ラット異系小腸移植におけるチロシンキナーゼ阻害剤(ゲニスティン)の拒絶反応抑制効果

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者:
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9172

金沢大学十全医学会雑誌　第104巻　第6号　719－731（1995）

ラット異系小腸移植におけるチロシンキナーゼ阻害剤（ゲニステイン）の拒絶反応抑制効果

金沢大学医学部外科学第二講座（主任：宮崎逸夫教授）
高　村　博　之

ラット異系小腸移植モデルを用いてチロシンキナーゼ阻害剤 (tyrosine kinase inhibitor) であるゲニステイン (genistein) の拒絶反応抑制効果を検討した．雄性 BN ラットから雄性 LEW ラットに小腸を移植し，ゲニステインを移植後7日間連日投与する群と，投与しない無治療群の2群に分けて以下の検討を行った．無治療群の移植小腸片（グラフト小腸）の平均生着日数が 5.7±0.2 ($\bar{x}$±SD) 日であったのに対し，ゲニステイン投与群のグラフト小腸の平均生着日数は 14.7±0.3 ($\bar{x}$±SD) 日と有意に長かった．さらに移植7日後のグラフト小腸のインターロイキン2 (interleukin-2, ILの2) およびインターロイキン2レセプター　ベーター鎖 (interleukin-2 receptor β chain, IL-2R β 鎖) の mRNA 発現量を逆転写 PCR (reverse transcription, RT-PCR) サザンブロットハイブリダイゼーション法を用いて比較したところ，ゲニステイン投与群は無治療群に比べて明らかに低かった．次に細胞性免疫能を評価すべく移植後7日目のラットの脾細胞を用いてリンパ球混合培養および細胞障害性試験（クロム遊離試験，^{51}Cr release assay）を施行したところ，ゲニステイン投与群は無治療群に比べて細胞障害活性が有意に低かった．またリンパ球混合培養上清中の IL-2 蛋白産生量を ELISA 法を用いて比較したところ，ゲニステイン投与群は無治療群に比べてその産生量が有意に低かった．さらにリンパ球混合培養細胞の IL-2 および IL-2R β 鎖の mRNA 発現量を RT-PCR サザンブロット法を用いて比較したところ，ゲニステイン投与群は無治療群に比べて明らかに低かった．以上より，ゲニステインは小腸移植後のラットの細胞性免疫能を抑制するとともに急性拒絶反応の発現を有意に遅延させることが明らかとなり，チロシンキナーゼ阻害剤の免疫抑制剤への応用の可能性が示された．

Key words small bowel transplantation, rejection, tyrosine kinase inhibitor, genistein, immunosuppression

臓器移植における拒絶反応の制御はサイクロスポリン A (Cyclosporin A, CsA)[1)2)] や FK506[3)4)] の登場により飛躍的に進歩したが，依然として術後の最も深刻な問題である．特に小腸移植では，肝移植や心臓移植，腎移植などに比べて拒絶が起こりやすく，より強い免疫抑制が必要である[5)]．既存の免疫抑制剤は腎毒性などの重篤な副作用を有することから，強い免疫抑制を期待したこれらの薬剤の増量にはおのずから限界がある．現在では一つの薬剤の投与量を減らし副作用を軽減させる目的で多剤を併用することが一般的とされているが，こうした中でも有効な拒絶抑制効果が得られず，結局は薬剤の増量を余儀なくされるとともに，重篤な肝，腎機能障害から命を落としてしまう場合が少なからずある[5)]．このため既存の免疫抑制剤の効果を補えるような新しい免疫抑制法の開発が必要である．

一方，チロシンキナーゼの活性を選択的に抑制するチロシンキナーゼ阻害剤で，癌の増殖を制御できる[6)7)]ことが報告されているが，さらに抗原刺激によるT細胞の活性化によりT細胞内のチロシンリン酸化レベルが急速に上昇するが，これもまたチロシンキナーゼ阻害剤で抑制されることが明らかにされている[8)]．ゲニステイン〔5, 7-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4*H*-1-benzopyran-4-one; 4',5,7-trihydroxyisoflavone〕は緑膿菌により生産されるイソフラボンに属する物質で，ATP に対して拮抗的に働きチロシンキナーゼを特異的に阻害する[6)]．培養細胞を用いた実験においてT細胞レセプター (T cell receptor, TCR) を刺激するとチロシンキナーゼ p56^{lck} の活性化と CD3, TCR ζ 鎖のチロシンリン酸化がみられるが，ゲニステインで処理することによりこれらのリン酸化が抑制されるとともにインターロイキン2 (interleukin 2, IL-2) や IL-2R の発現が低下することが報告されている[10)~12)]．したがってチロシンキナーゼ阻害剤も免疫抑制剤としての効果が十分に期待できるものと考えられるが，動物を用いた実験系では未だその効果に対する検討がなされていない．そこで今回このチロシンキナーゼ阻害剤の一つであるゲニステインの免疫抑制効果をラットの異系小腸移

平成7年11月1日受付，平成7年11月28日受理

Abbreviations: Con A, concanavalin A; DMSO, dimethyl sulfoxide; DTT, dithiothreitol; E/T, effector to target cell ratio; FCS, fetal calf serum; G3PDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IL, interleukin; 2-ME, 2-mercaptoethanol; MHC, major histocompatibility complex; RT, reverse transcription; TCR, T cell receptor

植モデルを用いて検討した．

材料および方法

I．実験モデルの作成

体重 200〜250g の雄性 BN ラット ($RT1^n$) あるいは同条件の雄性 LEW ラット ($RT1^l$) をドナー (donor) とし，同条件の雄性 LEW ラットをレシピエント (recipient) として用いた．ラットは手術24時間前より絶食とし 5 %ブドウ糖水のみを投与した．麻酔は硫酸アトロピンを筋注 (40μg/Kg) した後に，ペントバルビタール (pentobarbital) の腹腔内投与 (40mg/Kg) にて行った．また移植手術は手術用顕微鏡下にて行った．

1．ドナー手術

空腸起始部より 5cm 肛門側の部位から回腸末端より 5cm 口側の部位までの小腸を移植片として摘出した．移植片の動脈茎は大動脈を付けた上腸間膜動脈とし，静脈茎は門脈として肝門部で切離した．また移植片は摘出直前に 10ml の 4℃ ヘパリン加生理食塩水にて潅流した．摘出した移植片はレシピエントに供与するまで 4℃ 生理食塩水内にて保存した．

2．レシピエント手術

Zhong ら[13]の方法に準じた異所性小腸移植を施行した．移植片の動脈茎である大動脈をレシピエントの腎動脈分岐部下方の腹部大動脈に端側吻合し，移植片の静脈茎である門脈をレシピエントの腎静脈下方の下大静脈に端側吻合した．移植腸管の口側および肛門側断端は，それぞれレシピエントの右側腹壁に縫合し腸瘻とした．またレシピエントには手術当日から術後 5 日目までセフォキシチン (cefoxitin) 40mg/Kg/日を 6 日間筋注した．

II．実 験 群

実験群を以下の 3 群に分けた．

1．ゲニステイン投与群 (genistein group) (n=13)

ドナーが BN でレシピエントが LEW の異系小腸移植 (allogeneic small bowel transplantation) を施行した．レシピエントには移植手術 6 時間前にゲニステイン (Research Biochemicals Incorporated, Natick, MA, USA) 20mg/Kg をジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) にゲニステイン 5mg/DMSO 0.2ml の濃度で溶解して腹腔内投与した．さらに術後第 1 病日から第 7 病日までの 7 日間の間，ゲニステイン 20mg/Kg を連日腹腔内投与した．

2．無治療群 (non-treatment group) (n=8)

ドナーが BN でレシピエントが LEW の異系小腸移植を施行．レシピエントには移植手術 6 時間前に DMSO 1ml/Kg を腹腔内投与した．さらに術後第 1 病日から第 7 病日までの 7 日間の間，DMSO 1ml/Kg を連日腹腔内投与した．

3．コントロール群 (control group) (n=8)

ドナーとレシピエントがともに LEW の同系小腸移植 (syngeneic small bowel transplantation) を施行．レシピエントには移植手術 6 時間前に DMSO 1ml/Kg を腹腔内投与した．さらに術後第 1 病日から第 7 病日までの 7 日間の間，DMSO 1ml/Kg を連日腹腔内投与した．

III．拒絶の判定

術後 1 日 1 回の頻度でラットを連日観察し，腹部に硬結を触知した時点を拒絶確認日とした．無治療群のラットは全例術後 7 日目にペントバルビタールの腹腔内投与による麻酔後の脱血により犠牲死させた．またゲニステイン投与群のラットは無治療群との比較のため術後 7 日目に 3 匹を犠牲死させ，他の10匹は拒絶確認後直ちに犠牲死させた．組織学的拒絶の確認はラットを犠牲死させた後に移植小腸片を摘出し，HE 染色にて光顕下に判定した．組織学的拒絶の程度は以下のように分類した[14]．グレード 0 は正常小腸で拒絶の兆候を認めないもの．グレード 1 は小腸絨毛の軽度の破壊と上皮細胞の内腔への脱落を認めるとともに，陰窩の増成やその基底部にアポトーシス細胞の出現を認めるもの．グレード 2 は部分的に絨毛の破壊消失を認めるとともに，粘膜固有層への炎症性細胞の浸潤を認めるもの．グレード 3 (severe rejection) は小腸粘膜が壊死に陥いるとともに潰瘍を形成し，また血管に血栓の形成を認め，化膿性腹膜炎に陥っているものとした．

IV．リンパ球混合培養試験

1．反応細胞 (responder cell) の調整

術後 7 日目の各群のレシピエントを犠牲死させた後に速やかに脾臓を摘出し，ペニシリン 200U/ml とゲンタシン 10μg/ml を添加した 4℃ RPMI-1640 液 (Gibco, Gran Island, NY, USA) 中でピンセットにて細かくほぐした後，孔径 6.5mm の金属ステンレスメッシュ (飯田製作所，大阪) で濾過した．濾過した細胞浮遊液を，0.83% 塩化アンモニウム水溶液と 0.17M トリス緩衝液 (pH7.65) を 9 対 1 で混合した 4℃ 低張緩衝液 (hypotonic buffer) で 2 回洗浄し赤血球を除去した後，10% 非動化した牛胎児血清 (heat-inactivated fetal calf serum, FCS) (Gibco) および 5×10^{-5}M 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol, 2-ME) (和光，大阪) 添加 RPMI-1640 液に細胞を浮遊させ，これを反応細胞として使用した．細胞浮遊液は 200×g で 5 分間遠心後，沈渣を回収し，10% FCS, 5×10^{-5}M 2-ME 加 RPMI-1640 液でリンパ球の最終濃度が 3×10^6 個/ml となるように調整した．

