

令和元年5月24日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10441

研究課題名(和文)臓器移植における虚血再灌流障害に関わる免疫細胞の解析とその制御戦略

研究課題名(英文) Analysis of immune cells involved in ischemia reperfusion injury related acute transplant rejection and development of their effective control strategy

研究代表者

奥見 雅由 (OKUMI, Masayoshi)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60512978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス同種異系心臓移植モデルにおいて、冷阻血処理群(移植前4時間、8時間保存)では即時移植群(移植前4時間、0.5時間保存)と比べ移植グラフトの生着率が低下した。この冷阻血処理によるグラフト生着率の低下に関して、CX3CR1ノックアウト(KO)マウスをレシピエントとしたモデルもしくは抗フラクタルカイン(FKN)抗体を用いたFKN-CX3CR1シグナル遮断による影響を検討した結果、どちらも生着率の低下が改善された。これらの結果から、虚血再灌流障害後の拒絶反応にFKN-CX3CR1シグナルが関与していることが明らかとなり、またそれは抗FKN抗体投与により制御できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器移植において、摘出臓器を長時間冷却保存した後に移植すると虚血再灌流障害が起こることが知られている。この虚血再灌流障害はカルシニューリン阻害薬などの既存の免疫抑制剤では制御できない拒絶反応を誘導することが報告されており、その制御は移植医療の重要な課題の一つである。今回、我々はその虚血再灌流障害によって誘導される拒絶反応に白血球を遊走させるケモカインの1種であるフラクタルカイン(FKN)が関与していることを初めて明らかにした。さらに、本研究ではFKNをターゲットとした抗体製剤を用いることで、脳死下あるいは心停止下の臓器移植における成績を向上させ得る可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We transplanted allogeneic donor hearts preserved at 4 hours for 8 hours (IRI group) or 0.5 hours (control group). The survival rate of allografts in the IRI group was significantly lower than that in the control group. To clarify the importance of CX3CR1 in IRI-related rejection, donor hearts preserved at 4 hours for 8 hours were transplanted in CX3CR1 knock-out mice. The survival rate of allografts in these mice was significantly higher than that in the wild-type mice. Anti-fractalkine (FKN) antibody prolonged graft survival in mice transplanted with donor hearts preserved at 4 hours for 8 hours. In conclusion, FKN-CX3CR1 interaction is crucial in IRI-related rejection in allogeneic transplantation. Anti-FKN antibody has a potential to improve the outcome of deceased-donor transplantation by blocking FKN-CX3CR1 interaction.

研究分野：移植免疫学

キーワード：フラクタルカイン 虚血再灌流障害 臓器移植 拒絶反応 マウス心臓移植 献腎移植

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

1. 研究開始当初の背景

移植臓器を長時間冷却保存し、その後に移植を行う献腎移植には虚血再灌流障害 (以下 IRI) による移植臓器の機能発現遅延 (delayed graft function, DGF) が認められる。IRI により障害された移植腎は拒絶反応を誘発する¹⁾。免疫細胞の組織内浸潤は多くの接着分子と細胞遊走因子により制御されている。フラクタルカイン(FKN)は活性化内皮細胞に発現する膜結合型ケモカインで、接着分子としての機能とケモカインとしての細胞遊走活性を合わせもつ分子である。CX3CR1 は FKN の受容体であり、FKN と CX3CR1 の相互作用は、その結合だけで細胞接着を引き起こす。以上から、FKN-CX3CR1 シグナルが、移植後 IRI とその結果である DGF、これにより引き起こされる拒絶反応の両者に関与していると考えた。研究協力者であるカン研究所の今井らはヒト抗原に反応する抗 FKN 抗体を開発し、現在関節リウマチ及びクローン病を対象とした臨床試験を実施している。そこで本研究ではカン研究所と連携し、抗 FKN 抗体を投与により移植後 IRI が誘発する拒絶反応を制御することができれば、献腎移植の成績向上が期待できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、小動物実験モデルを用いて IRI 関連拒絶反応に FKN-CX3CR1 シグナルが重要であることを証明し、さらに抗 FKN 抗体により IRI 関連拒絶反応を制御できるか検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス冷阻血心臓移植モデルの確立

BALB/c マウスをドナー、C57BL/6 (B6) マウスをレシピエントとして、同種異系移植を行った。ドナーより心臓を摘出し、4°C で 8 時間保存 (冷阻血群) した後に移植を施行した。4°C で 0.5 時間保存して移植した即時移植群と冷阻血群で移植グラフトの生着率を比較した。移植日とその翌日に CTLA4-Ig を投与することで T 細胞による拒絶反応を抑え、IRI に依存する拒絶反応による移植グラフトの生着への影響を検出できるように試験系をデザインした。

