

心移植後冠動脈病変（慢性拒絶反応）の臨床的、分子生物学的研究

所属機関 東京女子医科大学附属第二病院内科
研究者名 大川 真一郎

《研究の概要》

本邦でも最近心臓移植が再開され、その効果に大きな期待がもたれている。しかし拒絶反応はなお心移植後の最も重篤な合併症である。移植心の冠動脈硬化も多く症例で認められ、移植心長期生着の最大の障害因子となっているが、その病態はほとんどわかっていない。これらの問題点を克服するためには、より安全な免疫抑制法の確立と慢性拒絶の病態解明を通じた予防法の確立が急務である。そこで本事業では移植後冠動脈病変（慢性拒絶反応）を中心とした臨床病理学的検討と分子生物学的研究を施行する基礎的研究ならびに臨床的検討を6人の班員により分担研究した。

臨床病理学的検討：(1) 心移植後の心電図で右脚ブロック型 QRS 波形を示す頻度の高いことが知られているが、その成因については諸説があり未だ一定の見解をえていない。そこで本研究では心移植後不完全右脚ブロック型 QRS 波形を呈した3剖検例で刺激伝導系の連続切片標本を作成し、刺激伝導系とくに右脚を中心に病理組織学的変化の有無を検討した。7歳、男児では房室結節動脈は高度の内膜肥厚を示したが、ヒス束貫通部、分岐部ともに正常。左脚後枝の中間部と末梢部に散在性細胞浸潤をみたが左脚前枝は正常。一方、右脚もI部、II部、III部とも正常であった。他の20歳、女性、23歳、男性例でも中、小の冠動脈には内膜肥厚を特徴とする移植後冠動脈硬化を認めたが刺激伝導系病理所見では、右脚を含め特徴的な所見に乏しかった。(大川、千田)

(2) 心筋構築から見た心臓移植対象症例に対する左室縮小形成術の適否につき検討した。拡張型心筋症では必ずしも後側壁で相対的減少を示さず、Batistaの左心室縮小形成術の適応には細心の注意を要すると考えられた。また虚血性心筋症の心筋病変は多分に非可逆的な変化が主体として確認され、糖尿病、心筋炎などの二次的因子の関与を鑑別する必要がある。さらに心臓移植対象疾患（拡張型心筋症、虚血性心筋疾患等）の冠動脈病変を含めた免疫応答能異常につき検討した。(河合)

基礎的研究：(1) マウス異所性心臓移植モデルにおいて、移植後動脈硬化巣の新生内膜平滑筋細胞の大部分がレシピエント由来であることを明らかにした。また、マーカー発現マウスを用いた骨髄移植を行い、「骨髄由来平滑筋前駆細胞」が慢性拒絶の病態生理に重要であり、造血幹細胞から分化することを明らかにした。またスタチンやアンジオテンシン受容体拮抗薬による移植後動脈硬化の抑制の可能性も示唆された。(佐田)

(2) 心移植後冠動脈硬化症の病態とその治療法の開発について小動物および大動物を用いた実験系で検討を加えた。Egr-1は慢性拒絶心の冠動脈内膜で発現増強が見られ、Egr-1に対するアンチセンス遺伝子導入では新生内膜が有意に減少していた。また抗 ICOS 抗体投与で著明な内膜肥厚の抑制がみられた。一方、抗 PD-L1 抗体投与で有意に拒絶が促進され、冠動脈狭窄が促進していた。また治療法を開発するためミニブタの腹部心移植による慢性拒絶モデルを開発したが、サイクロスポリンの短期投与により、3~5ヶ月後に臨床例と同様の内膜肥厚を生じることが示された。心移植後冠動脈硬化症の病態に諸種の増殖因

子、サイトカイン、接着分子、組織適合抗原、細胞周期の関与などがあきらかになった。さらに慢性拒絶における T 細胞の役割について、平滑筋増殖を含めその機構が明らかになった。(磯部)

臨床的検討: 心移植患者 23 名を対象に、観血的および非観血的なアプローチで心移植後冠動脈病変を検討した。心筋内小血管の病変をも包括した冠動脈病変を検討する上で、ドップラーガイドワイヤーを用いた ATP 負荷による冠動脈予備能検査は有用であり、微小循環を含めた冠動脈動態の低下傾向を認めた。冠内超音波法は検索対象血管が心外膜冠動脈に限られてはいるが、肥厚した血管内膜の定量的検討に優れており、前述の冠動脈予備能検査と兼ね合わせることにより、心外膜から心筋内までの冠動脈のより詳細な検討が可能となった。これらの検討結果は移植後の免疫抑制薬の調節に極めて有用であった。(布田)

研究者氏名	所属機関名	分担研究テーマ
大川 真一郎	東京女子医大第二病院内科 教授	刺激伝導系の病理組織学的検討 と研究全体の総括
千田 宏司	東京都老人医療センター循環器科 部長	刺激伝導系の病理組織学的検討
河合 祥雄	順天堂大学循環器科 助教授	臨床病理学的検討
佐田 政隆	東京大学大学院循環器内科 助手	基礎的研究
磯部 光章	東京医科歯科大学大学院循環制御学 教授	基礎的研究
布田 伸一	東京女子医大第二病院内科 講師	臨床的検討

研究報告

臨床病理学的検討

1. 心移植後心電図で右脚ブロック波形を呈した3剖検例における刺激伝導系の病理組織学的検討（大川、千田）

I. 研究目的

心移植後の心電図変化として右脚ブロックの高頻度なることが知られている。その成因については諸説があり未だ一定の見解をえていない。そこで本研究では心移植後不完全ないし完全右脚ブロック型 QRS 波を呈した当該剖検心で刺激伝導系の連続切片標本を作製し、刺激伝導系とくに右脚を中心に病理組織学的変化の有無を検討した。

II. 研究の対象と方法

心移植後不完全右脚ブロック型 QRS 波形を呈した3例の剖検心につき Lev 法に従い連続切片標本を作製し、刺激伝導系の病理組織学的検討を行った。

III. 研究成果

(1)心移植後不完全右脚ブロック型 QRS 波と右軸偏位を示し移植7年目に突然死した7歳、男児の刺激伝導系病理所見では洞房結節 SN はニヶあり、レシピエント SN、ドナー SN とも正常。房室結節 AVN には軽度リンパ球浸潤がみられ、AVN 動脈は高度の内膜肥厚を示した（磯部付図参照）。ヒス束は貫通部、分岐部ともに正常。左脚後枝の中間部と末梢部に散在性細胞浸潤をみたが左脚前枝は正常。一方、右脚も I 部、II 部、III 部とも正常であった。その後、(2)心移植後不完全右脚ブロック型 QRS 波を呈した20歳、女性の剖検例で刺激伝導系の検討を行ったが、右脚の変化は軽微であった。(3)さらに心移植後不完全右脚ブロック型 QRS 波を呈した23歳、男性剖検例で刺激伝導系の病理組織所見を検討した。中、小の冠状動脈には内膜肥厚を特徴とする移植後冠状動脈硬化（磯部付図参照）を認めたが、刺激伝導系病理所見では、右脚を含め特徴的な所見に乏しかった。

IV. 考察

心移植後の心電図変化として右脚ブロックが高頻度に出現する成因として刺激伝導系そのものに特異的な所見の存在を推測したが、本事業での3例の剖検心での検討では右脚そのものの変化は光学顕微鏡レベルでは特徴的な所見に乏しかった。今回の検討しえた症例数が少なく心移植後不完全右脚ブロック型QRS波形と移植心の刺激伝導系組織像との関連に明確に否定的な結論がえられたわけではない。しかし同じく不完全右脚ブロックを呈する二次孔型心房中隔欠損例でも心電図変化と刺激伝導系病理像との間に直接の因果関係を見いだしえなかった事実を想起させる。しかしながら心移植後剖検例という限られた対象ではあるが、今後さらに症例を蓄積する機会があれば上記の関係の有無につき検討を続けたい。