2．刺激細胞 (stimulator cell) の調整

無処置雄性 BN ラット (200〜240g) を犠牲死させた後に脾臓を摘出し，反応細胞と同様に金属メッシュで濾過した後，低張緩衝液で洗浄し赤血球を除去し，10% FCS, 5×10^{-5}M 2-ME 加 RPMI-1640 液に細胞を浮遊させ，リンパ球の最終濃度が 2×10^6 個/ml となるように細胞浮遊液を調整した．この細胞浮遊液に 2000rad の照射を行い刺激細胞として使用した．

3．反応細胞と刺激細胞の混合培養

反応細胞 (3×10^6 個/ml) 10ml と刺激細胞 (2×10^6 個/ml) 10ml を組織培養フラスコ (Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA) 内で48時間混合培養 (37℃, 5% CO_2) した培養細胞と培地をそれぞれ RNA 抽出と ELISA に使用し，5 日間培養した培養細胞をクロム遊離試験の作動細胞 (effector cell) として使用した．

4．標的細胞 (target cell) の調整

標的細胞としてコンカナバリン A (concanavalin A, Con A) (和光) で幼若化したリンパ球 (blast) を使用した．無処置雄性 BN ラット (200〜240g) を犠牲死させた後に脾臓を摘出し，刺激細胞と同様の方法で細胞浮遊液を調整した．但し，10% FCS, 5×10^{-5}M 2-ME, 10μg/ml Con A 加 RPMI-1640 液にて最終濃度が 2×10^6個/ml となるように細胞浮遊液を調整した．この細胞浮遊液をフラスコ内で 3 日間培養 (37℃, 5%CO_2) したものを標的細胞として使用した．

V．細胞障害性試験 (クロム遊離試験，^{51}Cr release assay)

1．標的細胞 (target cell) の準備

Con A 存在下で3日間培養した標的細胞を 200×g で5分間遠心後，沈渣を回収し，10% FCS 加 RPMI-1640 液にて 5×10^6 個/0.2ml となるように細胞浮遊液を作成した．この細胞浮遊液 0.2ml に 50μCi の $Na_2{}^{51}CrO_4$ (50μl)(第一生化学工業，東京)を添加し，37℃, 5%CO_2下でときおり振盪させつつ45分間インキュベーションした．インキュベーション後，10% FCS 加 RPMI-1640 液で2回洗浄し，クロム標識標的細胞の濃度が 2×10^5 個/ml となるように細胞浮遊液を作成した．

2．作動細胞 (effector cell) の調整

5日間混合培養した反応細胞を 200×g で5分間遠心後，沈渣を回収し，10% FCS 加 RPMI-1640 液にて 1×10^7 個/ml となるように細胞浮遊液を作成し，これを作動細胞液とした．

3．標的細胞と作動細胞の混合培養

96穴U底プレート (Nunc, Roskilde, Denmark) の2つのウェル (well) に作動細胞 (1×10^7 個/ml) を 200μl ずつ入れ，10% FCS 加 RPMI-1640 液を用いて倍々希釈系列を2ウェルずつ作成し，各ウェル内の液量を 100μl に調整した．各ウェルに標的細胞 (2×10^5 個/ml) を 100μl ずつ添加し全量を 200μl とした．上記希釈により標的細胞に対する作動細胞の比 (effector to target cell ratio, E/T cell ratio) は 50, 25, 25/2, 25/4, 25/8, 25/16 の6段階の2倍希釈系列となる．自然遊離 (spontaneous release) には作動細胞の代わりに 10% FCS 加 RPMI-1640 液を 100μl ずつ入れ，さらに標的細胞 (2×10^5 個/ml) を 100μl ずつ添加したものを3ウェル作成した．また最大遊離 (maximum release) には作動細胞の代わりに1%非イオン性洗浄剤 (nonionic detergent, IGEPAL CA630) (SIGMA, St. Luis, MO, USA) 水溶液を 100μl ずつ入れ，さらに標的細胞 (2×10^5 個/ml) を 100μl ずつ添加したものを3ウェル作成した．このプレートを 37℃, 5%CO_2下で4時間インキュベーションした後，1000×g で5分間遠心し，各ウェルから上清を 100μl ずつ採取し，^{51}Cr 放出量をオートウェルガンマーシンチレーションカウンター ARC501 (アロカ，東京) にて測定した．下記の計算式に基づき特異的^{51}Cr 放出量 (% specific ^{51}Cr release) を算出し，これを細胞障害活性とした．

細胞障害活性 (%)

$$=\frac{^{51}\text{Cr 実測値 (cpm)}-{}^{51}\text{Cr 自然遊離量 (cpm)}}{^{51}\text{Cr 最大遊離量 (cpm)}-{}^{51}\text{Cr 自然遊離量 (cpm)}}\times100$$

上記計算式の最大遊離量と自然遊離量は3ウェルの平均値を使用し，実測値には各希釈同倍率2ウェルの平均値を使用した．

また上記リンパ球混合培養・細胞障害性試験には各実験群のレシピエントラットを3匹ずつ使用した．すなわち，各群について3回ずつ施行し，統計学的有意差検定にはこの平均値を用いて行った．

Ⅵ．ELISA

リンパ球混合培養48時間後の培養液中の IL-2 濃度を ELISA キットを用いて測定した．リンパ球混合培養48時間後の培養液を 200×g で5分間遠心後，上清を採取し，この上清中の IL-2 蛋白量を IL-2 ELISA キット (Endogen, Cambridge, MA, USA) を用いてサンドイッチ法にて測定した．抗 IL-2 抗体 (固相化一時抗体) でコーティングされた96穴プレートに検体 (培養上清液) を 50μl ずつ加えた．またコントロールとして 10% FCS, 5×10^{-5}M 2-ME 加 RPMI-1640 液を使用した．さらに検量線を作成するために，3種類の濃度 (170pg/ml, 34pg/ml, 0pg/ml) の IL-2 標準溶液を作成し，検体と同様に 50μl ずつ各ウェルに加えた．このプレートを 37℃ で2時間インキュベーションした後，洗浄緩衝液で5回洗浄し，酵素標識2次抗体溶液を各ウェルに 100μl ずつ加え，再度 37℃ で1時間インキュベーションした．プレートを洗浄緩衝液で5回洗浄した後，発色基質を各ウェルに 100μl ずつ加え，室温で暗室に30分間放置した．反応停止液を各ウェルに 100μl ずつ加え，450nm と 550nm の2波長で吸光度 (OD) を測定した．450nm の吸光度 (OD_{450}) から 550nm の吸光度 (OD_{550}) を引き算した値 ($OD_{450}-OD_{550}$) を実測値として使用した．リンパ球混合培養の反応細胞として用いた脾細胞は各実験群のレシピエント3匹ずつから採取した．すなわち，各群について3回ずつ施行し，統計学的有意差検定にはこの平均値を用いて行った．

Ⅶ．逆転写 (reverse transcription, RT)-PCR サザンブロットハイブリダイゼーション

1．全 RNA の抽出

RNA の抽出にはイソゲン (ISOGEN) (ニッポンジーン，富山) を用いて行った．リンパ球混合培養48時間後の培養液を 200×g で5分間遠心後，細胞沈渣を採取し，1ml のイソゲンに溶解し攪拌，懸濁させた後，1分間室温で静置した．クロロホルム (chloroform) を 0.2ml 添加後，攪拌，懸濁させ3分間静置し，4℃, 12000×g で15分間遠心した．上清を採取し，0.5ml のイソプロピールアルコール (isopropanol) を加え，−20℃で1時間静置後，4℃, 12000×g で10分間遠心した．上清を除去した後，1ml の75%エタノール (ethanol) を加え，攪拌後，4℃, 7500×g で5分間遠心し，再び上清を除去し10分間減圧乾燥した後，滅菌蒸留水に溶解した．各 RNA の 260nm における吸光度 (OD_{260}) を測定し，1OD を 40μg/ml として RNA 濃度を計算した．移植小腸片からの RNA の抽出は，組織を採取後，直ちにはさみで細切し，1ml のイソゲン (4℃) を入れたホモジナイザー用ガラス容器に移し，ホモジナイザーで破砕，懸濁させた後，培養細胞と同様の操作で行った．

2．プライマー (primer) およびプローブ (probe) 用オリゴヌクレオチド (oligonucleotide) の作成

405塩基対のラット IL-2 遺伝子 cDNA[15] を特異的に増幅する PCR プライマーとしてセンスプライマー (67−88): 5'-TCAACAGCGCACCCACTTCAAG-3' とアンチセンスプライマー (447−469): 5'-GTTGAGATGATGCTTTGACAGA-3', およびプローブとして 5'-GGAAGACGCTGGAAATTTCATCAGC-3' (314−338) をラット IL-2 遺伝子 cDNA の塩基配列より決定した．560塩基対のラット IL-2R β 鎖遺伝子 cDNA[16] を特異的に増幅する PCR プライマーとしてセンスプライマー (852−871): 5'-ATGCCTTCTACTGGTCCTCG-3' とアンチセンスプライマー (1390−1409): 5'-GAGAAGAGCAGCAGGTCATC-3', およびプローブとして 5'-AATCTCCCCTCCCACCTCTGCTCTTCTC-3' (1322−1346) をラット IL-2R β 鎖遺伝子 cDNA の塩基配列より決定した．また984塩基対のラットグリセルアルデヒド−3−リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, G3PDH) 遺伝子 cDNA[17] を特異的に増幅する PCR プライマーとしてセンスプライマー (35−57): 5'-TGAAGGTCGGTGTCAACGGATTT-3' とアンチセンスプライマー (995−1016): 5'-ATGTAGGCCATGAGGTCCACCA-3', およびプローブとして 5'-ATCCATGACAAC-

