

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10431

研究課題名(和文) 高解像度画像システムを用いた小腸移植後拒絶反応の革新的診断法の開発

研究課題名(英文) Development of innovative method for diagnosis of acute rejection after small bowel transplantation using high resolution graphic system

研究代表者

高橋 良彰 (Takahashi, Yoshiaki)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：50621710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：拒絶反応のモデルを作成するにあたり、マウスを用いた小腸移植を行った。マウスは非常に小さく、血管吻合が困難であるため、血管吻合を要しない小腸移植モデルの作成が重要であった。新生仔小腸を血流豊富な腹壁に移植し、拒絶反応の有無を評価した。Auto移植群は移植後1週間、1カ月ともに肉眼的に確認でき、病理学的にも絨毛が維持されていた。一方、Allo群は肉眼的に確認できず、病理学的にも絨毛高が低くなっており、リンパ球の浸潤が目立った。免疫染色においても拒絶反応のモデルとして使用できることが確認できた。その後の三次元X線マイクロCTやFDG-PETを用いた研究はまだ出来ておらず、今後継続していく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小腸移植では、移植後の拒絶反応を他臓器より起こしやすく、全身状態も重篤化しやすい。その理由として小腸自体リンパ組織を豊富に含む臓器であり、拒絶反応を起こしやすい。拒絶反応は免疫機序が関与しており、マウスを用いた免疫の研究は進んでおり、マウスモデルを用いた研究は重要である。しかしながら、マウスは小さく、血管吻合をすることは困難であるため、血管吻合を必要としないモデルの作成は重要である。今回、グラフト小腸を腹壁に移植するモデルを作成することができ、今後の研究の発展に寄与できると考える。拒絶の診断に三次元X線マイクロCTやFDG-PETを用いる研究はできなかったが、今後継続していきたいと考える。

研究成果の概要(英文)：We performed small bowel transplantation using mouse to make acute rejection model. However, it was difficult to perform small bowel transplantation using mouse model because mouse was very small for vascular anastomosis. So, the new model without vascular anastomosis was necessary. Then, we transplanted the small intestine of neonatal mouse into the abdominal wall of recipient where the blood stream was abundant. And we evaluated the presence or absence of acute rejection. In auto-transplantation group, we confirmed the graft bowel one week and one month after transplantation, and the villous height was well maintained. On the other hand, in allo-transplantation group, the graft bowel wasn't confirmed and the villous was flattened and lymphoid cells were infiltrated. We were able to check that the rejection model was useful due to immunohistological findings. We could not perform research using three-dimensional CT imaging and FDG-PET. So we have to continue further research.

研究分野：Transplantation

キーワード：拒絶反応 小腸移植 マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小腸移植では、移植後の拒絶反応が他臓器の移植より起こりやすく、全身状態も重篤化し易い。その理由として小腸自体リンパ組織を豊富に含む臓器であることなどが挙げられる。小腸は再生力に富んでいるものの、拒絶反応で一旦粘膜バリアが破壊されると、bacterial translocation は必発である。以上の機序から容易に拒絶反応と敗血症という治療のベクトルが全く正反対な病態を同時に生じてしまうことが、小腸移植後拒絶

反応の治療を大きく困難にしている主な要因である。近年の免疫抑制療法の進歩により、その短期成績は多少向上してはいるものの、長期成績は依然厳しい状況で

ある。慢性拒絶反応によるグラフト機能廃絶も長期成績に影響を及ぼしている大きな課題である。(図1; 日本小腸移植研究会: 本邦の小腸移植症例について, 2015)

拒絶反応の早期診断を得るため、小腸移植後のモニタリングにはストーマからの定期的な拡大内視鏡検査と生検による組織学的検査が現在の Gold standard である。

拡大内視鏡では 80 ~ 100 倍でグラフト粘膜微細構造

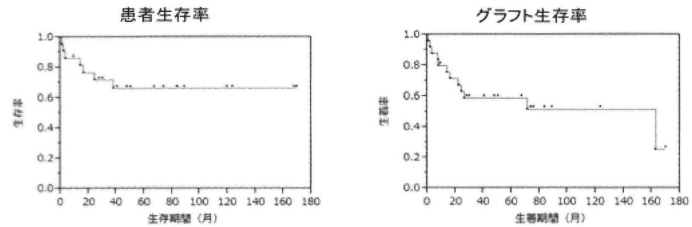
を観察し、消化管運動の有無、絨毛の構造、粘膜の色調、脆弱性、潰瘍形成の有無などを評価する。拒絶時には絨毛は短縮して不均一となり、重度の