(論文)

1. Kubo Y, Murakami S, Matsuoka O, Hotta N, Oinuma S, Shinagawa M, Omori K, Nunoda S, Otsuka K, Ohkawa S, Cornelissen G, Halberg F: Cornelissen G, Halberg F: Toward chronocardiologic and chronomic insights: dynamics of heart rate associated with head-up tilting Biome, dPharmacother 57 (Suppl 1): 110s-115s, 2003
2. 千田宏司, 軽部裕也, 谷口 泰, 岡林潤, 濱松晶彦, 宮崎徳蔵, 村山 繁, 森 眞由美, 原田和昌, 山之内 博: 完全房室ブロックにてペースメーカー植込み後, 右心不全有意の難治性心不全を呈した一症例. Geriat Med 2003; 41(5), 719-731

(著書)

1. 大川真一郎: 超高齢者にみられた完全房室ブロック. 小川 聡 編, 心電図検査のコツと落とし穴 中山書店, 2003, p. 112-113
2. 大川真一郎: 副伝導路の病理. 杉本恒明 監、井上 博 編, 新不整脈学 南江堂, 2003, p. 239-243
3. 千田宏司, 大川真一郎: 洞不全症候群. 高久史麿 総監、溝口秀昭他 監, 外来診療のすべて 改訂第3版 メジカルビュー社, 2003, p. 302-303
4. 岡島清貴, 布田伸一, 下倉和修, 飯島裕子, 堀田典寛, 生沼幸子, 松岡 治, 品川亮, 久保 豊, 大塚邦明, 大川真一郎: Fallot 四徴症心内修復術後 25年を経過して心移植対象難治性心不全を呈した成人例. 堀 正二 監修, 心不全 Cases & Lectures 永井書店, 2004, p. 74-77
5. 千田宏司, 大川真一郎: 病理学的考察. IV. 病態生理. 永井良三、西村敬史編、心房細動一予防・管理・治療南江堂, 2004, p. 28-35

2. 心臓移植対象症例(拡張型心筋症、虚血性心筋疾患等)の形態学的研究(河合)

I 心筋構築から見た心臓移植対象症例に対する左室縮小形成術の適否

目的: 心臓移植の対象となる拡張型心筋症患者に対する外科的なアプローチとして、実地

症例数が少ない移植の他に、僧帽弁輪形成術、左心室縮小形成術や Cardiomyoplasty などが行われる。その中で、Batista の左心室縮小形成術が最も多く行われているが、その理論的根拠や解剖学的な裏付けは十分とは言えない。特に、拡張型心筋症で後側壁に病変が強いとすることに対する共有する認識はない。そこで、拡張型心筋症剖検例を用い、切除部位（後壁）の心室筋性状を他の心室部位と比較した。方法：拡張心 46 例（内訳；線維症優位型拡張型心筋症 10 例、線維症非優位型拡張型心筋症 27 例、慢性心筋炎 9 例）（平均 45 ± 16 歳）、不整脈源性右心室異形成症（ARVD）9 例（平均 31.5 ± 14 歳）の両心室中間部横切面を切り出し、標本作製。左心室前壁、後側壁、心室中隔中央部それぞれの部位において、壁に直交する直線 3 本を引き、中拡大視野で線に沿って検鏡し、線と交差する緻密層心筋細胞数より、壁構成心筋細胞総数を計測した。後側壁の心室壁構成心筋細胞層数（壁層数）を、前壁および心室中隔中央部の壁層数、ならびに对照の非虚血性心疾患 11 例（平均 51 ± 18 歳）の壁層数と比較した。結果：拡張心の左心室壁層数は前壁、後壁、中隔のいずれにおいても、对照に比し有意の減少を示し（ 201 ± 101 層 vs 336 ± 46 層、 185 ± 92 層 vs 349 ± 65 層、 249 ± 95 層 vs 361 ± 60 層）、ARVD でも同様であった（ 196 ± 67 層、 184 ± 49 層、 258 ± 104 層）。拡張心では後壁は中隔に比し有意に壁層数の減少をみたが、前壁とは有意差を示さなかった。壁層数が相対的に後壁で減少していたのは慢性心筋炎の 2/9、拡張型心筋症の 22/37、ARVD の 7/9（对照は 3/11）であり、後側壁で心筋細胞束が左右から融合するとの所見は認められなかった。

結論：拡張型心筋症では各心室部位での壁層数は、对照の非虚血心に比して減少しているが、必ずしも後側壁で相対的な減少を示さない。特に線維症の多い群では病変が不均一であり、拡張型心筋症に対する左心室縮小形成術の適応には細心の注意を要すると考えられた。

II 虚血性心筋疾患の生検所見

【目的】拡張型心筋症と鑑別すべき病態として提示された「虚血性心筋症」は現時点では心臓移植の対象疾患の一つとされている。しかし、その組織所見が通常虚血性病変のみであるか、心筋変性もしくは心筋委縮であるかは、十分に明らかにされていない。

【方法】拡張型心筋症様病態を呈した症例の連続心筋生検症例中より、有意な冠状動脈病変を有した症例を虚血性心筋疾患として、その組織所見を術中生検虚血心症例と拡張型心筋症症例の所見と比較検討した。

【結果】検索した拡張型心筋症関連心筋生検例 120 例中、うち 5 例が虚血性心筋症に該当した。症例は 32 歳から 72 歳のいずれも男性で、2 枝病変 1 例、3 枝病変 4 例、左室機能はびまん性に障害され（平均駆出率 32.8%）、1 例のみ V1、V2 に QS 波を認めた。生検では、心内膜弾性線維症、（急性期虚血心に見られるような）水腫状変化、巣状・斑状線維化、間質細胞浸潤を見た。

【結論】虚血性心筋症の古典的な心筋萎縮変性は、生検では見られなかった。「虚血性心筋症」は、元来、拡張型心筋症と鑑別すべき疾患で、注意深い診察で鑑別可能な疾患であるが、その想定される組織像を除いて、虚血性心臓病とは別個に確立すべき臨床的範疇・疾病概念であるかは疑問である。冠状動脈狭窄例に見られるびまん性左心室収縮障害（虚血性心不全）の成因には糖尿病、心筋炎などの二次的因子の関与を鑑別する必要があるが、

移植の対象疾患に虚血性心筋疾患を含めることには矛盾しないと考えられる。

Ⅲ 心臓移植対象疾患（拡張型心筋症、虚血性心筋疾患等）の冠状動脈病変を含めた免疫応答能異常

【目的】心移植後冠動脈病変における被移植者側の因子を検討するために、虚血性心筋疾患を含む拡張型心筋症における冠状動脈、心筋病変、免疫応答能異常の可能性を検討した。

【方法】拡張型心筋症様病態を呈した剖検例 68 例の冠状動脈病変、心筋線維症形態、間質細胞浸潤（より、虚血性心筋疾患、慢性心筋炎、特発性拡張性心筋症に分け、病理学的に比較し、また先行感染症状の有無を検討した。心筋疾患の連続心筋生検 99 例中におけるアレルギー歴と病理所見とを対比した。アレルギー歴、薬物過敏症の有無は入院病歴、外来病歴、現症所見を参照し、不明、記載不十分例は、可能な限り患者本人もしくは家族に確認した。間質の単核細胞数は HE 染色標本、400 倍視野、250 ミクロン方眼内の細胞数を、各標本 5 視野で算定し、10 万ミクロン平方当たりの平均細胞数で表現した。線維症は azan 染色標本で（-）から（3+）に 4 段階に分類し、0-3 の点数をつけ半定量化し、また、それを平均し線維化指数とした。