TTTGGCATCGTGG-3' (514−538) をラット G3PDH 遺伝子 cDNA の塩基配列より決定した．プローブ DNA 10pmol に対し [γ-^{32}P] ATP (Amersham, Greenwhich, CT, USA) 10μCi，ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液 [50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM 塩化マグネシウム ($MgCl_2$), 5mM ジチオトレイトール (dithiothreitol, DTT), 10mM スペルミジン (spermidine-HCl), 1mM EDTA], 10 単位 T4 キナーゼ (和光) および滅菌蒸留水を加え全量 6ml とし，37℃で45分間インキュベーションし5' 末端を標識した後，ハイブリダイゼーションに用いた．

3．逆転写 (RT) 反応

各 RNA サンプル 4μg にオリゴ (dT) プライマー [oligo (dT) 16 primer] (Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey, USA) 1μg を加え蒸留水で全量 33ml とし，68℃, 15 分間加熱後，氷中にて急冷した．これに RT 反応緩衝液 [50mM Tris-HCl (pH8.3), 75mM 塩化カリウム (KCl), 3mM 塩化マグネシウム ($MgCl_2$), 10mM DTT]，デオキシリボヌクレオチド混合液 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 各 0.5mM), RNA 分解酵素阻害因子 (ribonuclease inhibitor, RNasin) (Promega Biotec, Madison, WI, USA) 2 単位，逆転写酵素 (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, M-MLV RT) (Gibco) 200 単位および滅菌蒸留水を加え全量 50μl とし，42℃で1時間インキュベーションし cDNA を合成した．さらに95℃にて5分間加熱した後，氷中にて急冷した．各々の cDNA 溶液 50μl は RNA 4μg から合成されたものであるため，RNA 1μg から合成された cDNA 量に相当する溶液量は 12.5μl となる．また RNA $10^{-1}\mu$g, $10^{-2}\mu$g, $10^{-3}\mu$g に相当する cDNA 溶液量はそれぞれ $12.5\times10^{-1}\mu$l, $12.5\times10^{-2}\mu$l, $12.5\times10^{-3}\mu$l に相当する．このため cDNA 溶液の4段階10倍希釈系列 (原液，10倍希釈液，10^2倍希釈液，10^3倍希釈液) を作成し，それぞれ 12.5μl ずつを PCR 反応に使用して，目的とする mRNA の定量化を行った．また IL-2 mRNA および IL-2R β 鎖 mRNA 発現量の定量化に際し，G3PDH は内部コントロールとして使用した．

4．PCR 反応

各々の cDNA 溶液 12.5μl に PCR 反応緩衝液 [10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM 塩化カリウム，1.5mM 塩化マグネシウム，0.01% ゼラチン (SIGMA)，デオキシリボヌクレオチド混合液 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 各 250μM)]，センスおよびアンチセンスプライマー各 50pmol, Taq DNA ポリメラーゼ (Perkin Elmer) 1 単位および滅菌蒸留水を加え全量 20μl に調整した．これに 20μl のミネラルオイル (SIGMA) を重層させ，サーマルサイクラー (PC700) (アステック，福岡) で PCR 反応を行った．熱変成を 94℃, 1 分間，アニーリングを 58℃, 1 分30秒間，DNA の伸長を 72℃, 2 分間とし，これを1サイクルとして23サイクル施行した後，熱変成を 94℃, 1 分間，アニーリングを 58℃, 2 分間，DNA の伸長を 72℃, 5 分間でさらに2サイクル行った．

5．増幅 DNA 断片の検出

PCR 反応後の DNA 溶液に滅菌蒸留水 80μl とクロロホルム 150μl を加えて振盪した後，上層の PCR 反応溶液を採取した．この溶液に 10μl の 3 M酢酸ナトリウム (pH5.2) と99%エタノールを 300μl 添加し，−80℃で30分間放置した後，4℃, 15000×g で20分間遠心し，DNA を沈殿させた．この DNA を80%エタノールで洗浄後，減圧乾燥し，試料溶解液 [0.06% ブロモフェノールブルー (bromophenol blue), 0.06% キシレンシアノール (xylene cyanol), 6.7% グリセロール (glycerol) を含むトリス-EDTA (TE) 緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)] 9μl に溶解した．各試料は 0.5μg/ml の臭化エチジウム (ethidium bromide) を含む泳動緩衝液 (40mM Tris, 20mM 酢酸ナトリウム，1mM EDTA, pH8.0；TAE) 中で，定電圧 100V にて，1.5%アガロースゲル (agarose gel) を用いて電気泳動を行った．泳動後のゲルは紫外線照射下に写真撮影を行った後，サザン法[18]に準じて DNA の転写を行った．すなわち，泳動終了後のゲルをアルカリ変成液 (0.5M 水酸化ナトリウム，1.5M 塩化ナトリウム) 中で30分間振盪し DNA を変成させた後，中和液 (3M 塩化ナトリウム，0.5M Tris-HCl, pH7.2) 中での15分間の振盪を2回繰り返した．DNA は 20×SCC を用いてゲルからナイロンメンブレンフィルター (Hybond-N+nylon membrane, Amersham) に転写した．転写後のフィルターに10分間紫外線を照射して DNA のフィルターへの固定を強固なものとした．フィルターをラピッドハイブリダイゼーションバッファー (Rapid hybridization buffer, Amersham) を満たしたハイブリバック (コスモバイオ，東京) 内に入れ，42℃の恒温水槽内で15分間プレハイブリダイゼーションを行った．その後，^{32}P で標識したプローベを最終濃度が 1pmol/ml となるようにハイブリバック内へ投与し，42℃の恒温水漕内で2時間ハイブリダイゼーションを行った．ハイブリダイゼーション後のフィルターを42℃の 2×SSC, 0.1% SDS 溶液で15分間2回洗浄した後，バイオイメージアナライザー (富士フィルム，東京) を用いて，PCR 増幅 DNA 断片に相補的に結合したプローベの放射活

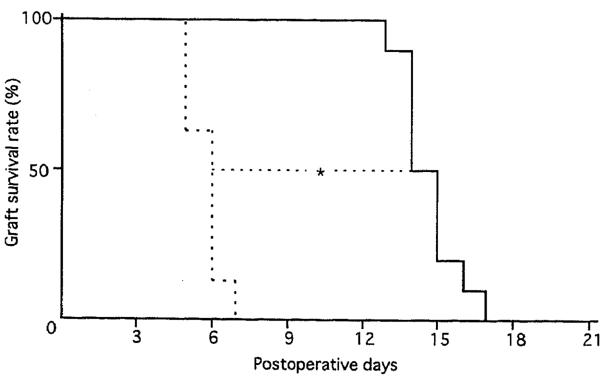


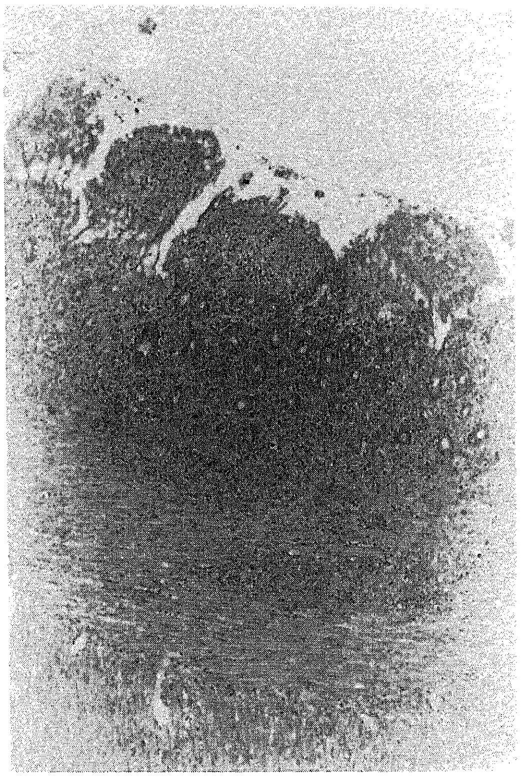
Fig. 1. Graft survival days after the operation until the appearance of the rejection. Rejection was clinically defined as the appearance of a abdominal palpable mass, and always confirmed by histological examination. The solid polygronal line shows the graft survival days of genistein group (n=10) and the broken polygronal line shows the graft survival days of non-treatment group (n=8). *$P<0.001$ by generalized Wilcoxon.

Table 1. Graft survival days

Group	No. of rats used	Graft survival days: Range	Graft survival days: $\bar{x}\pm$SD
Non-treatment	8	5～ 7	5.7±0.2 ┐*
Genistein	10	13～17	14.7±0.3 ┘
Control	5	>21	>21

*$P<0.001$ by generarized Wilcoxson

A



B

Fig. 2. Histopathology of the allografts on postoperative day 7th. A. Allograft view of the non-treatment group. Small bowel is showing necrosis and severe distortion of the mucosa, and mononuclear cells infiltrate within the lamina propria (rejectional grade 3). B. Allograft view of the genistein group. Small bowel is normal with mild mononuclear cells infiltrating to the mucosa (rejectional grade 0). (HE stain. ×250)

性を測定した．

Ⅷ．統計学的検討

各数値は $\bar{x}$ ±SD をもって表わし，移植小腸片の拒絶までの生着日数の比較検定には一般化ウィルコクソン (generalized Wilcoxon) 検定を用い，術後７日目の拒絶の程度や ELISA の測定結果および特異的^{51}Cr 放出量の比較検定にはマンフォイットニー (Mann-Whitney) 検定を用いて行い，危険率５％未満を有意な相関ありとした．

成　　績

Ⅰ．移植片生着期間

無治療群 (n=8) は全例，移植手術後７日目までに拒絶が確認され，その平均生着期間は 5.7±0.2 日であった．一方，ゲニステイン投与群はリンパ球混合培養を行うために術後７日目に犠牲死させた３例を除く10例において，全例術後12日目まで拒絶は確認されず，うち５例は術後14日目まで拒絶が確認されなかった．その平均生着期間は 14.7±0.3 日であり，無治療群に比べて有意に (p<0.001) 長かった (表１，図１)．同系移植を行ったコントロール群は全例 (n=5)，移植後３週間以上の観察を行うも拒絶は認められなかった．移植後７日目の組織学的拒絶の程度は，無治療群では全例 (n=8)，グレード３ (severe rejection) の高度の拒絶が認められた (図 2A) のに対し，ゲニステイン投与群は３例中２例がグレード０ (図 2B) で拒絶の兆候を認めず，他の１例もグレード１の軽度の拒絶を認めるのみであった (表 2)．