拒絶反応となると粘膜は脱落し絨毛構造を認めなくなってくることから絨毛構造の観察が重要である(図2)。

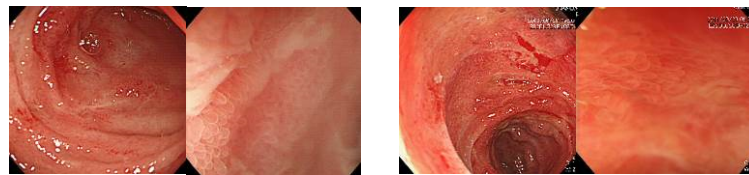
内視鏡検査は患者にとっては侵襲があり、生検に伴う合併症の危険もある。また、内視鏡ではグラフト小腸は長いいためグラフト全体像を把握することはできない。小腸移植患者は腹腔内の癒着が強いことが多く、観察可能な小腸はストーマから口側 30-40cm 程度であることが多い。しかし、現行の拒絶反応のモニタリングはストーマからのアプローチに依存しているため、ストーマ閉鎖をすることが困難である。ストーマ閉鎖にはボディイメージの改善、ストーマケアが不要となる、腸液の腸管からの吸収を促し補液離脱の一助となる、腸内細菌叢の改善など患者 QOL の向上につながる利点が多々ある。しかし、ストーマ閉鎖をした場合には、グラフトへのアプローチは極めて困難となり、結果として慢性拒絶反応によるグラフトロスが制御できず、小腸移植の長期成績の改善がなかなか得られない一因となっていると考えられる。

小腸移植グラフトにおける拒絶反応の所見は必ずしも一様ではない。臨床小腸移植症例で拒絶反応により摘出した小腸グラフトの病理組織像を図3に示す。グラフトの肛門側では上皮が完全に脱落し severe rejection の所見を呈しているが、同じグラフト内であるにも拘らず口側では絨毛構造がほぼ完全

< 図 1 > 本邦小腸移植の成績



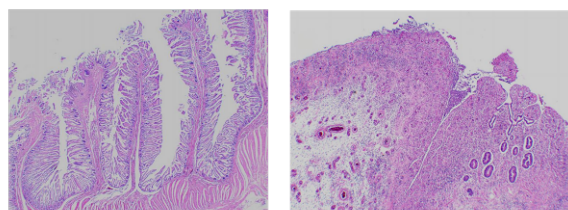
< 図 2 > 小腸移植後の拡大内視鏡



絨毛構造が保たれている

易出血性で粘膜が脱落

< 図 3 > 拒絶反応により摘出した小腸グラフトの組織像



摘出グラフト(口側)

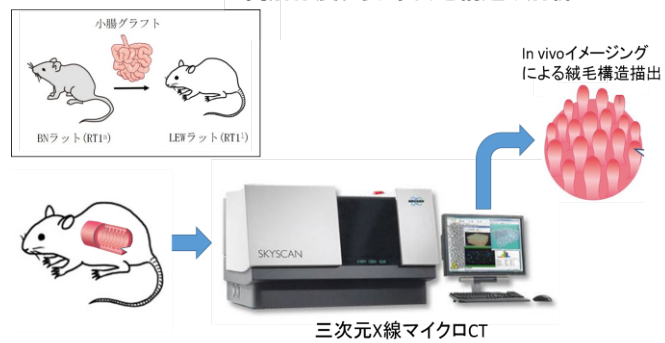
摘出グラフト(肛門側)

な形で維持された部位も認められた。このことは、小腸移植後拒絶反応の診断には、グラフトの一部分だけの観察では不十分であることを物語っている。

近年、歯科学や整形外科において三次元 X 線マイクロ CT を用いた、歯牙の評価、骨粗鬆症や脊髄神経の評価をした文献を散見される。また、ラットの肝臓の血管系が大きな血管から分枝した洞様毛細管まで三次元で観察可能であり、移植領域においても、心移植、肺移植、腎移植の動物実験でグラフト構造の把握と拒絶反応の診断に有用であったとする報告が出ている。