【結果】虚血性心筋疾患 1 例（55 歳男性、発症年齢 45 歳）、慢性心筋炎 15 例（平均 49.9 歳）、拡張型心筋症 52 例（平均 45.6 歳）。慢性心筋炎と拡張型心筋症間に、発症年齢、全経過、心不全期間、心胸郭比、左心室駆出率、心電図所見頻度に優位差はなかった。先行感染症状は慢性心筋炎 7 例（うち 3 例は急性心筋炎からの進展例）、拡張型心筋症 7 例で慢性心筋炎例に多い傾向を見た。今回検討した症例中に筋層内冠状動脈びまん性硬化症例は見られなかった。拡張型心筋症のうち線維症面積 25% 以上の症例の線維症形態は慢性心筋炎と類似していた。

心筋生検 99 例中、18 例に何らかのアレルギー歴を、62 例に既往／所見を認めなかった。病歴記載不十分であるが、入院時に所見がないものは 19 例で、既往なしまたは所見のないものを非アレルギー群とした。アレルギー歴群の内訳は薬物 4 例、薬剤性肝障害 7 例、薬剤性好酸球增多症 5 例、気管支喘息、PIE 症候群各 1 例。組織学的に 43 例が活動性心筋炎であり、アレルギー歴を有する症例に心筋炎が多く（17/18 例、 $P < 0.01$ ）、非アレルギー群は 26/87 例で、その病期は亜急性 5 例、慢性 2 例、非活動性 10 例であった。

間質の単核細胞数はアレルギー群 5.18 ± 1.79 個に対し、非アレルギー群は 4.25 ± 2.19 個で、有意さは認められないものの、単核細胞数はアレルギー群でやや増加していた。心筋炎群でのアレルギー歴陽性の 17 例と、組織学的に心筋炎と診断されアレルギー歴陰性の 26 例との比較では、単核細胞数はアレルギー陽性群の 5.01 ± 1.70 に対し、アレルギー歴陰性群は 4.79 ± 2.20 で、アレルギー陽性心筋炎群で間質細胞数増加傾向が認められた。線維症の程度はアレルギー陽性心筋炎群で 2+ 以上の比率の増加傾向が認められた。

【結論】心臓移植対象疾患である拡張型心筋症には炎症に関与する病態が、現実的には含まれており、心筋炎の発症には免疫応答という被移植者側の因子の関与が想定され、術後の拒絶反応に関連する可能性が指摘される。移植後のびまん性筋層内冠動脈硬化に相当する病変は通常の拡張型心筋症様病態を呈する例ではまれである。

(論文)

1. 河合祥雄：たこつぼ. 心エコー2(6): 478-4789, 2001.
2. 河合祥雄：“タコツボ”型心筋炎とはどういう疾患か—“タコツボ”型心筋障害炎症説の検討—. 心エコー 2(10): 860-865, 2001.
3. 河合祥雄：タコツボ型心筋障害の成因。心臓 34(3):211-220, 2002.
4. 河合祥雄 ダイバーのメディカル・チェック 日本高気圧環境医学会誌 38(2): 96-100, 2003.
5. 河合祥雄、山田京志、鈴木宏昌 “たこつぼ心筋障害”の病理 Heart View 8(2): 159-166, 2004.

(著書)

1. 河合祥雄：“拘束型心筋症”と特発性拘束型心筋症。矢崎義雄、島田和幸、井上博、永井良三（編）
「循環器疾患—state of arts ver.. 2」、医師薬出版株式会社、東京、2001、663-669
2. 河合祥雄 たこつぼ型心筋障害 杉下靖郎、門間和夫、矢崎義雄、高本眞一（編）
「Annual Review 循環器 2003」、中外医学社、77-82, 2003
3. 河合祥雄、岡田了三 冠状動脈系の解剖学, 「冠動脈の臨床（上）-21世紀の診断治療体系」、日本臨床、大阪、7-21, 2003

基礎的研究

1. 心移植後冠動脈病変構成細胞の起源とその機能解析に関する研究（佐田）

(1)実施内容

本研究では、マウス心移植モデルを用いて、新生内膜細胞の起源を同定し、薬物療法の可能性を検討した。

(a)マウス異所性心臓移植

全身に LacZ 遺伝子を発現するマウス ROSA26 マウス (C57BL/6x 129S background、(Stocknumber002072) 3 は米国ジャクソン研究所から購入した。他の野生型マウスは日本 SLC (静岡) から購入した。全ての実験手技は東京大学の「動物実験に関する指針」に沿い、米国国立衛生院の実験動物の取り扱いに関する指針に従った。7-9 週令の ROSA26 マウス (H-2b) と野生型 C3H/HeN マウス (H-2k) との間の異所性心臓移植は (それぞれをドナーもしくはレシピエントとして n=7) 以前報告された方法で行った 4。さらには、7-9 週令の雌の BALB/c (H-2d) マウスから雄の C3H/HeJ (H-2k) マウスへの心臓移植を行った。急性拒絶の予防のため、すべてのレシピエントに FK506 を投与した (0.3mg/kg/日の腹腔内連日投与)。全身に LacZ もしくは GFP を発現するマウス、ならびにマーカー発現マウスの骨髄を移植したマウスを用いて異所性心臓移植を行った。FK506 により急性拒絶を制御し、一ヶ月後の動脈硬化病変を検討した。

(b)薬物の投与

レシピエントマウスに、0.5% Carboxymethyl Cellulose に懸濁した atorvastatin (10mg/kg/day) もしくは tranilast (300mg/kg/day)、valsartan (10mg/kg/day) を経口ゾルデにて心移植一週間前から連日投与した。コントロールとして 0.5% Carboxymethyl

Cellulose を投与した。Cerivastatin (6mg/kg/day) は生理的食塩水に希釈して連日皮下に注射した。コントロールとして生理的食塩水を連日投与した。

(2) 成果

(a) 移植後動脈硬化の新生内膜構成細胞の起源について

野生型のマウスの心臓を LacZ マウスに移植した。野生型のグラフト冠動脈にヒトと同様の求心性の動脈硬化が生じた。この新生内膜の 9 割以上は LacZ 陽性であった。つまりグラフト上の冠動脈の中膜を起源としたものでなく、レシピエントの血流中の細胞を起源としていることが明らかとなった。この逆に、LacZ マウスの心臓を野生型マウスに移植した場合は、LacZ 陽性の中膜平滑筋細胞は中膜に留まり、新生内膜はレシピエント由来の細胞で構成されていた。同様の現象は、性不一致個体間心臓移植後の動脈硬化病変においても、Y 染色体をマーカーとした *in situ hybridization* によって確認された。この新生内膜は、平滑筋細胞に特異的なミオシン重鎖、カルポニン、h-カルデスモン、 α -アクチンを発現していた。以上の実験結果により流血中の前駆細胞が付着することで病変が形成されることが明らかとなった。

レシピエント中の平滑筋前駆細胞の起源を同定するために、野生型マウスの骨髄を致死量 X 線で照射し LacZ マウスもしくは GFP マウス (全身に蛍光物質 GFP (green fluorescent protein、緑色蛍光蛋白) を発現するトランスジェニックマウス) の骨髄を移植した。骨髄、脾臓、胸腺などでは移植骨髄細胞が同定されたが、無処置の血管には骨髄細胞は定着していなかった。この骨髄移植マウスに野生型マウスの心臓を移植したところ、グラフト動脈硬化病変の 8 割以上の細胞は骨髄由来であった。

