

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390314

研究課題名(和文) GvHRによるドナーキメラ増強作用に基づく大動物小腸移植での革新的免疫寛容誘導法

研究課題名(英文) Intestinal Transplantation in CLAWN Miniature Swine: Establishment of Orthotopic Model and Roles of Chimerisms, HVG and GVH Responses

研究代表者

山田 和彦 (Yamada, Kazuhiko)

鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研究センター・教授

研究者番号：40241103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：鹿児島大学で開発された国内唯一の組織適合性抗原が確立したクラウンミニブタを用い、同所性小腸移植慢性実験モデルの開発に国内で初めて成功し、小腸移植において、持ち込みリンパ球による非常に強い移植直後のサイトカインシンドロームによる炎症性サイトカインの放出とその対処戦略、更に確立した同所性小腸移植において、短期免疫抑制療法のみで3か月を超える移植小腸機能によるレシピエントの生存を確認した。これらの成果は論文投稿の段階に至っている。

研究成果の概要(英文)：With this grant support, we have successfully established a survival orthotopic intestinal transplantation procedure in MHC-inbred CLAWN miniature swine. To our knowledge, this is the first successful long term, life supporting preclinical intestinal transplantation model in Japan. Our results demonstrated (1) compartment syndrome following heterotopic intestine transplantation in CLAWN miniature swine, (2) greater than 3 months acceptance of a life-supporting intestinal grafts, and (3) severe and acute inflammatory cytokine storm in the induction period as well as a strategy to inhibit the cytokine storm (manuscript in preparation).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：小腸移植 ミニブタ 組織適合性抗原 GvH キメラ

### 1. 研究開始当初の背景

臓器移植法案改正は移植医療の新たな夜明けと位置付けられ、脳死ドナーは法案施行後著明に増加した。移植医療の普及が更に見込まれる中、近年の免疫抑制療法の改良により腎、肝、心、肺、膵臓移植成績は向上したものの、小腸移植の生着・生存率は依然低く、原因として(1)小腸・腸間膜に豊富に存在する抗原提示細胞・免疫担当細胞に対する激しい拒絶反応の制御が困難なこと、(2)強い免疫抑制療法が誘因となるウイルスや移植小腸細菌叢からの感染合併症および低栄養が挙げられる。小腸移植は、移植領域の研究としては、手技、拒絶反応、感染、更には同所性移植に伴う栄養管理の困難さから、小動物を用いた実験系は限られるが、特に臨床に直結する成果が期待される大動物実験の報告は限られており、我が国における他施設からの報告は、小腸手術手技の報告に留まっている。

### 2. 研究の目的

本課題研究者は15年以上にわたり、前臨床 Translational Research に位置付けられる大動物を用いた移植免疫寛容誘導メカニズム解明および寛容誘導戦略の開発研究を行い、特に組織適合性抗原(MHC)確立 MGH ミニプタ同種免疫寛容誘導に関する多くの成果を報告している(J Exp Med 1997; Transplantation 1999; PNAS 2004, 2006; Nat Med 2005; JI 2000, 2002, 2009 等、英文論文100編以上)。その経験を活かし、本課題研究において、移植において最も重要な抗原である組織適合性抗原が、国内で唯一確立したクラウンミニプタを用い、(1)異所性のみならず同所性・機能性小腸長期生着モデルを確立し、生着・生存率が向上しない臨床小腸移植に対し、臨床小腸移植成績向上を目指す前臨床データを示す目的で、(2)HvGR (Host vs Graft 反応: 宿主のグラフト拒絶あるいは寛容反応)ならびに GvHR (Graft vs Host 反応: 小腸グラフトに存在するリンパ装置による移植片の宿主に対する、ただし致死性 GvHD ではない反応)の各々を評価する実験群によって、移植直後の免疫反応を解析し、(3)革新的小腸免疫寛容誘導戦略の開発を目指すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)ミニプタ異所性小腸移植:

レシピエントの右腎を摘出し、小腸グラフトの Bed を作成すると同時に、腹部大動脈、下大静脈を露出した。ドナーから採取した小腸グラフトを右下腹部に挿入し、グラフトの上腸間膜動脈、上腸間膜静脈をそれぞれレシピエントの腹部大動脈、下大静脈に end-side で吻合し、再灌流した。レシピエントの小腸はすべて温存し、グラフト小腸の口側・肛門側を腸管内のドレナージ、及び腸管の性状観察のために人工肛門として腹壁外に露出し