Ⅱ．リンパ球混合培養，細胞障害性試験

１．細胞障害活性 (クロム遊離試験)

細胞障害活性は特異的^{51}Cr 放出量 (%specific ^{51}Cr release) として表わした．横軸を対数とした片対数グラフの縦軸にこの特異的^{51}Cr 放出量をプロットし，横軸に標的細胞に対する作動細胞の比 (effector to target cell ratio, E/T cell ratio) をプロットすると，各実験群ともほぼ直線的な正の相関が認められた (図 3)．このことより，各実験群間における特異的^{51}Cr 放出量の統

Table 2. Rejectional grades of allografts at postoperative day 7th

Group	No. of rats used	No. of rats with rejectional grade				
		0	1	2	3	
Non-treatment	8	0	0	0	8	] *
Genistein	3	2	1	0	0	

*P<0.001 by Mann-Whitney

Table 3. Cytotoxic T lymphocytes (CTL)-mediated cytotoxicity assay

Group	No. of rats used	E/T ratio	% specific ^{51}Cr release ($\bar{x}$ ±SD)	
Non-treatment	3	50	33±2.0	] *
Genistin	3	50	15±2.5	
Control	3	50	37±3.0	

E/T ratio, effector to target cell ratio.
*P<0.001 by generarized Wilcoxson

計学的有意差検定は，標的細胞に対する作動細胞の比が 50 (E/T ratio=50) の値について行った．コントロール群の特異的 ^{51}Cr 放出量 (E/T ratio=50) が 37±3.0%，無治療群のそれが 33±2.0% であったのに対し，ゲニステイン投与群の特異的 ^{51}Cr 放出量 (E/T ratio=50) は 15±2.5% であり，他の 2 群に比べて有意に低かった (p<0.0001) (表 3).

2．リンパ球混合培養上清中の IL-2 濃度

無治療群 (n=3) のリンパ球混合培養上清中 IL-2 濃度は 30±1.6pg/ml であった．一方，ゲニステイン投与群のそれは 10±3.3pg/ml であり，ゲニステイン投与群のほうが無治療群に比べて有意に低かった (p<0.0001) (図 4). コントロールとして用いた 10% FCS, 5×10^{-5}M 2-ME 加 RPMI-1640 液の測定値は感度以下であり，またコントロール群のリンパ球混合培養液中の IL-2 濃度は 3±5.1pg/ml ときわめて低値であった．

3．リンパ球混合培養細胞における IL-2, IL-2R β 鎖および G3PDH mRNA の発現

リンパ球混合培養48時間後の培養細胞の IL-2, IL-2R β 鎖および G3PDH の mRNA の発現を観察するために，各実験群の培養細胞より抽出した RNA から，オリゴ (dT) プライマーを用いた逆転写反応により作成した cDNA の段階希釈系列を作成し，PCR を施行した．アガロースゲル電気泳動後，各 PCR 産物を臭化エチジウム染色により解析した結果，IL-2 に対するプライマーペアーでは IL-2 mRNA 由来の405塩基対の増幅 DNA 断片が特異的に検出され，IL-2R β 鎖に対するプライマーペアーでは IL-2R β 鎖 mRNA 由来の560塩基対の増幅 DNA 断片が特異的に検出され，また G3PDH に対するプライマーペアーでは G3PDH mRNA 由来の984塩基対の増幅 DNA 断片が特異的に検出された (図 5). それぞれの増幅 DNA 断片の塩基配列に特異的なプローベを用いたサザンブロットハイブリダイ

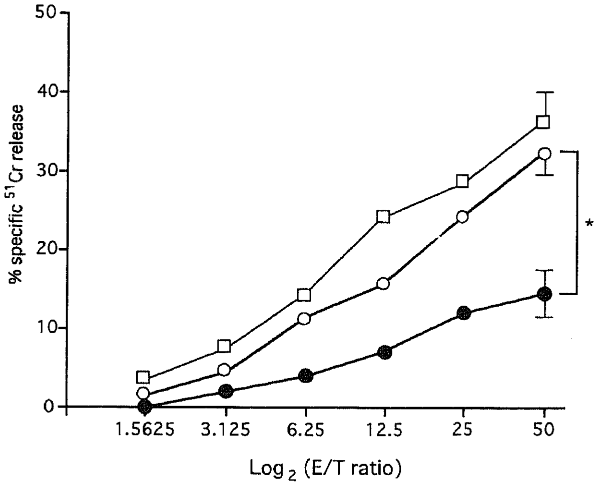


Fig. 3. CTL-mediated cytotoxicity of spleen cells isolated from the recipient harvested at postoperative day 7th. Spleen cells were isolated from non-treated (○), genistein treated (●) or control (□) rat. ^{51}Cr release from Con-A blast target cells from BN rat was assayed at E/T cell ratios of 50 : 1 to 25 : 16. All assays were repeated at last once and were performed three rats in each group, and results are expressed as $\bar{x}\pm$SD. *$P<0.0001$ by Mann-Whitney.

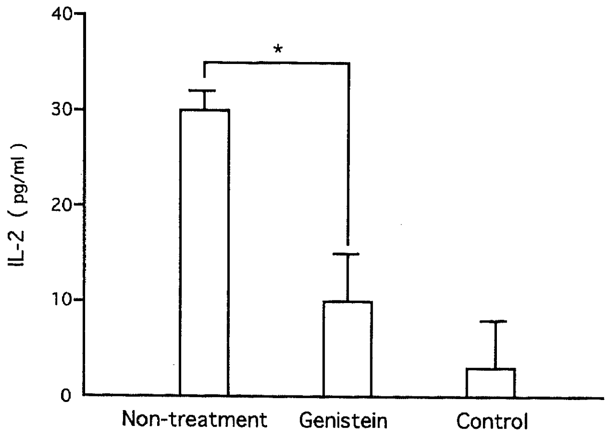


Fig. 4. Quantitative measurement of IL-2 production in mixed culture spleen cells isolated from the recipient harvested at postoperative day 7th using the ELISA kit. Mixed lymphocyte reaction was performed for 48 hr with BN rat spleen cells, and responder to stimulator cell ratio was instituted at 3 : 2. Measurement were repeated at last once respectively and were performed three rats in each group, and results are expressed as $\bar{x}\pm$SD. *$P<0.0001$ by Mann-Whitney.

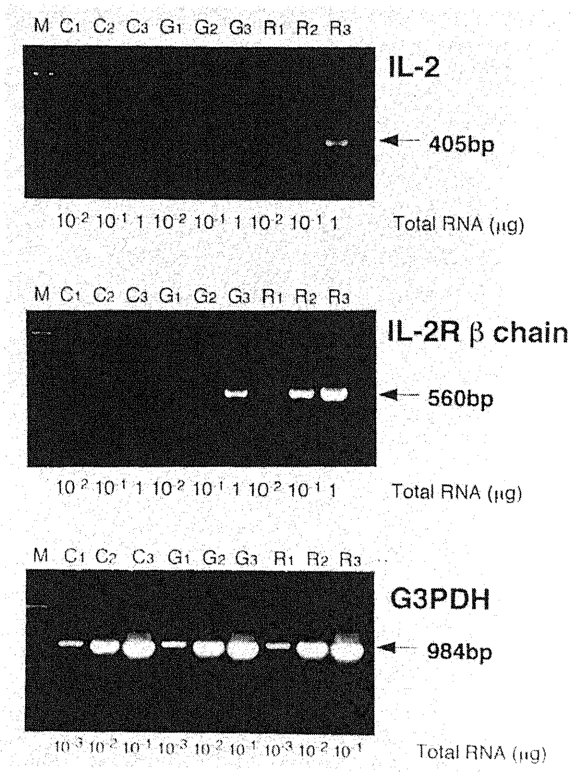


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of each RT-PCR product. Total RNA (4 μg) from the 48 hr mixed culture responder cells, isolated from the recipient harvested at postoperative day 7th, with stimulator cells of BN rat spleen cells, was reverse transcribed in cDNA and the cDNA was diluted ranging from ×10^3 to×1 and amplified by 25 cycles of PCR. Total RNA extraction from the control group responder cell ($C_{1\text{-}3}$), genistein group responder cell ($G_{1\text{-}3}$) or non-treatment responder cell ($R_{1\text{-}3}$). (bp, base pair ; M, DNA size marker)

ゼーション法により，増幅 DNA 断片の解析を行った．その結果，mRNA 由来増幅 DNA 断片は，各々が単一のバンドとして検出された (図 6)．一方，リンパ球混合培養細胞から抽出された RNA を用いて，逆転写酵素を添加せずに RT-PCR の一連の操作を行ったところ増幅 DNA 断片は検出されなかった．すなわち本法で検出された DNA 断片は，抽出した RNA 溶液中に混入したゲノム DNA より増幅されたものではなく，mRNA より逆転写により合成された cDNA に由来するものと判断される．検出された DNA 断片は，相補結合したプローベの放射活性を測定することで定量化した．両対数グラフの横軸に鋳型 RNA 量をプロットし，縦軸に測定した放射活性量をプロットすると，両者はほぼ直線関係になるとともに，この直線の傾きは PCR のターゲットが同一の場合，各実験群間での違いは認められずほぼ一定であり，本法の高い定量性が示された．また遺伝子発現の内部コントロールとした G3PDH の発現量には各実験群間でほとんど差は認められなかった (図 7)．最終的には，ゲニステイン投与群および無治療群の増幅 DNA 断片量は，それぞれの放射活性値をコントロール群の放射活性値で補正した相対的な値として表わし，さらにゲニステイン投与群および無治療群の IL-2 および IL-2R β 鎖の mRNA 発現量は，それぞれの相対的増幅 DNA 断片量を個々の G3PDH の相対的増幅 DNA 断片量で補正した値として表わした．これに基づい

Table 4. Detection of IL-2, IL-2 receptor β chain and G3PDH mRNA expression by RT-PCR method from mixed culture lymphocyte