(2) FKN-CX3CR1 シグナルの重要性の解明

血流再開 48-72 時間後に移植心臓を摘出し、即時移植群と冷阻血群で蛍光抗体法により FKN の発現を比較した。次に、CX3CR1 ノックアウト (KO) B6 マウスをレシピエントとして冷阻血処理した心臓を移植し、野生型マウスと移植グラフトの生着率を比較した。またカン研究所より供与された抗 FKN 抗体を用いて、FKN-CX3CR1 シグナルの遮断による冷阻血処理グラフトの生着率への影響を検討した。抗 FKN 抗体は、移植前日及び移植後 3, 7, 11, 14 日に 500 µg を腹腔内投与した。

(3) CX3CR1 陽性単球の検証

野生型マウスより骨髓を採取し、マクロファージコロニー刺激因子を用いて 3 日間培養して単球へ分化させた。CD115 陽性細胞分離キットを用いて CD115 陽性単球を回収し、フローサイトメトリーで CX3CR1 の発現を確認した。この CX3CR1 陽性単球を CX3CR1 KO レシピエントに移入後、4°C で 8 時間保存したグラフトを移植し、IRI による拒絶反応が再現できるか検証した。

4. 研究成果

(1) マウス冷阻血心臓移植モデルの確立

移植心臓の冷阻血処理により、拒絶反応が誘導されるか検証した。移植日とその翌日に CTLA4-Ig を投与し、冷阻血群と、即時移植群で移植グラフトの生着率を比較した。冷阻血群では、即時移植群と比較して移植グラフトの生着率が低下することが確認された (Log-rank test, $P = 0.0303$) (図 1)。この結果から、冷阻血処置後の IRI が生着率の低下に関与している可能性が示された。

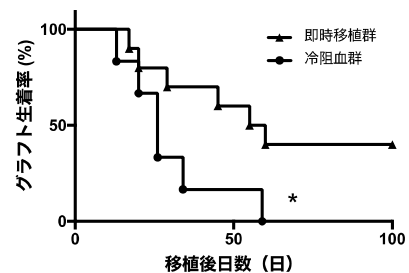


図1 冷阻血処理後の移植グラフトの生着期間 (●)

(2) IRI 後の FKN-CX3CR1 発現の評価

蛍光抗体法により、IRI による血管内皮における FKN 発現への影響について検証した。8 時間の冷阻血処置後に心臓移植を施行し、術後 3 日後に移植グラフトを採取し、抗 FKN 抗体及び抗 CD31 抗体で染色した。核は DAPI で染色した。冷阻血群では血管内皮に FKN 発現を認めた。一方で、即時移植群では FKN 発現は認められなかった (図 2)。この結果から IRI によって血管内皮に FKN 発現が誘導されることが示された。

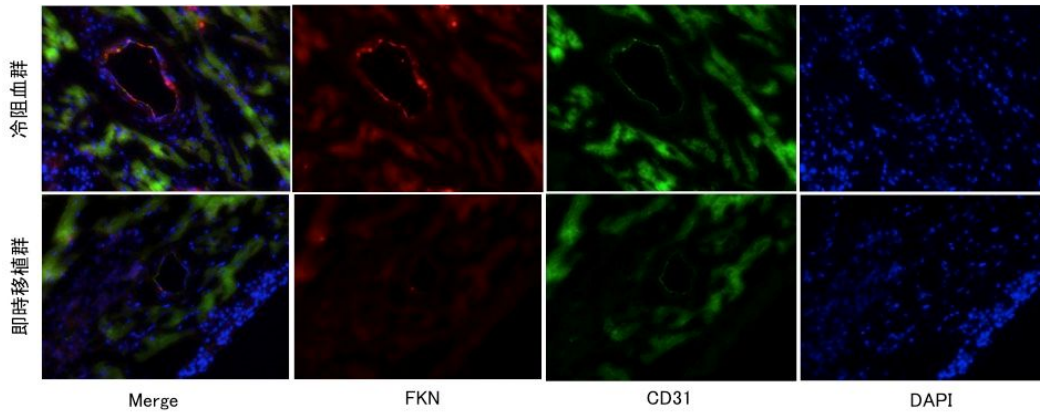


図2 冷阻血群と即時移植群の血管内皮のフラクタルカイン発現

(3) FKN-CX3CR1 シグナルの重要性の解明

IRI 関連拒絶反応に FKN-CX3CR1 シグナルが関与していることを証明するために、8 時間の冷阻血処理を加えた心移植グラフトの生着率について、野生型マウスをレシピエントとしたモデルと CX3CR1KO をレシピエントとしたモデルで比較した。その結果、CX3CR1 KO マウスをレシピエントとしたモデルでは移植グラフトの生着率は、野生型マウスをレシピエントとしたモデルと比較して有意に改善した (Log-rank test, $P = 0.0226$) (図 3)。