(b) レシピエントとドナー細胞の融合の可能性

GFP マウスの心臓を LacZ マウスへ移植した場合、中膜は GFP 単独陽性細胞、新生内膜は LacZ 単独陽性細胞から構成されていた。LacZ マウスの心臓を GFP マウスへ移植した場合、中膜は LacZ 単独陽性細胞、新生内膜は GFP 単独陽性細胞から構成されていた。ドナー細胞とレシピエント細胞の融合と思われる両者陽性細胞はほとんどみうけられなかった。

(c) 造血幹細胞 (KSL 分画) から平滑筋細胞への分化

近年、骨髄中には神経、肝臓、骨、内皮、心臓といった様々な臓器への分化能を有する成体幹細胞が存在することが報告されている。従来、骨髄幹細胞は血球系へ分化する造血幹細胞と骨、軟骨、筋肉などに分化する間葉系幹細胞に分類されていた。ところが最近の知見によると、「造血」幹細胞の潜在分化能力は考えられた以上に大きく肝細胞や心筋細胞への分化能も有することが明らかになっている。そこで、GFP マウスから造血幹細胞 (c-Kit⁺、Sca-1⁺、Lin⁻、KSL) 分画を分離した。この細胞をラット血管平滑筋細胞上で培養したところ、平滑筋細胞様の形態を示し、 α -平滑筋型アクチン、カルポニンの発現を認めた。さらに、致死量照射したマウスに純化した KSL 分画細胞の移植を行った。大腿動脈にワイヤーによる傷害を加えたところ、新生内膜の中膜平滑筋細胞の半数近くは移植した造血幹細胞由来であった。また、再生した内皮の大半は移植した造血幹細胞由来であった。つまり、造血幹細胞 (厳密には KSL 分画) が平滑筋細胞と内皮細胞に分化し血管リモデリングに重要な役割を演じることが明らかとなった。

(d) 骨髄細胞関与のモデルによる相違

最近、血管移植モデルにおける病変部平滑筋細胞はレシピエント由来であるものの骨髄以外の前駆細胞を起源にすると報告された。血管移植モデルでは免疫抑制剤は使用されておらず、大動脈の移植後病変である。移植心の最小血管に生じる移植後冠動脈病変とは病理学的にも大きな違いが見られる。このため、レシピエントの骨髄由来平滑筋細胞が病変でわずか10%しか認められなかったと考えられる。一方、高度純化した造血幹細胞が他の系統の細胞に形質転換分化することは非常に稀であると報告された。この論文で著者らは一個の造血幹細胞によって骨髄を置換したマウスを用いていろいろな臓器を無傷害の状態を検索している。そして、造血幹細胞由来の細胞がほとんど認められていないと報告している。しかし、ターンオーバーの盛んな血液系細胞に比して実質臓器の細胞の寿命は通常長い。遠隔の幹細胞が定着して分化する確率が低いのは当然である。実際、強い傷害を加えた場合に効率に骨髄由来細胞の筋肉や消化管上皮の組織修復への関与が認められる。以上のように、モデルによっては成体幹細胞の可塑性を過小評価して全く異なる結論に達する可能性があり注意を要する。

著者らは、骨髄を置換した同一マウスの三つの異なる血管に、同時に別々の異なる血管傷害を加えた。ワイヤー傷害 (Wire Injury)、頸動脈の結紮 (Ligation)、ポリエチレンチューブの大腿動脈周囲への留置 (Cuff) 何れのモデルによってもアクチン陽性細胞からなる新生内膜が形成された。Wire Injury では多くの骨髄細胞が取り込まれていたが、Ligation では非常に少なかった。また、Cuff では周囲の炎症細胞としては骨髄由来細胞が存在したが、新生内膜には殆ど取り込まれていなかった。また、この骨髄由来細胞の取り込まれる程度は、組織損傷の程度とその後のケモカイン、サイトカインの発現と関連していた。特に wire injury 後の大腿動脈は、バルーンによる血管傷害直後のように、内皮はほぼ完全に剝離され、中膜の細胞はアポトーシスにより消失していた。このような強い傷害により、傷害後修復に必要な細胞が局所血管に存在せず、遠隔の幹細胞が動員されざるをえなくなるのかもしれない。

(e) スタチンによる移植後動脈硬化の抑制

DBA2 から B10D2 へ移植する系においてレシピエントに atorvastatin 10mg/kg/day を連日投与した。移植後動脈硬化の病変形成が有意に抑制された (内膜/中膜比: 1.6 ± 0.3 vs 0.9 ± 0.2)。BALB/c から C3H へ移植する系 (FK506 0.3mg/kg/day 併用) においても、6mg/kg/day の cerivastatin の投与によって移植後動脈硬化の病変形成が有意に抑制された (内膜/中膜比: 1.2 ± 0.2 vs 0.7 ± 0.1)。

(f) Tranilast による移植後動脈硬化の抑制

DBA2 から B10D2 に移植するモデルにおいて、300mg/kg/day の tranilast をレシピエントに連日投与したところ、グラフトに生じる新生内膜形成が有意に抑制された (内膜/中膜比: 0.8 ± 0.1 vs. 0.5 ± 0.1 ; 両群とも $n=6$)。

(g) angiotensin 受容体拮抗薬による移植後動脈硬化の抑制

DBA2 から B10D2 へ移植する系においてレシピエントに Valsartan 10mg/kg/day を連日投与した。移植後動脈硬化の病変形成が有意に抑制された (内膜/中膜比: 1.6 ± 0.3 vs 0.9 ± 0.2)。BALB/c から C3H へ移植する系 (FK506 0.3mg/kg/day 併用) においても、6mg/kg/day の cerivastatin の投与によって移植後動脈硬化の病変形成が有意に抑制された (内膜/

中膜比 : 1.2 ± 0.2 vs 0.7 ± 0.1 。

(3)論文発表

1. Saiura, A., Sata, M., Hirata, Y., Nagai, R., Makuuchi, M. Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nature Medicine*. 2001, 7: 382-383.
2. Sata, M., Luo, Z., Walsh, K. Fas ligand overexpression on allograft endothelium inhibits inflammatory cell infiltration and Transplant-associated intimal hyperplasia. *J. Immunol*. 2001, 66: 6964-6971.
3. Sata, M., Nishimatsu, H., Suzuki, E., Sugiura, S., Yoshizumi, M., Ouchi, Y., Hirata, Y., Nagai, R. Endothelial nitric oxide synthase is essential for the HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin to promote collateral growth in response to ischemia. *FASEB J*. 2001. 15: 2530-2532.
4. Sata, M., Sugiura, S., Yoshizumi, M., Ouchi, Y., Hirata, Y., Nagai, R. Acute and chronic smooth muscle cell apoptosis after mechanical vascular injury can occur independently of the Fas-death pathway. *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol*. 2001. 21: 1733-1737.
5. Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhisa, T., Hirai, H., Makuuchi, M., Hirata, Y., Nagai, R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nature Medicine*. 2002. 8: 403-409.
6. Sata, M., Hirata, Y., Nagai, R. Role of Fas/FasL interaction in ischemia-induced collateral vessel. growth. *Hypertension Research*. 2002. 25:577-582
7. Sata, M., Takahashi, A., Tanaka, K., Washida M., Ishizaka N., Ako J., Yoshizumi M., Ouchi Y., Taniguchi T., Hirata, Y., Yokoyama M., Nagai R., Walsh K. Mouse genetic evidence that tranilast reduces smooth muscle cell hyperplasia via a p21waf1-dependent pathway. *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol*. 2002.22:1305-1309
8. Sata, M., Nagai, R. Phosphatidylinositol 3-Kinase. A Key Regulator of Vascular Tone? *Circ. Res*. 2002. 91 :273-275.
9. Sata, M. Biphasic Effect of Statins on Angiogenesis. *Circulation*. 2002. 106: e47.
10. Sata, M., Tanaka, K, Nagai, R. Origin of smooth muscle progenitor cells: Different conclusions from different models *Circulation*. 2003. 107: e106-e107.
11. Sata M. Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling and lesion formation. *Trends Cardiovasc Med*. 2003. 13:249-253.
12. Saiura A, Sata M, Washida M, Sugawara Y, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. Little evidence for cell fusion between recipient and donor-derived cells. *J Surg Res* 2003. 113:222-227.
13. Sata, M., Tanaka, K., Ishizaka N., Hirata, Y., Nagai R. Absence of p53 leads