Responder cell	Relative amount ratio of PCR product			Relative amount of mRNA	
	IL-2	IL-2R	G3PDH	IL-2	IL-2R
Non-treatment	20	82	0.36	55.5	228
Genistein	2	12	1.24	1.6	10

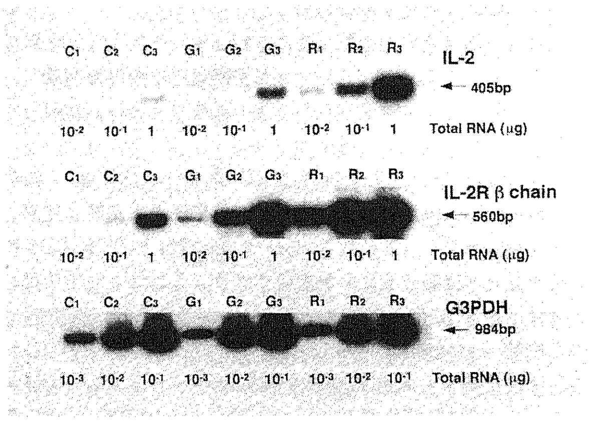


Fig. 6. Southern blot analysis of IL-2, IL-2 receptor β chain and G3PDH mRNA RT-PCR products from serial dilutions of the cDNA reverse transcribed from the total RNA which from the 48 hr mixed culture responder cells, isolated from the recipient harvested at postoperative day 7th, with stimulator cells of BN rat spleen cells. Total RNA extraction from the control group responder cell ($C_{1\text{-}3}$), genistein group responder cell ($G_{1\text{-}3}$) or non-treatment responder cell ($R_{1\text{-}3}$). (bp, base pair)

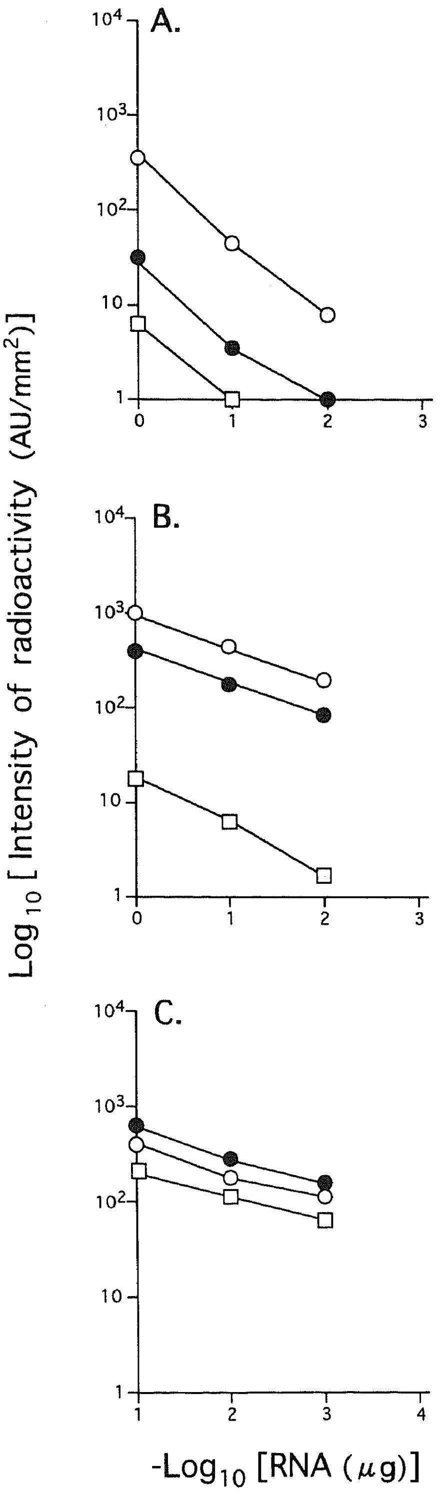


Fig. 7. Radioactivity of PCR products from the 48 hr mixed culture responder cells using the intensity of the hybridization signals in Fig. 6. The radioactivities of the PCR products shown in Fig. 6 were analyzed using a Fujix Bioimage analyzer and described in arbitary units (AU) per mm^2. The radioactivity was plotted against the concentration of total RNA as template. These figures show the expression levels of the IL-2 (A), IL-2 receptor β chain (B) and G3PDH (C) genes in the mixed culture responder cells of control group (□), genistein group (●) and non-treatment group (○).

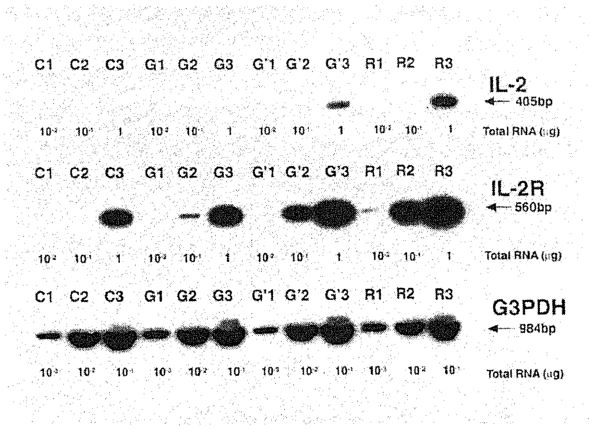


Fig. 8. Southern blot analysis of IL-2, IL-2 receptor β chain and G3PDH mRNA RT-PCR products from serial dilutions of the cDNA reverse transcribed from the total RNA which from the grafted intestines. Total RNA (4 μg) from the grafted intestines was reverse transcribed in cDNA and the cDNA was diluted ranging from $\times 10^4$ to $\times 1$ and amplified by 25 cycles of PCR. Total RNA extraction from the grafted intestine of control group harvested at postoperative day 7th ($C_{1\text{-}3}$), genistein group harvested at postoperative day 7th ($G_{1\text{-}3}$) and postoperative 14th ($G'_{1\text{-}3}$) or non-treatment group harvested at postoperative day 7th ($R_{1\text{-}3}$). (bp, base pair)

Table 5. Detection of IL-2 and IL-2 receptor β chain mRNA expression by RT-PCR method from lymphocyte of mixed culture

Grafted intestine	Tissue of examination (POD)	Relative amount of mRNA	
		IL-2	IL-2R
Non-treatment	7	300	2
Genistein	14	60	2
Genistein	7	1	1

POD, postoperative day

てリンパ球混合培養細胞中の IL-2 および IL-2R β 鎖の相対的 mRNA 発現量をゲニステイン投与群と無治療群で比較した場合，無治療群ではゲニステイン投与群に比べて35倍の IL-2 mRNA を過剰発現しており，また IL-2R β 鎖 mRNA については無治療群でゲニステイン投与群に比べて23倍の過剰発現が認められた (表 4).

Ⅲ. ラット移植小腸片における IL-2, IL-2R β 鎖および G3PDH mRNA の発現

リンパ球混合培養細胞の IL-2, IL-2R β 鎖および G3PDH の mRNA の発現を観察する場合と同様に，各実験群の移植 7 日目およびゲニステイン投与群の移植14日目の移植小腸片より抽出した RNA から逆転写反応により作成した cDNA の段階希釈系列を作成し PCR を施行した．アガロースゲル電気泳動後，各 PCR 産物を臭化エチジウム染色により，それぞれの遺伝子に対するプライマーペアーで目的とする DNA 断片が特異的に増幅されていることを確認した．またそれぞれの増幅 DNA 断片に特異的なプローベを用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法による解析を行った．またこの際 mRNA 由来増幅 DNA 断片は単一のバンドとして検出された (図 8)．検出された DNA 断片は，相補結合したプローベの放射活性を測定することで定量化した．ゲニステイン投与群および無治療群の IL-2 および IL-2R β 鎖の mRNA 発現量は，それぞれの相対的増幅 DNA 断片量 (コントロール群の増幅 DNA 断片量で補正した値) を個々の G3PDH の相対的増幅 DNA 断片量 (コントロール群の増幅 DNA 断片量で補正した値) で補正した値として表わした．これに基づいて移植 7 日目の移植小腸片の IL-2 および IL-2R β 鎖の相対的 mRNA 発現量をゲニステイン投与群 (拒絶 grade 0) と無治療群 (拒絶 grade 3) で比較した場合，無治療群ではゲニステイン投与群に比べて300倍の IL-2 mRNA を過剰発現していたが，IL-2R β 鎖 mRNA については両者の発現量の間に 2 倍程度の差しか認められなかった．また無治療群移植 7 日目の移植小腸片とゲニステイン投与群移植14日目 (拒絶 grade 2) の移植小腸片の IL-2 および IL-2R β 鎖の相対的 mRNA 発現量を比較した場合，移植14日目ゲニステイン投与群では拒絶が起こっているもののその程度はグレード 2 であり，移植 7 日目無治療群の IL-2 mRNA 発現量の 5 分の 1 にとどまっていた．一方 IL-2R β 鎖 mRNA については両者の発現量の間に差は認められなかった (表 5).