固定した。

#### (2)ミニプタ同所性小腸移植:

レシピエントの右腎摘出に加え自己小腸を約90%切除し、より広い腹腔内スペースを確保した。グラフトを自己小腸摘出部に挿入し上記と同様に血管吻合した後、残存自己小腸とグラフトを吻合した。誤嚥予防と術後経腸栄養目的に胃瘻を作成した。

#### (3)ミニプタリンパ球混合培養試験:

移植前、移植後に血液を採取しリンパ球を分離し、我々の既報にある方法を用い(Oku M et al. Transplant Int 2008)、レシピエントの対ドナー反応、3rd party への反応のそれぞれをリンパ球混合培養試験により比較した。

(4)ミニプタ炎症性サイトカイン ELISA: 小腸術前(pre)、術後2時間(2h)、6時間(6h)経過時点で採血を行い、遠心分離により血清を分離した。血清中の炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  濃度を TNF- $\alpha$  ELISA kit (R&D Systems)を用いて測定した。

(5)小腸移植ミニプタの小腸 HCS Progenitor cells の CFU アッセイによる分離培養および c-kit<sup>+</sup> precursors の同定:

移植前、再灌流2時間、術後2週間、4週間、3か月に移植小腸腸間膜から腸間膜リンパ節を摘出した。これらを抗 c-kit 抗体で染色することにより c-kit<sup>+</sup>である細胞が豊富に分布する部位を同定し、選択的に分離・培養した。

### 4. 研究成果

(1)MGH ミニプタ異所性小腸移植とキメリズム解析:

選択的組織適合性抗原適合異所性小腸移植・短期高濃度タクロリムス療法 HvGR 長期生着(100日以上3例)モデルにおいて、移植後の小腸腸間膜リンパ節(m-LN)の制御性T細胞ならびキメリズムを解析した。

m-LN 検体を用いた制御性T細胞(T-reg)の移植後の解析では、拒絶反応を認めた症例は、Foxp3/CD25 陽性 および Foxp3/CD4 陽性 Treg が移植後1ヶ月以内に上昇したものの、拒絶反応を認めた移植後60日時の生検で明らかに減少した。これに対し、同時期に拒絶反応を呈しなかった症例は、これら陽性細胞が移植後60日においても移植後30日のレベルを維持した。このT-regの推移はレシピエント m-LN においても同様な傾向を認めたが、移植後60日での拒絶症例でのT-reg減少は、グラフト m-LN において顕著であった。更に、これら m-LN のキメリズムの解析では、レシピエント m-LN でのドナー細胞は、移植後7日生検では6%を超えるキメラを認めたが、拒絶症例では移植後30日時には2%以下となった。半面、拒絶を認めない症例では、移植30日時に5%以上を維持し、60日生検検体においても1.5%以上を呈した。

(2)クラウンミニプタを用いた異所性小腸

移植の問題点と機能性同所性小腸移植モデルの確立：

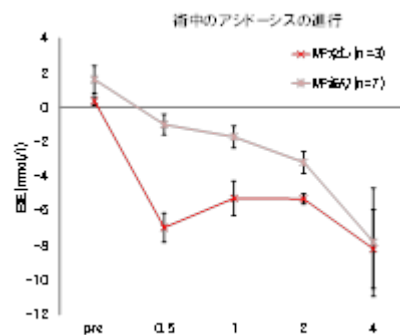
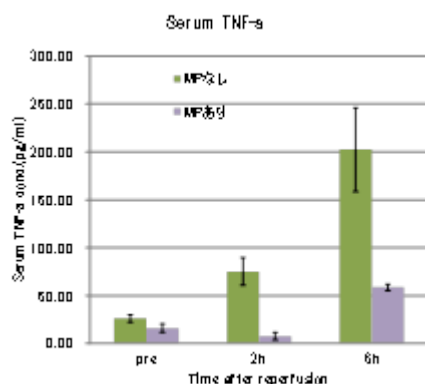
MHC の確立したクラウンミニプタを使用し、MHC 適合、MHC 部分適合、MHC 完全不適合小腸移植を合計 11 例行った。