- to accelerated neointimal hyperplasia after vascular injury. *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 2003. 23:1548-1552.
14. Fukino, K., Sata, M., Seko, Y., Hirata, Y., Nagai, R. Genetic background influences therapeutic effectiveness of VEGF. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003. 310:143-147.
 15. Tanaka K., Sata, M., Hirata Y., Nagai R. Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries. *Circ Res.* 2003. 93: 783-790.
 16. Sata, M. Molecular strategies to treat vascular diseases; Circulating vascular progenitor cell as a potential target for prophylactic treatment of atherosclerosis. *Circ J.* 2003: 67: 983-991.
 17. Sata, M., Nagai, R. Inflammation, angiogenesis, and endothelial progenitor cells: How do EPCs find their place? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004. 36: 459-463.
 18. Sata, M., Nishimatsu, H., Osuga, J.I., Tanaka, K., Ishizaka, N., Ishibashi, S., Hirata, Y. Nagai, R. Statins augment collateral growth in response to ischemia but they do not promote cancer and atherosclerosis. *Hypertension.* 2004. 43: 1214-1220.
 19. Sata, M., Nagai, R. Origin of neointimal cells in autologous vein graft. *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 2004. in press

2. 移植心冠動脈硬化（慢性拒絶反応）の分子機構の解明と遺伝子治療に関する研究（磯部）

(1)実施内容

研究の背景

心移植は末期心不全の治療法として臨床応用されている。しかし慢性拒絶とも呼ばれる移植心冠動脈内膜肥厚は長期予後を決定する重要な要素である。病態には不明な点が多く予防法や有効な治療法がない。病理学的には、血管平滑筋細胞の増殖がみられ、合成型ミオシンの発現増加を伴っていることを報告してきた。我々は本動脈硬化の病態に免疫反応、特に T 細胞の活性化が強く関わっているという立場から、病態の解明と治療法の開発を行ってきた。これまでの研究で ICAM-1 と LFA-1 の阻害により免疫寛容を誘導すると慢性拒絶が予防されることを示してきた。他の研究者らは、CTLA4Ig と CD40L の阻害でも同様の現象が見られることを報告しているが、これらの結果は T 細胞の活性化が本病態にかかわっていることを示している。また最近 CD28 経路に加えて新しい T 細胞活性化に関わる副刺激分子が同定されてきている。ICOS (inducible costimulator)、PD (programmed death) -1 などの副刺激分子が急性および慢性拒絶に果たしている役割について未だ十分解明されていないのが現状である。

本研究班での検討課題は、この病態に関わっている諸因子をさらに詳細に検討し、臨床応用可能な治療法を開発することにある。そのために、マウスおよびサル的心移植と遺伝子導入などの方法を用いて諸因子の発現抑制を通じて病態の解析を行ってきた。

一つは血管平滑筋細胞の増殖に関わる諸因子である。転写因子である E2F は静止期では不活性化されているが、血清などの刺激により活性化され、cyclinA や cdk2 kinase と複合体を作ることにより細胞周期調節において S 期進展に必要な細胞周期調節遺伝子群 (c-myc、c-myb、cdc2 キナーゼ、PCNA など) を活性化し、細胞増殖を引き起こす。そこで E2F 結合配列と同じ配列をもつ 2 本鎖核酸化合物 (デコイ) の導入により、転写因子 E2F の結合を競合的に阻害することが期待される。また Early Growth Response Factor 1 (Egr-1) 遺伝子は平滑筋細胞のフェノタイプ変換に関わる主要な転写因子である。

Egr-1 アンチセンスオリゴヌクレオチドを遺伝子導入することによって、心慢性拒絶におけるその役割を検討した。

また、もう 1 つは T 細胞活性化に関わる諸因子の検討である。そのために、マウスの心移植と抗体および副刺激分子と免疫グロブリンの融合蛋白による接着の阻害を行うことで病態の解析を行った。副刺激経路としては、ICOS や PD-1 のほかに HVEM、4-1BB などが同定されている。この中で着目したのは、ICOS (inducible costimulator)、PD (programmed death) -1、LIGHT/HVEM (herpes virus entry mediator) 経路である。マウスの心移植と抗体および副刺激分子と免疫グロブリンの融合蛋白による接着の阻害を行うことで病態の解析を行った。また、これまでに明らかにしてきた炎症や細胞周期調節因子の抑制による慢性拒絶の予防効果を臨床応用に近づけるためにミニブタにおける心慢性拒絶モデルの確立を行った。

研究方法

マウス心移植と慢性拒絶の作製とその病理学的検索、免疫寛容の作製、免疫染色、遺伝子発現の検索、等は、従来報告してきた方法で施行した。慢性拒絶検討のためのマウス移植モデルは、DBA/2 マウスをドナーとし B10D2 マウスに移植する系と class II ミスマッチである C57BL/6 の心臓を Bm12 の腹部に移植するモデルを用いた。冠動脈硬化の程度を定量化するため、摘出された移植心から凍結薄切病理標本を作製し、Elasticvan Gieson 染色により冠動脈の肥厚内膜の内弾性板内占拠率を以下のように算出した。

$\{ \text{IEL (内膜弾性板) で囲まれた面積} \} - (\text{血管内腔面積}) / \text{IEL で囲まれた面積}$ 。

平滑筋細胞の増殖と免疫反応の関わりを検討するため、平滑筋細胞をマウス大動脈より単離し継代培養した。また感作 T 細胞を移植後 2 週経ったマウスから脾臓から分離した。その後マイトマイシンにて T 細胞を不活性化し、平滑筋と混合培養し平滑筋の増殖反応を検討した。

1. 遺伝子導入による細胞増殖の抑制

HVJ-liposome 法による遺伝子導入は ODN をドナー心の大動脈より注入し、4°C で 10 分間の留置により行った。E2F デコイとして 5' -CTA-GAT-TTC-CCG-CG-3'、3' -TA-AAG-GGC-GCC-TAG-5' を用いた。bc1-x のアンチセンス ODN として用いたのは、5' -GTT-GCT-CTG-AGA-CAT-TTT-3'、センス ODN は 5' -AAA-ATG-TCT-CAG-AGC-AAC-3' である。ドナーへの免疫抑制等の治療は行わなかった。コントロールとして既報の cdk2kinase アンチセンスを同様の方法で導入した。Egr-1 のアンチセンス ODN としては 5' -GCG-GGG-TGC-AGG-GGC-ACA-CT-3' (-118 to -99) ; スクランブルとして 5' -AGG-CTG-GCT-GCC-GGG-AGC-GA-3' を用いた。同様にして NF κ B デコイを導入した。