三次元 X 線マイクロ CT は高分解能のものも開発されており、分解能は $1\mu\text{m}$ を上回る値を保証されるものが出てきた。近年は 350nm 程度まであげられるものもある。絨毛の高さが 1mm 、微絨毛の高さが $1\sim 1.5\mu\text{m}$ であることから考えると三次元 X 線マイクロ CT で観察可能と思われる。また、内視鏡では全小腸を観察することは困難であったが、マイクロ CT を使用することで全小腸の絨毛構造を高解像度で観察可能である可能性がある。

＜図4＞ 三次元X線マイクロCTによる高解像度グラフト絨毛構造の解析



また、活性化されたリンパ球は体内のブドウ糖を正常細胞より消費するという原理を利用した ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG) を用いた非侵襲的画像診断法は近年、がんの診断領域でもその有用性が多く報告されている。図5のように拒絶されたグラフトに集積するリンパ球を in vivo イメージングでリアルタイムに同定出来る可能性がある。

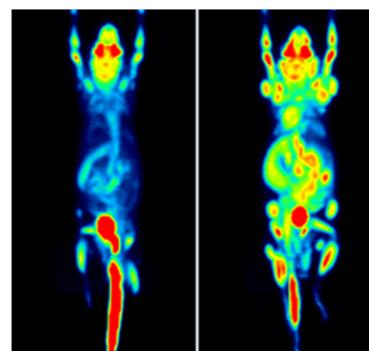
これらの in vivo イメージング手法を組み合わせることで、リアルタイムなグラフト全体像の把握が永続的に可能となる。このことは、小腸移植患者の管理を大きく変えることとなり、小腸移植の長期成績の改善のみならず、移植患者の QOL の向上にも大きく寄与するものと思われる。

2. 研究の目的

小腸移植は小腸不全の治療として確立されているが拒絶反応の制御が難しい。現在の拒絶反応診断法は定期的なストーマからの拡大内視鏡による観察と生検である。しかし、内視鏡での観察範囲はストーマから約 $30\sim 40\text{cm}$

程度が限界でありグラフト全体像の把握は不可能である。また、ストーマを閉鎖した場合、内視鏡でのアプローチは困難となるため、慢性拒絶反応を含めた長期的なグラフトの問題点を捉えることが難しく小腸移植の長期成績に影響を及ぼしている。従って内視鏡に頼らない革新的診断法の開発が不可欠である。三次元 X 線マイクロ CT は in vivo イメージングとして高解像度の絨毛構造所見が得られ、グラフト全体像の把握も可能である。FDG 代謝イメージング法による免疫細胞動態の観察を組み合わせることで新規診断法の確立を目指す。

＜図5＞ FDG-PETによる拒絶反応の可視化イメージ図



拒絶反応(-) 拒絶反応(+)

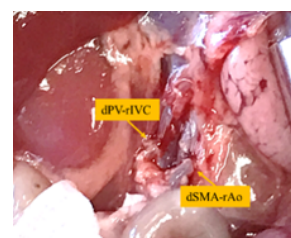
3. 研究の方法

ラット小腸移植モデルにおいて、非拒絶群と拒絶群を作成し in vivo イメージングを用いた高解像度画像システムによる拒絶反応診断の有用性について評価する。1) 三次元 X 線マイクロ CT によるグラフト腸管の高解像度絨毛構造の解析、2) FDG-PET によるグラフト腸管内のリンパ球イメージング解析、これらの所見から内視鏡を必要としない革新的新規拒絶反応診断基準を作成しその有用性についての検証を行う。

4. 研究成果

まず、拒絶反応の研究を行うにあたり、ラットで実際に小腸移植を行い、拒絶反応モデルが作成可能かどうか確認した。小腸移植の主義は非常に難易度が高く、顕微鏡を用いた血管吻合が必要である。そこで、ラットを用いて血管吻合の修練を行い、手技もある程度習得することができた(図6)。