我々の自験例である (1) に示した MGH ミニプタ異所性小腸移植症例と異なり、クラウンミニプタ異所性小腸移植ではコンパートメントシンドロームが不可避であることが確認された (4 例全例)。MGH ミニプタ症例では全く見られない現象であるが、クラウン小腸異所性移植症例では、血流再開後閉腹時まで小腸グラフとの血流は全く問題ないものの、閉腹後血圧の急激な減少とともにストーマの色調が暗褐色を呈し、グラフ血流の減少を認めた。この結果は、(1) 用いるミニプタの特性 (腹腔内容量の違い) ならびに (2) 他施設での小腸移植実験報告にあるような手術所見のみによる移植実験は評価に価せず、大動物実験での術後を含めた評価体制の重要性を示唆している。

本異所性小腸モデルの結果から、同所性移植モデルへの変更を行った。上記方法により自己小腸を 90% 切除し、グラフ小腸と残存小腸を生理的なルートに吻合し再建した同所性小腸移植モデルを確立し、11 頭全てにおいて、虚血再灌流障害やコンパートメント症候群など術後急性期の合併症による死亡を回避することができ、術後炎症性サイトカインの変化 (3 項) ならびに長期生着例 (4 項) を得るに至った。

(3) HvGR (Host vs Graft 反応) による移植直後の炎症性サイトカイン放出とそれに対する抗炎症性療法の効果：

移植直後の移植腸間膜リンパ節ならびに小腸実質から誘発される著しい炎症性サイトカイン放出と、それに伴うサイトカインシンドロームと確認した。更に、血清中の炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ ) の上昇およびアシドーシスの進行 (下図) を、ドナーのグラフ摘出前およびレシピエントの再灌流直前それぞれに、メチルプレドニゾロン 5 mg/kg を投与、あるいは抗 HMGB1 抗体投与により軽減しえることを確認した。



(4) クラウンミニプタ機能性同所性小腸移植における 100 日以上長期間生存例：

著しい HGR 反応を呈する MHC 不適合症例では、肺ならびに腎臓移植モデルで 60 日程度のグラフ生着が期待できる高濃度短期タクロリムス療法を用いても、移植小腸が 14 日で拒絶することが確認された。これに対し、軽度の GVHR 反応を呈する組み合わせにおいて、同所性小腸グラフが、最長 9 か月の生存を確認している。

本症例は、移植後 30 日、105 日の生検で良好なグラフ腸管の色調を呈していた。栄養状態も良好で術後 9 か月で体重は手術時の 2 倍に増加した。病理学的にも拒絶を疑う所見は認めなかった。

(5) ドナー小腸および腸間膜リンパ節からの HSC Progenitor Cells の分離：

我々の異所性実験結果において、ミニプタ小腸移植後に Lymphoid 系キメラのみならず Myeloid 系キメラが持続することが確認された (1 参照)。ミニプタ移植小腸グラフでの Hematopoietic Stem Cells (HSC) の存在を確認する目的で、小腸ならびに腸間膜リンパ節の組織学的・分子生物学・免疫学的な検討を行なった。本実験に必要なミニプタ CFU、PCR 法の確立に続き、小腸移植前のドナーミニプタの小腸 HSC Progenitor cells を CFU アッセイにより分離培養し、c-kit+ precursors の同定を行った。現在検体組織の免疫病理学検討ならびに培養コロニーのドナー特異的プライマーを用いた PCR 検査を行っている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 1 件)

三浦宏平、佐原寿史、河合昭浩、脇 詩織、清水 章、山田和彦. MHC 確立クラウンミニプタ小腸移植手技の工夫. 第 114 回日本外科学会定期学術集会. 2014.4.3-5 (5). 京都

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~xeno tx/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 和彦 (YAMADA, Kazuhiko)  
鹿児島大学 医用ミニブタ・先端医療開発  
研究センター 教授  
研究者番号: 40241103

(2) 研究分担者

佐原 寿史 (SAHARA, Hisashi)  
鹿児島大学 医用ミニブタ・先端医療開発  
研究センター 准教授  
研究者番号: 90452333

屋 万栄 (OKU, Manei)  
鹿児島大学・医学部歯学部附属病院・医員  
研究者番号: 50550000

清水 章 (SHIMIZU, Akira)  
日本医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 00256942