の詳細な解析が可能になると考えられた。

(c)心移植慢性拒絶反応の治療戦略推進に向けた基礎実験系の確立

心移植慢性拒絶反応の主要な病理病変は冠動脈硬化である。その病因は今なお不明な点が多く、複数の因子が発症に関わっている。本研究は、心移植後慢性拒絶反応の診断及び治療に向けて関連因子の分子生物学的変化の解明を目的としている。心移植後冠動脈硬化症の実験モデルで移植後 120 日に組織の線維化が亢進し、血管内腔は新生内膜の増殖でほとんど閉塞していた。このモデルでは、慢性血管病変の発症はほぼ移植後 60 日頃に始まり、術後 120 日から 180 日の間に、典型的な重度慢性血管病変が発症することが分かった。現在、慢性拒絶反応関連因子 (TNF- α 、TGF- β 、MIP-1 α 等) の遺伝子発現変化、作用部位、及びその作用機序について検討している。

医療行政への貢献

(a)公共的ヒト組織バンクシステム構築に関する検討

病気の治療法の開発や改良のため、特に創薬や再生医療の領域でヒト組織利用研究の重要性が高まっている。しかしながら本邦では脳死体の臓器・組織の研究利用が法的に禁止されている等の事情により、未だに研究用ヒト組織は輸入に依存している。国の方針としては平成 10 年の厚生科学審議会答申（黒川答申）で、提供者本人の承諾を前提とした「手術摘出組織」の研究利用が提案されている。手術を含め医療行為は個人の利益の為に行われるが、研究成果は社会の利益として還元される。そこに医療と研究を一体に考えてはならない理由がある。組織提供のためには「患者さん本位のインフォームド・コンセント」を誠実かつ適切に実施することが不可欠との考えから、高度先進医療の経験者を含む一般市民に「協力者」として研究への参加を請い、随時ディスカッションを行っている。また、模擬患者（SP）に対して現場の外科医が研究利用に関する説明を行うシミュレーションを実施し、現行の問題点の分析を進めている。これまでに患者・家族への説明の方法や内容、さらには遺伝子解析研究等に関連する個人情報保護の問題など、倫理的・制度的な諸問題について検討した。

(b)異種移植の臨床応用に関わる指針案の検討

移植医療における新しいドナーソースとしての家畜臓器の利用や再生医療における動物細胞を用いたヒト細胞の維持など、異種動物由来の臓器・組織・細胞の医療目的使用はもはや遠い先の問題ではなくなっている。鈴木部長は日本移植学会異種移植のガイドライン検討作業部会の代表として平成 11 年 2 月に異種移植における感染症に関するガイドラインを作成した。これを基に平成 13 年度厚生科学研究異種移植の臨床研究の実施に関する安全性確保についての研究班が組織、参加した。その成果として 7 月に「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針（医政研発第 0709001）」が示された。