2. 副刺激経路阻害

抗 ICOS 抗体 (100/ μ g/日)、ICOSIg (100/ μ g/日)、HVEMIg (100/ μ g/日) を移植直後から週一回腹腔内に投与し、56 日目に病理学的検討を行った (計 8 回投与した)。また、PD-1 抗体 (200/ μ g/日)、PD-L1 抗体 (200/ μ g/日) を週 2 回、4 週間投与した。

3. ミニブタにおける検討

ミニブタで異所性心移植を行った。サイクロスポリンにより免疫抑制を行い、3~6 ヶ月の観察期間で慢性拒絶反応の出現を検討した。拒絶は心エコーで定期的にフォローし、またサイクロスポリンの血中濃度をモニターして適切な免疫抑制を行った。一部のブタでは SIA の測定を行った。

(2) 成果

研究結果

1. E2F デコイ導入

Egr-1 は慢性拒絶心の冠動脈内膜で発現増強が見られた。Egr-1 に対するアンチセンス遺伝子導入では 28 日目に対照群に比して新生内膜が有意に減少していた ($61.9 \pm 36.9\%$ vs $9.3 \pm 15.7\%$)。E2F デコイ遺伝子によりマウス移植心の冠動脈内膜肥厚が著明に抑制された。図 1 に結果を示す。無導入群 (内弾性板内占拠率 $60 \pm 23\%$) では冠動脈内膜肥厚を認めたのに対し、E2F デコイ導入群 ($15 \pm 9\%$ 、 $p < 0.01$) ではその進展は著明に抑制されていた。cdk2kinase に対するアンチセンス ODN の導入では 56 日目に内膜肥厚が進展するのに対して、E2F デコイ遺伝子は 56 日目の肥厚も有意に抑制されていた。また内膜肥厚が抑制されていたデコイ遺伝子導入マウス移植心の口冠動脈では ICAM-1、VCAM-1 などの接着分子、増殖因子である PDGF、細胞周期調節遺伝子の cdk2 kinase などの発現も著明に抑制されていた。NF κ B デコイ遺伝子導入でも同様の結果が得られた (図 1)。導入群での内膜肥厚率は $20.8 \pm 17.5\%$ であったのに対して、対照群では $60.0 \pm 22.8\%$ であった。

2. 副刺激経路阻害

ICOS の阻害では、図 2 に示すように、無治療コントロールマウスでは内膜の血管内腔に占める率は $70 \pm 6\%$ であったのに対し、抗 ICOS 抗体投与マウスでは $8.3 \pm 4.8\%$ 、ICOSIg 投与マウスでは $10 \pm 5.6\%$ と著明な内膜肥厚の抑制が見られた。HVEM/LIGHT 経路の阻害は、図 3 に示すように、無治療コントロールマウスでは内膜の血管内腔に占める率は $62 \pm 12\%$ であったのに対し、HVEMIg 投与マウスでは $16 \pm 7.7\%$ と著明な内膜肥厚の抑制が見られた。免疫染色では、移植心の浸潤細胞に一致して LIGHT の発現が確認された。また、移植前の血管には LIGHT の発現は認めなかったが、移植後 2 週目に血管平滑筋に一致して LIGHT に発現が誘導された。

PD-1 経路阻害では、4 週間後の冠動脈の狭窄率は、無治療群 $7.4 \pm 3.1\%$ 、抗 PD-1 抗体投与群 $8.4 \pm 5.5\%$ に対して、抗 PD-L1 抗体投与群では $48 \pm 11\%$ と有意に冠動脈の狭窄が促進していた。 $(p < 0.05)$ 免疫染色では、移植心の GAD 病変の血管内皮細胞に PD-L1 の発現が確認された (図 4)。

3. ミニブタにおける検討

ミニブタを用いて心移植の手技と慢性実験モデルを確立した。19 ペアの移植を行った。サイクロスポリンの投与プロトコールを変化させて至適な量、期間を検討した。3 ヶ月で採取した移植心 4 ヶ (21%) で病理学的に著明な内膜肥厚を確認できた (図 5)。

4. 平滑筋増殖実験

無刺激の平滑筋には、LIGHT、HVEM の発現はみられなかったが、IFN- γ 刺激後の平滑筋には HVEM の発現が認められた。一方、IL-4 や IL-6 刺激では HVEM 発現の誘導はみられなかった。

不活化した未感作の T 細胞と IFN- γ 刺激後の平滑筋を共培養しても平滑筋の増殖は起こらなかった (図 6A)。一方、不活化した移植後の感作の T 細胞と IFN- γ 刺激後の平滑筋を共培養すると平滑筋は有意に増殖した (図 6B)。またこの系に HVEMIg を加えると平滑筋増殖は見られなかった。このことから平滑筋増殖に HVEM/LIGHT 経路が重要な役割を果たしていることが示唆された。

(以上の図 1~6 は別紙に付図として掲げた)

(3) 考察

慢性拒絶とされる冠動脈硬化は、促進性冠動脈硬化とも呼ばれ、病態、予防法、治療法とも不明で、現在心移植後の長期予後を左右する最も深刻な問題となっている。これまでの我々の一連の研究結果から、諸種の増殖因子、サイトカイン、接着分子、組織適合抗原、細胞周期の関与が明らかとなっている。

今回の検討で、E2F デコイ遺伝子や *egr-1* 遺伝子導入でも内膜肥厚の進展が認められず、治療効果が認められている。E2F が複数の細胞周期調節遺伝子の転写に関わる転写因子であることと、導入した遺伝子が二本鎖 DNA であり、アンチセンスよりも、安定性が高いことから、*cdk2* kinase よりも、より長期に効果がある可能性が考えられる。この点については今後検討する予定である。

一方、今回の実験で移植心冠動脈肥厚に平滑筋のアポトーシスが関与していることが初めて示された。今後 *bcl-2*、*bax* によるアポトーシスが本疾患に果たしている役割についてはさらに検討を重ねる必要があるが、治療の標的として有用であることが示された。また、炎症については NF κ B デコイが内膜肥厚の抑制に有効であったことから、その関与が証明されたと考える。今後はさらにその機序を検討することが必要である。また炎症抑制をめざした別のアプローチにより本症の予防を図ることも可能と考えられ、さらなる検討が必要である。

これまで動物実験においては、副刺激経路と慢性拒絶の進展抑制に関する報告が多くなされている。CTLA4Ig を用いた CD28 経路の阻害や CD154 経路の阻害について研究が進んでいる。これらの阻害により免疫寛容の導入がみられ、臨床応用が期待される。しかし、これら単独では慢性拒絶の効果が不十分であったり血栓症などの問題が指摘されている。人の免疫系でも末梢性寛容誘導は可能と考えられるが、副刺激の経路については未解決の問題が残されており、複数の経路についての役割分担についてさらに詳細な検討が必要であろう。昨年までに我々は、ICOS、PD-1 経路が慢性拒絶に大きな役割を果たしていることを

報告してきた。今回新しい経路である HVEM/LIGHT に関して検討し、慢性拒絶進展に関わっていることが明らかにされた。また、in vitro の系において平滑筋の増殖に HVEM/LIGHT 経路が重要な役割を果たしていることが示された。今後さらに他の経路についての検討が必要である。

今後の展望

今回本研究班での研究で、慢性拒絶における T 細胞の役割について、平滑筋増殖含めその機構が明らかになった。その制御が動脈硬化の進展抑制に有効であると考えられる。今後は臨床応用を目指すために、より長期的な観察、適切な分子標的の更なる探索、大動物での安全性の検討、などについて検討していく必要がある。さらに小動物だけでなくミニブタを用いて、遺伝子導入を検討していくことで、近い将来の臨床応用を視野にの検討を行っていきたい。