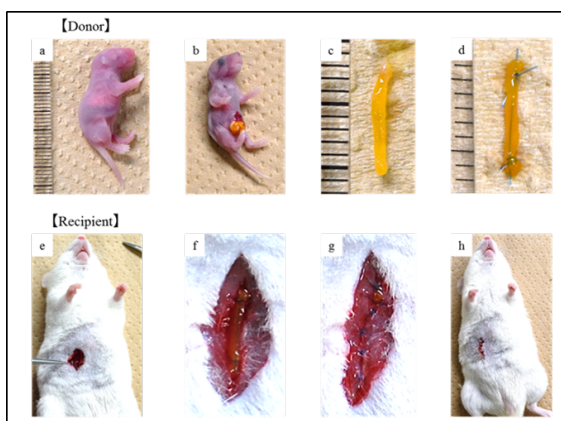
<図6>ラット小腸移植の実際



しかし、当科の研究室移転に伴いラットの飼育が出来なくなり、マウスを使用しなければならなくなった。マウスを用いた小腸移植はさらに小さくなるため、非常に困難であり、そのため新たな小腸移植モデルの作成が必要となった。

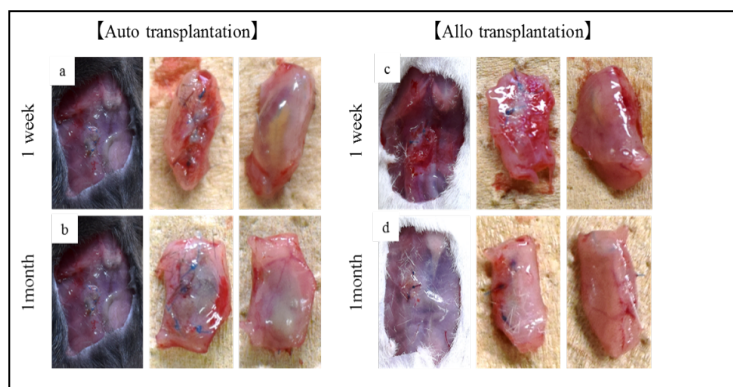
そこで、マウスを用いた血管吻合を用いない小腸移植モデルの作成を行った。小腸を皮下や大網内に移植し生着した報告(周囲からの血管新生に伴い)もあり、今回我々は小腸を血流豊富な腹壁に移植して、拒絶モデルとして使用可能かどうかの判定を行った。日齢1の新生仔マウス空腸(C57BL/6j マウス)を約1cm摘出し、レシピエントマウスの腹壁(腹直筋と腹膜の間)に移植した(図7)。

<図7>新生仔マウス空腸を用いた小腸移植モデル

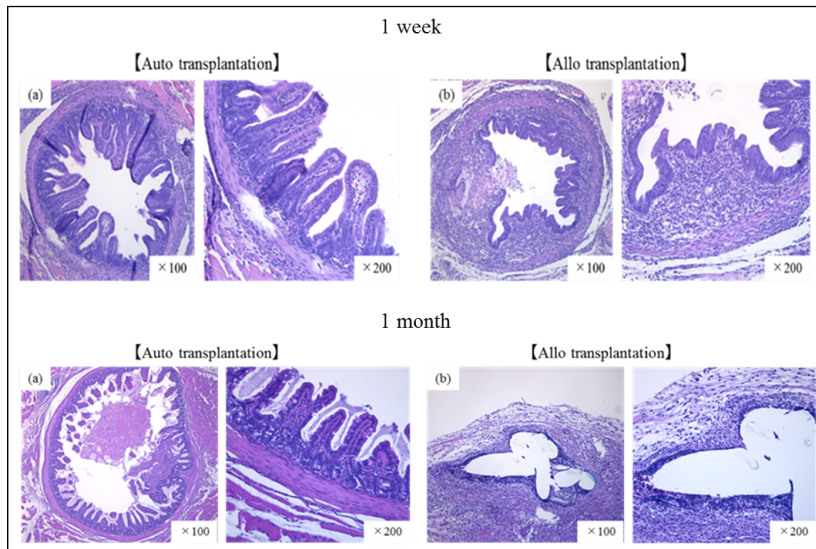


手技自体は安定して行うことが出来るようになったため、C57BL/6jをレシピエントした Auto 群、ICR マウスをレシピエントとした Allo 群にわけて、拒絶によるグラフトの排除機構があるかどうかを検討した。まず1週間後および1カ月後にグラフトを摘出し、評価を行った。まずは肉眼的に生着しているかどうか、次に病理学的な評価を行った。肉眼的には、Auto 群では腹膜側からグラフトを1週間、1カ月後ともに確認することができたが、Allo 群では消失していた(図8)。病理学的所見では、Auto 群では絨毛高が維持されていたが、Allo 群では1週間後は絨毛高が低く、1カ月後では消失していた。また、Allo 群ではリンパ球浸潤を有意に認めた(図9)。そこで、この小腸移植モデルは拒絶反応のモデルとなりうることを確認できた。