考 察

同種移植片 (アログラフト) の拒絶 (rejection)[19] はT細胞の移植抗原 (アロ抗原) の認識と細胞破壊により起こる．その際，標的となるおもな抗原は主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex, MHC) である．ヒトの MHC は HLA であるが，ラットでは RT-1[20] と呼ばれ，BN ラットと LEW ラットではこの RT-1 が異なる．すなわち，BN ラットから LEW ラットへの小腸移植は MHC の異なる異系移植 (allogenic small bowel transplantation) ということになり，当然強い拒絶反応が惹起される[21]．今回の実験でも，無治療群では全例，グラフト小腸が術後 7 日以内に拒絶され，その平均生着日数は 5.7±0.2 日と短かった．また術後 7 日目の病理組織学的検討でも，全例でグレード 3 の高度の拒絶を呈していた．一方，ゲニステイン投与群の平均グラフト生着日数は 14.7±0.3 日と，無治療群に比べて有意に長く，ゲニステインが拒絶反応の発現を抑制し，移植片 (allograft) の生着日数を有意に延長させることが明らかとなった．

拒絶反応に際し，まずアロ MHC あるいは抗原提示細胞 (antigen presenting cell, APC) によって提示されたアロ抗原ペプチドを，ヘルパーT細胞 (helper T cell, Th) が TCR, CD3 複合体を介して認識することが重要であり，これによってT細胞が活性化され IL-2 などのサイトカインが産生され，細胞障害性T細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) などが活性化される．活性化された細胞障害性T細胞はパーフォリン (perforin)[22] などの細胞障害物質 (cytolytic molecule) を放出して標的細胞 (ドナー細胞) を破壊する．T細胞活性化への第 1 のシグナルである TCR, CD3 複合体を介した刺激によりT細胞内では，まずチロシンキナーゼが活性化される．つまり p59^{fyn} [23], p56^{lck} [24] の活性化に続き，ZAP-70[25][26] が活性化される．これにより下流へとシグナルが伝えられ IL-2 の産生が起こる[27]．サイクロスポリンAや FK506 はT細胞内シグナル伝達系の途中にあるカルシニューリン (calcineurin) に結合することにより，活性化T細

胞核内転写因子 (nuclear factor of activated T cell, NF-AT)[28]の活性化を阻害する[29][30]と考えられている．サイクロスポリンAや FK506 はいうなればT細胞内のシグナル伝達系の途中を阻害することにより免疫抑制効果を発揮するということができるが，一方，T細胞内シグナル伝達系において重要な役割を担っているチロシンキナーゼの活性をゲニステインなどの特異的阻害剤などで直接制御することにより，これらの免疫抑制剤と同様の効果を導きだすことができるのではないかと考えられる．

Mustelin ら[12]は，培養細胞を用いた実験系で，ゲニステインが TCR-CD3 複合体からのシグナル伝達の最初のステップである p59^{fyn}, p56^{lck} のリン酸化 (チロシンキナーゼの活性化) を抑えることにより，IL-2R の発現やT細胞の増殖を抑制することを明らかにした．また Atluru ら[10]は，同様に培養細胞を用いた実験系において，T細胞活性化の副刺激 (costimulatory signal) として重要な CD28[31][32]を TCR とともに刺激した場合のT細胞活性化に際し，ゲニステインを投与することにより，T細胞に対する細胞毒性をきたさない濃度範囲内でその活性化が抑制されるとともに IL-2 の産生や IL-2R の発現が抑制されることを明らかにした．さらに Atluru らは，この CD28 と TCR を刺激することによる IL-2 の産生は，サイクロスポリンAでも抑制されるものの，IL-2R の発現はサイクロスポリンAでは抑制されないことを明らかにした．すなわち，ゲニステインはT細胞活性化の情報伝達系に対しサイクロスポリンAとは異なる経路に対しても阻害作用を有することが明らかにされた．本研究でも，レシピエントとドナーの脾臓から採取したリンパ球を用いた混合培養試験において，IL-2 蛋白産生量が無治療群に比べてゲニステイン投与群で有意に低く抑えられており，このことは mRNA レベルでも明らかであった．また IL-2R β 鎖発現量は蛋白レベルでは証明していないが，mRNA レベルでは IL-2 と同様に，ゲニステイン投与群では無治療群に比べて明らかに低く，前述した Atluru らの結果に合致するものであり，ラット小腸移植モデルを用いた実験系においてこのことを証明しえたことは極めて重要な意味を持つものと考える．さらに今回の実験ではリンパ球混合培養に続く細胞障害試験でも，無治療群に比べてゲニステイン投与群では，その細胞障害活性が有意に低く，ゲニステインの細胞性免疫抑制効果を，培養細胞レベルではなく動物を用いた実験系において同様に明らかにすることができた．しかし，ゲニステイン投与群の細胞障害活性は無治療群に比べて低いとはいへ，免疫寛容状態を誘導できた場合に期待できるレベルからみれば高値であった．小腸移植後8日目からゲニステインの投与を中止したことにより，拒絶反応が出現してくることを考えれば，今回の投与方法では残念ながら臓器特異的寛容導入は期待できないものと考える．術後7日目までゲニステインを1日 20mg/kg の割合で腹腔内投与したが，当然のことながらゲニステインの投与量をこれより増量したり，投与期間をさらに延長した場合にさらなる効果が期待できるのではないかと考えられるが，実際には以下の理由から今回の投与量および投与期間の設定を行った．1日の投与量がこれより多い量ではラットの著名な体重減少や下痢，活動性の低下などの副作用が顕著となり，また1日 20mg/kg の量を8日間以上続けた場合も，ゲニステインの副作用に加えて，DMSO の毒性も顕著となり致死的となる．さらに1日の投与量を減量した場合には拒絶抑制効果が十分なものではなかった．

これまでの培養細胞を用いたさまざまな研究から，ゲニステインが細胞毒性をきたさない濃度範囲内でT細胞の活性化を抑制し細胞性免疫の抑制効果を期待できることが明らかにされているわけだが，これらはあくまでも培養細胞レベルの実験系であり，臨床応用という観点からすれば解決しなければならない問題が多々ある．ゲニステインは脂肪酸合成阻害[33]や DNA のトポイソメラーゼ (topoisomerase Ⅱ) 阻害作用[34]などの副作用を有する上，マウスへの静脈投与ではその半減期が5時間あまりと短い[35]．さらに，ゲニステインは基質 (ATP) 拮抗型でありハービマイシンAのように[36]Src ファミリーのチロシンキナーゼに特異的な阻害剤ではないため，他のファミリーのチロシンキナーゼに対する阻害作用の発現も同程度に予想される．またゲニステインは極めて難溶な物質であるため DMSO に溶解する以外に有効な溶解方法がないため，この点も生体に投与する際の大きな障壁となる．しかし，細胞性免疫能を司るTリンパ球に対してより特異的に作用する誘導体が開発され，生体に対して毒性のない溶解方法や投与方法の開発により安定した血行動態が維持されるならば，既存の免疫抑制剤の補助薬として十分に臨床応用が可能になるのではないかと考える．そのための一つの方法として Uckun ら[35]は極めて興味深い報告を行っている．ヒト前Bリンパ球性白血病のマウスモデルにおいて，Bリンパ球に特異的な CD19 に対する抗体とゲニステインの免疫複合体を作成し，これをこのモデルに投与することによりゲニステイン単独投与に比べて極めて良好な抗腫瘍効果が発揮されるとした．この理由の一つとして，抗 CD19 抗体・ゲニステイン免疫複合体の血行動態の安定性を上げている．この免疫複合体はゲニステインに比べて血中の半減期が長いため，有効血中濃度を維持する上で好都合であり，さらに CD19 を発現した前Bリンパ球性白血病細胞に比較的特異的に結合するため，ゲニステインが腫瘍細胞の CD19 に付随した Src ファミリーのチロシンキナーゼに対する阻害作用を効率的に発揮し，毒性をきたさない少ない投与量で十分な効果が期待できるとともに臨床応用も可能だと報告している．

ゲニステインは可逆的な阻害剤である上，細胞内へ取り込まれにくく，血中半減期も短いことより，拒絶反応を抑制するためにゲニステインそのものを生体に投与する場合には，相当量を投与しなければならないわけだが，重篤な副作用の発現という点から，そこにはおのずから限界があり，長期的な拒絶反応抑制効果を評価することはできなかった．このため生体内でより効率的で良好な効果を期待する場合には，免疫複合体などの誘導体という形でゲニステインの臨床応用への可能性が論じられるべきであろう．今回のように拒絶反応抑制効果を期待する場合も，ゲニステインを CD3, CD4 や CD28 などのT細胞上のレセプターに対する抗体との免疫複合体という形で投与することができれば，さらに良好な拒絶反応抑制効果を期待できるものと考える．実際，CD3 に対する抗体である OKT3 や CD4 に対する抗体[37]をはじめ，CD28 の2次シグナル産生を阻害する CTLA4-Ig[38][39]の拒絶反応抑制効果が明らかにされ，特に OKT3 は既にヒトに応用され良好な結果が得られており[40]，さらにこれらとゲニステインとの複合体が開発されるならば，より強力で効率的な免疫抑制効果が期待できるものと考える．

臓器移植における拒絶反応抑制の理想は，臓器特異的な免疫寛容の誘導に他ならないが，この寛容の獲得のメカニズムには未だ未知の部分が多いため一概に論じることはできないが，一

般的には，TCR から一定レベルの刺激が入っても副刺激などが欠如しT細胞が細胞分裂に至らない場合にアナジー（免疫寛容）が誘導され[41]，この維持にはマイクロキメリズム[42]の形成が重要であろうと考えられている．この考え方に基づけば，T細胞活性化の副刺激を司るレセプターに対する抗体とゲニステインとの免疫複合体の開発は，免疫寛容導入への可能性を十分に期待させてくれるものと考える．

本研究ではさらに移植臓器（グラフト小腸）そのものにおける IL-2 および IL-2R β 鎖の mRNA 発現量も比較検討した．T細胞活性化に始まるサイトカインネットワークによる拒絶反応の発現の中心的な役割を担っているのが IL-2 や IL-2R であることより，グラフト小腸局所におけるこれらの mRNA の発現は，異系臓器に対するホスト側の免疫応答，すなわち局所における拒絶反応の発現を表す重要な因子と考えられる．mRNA 発現量の比較検討を RT-PCR 法を用いて行ったが，段階希釈系列を用いた方法は mRNA の定量化に際し十分に満足のいく結果が得られたものと考える．これまでにも移植臓器片におけるサイトカインの mRNA 発現量の比較検討に RT-PCR 法を用いた報告[43]~[47]がなされているが，その定量化の手法は必ずしも十分なものとは言い難い．その理由の一つとして，段階希釈系列を用いた検討がなされていないことが上げられる．cDNA 溶液の段階希釈系列を作成して PCR を行い，定量化に適した PCR のサイクル数を決定して目的とする mRNA の発現量を評価する方法の詳細については Ninomiya ら[48]が報告しているが，この方法は客観的評価に十分耐えうるものと考える．実際の臨床の場で，少量の生検材料を用いて移植片のサイトカイン mRNA の発現量を評価することにより，移植片に明らかな拒絶の兆候が組織学的に認められる前に，いちはやく拒絶の出現を察知し，その後の治療に役立てることができないかどうかを明らかにするために，これまで RT-PCR 法を用いた検討がなされてきたものと考える．