(4) 本事業により作成した印刷物（研究報告書等）

1. Isobe M, Kosuge H, Koga N, Futamatsu H, Suzuki J: Gene therapy for heart transplantation-associated acute rejection, ischemia/reperfusion injury and coronary arteriosclerosis. *Curr Gene Ther*, 4 : 145-152, 2004
2. Kosuge H, Suzuki J, Kakuta T, Haraguchi G, Koga N, Futamatsu H, Gotoh R, Inobe M, Isobe M, Uede T: Attenuation of graft arterial disease by manipulation of the LIGHT pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, in press
3. Koga N, Suzuki J, Kosuge H, Haraguchi G, Onai Y, Futamatsu H, Gotoh R, Saiki H, Tsushima F, Azuma M, Isobe M: The blockade of the interaction between programmed death-1 (PD-1) and its ligand PD-L1 accelerates graft arterial disease (GAD) in cardiac allografts. On submission
4. Kosuge H, Suzuki J, Gotoh R, Koga N, Ito H, Isobe M, Inobe M, Uede U: Induction of immuneologic tolerance to cardiac allograft by simultaneous blockade of inducible co-stimulator and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 pathway. *Transplantation* 75: 1374-1379, 2003.
5. Wada Y, Fujimori M, Suzuki J, Kawauchi M, Tsukioka K, Sawa Y, Morishita R, Kaneda Y, Takamoto S, Isobe M, Amano J: Intimal hyperplasia in cardiac allografts is dependent upon transcriptional regulator Egr-1: effective inhibition by antisense Egr-1 ODN transfection. *J Surg Res*, 115:294-302, 2003
6. Futamatsu H, Suzuki J, Kosuge H, Yokoseki O, Kamada M, Ito H, Inobe M, Isobe M, Uede T: Attenuation of Experimental Autoimmune Myocarditis by Blocking Activated T Cells through Inducible Costimulatory Molecule Pathway. *Cardiovasc Res*, 59:95-104, 2003.
7. Tsukioka K, Suzuki J, Fujimori M, Wada Y, Yamaura K, Ito K, Morishita R, Kaneda Y, Isobe M, Amano J. Expression of matrix metalloproteinases in cardiac allograft vasculopathy and its attenuation by anti MMP-2 ribozyme gene transfection. *Cardiovasc Res* 56: 472-8, 2002

臨床的検討

心移植後冠動脈病変（慢性拒絶反応）に対する臨床的検討（布田）

(1)実施内容

心移植患者 23 名を対象に、観血的アプローチによる研究として、全例に心臓カテーテル検査を実施し、血行動態測定の後、選択的左右冠動脈造影、ならびにドップラーガイドワイヤーを用いた ATP 負荷による冠動脈予備能検査、心内膜心筋生検を実施した。さらに、移植時のドナー体重が 45kg 以上の例に対しては冠動脈内超音波法を用い、冠動脈内膜肥厚の定量的検討も併せて行った。

非観血的には、ドブタミン負荷心エコー検査、超音波後方散乱信号（integrated backscatter）を用いた超音波組織性状診断（ultrasonic Tissue Characterization）を行った。

観血的、非観血的検査アプローチによる検討結果から、心移植後冠動脈病変（慢性拒絶反応）の病態を臨床的に解析し、本病変の早期発見と移植後に用いる各種免疫抑制薬の及ぼす影響について検討した。また心移植後冠動脈の血管リモデリングの特徴について検討を重ねた。

(2)成果

移植後の定期的検査（心臓カテーテル検査を含む）時に得られた、血行動態値の検討から、血行動態の経年変化には心移植後冠動脈病変（慢性拒絶反応）が関わっている可能性を報告した。

心移植後冠動脈病変（慢性拒絶反応）の検討は、通常を選択的左右冠動脈造影とドップラーガイドワイヤーを用いた ATP 負荷による冠動脈予備能検査、さらに血管内超音波法を用いて総合的に評価した。その結果、心筋内小血管の病変をも包括した移植後冠動脈病変を検討する上で、冠動脈予備能の検査は有用であり、かつ小児例への施行も安全に施行可能であることが判明した。

血管内超音波法は検索対象血管が心外膜冠動脈に限られてはいるものの、肥厚した血管内膜の定量的検討に優れた方法であり、前述の冠動脈予備能検査と兼ね合わせることで、心外膜から心筋内までの冠動脈のより詳細な検討が可能となった。これらの検討結果は移植後の免疫抑制薬の調節に極めて有用であった。そして移植後拒絶反応の遷延した症例、サイトメガロウイルス持続感染例、移植後の動脈硬化危険因子（高血圧、高脂血症、耐糖能異常）のコントロール不良例で、冠動脈内超音波検査上の血管内膜肥厚の進行を、また冠動脈予備能検査の低下を認めた。これらの症例のなかには、上記の増悪因子をコントロールすることにより、心移植後冠動脈病変の退縮を認めた症例も観察された。

本病変に対する非観血的検討では、ドブタミン負荷心エコー検査、後方散乱信号（integrated back scatter）を用いた超音波組織性状診断（Ultrasonic Tissue Characterization）で、これら非観血的検査法が、症例によっては、観血的検討よりもより早期に出現することが判明した。

(3) 研究成果 (論文)

- 1) 布田伸一, 久保 豊, 山中 崇, 品川 亮, 大塚邦明, 大川真一郎: 移植心の病態生理. Cardiovasc Anesthesia 5:69-73, 2001
- 2) 布田伸一, 藤井千恵子, 堀田典寛, 品川 亮, 久保 豊, 大塚邦明, 大川真一郎: 心移植遠隔期における移植心冠動脈病変の検討. 脈管学 41:887-893, 2001
- 3) 布田伸一: 心移植患者をどう診ていくか? 循環器診療二頁の秘訣 (永井良三 編、金原出版) 2002, 110-111.
- 4) 布田伸一: 心移植後の慢性拒絶反応について. Therapeutic Research 23: 1383-1391, 2002,
- 5) 布田伸一: わが国における心臓移植と患者管理: 移植後遠隔期管理. 日本循環器学会専門医誌 10 Suppl: 95-102, 2003,
- 6) 布田伸一: 移植後遠隔期管理 (わが国における心臓移植の適応と患者管理) 循環器専門医 10 増刊号: 95-102, 2003