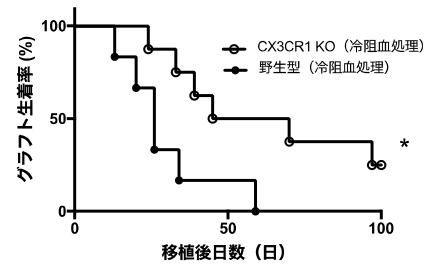


図3 CX3CR1 ノックアウトマウスと野生型マウスのグラフト生着期間

次に、野生型 B6 マウスをレシピエントとするモデルに抗 FKN 抗体の投与を行い、8 時間の冷阻血処理を行った移植グラフトの生着率が改善するか検証した。その結果、抗 FKN 抗体投与により移植グラフトの生着率は改善されることが確認された (Log-rank test, $P = 0.0316$) (図 4)。

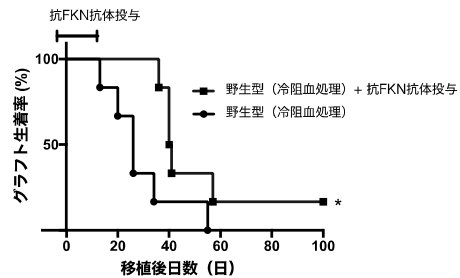


図4 抗フラクタルカイン抗体投与モデルのグラフト生着期間 (■)

(4) CX3CR1 陽性単球についての解析

次に、この IRI 関連拒絶反応を起こすエフェクター細胞について検証した。CX3CR1 陽性細胞がエフェクターとして考えられることから、CX3CR1 発現が報告されている単球²⁾に注目し、それらがエフェクター細胞となっているか解析した。

CX3CR1KO マウスをレシピエントとして 8 時間の冷阻血処理を加えて心移植を施行するモデルを用いて、術前に野生型マウス CX3CR1 陽性単球を移入することによりその生着率が低下するか、検証した。CX3CR1 陽性単球は、野生型 B6 マウスの骨髓を採取し、マクロファージコロニー刺激因子の刺激下で 3 日間培養後に、CD115 陽性細胞分離キットを用いて採取した。フローサトメトリーで採取細胞の CD115 陽性と CX3CR1 陽性を確認し (図 5)、 3×10^6 個を CX3CR1 KO マウスに移入した。

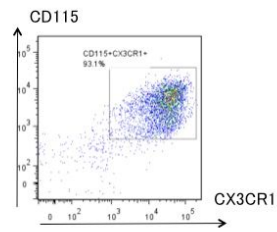


図5 野生型B6マウス骨髓を培養し分離した細胞のCD115及びCX3CR1発現

CX3CR1 陽性単球を移入した CX3CR1 KO マウスでは、同細胞を移入しなかったマウスと比較して移植グラフトの生着率は低値を示した (図 6)。したがって、CX3CR1 陽性単球が、冷阻血処理により誘導される拒絶反応に関与している可能性が示唆された。

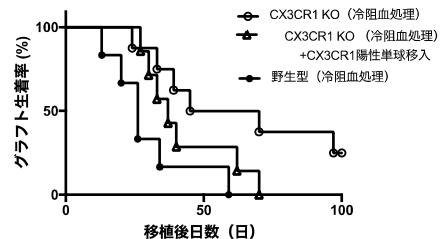


図6 CX3CR1 ノックアウトマウスにCX3CR1陽性単球を移入したモデル (△) のグラフト生着期間

以上の結果をまとめると、IRI により誘導される拒絶反応に FKN-CX3CR1 シグナルが関与していることが示された。さらに、そのメカニズムとして IRI により血管内皮に FKN が発現し、CX3CR1 陽性単球が移植グラフト組織に侵入し、拒絶反応が起こることが明らかとなった。

< 引用文献 >

Su CA, Iida S, Abe T, Fairchild RL. Endogenous memory CD8 T cells directly mediate cardiac allograft rejection. *Am J Transplant*. 2014;14(3):568-79.

Hamon P, Loyher PL, Baudesson de Chanville C, Licata F, Combadière C, Boissonnas A. CX3CR1-dependent endothelial margination modulates Ly6C^{high} monocyte systemic deployment upon inflammation in mice. *Blood*. 2017;129(10):1296-1307.

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〕

特になし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：平井 敏仁、神澤 太一、今井 俊夫、時田 大輔

ローマ字氏名：(HIRAI, toshihito)、(KANZAWA, taichi)、(IMAI, toshio)、(TOKITA, daisuke)

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。