McDiarmid ら[47]はラット異系小腸移植モデルを用いた検討で，拒絶された移植片における IL-2 mRNA の発現量を RT-PCR 法を用いて同系移植モデルの移植片のそれと経時的に比較した場合，移植後7日目から14日目では拒絶された移植片の方が有意に高かったと報告している．本研究でも高度の拒絶を発現している無治療群移植7日目の移植片の mRNA 発現量は，同系移植ラット術後7日目の移植片のそれよりも極めて高く，同様の結果であった．一方，組織学的に拒絶を認めないゲニステイン投与群術後7日目の移植片の mRNA 発現量は同系移植ラット術後7日目の移植片のそれとほぼ同程度であり，その発現量は拒絶群と比べて明らかに低く，このことはゲニステインが拒絶反応を抑えていることの明確な証明に他ならない．しかしヒトの腎移植における検討[45]では，移植片における IL-2 mRNA の発現は拒絶のきわめて初期の段階で一過性に高発現するが，拒絶が進めば非拒絶移植片同様その発現は極めて低いものであると報告されている．さらに，ヒト肝移植における検討[44]では，拒絶移植肝と非拒絶移植肝の間で IL-2 mRNA 発現量に明らかな差は認められず，その発現量も極めて低いと報告されており，ラットを用いた小腸移植モデルの結果とは異なっている．その理由として，RT-PCR による定量化の方法の違いや，ヒトとラットの種の違い，あるいは，小腸は肝臓や腎臓に比べてリンパ組織が極めて豊富であるといった移植臓器の違いなどをあげることができる．しかし，一般的には拒絶の発現に際しT細胞の活性化による IL-2 の産生が極めて重要であるとともに，拒絶のいづれかの段階で一過性ではあるが拒絶移植片局所における IL-2 mRNA の高発現が認められると考えられており，本研究の結果はこの考え方に矛盾するものではない．

一方，移植片における IL-2R β 鎖の mRNA の発現量については，一般的には拒絶の指標とはなりにくいと考えられている．この根拠として McDiarmid ら[47]は，ラットにおいては静止期のリンパ球であっても活性化されたリンパ球と同様に IL-2R β 鎖を発現しており，その mRNA 発現量が拒絶片と非拒絶片との間で大きく異なることはないと報告している．本研究でも，高度の拒絶を発現している無治療群移植7日目の移植片の mRNA 発現量は，同系移植ラット術後7日目の移植片のそれよりもやや高いものの，その程度は IL-2 と比較すると軽微なものであり，McDiarmid らと同様の結果であった．Page ら[16]はラットの IL-2R α 鎖と β 鎖の cDNA のクローニングの過程で，静止期のリンパ球では β 鎖の mRNA の発現は認められるものの，α 鎖の mRNA の発現は認められず，リンパ球が活性化されて初めて α 鎖の mRNA の発現が起こるとともに β 鎖の mRNA の発現亢進が認められることを明らかにした．さらに Page らは，このリンパ球活性化に伴う α 鎖の発現と β 鎖の発現亢進により，IL-2R の IL-2 に対する親和性が高まることより，両方の鎖の発現調節により，IL-2R を介したシグナル伝達系がコントロールされていると述べている．β 鎖は単独では IL-2 に対する結合能が弱く，α 鎖と共役することで初めて高親和性を獲得する[49]ことより，リンパ球活性化による α 鎖の発現が IL-2R を介したシグナル伝達において重要な役割の一端を担っているということは明らかであるが，実際には α 鎖ではなく β 鎖が IL-2 による細胞の増殖応答に必須であることが明らかにされている[50]上，α 鎖はT細胞活性化過程の極めて早期に一過性に発現する[51]だけであり，IL-2R を介したシグナル伝達の本体はやはり β 鎖と考えられる．

これらのことを踏まえて IL-2R β 鎖の mRNA 発現量を評価したのであるが，移植7日目の拒絶移植片と非拒絶片との間にはその発現量に大きな差は認められなかった．しかし，わずかとはいえ拒絶異系移植片と非拒絶同系移植片との間にはその発現量に2倍の開きを認めるとともに，移植7日目のゲニステイン投与群の異系移植片の IL-2R β 鎖の mRNA 発現量は非拒絶同系移植片のそれと同程度に低く，このことはゲニステインがTリンパ球の活性化を阻害するとともに，IL-2R β 鎖の発現亢進を抑えていることの証に他ならないと考える．また β 鎖はその細胞内ドメインで Src ファミリーチロシンキナーゼの $p56^{lck}$ と直接会合しており，そのチロシンリン酸化が下流のシグナル伝達系を活性化するのではないかと考えられていることより[52]，当然ゲニステインは β 鎖の活性化機構も阻害しうるものと考える．

本研究ではゲニステインが細胞性免疫能を抑制するとともに臓器移植における拒絶反応を抑制することを，異系ラット小腸移植モデルを用いて証明するとともに，チロシンキナーゼ阻害剤の免疫抑制剤への応用の可能性を明らかにすることができた．しかし臨床応用を主眼に置いた場合，生体に対して安全で効率良く作用する免疫複合体などのゲニステイン誘導体の開発が今後の最も重要な課題であり，その実現が急務であると考える．

結　　論

ラット異系小腸移植モデルを用いてチロシンキナーゼ阻害剤であるゲニステインの拒絶反応抑制効果を検討し以下の結果を得た．

1．無治療群の移植小腸片の平均生着日数が 5.7±0.2 日であったのに対し，ゲニステイン投与群のグラフト小腸の平均生着日数は 14.7±0.3 日と有意に長く，ゲニステイン投与により拒絶反応の発現が抑制された．

2．移植7日後のグラフト小腸の IL-2 および IL-2R β 鎖の mRNA 発現量は，ゲニステイン投与群では無治療群に比べて明らかに低かった．

3．移植後7日目のラットの脾細胞を用いたリンパ球混合培養および細胞障害性試験（クロム遊離試験）では，ゲニステイン投与群は無治療群に比べて細胞障害活性が有意に低かった．また，リンパ球混合培養上清中の IL-2 蛋白産生量は，ゲニステイン投与群では無治療群に比べて有意に低かった．さらにリンパ球混合培養細胞の IL-2 および IL-2R β 鎖の mRNA 発現量もまた，ゲニステイン投与群では無治療群に比べて明らかに低かった．

以上より，ゲニステインは小腸移植後のラットの細胞性免疫能を抑制するとともに急性拒絶反応の発現を有意に抑制させることが明らかとなり，チロシンキナーゼ阻害剤の免疫抑制剤への応用の可能性が示された．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，懇篤な御指導と御稿閲を賜りました金沢大学医学部外科学第二講座宮崎逸夫教授に深甚なる謝意を表します．本研究の遂行にあたり，直接御指導と御鞭撻を賜わりました金沢大学医学部外科学第二講座八木雅夫講師に深く感謝いたします．また御助言，御協力を戴きました金沢大学医学部外科学第二講座橋本哲夫博士ならびに本学がん研究所化学療法部遠藤良夫博士をはじめ，本学外科学第二講座およびがん研究所化学療法部諸兄に厚く御礼申し上げます．

尚，本研究の要旨は第31回日本移植学会総会（1995，京都）において発表した．

文　　献

1）**Borel, J. F.**: Pharmacology of cyclosporine (Sandimmune) Ⅳ. Pharmacological properties in vivo. Pharmacol. Rev., **41**, 259-371 (1989).

2）**Lawen, A. & Zocher, R.**: Cyclosporine Synthetase. J. Biol. Chem., **265**, 11355-11360 (1990).

3）**Thomson, A. W.**: FK506 How much potential? Immunol. Today, **10**, 6-9 (1989).

4）**Thomson, A. W.**: FK506 enters the clinic. Immunol. Today, **11**, 35-36 (1990).

5）**Bernstein, C. N.**: Small bowel transplantation. Scand. J. Gastroenterol., **30**, 118-124 (1995).

6）**Toi, M., Mukaida, H., Wada, T., Hirabayashi, N., Toge, T., Hori, T. & Umezawa, K.**: Antineoplastic effect of erbstatin on human mammary and esophageal tumors in athymic nude mice. Eur. J. Cancer, **26**, 722-724 (1990).

7）**Yoneda, T., Lyall, R. M., Alsina, M. M., Persons, P. E., Spada, A. P., Levitzki, A., Zirberstein, A. & Mundy, G. R.**: The antiproliferative effects of tyrosine kinase inhibitors tyrphostins on a human squamous cell carcinoma in vitro and in nude mice. Cancer Res., **51**, 4430-4435 (1991).

8）**Weiss, A.**: T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. Cell, **73**, 209-212 (1993).

9）**Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. & Fukumi, Y.**: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. J. Biol. Chem., **262**, 5592-5595 (1987).

10) **Atluru, A. & Atluru, D.**: Evidence that genistein, a protein-tyrosine kinase inhibitor, inhibits CD28 monoclonal-antibody-stimulated human T cell proliferation. Transplantation, **51**, 448-450 (1991).

11) **Norton, S. D., Hovinen, D. E. & Jenkins, M. K.**: IL-2 secretion and T cell clonal anergy are induced by distinct biochemical pathways. J. Immunol., **146**, 1125-1129 (1991).

12) **Mustelin, T., Coggeshall, K. M., Isakov, N. & Altman, A.**: T cell receptor-mediated activation of phospholipase C requires tyrosine phosphorylation. Science, **247**, 1584-1587 (1990).

13) **Zhong, R., Grant, D., Sutherland, F., Wang, P., Chen, H., Lo, S., Stiller, C. & Duff, J.**: Refined technique for intestinal transplantation in the rat. J. Microsurg., **12**, 268-274 (1991).

14) **Fecteau, A. H., Tchervenkov, J. I., Guttman, F. M., Takara, T. & Rosenmann, E.**: Small bowel transplantation. Transplantation, **58**, 399-402 (1994).

15) **McKnight, A. J., Mason, D. W. & Barclay, A. N.**: Sequence of rat interleukin 2 and anomalous binding of a mouse interleukin 2 cDNA probe to rat MHC class Ⅱ-associated invariant chain mRNA. Immunogenetics, **30**, 145-147 (1989).

16) **Page, T. H. & Dallman, M. J.**: Molecular cloning of cDNAs for the rat interleukin 2 receptor α and β chain genes: differentially regulated gene activity in response to mitogenic stimulation. Eur. J. Immunol, 21, 2133-2138 (1991).