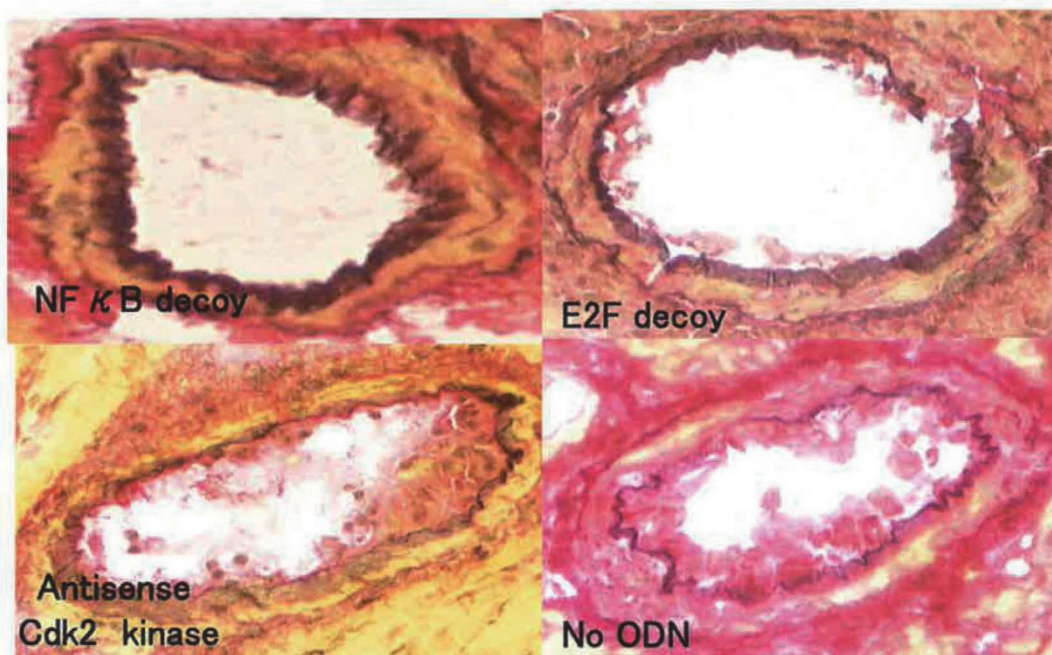


図1 マウス移植心冠動脈（移植後28日目）。
デコイ導入マウスで新生内膜の抑制が認められる

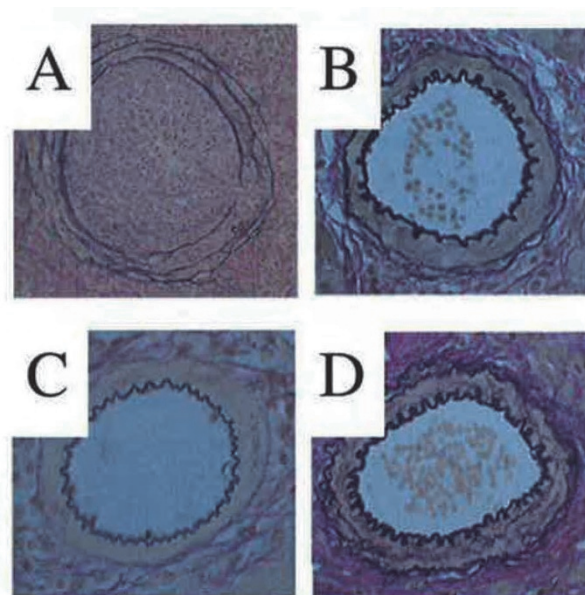


図2 ICOSの阻害によるマウス心慢性拒絶反応の抑制。
A: 無治療コントロール、B: 抗ICOS抗体投与、C: ICOSIg投与、D: イソグラフト

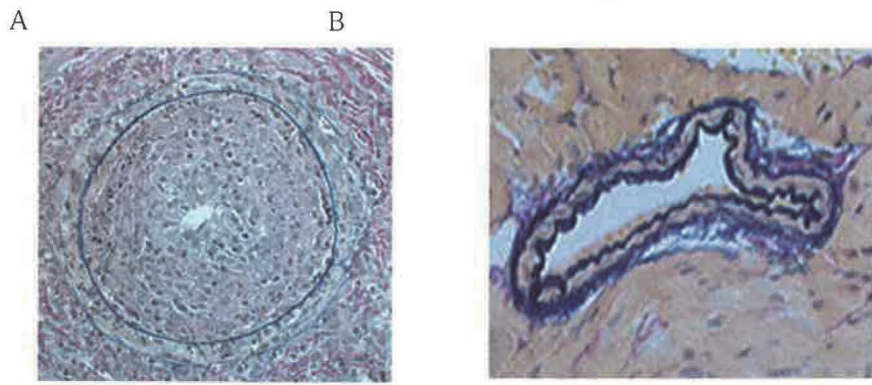


図 3 LIGHT/HVEM 経路の阻害によるマウス心慢性拒絶反応の抑制。
A: 無治療コントロール、B: HVEM Ig 投与

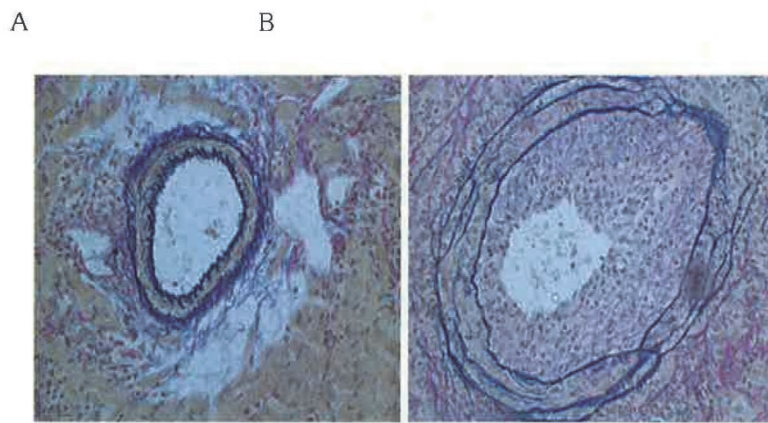


図 4 抗 PD-L1 抗体投与の効果。
A: 無治療コントロール、B: 抗 PD-L1 抗体投与マウス。

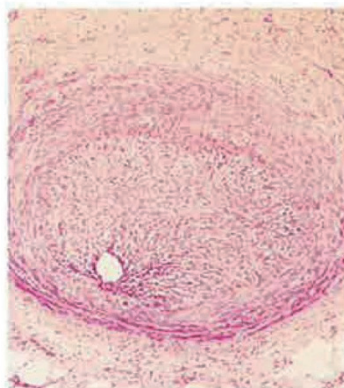


図 5 ミニブタで移植後 3 ヶ月目に見られた冠動脈内膜肥厚

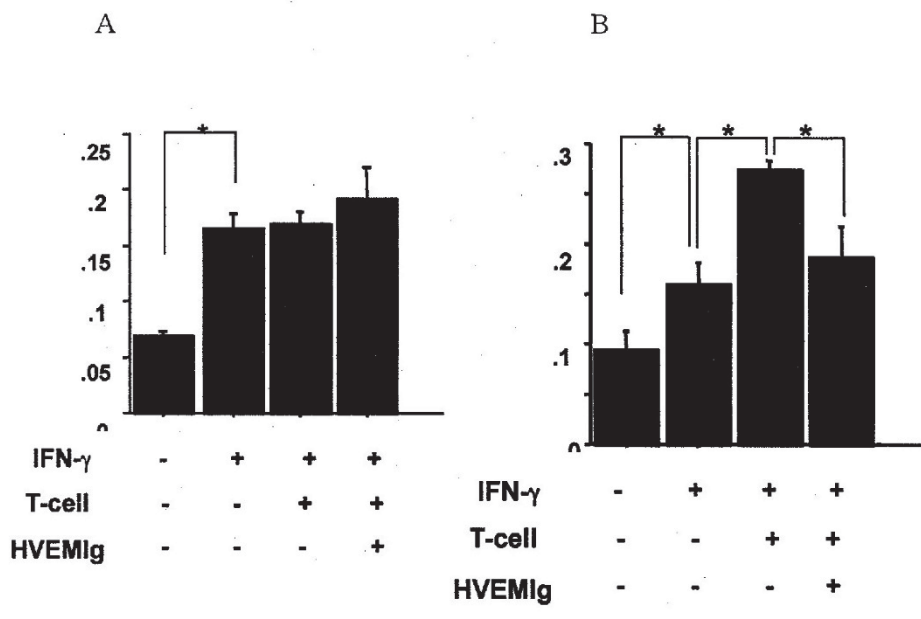


図 6 平滑筋増殖実験。

A : 未感作 T 細胞と平滑筋の共培養、B : 移植后感作 T 細胞と平滑筋の共培養