<図8>新生胎小腸の腹壁内移植後1週間、1カ月後の肉眼所見

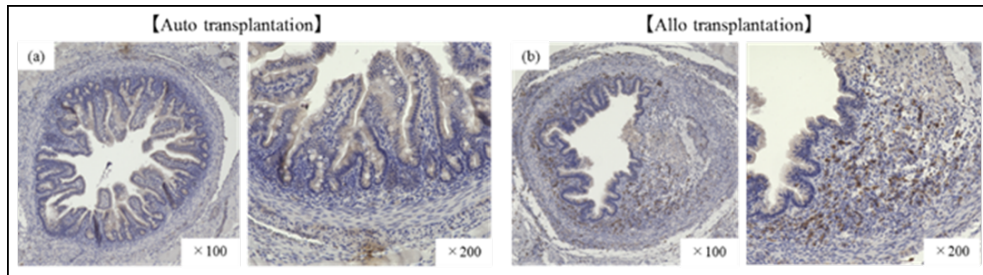


<図 9>新生仔小腸の腹壁内移植後 1 週間、1 カ月後の病理組織

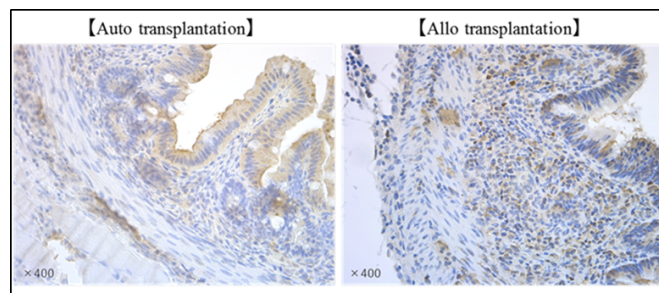


次に、このモデルが虚血の影響だけではなく、免疫学的機序が関与していることを確認するため、免疫染色を追加した。CD3 染色でリンパ球の浸潤の有無を評価したところ、Auto 群ではリンパ球の浸潤を認めなかったが、Allo 群では粘膜固有層にリンパ球の浸潤を認めた(図 10)。Allo 群では拒絶に伴い、リンパ球が浸潤していることが証明された。また、FOXP3 染色で制御性 T 細胞の有無を評価したところ、Auto 群では認めなかったが、Allo 群では FOXP3 陽性細胞を認めた。Allo 群では、拒絶反応を制御するため、制御性 T 細胞が有意に浸潤していることが示された。

<図 10>CD3 染色 (移植したグラフト小腸)



<図 11>FOXP3 染色 (移植したグラフト小腸)



上記の検査結果より、新生仔空腸を腹壁内に移植するモデルは新たな拒絶反応のモデルとして使用可能なことが証明された。その後、移植したグラフト小腸が拒絶反応を発症した際に、三次元 X 線マイクロ CT を用いた高解像度絨毛構造の解析や、FDG-PET を用いたリンパ球イメージング解析を行う予定としていたが、期間内に行うことが出来なかった。今後、継続していきたいと考えるが、マウス新生仔小腸は非常に小さいため、三次元 X 線マイクロ CT においても絨毛を描出することは困難であることが予想される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：田口 智章

ローマ字氏名：TAGUCHI, tomoaki

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学院医学研究院

職名：教授

研究者番号(8桁)：20197247

研究分担者氏名：松浦 俊治

ローマ字氏名：MATSUURA, toshiharu

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：准教授

研究者番号(8桁)：10532856

研究分担者氏名：柳 佑典

ローマ字氏名：YANAGI, yusuke

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：30596664

研究分担者氏名：吉丸 耕一郎

ローマ字氏名：YOSHIMARU, koichiro

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学院医学研究院

職名：講師

研究者番号(8桁)：60711190

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。