17) **Tso, J. Y., Sun, X. H., Kao, T. H., Reece, K. S. & Wu, R.**: Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase cDNAs: Genomic complexity and molecular evolution of the gene. Nucleic Acids Res., **13**, 2485-2502 (1985).

18) **Southern, E. M.**: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., **98**, 503-517 (1975).

19) **Hutchinson, I. V.**: Effector Mechanisms in Transplant Rejection-an Overview. In M. L. Rose & M. H. Yacoub (eds.), Immunology of Heart and Lung Transplantation, 1st ed., p3-21, Edward Arnold, Boston, 1993.

20) **Klein, J.**: MHC of Rodents Other than the Mouse. In J. Klein (ed.), Natural History of the Major Histocompatibility Complex, 1st ed., p76-79, John Wiley & Sons Inc., New York, 1986.

21) **Butcher, G. W., Corvalan, J. R., Licence, D. R. & Howard, J. C.:** Immune response genes controlling responsiveness to major transplantation antigens. J. Exp. Med., **155**, 303-320 (1982).

22) **Podack, E. R., Young, J. D. E. & Cohn, Z. A.:** Isolation, biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T cell granule. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 8629-8633 (1986).

23) **Samelson, L. E., Phillips, A. F., Luong, E. T. & Klausner, R. D.:** Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 4358-4362 (1990).

24) **Veillette, A., Bookmann, M. A., Horak, E. M. & Bolen, J.:** The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase $p56^{lck}$. Cell, **55**, 301-308 (1988).

25) **Chan, A. C., Iwashima, M., Turck, C. W. & Weiss, A.:** ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR ζ chain. Cell, **71**, 649-662 (1992).

26) **Kolanus, W., Romeo, C. & Seed, B.:** T cell activation clustered tyrosine kinases. Cell, 74, 171-183 (1993).

27) **Secrist, J. P., Burns, L. A., Karnitz, L., Koretzky, G. A. & Abraham, R. T.:** Stimulatory effects of the protein tyrosine phosphatase inhibitor, pervanadate, on T-cell activation events. J. Biol. Chem., **268**, 5886-5893 (1993).

28) **Northrop, J. P., Ho, S. F., Chen, L., Thomas, D. J., Timmerman L. A., Nolan, G. P., Admon, A. & Crabtree, G. R.:** NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. Nature, **369**, 497-502 (1994).

29) **O'Keef, S. J., Tamura, J., Kincaid, R. L., Tocci, M. J. & O'Neill, E. A.:** FK-506 - and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. Nature, **357**, 692-694 (1992).

30) **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).

31) **Schwartz, R. H.:** Costimulation of T lymphocytes: The role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. Cell, 71, 1065-1068 (1992)

32) **Fraser, J. D., Irving, B. A., Crabtree, G. R. & Weiss, A.:** Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. Science, **251**, 313-316 (1991).

33) **Young, S. W., Poole, R. C., Hudson, A. T., Halestrap, A. P., Denton, R. M. & Tavare, J. M.:** Effects of tyrosine kinase inhibitors on protein kinase-independent systems. FEBS Lett., **316**, 278-282 (1993).

34) **Markovits, J., Linassier, C., Fosse, P., Couprie, J., Pierre, J., Jacquemin-Sablon, A., Saucier, J. M., Le Pecq, J. B. & Larsen, A. K.:** Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. Cancer Res., **49**, 5111-5117 (1989).

35) **Uckun, F. M., Evans, W. E., Forsyth, C. J., Waddick, K. G., Ahlgren, L. T., Chelstrom, L. M., Burkhardt, A., Bolen, J. & Myers, D. E.:** Biotherapy of B-cell precursor leukemia by targeting genistein to CD19-associated tyrosine kinases. Science, **267**, 886-891 (1995).

36) **Graber, M., June, C. H., Samelson, L. E. & Weiss, A.:** The protein tyrosine kinase inhibitor herbimycin A, but not genistein, specifically inhibits signal transduction by the T cell antigen receptor. Int. Immunol., **4**, 1201-1210 (1992).

37) **Shizuru, J. A., Seydel, K. B., Flavin, T. F., Wu, A. P., Kong, C. C., Hoyt, E. G., Fujimoto, N., Billingham, M. E., Starnes, V. A. & Fathman, C. G.:** Induction of donor-specific unresponsiveness to cardiac allografts in rats by pretransplant anti-CD4 monoclonal antibody therapy. Transplantation, **50**, 366-373 (1990).

38) **Lenschow, D. J., Zeng, Y., Thistlethwaite, J. R., Montag, A., Brady, W., Gibson, M. G., Linsley, P. S. & Bluestone, J. A.:** Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig. Science, **257**, 789-792 (1992).

39) **Linsley, P. S., Wallace, P. M., Johnson, J., Gibson, M. G., Greene, J. L., Ledbetter, J. A., Singh, C. & Tepper, M. A.:** Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. Science, **257**, 792-795 (1992).

40) **Starzl, T. E., Rowe, M. I., Todo, S., Jaffe, R., Tzakis, A., Hoffman, A. L., Esquivel, C., Porter, K. A., Venekataramanan, R., Makowka, L. & Duquesnoy, R.:** Transplantation of multiple abdominal viscera. JAMA, **261**, 1449-1457 (1989).

41) **Muller, D. L., Jenkins, M. K. & Schwartz, R. H.:** Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signaling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. Annu. Rev. Immunol., **7**, 445-480 (1989).

42) **Starzl, T. E., Demetris, A. J., Trucco, M., Ricordi, C., Ildstad, S., Terasaki, T. I., Murase, N., Kendall, R. S., Kocova, M., Rudert, W. A., Zeevi, A. & Thiel, D. V.:** Chimerism after liver transplantation for type IV glycogen storage disease and type 1 Gaucher's disease. N. Eng. J. Med., 328, 745-749 (1993).

43) **Krams, S. M., Falco, D. A., Villanueva, J. C., Rabkin, J., Tomlanovich, S. J., Vincenti, F., Amend, W. J., Melzer, J., Garovoy, M. R., Roberts, J. P., Ascher, N. L. & Martinez, O. M.:** Cytokine and T cell receptor gene expression at the site of allograft rejection. Transplantation, **53**, 151-156 (1992).

44) **Martinez, O. M., Krams, S. M., Sterneck, M., Villanueva, J. C., Falco, D. A., Ferrell, L. D., Lake, J., Roberts, J. P. & Ascher, N. L.:** Intragraft cytokine profile during human liver allograft rejection. Transplantation, **53**, 449-456 (1992).

45) **Dallman, M. J., Roake, J., Hughes, D., Toogood, G. & Morris, P. J.:** Sequential analysis of IL-2 gene transcrip-

tion in renal transplants. Transplantation, **53**, 683-685 (1992).
46) **Morgan, C. J., Hernandez, C. J., Ward, J. S. & Orosz, C. G.**: Detection of cytokine mRNA in vivo by polymerase chain reaction. Transplantation, **56**, 437-443 (1993).
47) **McDiarmid, S. V., Farmer, D. G., Kuniyoshi, J. S., Robert, M., Khadavi, A., Shaked, A. & Busuttil, R. W.**: The correlation of intragraft cytokine expression with rejection in rat small intestine transplantation. Transplantation, **58**, 690-697 (1994).
48) **Ninomiya, I., Endo, Y., Yonemura, Y., Noguchi, M., Fushida, S., Nakai, H., Takamura, H., Harada, F., Suzuki, T., Miyazaki, I. & Sasaki, T.**: Specific detection of c-erbB-2 mRNA expression in gastric cancers by the polymerase chain reaction following reverse transcription. Br. J. Cancer., **66**, 84-87 (1992).
49) **Waldmann, T. A.**: The interleukin-2 receptor. J. Biol. Chem., **266**, 2681-2684 (1991).
50) **Hatakeyama, M., Mori, H. & Tanaguchi, T.**: A restricted cytoplasmic region of IL-2 receptor β chain is essential for growth signal transduction but not for ligand binding and internalization. Cell, **59**, 837-845 (1989).
51) **Smith, K. A.**: Interleukin-2: Inception, impact, and implications. Science, **240**, 1169-1176 (1988).
52) **Hatakeyama, M., Kono, T., Kobayashi, N., Kawahara, A., Levin, S. D., Perlmutter, R. M. & Taniguchi, T.**: Interaction of the IL-2 receptor with the src-family kinase $p56^{lck}$: Identification of novel intermolecular association. Science, **252**, 1523-1528 (1991).

Immunosuppressive Effects of a Tyrosine Kinase Specific Inhibitors (genistein) on the Rejection of Rat Allogeneic Small Bowel Transplantation Hiroyuki Takamura, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 －J. Juzen Med Soc., **104,** 719－731 (1995)

Key words small bowel transplanataion, rejection, tyrosine kinase inhibitor, genistein, immunosuppression

Abstract

The present study investigated the prevention effect of genistein, one of the tyrosine kinase specific inhibitors, on the rejection from rat allogeneic small bowel transplantation (BN→LEW). Two groups were used for this study. The non-treatment group (n=8) was untreated and the genistein group (n=13) was treated with genistein (20mg/kg/day; postoperative day 0-7th, 8 days). The allograft survival term for the genistein group was 14.7 days ± 0.3, which was significantly longer than that for the non-treatment group (5.7 days ± 0.2). The IL-2 and IL-2 receptor β chain gene (mRNA) expression in the allograft postoperative day 7th of the genistein group was much lower than that in the non-treatment group. To examine the intensity of the cellular immunity in the allograft, mixed lymphocyte reaction was examined and a CTL - mediated cytotoxicity assay (^{51}Cr release assay) of the spleen cells from the recipients toward the donoar was conducted. CTL - mediated cytotoxic activity in the genistein group was significantly lower than in the non-treatment group. The IL-2 levels in genistein group's recipient T cells which were mixed in a culture with donor lymphocytes, were significantly lower than those of the non-treatment group, while the degrees of the IL-2 and IL-2 receptor gene (mRNA) expression in the genistein group's mixed culture recipient T cells were lower than those of the non-treatment group. These results show that, in a vivo experimental model, genistein, a tyrosine kinase specific inhibitor, to some degree prevented rejection from the rat allogenic small bowel transplantation model and significantly inhibited the cellular immunity of the recipient of the allograft. This suggests that genistein has an immunosuppressive effect and yields positive results in the treatment of allograft rejection.