

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20344

研究課題名(和文)小腸移植成績の向上を目指した自然免疫システム制御法の検討

研究課題名(英文)Research on control of innate immunity in the small bowel transplantation

研究代表者

松浦 玲 (Matsuura, Rei)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：00747412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：小腸移植では他臓器移植と比べ強い拒絶反応が生じ、その管理が問題となる。そのためカルシニューリン阻害薬(CNI)とは作用機序の異なる免疫抑制剤が求められている。今回の研究では、PAK2inhibitor/PQA-18がマクロファージ(M ϕ)の機能を抑制し、CNIと異なる機序で免疫を抑制することが示された。またPQA-18投与により小腸グラフトの生着期間が延長した。PQA-18は混合リンパ球反応だけでなくM ϕ の分化/極性を抑制することで、ラット、さらにはヒトの免疫細胞に効果的に作用しうる。さらに、PQA-18はM ϕ の関与しない経路でT細胞を抑制しうると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植後の免疫抑制の方法はこれまでリンパ球に主軸を置いて研究されてきた。現在用いられているリンパ球に対する免疫抑制剤の副作用として、腎障害などが知られている。今回、ラット小腸移植モデルにおよび in vitro の実験において、PQA-18のマクロファージを抑制する効果が示された。PQA-18は自然免疫系細胞の抑制による新たな経路での免疫抑制剤である。今後、投与量や副作用の検証を必要とするが、新たな免疫抑制剤となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The rejection of the small intestine is usually very severe and represents a significant immunogenic burden to manage. Therefore, the development of a new immunosuppressive drug with a different suppressive mechanism from Calcineurin inhibitors would be desirable in the field of intestinal transplantation. In this study, we demonstrated that PAK-2 inhibitor/PQA-18 suppresses the function of macrophages and induces a clear immunosuppressive effect via a different mechanism from CNI. We found that PQA-18 clearly prolongs the graft survival in a rat intestinal transplant system. PQA-18 can function efficiently in rat immune cells, and in human ones, by virtue of its ability to suppress not only mixed lymphocyte reactions but macrophage differentiation/polarization in in vitro and in vivo as well. In addition, it can be assumed that PQA-18 is effective in the suppression of T cell activation in the macrophages-independent manner.

研究分野：移植

キーワード：小腸移植 補体 マクロファージ 自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一般的に移植における拒絶反応は、主にリンパ球、特にT細胞を中心とした獲得免疫系の反応として受け止められている。そのため、活性化リンパ球の制御を中心とした免疫抑制療法に主体が置かれて来た。一方、最近はToll-like Receptorの研究の進展を初めとして、自然免疫系がこれ迄に考えられていた以上に獲得免疫系にも重要な影響・役目を果たしている事が判明している。

一方、腸管機能不全や短腸症に対する根本的な治療として、1960年代より小腸移植が臨床応用されるようになってきた。さまざまな免疫抑制剤の出現により、次第に小腸移植の臨床成績も上昇してきた。しかし、小腸はそのグラフト中にドナーの免疫系を多く含んでおり、拒絶反応そのもののメカニズムも、心臓や腎臓移植とはかなり異なる様子を呈していると考えられる。そのため実際、臨床での治療成績も他臓器移植と比べ悪いと言わざるをえず、新たな免疫制御法が求められている。

さらに、獲得免疫系の抑制を標的としたカルシニューリンインヒビターが臨床で用いられるようになり、移植後のグラフト生存率は改善したものの、小腸移植においてはカルシニューリンインヒビターの血中濃度を高濃度に保つ必要があり、その条件下では腎不全を生じることがある。そのため、カルシニューリンインヒビターの使用量を減量する意味でも、併用できるような新たな免疫制御法が求められている。

2. 研究の目的

自然免疫の液性因子の代表として補体系を、細胞の代表としてマクロファージ(M ϕ)を中心に置き、ラット異所性小腸移植モデルを使って、小腸移植の拒絶反応における自然免疫系の役割を調べる事を目的とした。

また、拒絶反応を抑制する新規薬剤(抗補体薬やM ϕ 除去薬など)を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ラット異所性小腸移植モデルの作成

体重150g-200gの生後8週以内のラットを用い、ドナー側のラットより小腸(30cm)を摘出し、レシピエントのラットへ腹部異所性(両端を人工肛門)に移植した。

同種同系移植モデルとしてはドナー・レシピエント双方のラットにLewisラットを用い、同種異型移植モデルにはDAラットをドナー、Lewisラットをレシピエントとした。

(2)拒絶評価

グラフトの拒絶反応については、人工肛門の色調や変化で判断することとし、グラフト生存期間を評価した。また拒絶を起こす移植後6日目に免疫反応の評価を行なった。

RT-PCRにてグラフト小腸上皮の各補体因子の発現量を測定、また血液を採取し白血球分画を測定した。

次に、レシピエントの腸間膜リンパ節を摘出し、EasySep Magnetを用いてCD3+Tcellを分離し、これとMMC処理を行なったドナー脾細胞(DAラット)を2:1の細胞数で混合し共培養(96時間)することでリンパ球混合試験(MLR)を行った。MLRの評価はWST-8 assayで細胞の増殖率を測定し、決定した。

(3)自然免疫系の抑制による拒絶反応抑制の評価：抗補体薬、M ϕ 除去薬、新規薬剤PQA-18の投与

抗補体薬による拒絶抑制効果

マクロファージ除去薬による拒絶抑制効果

PQA-18(プレニルキノリンカルボン酸誘導体)は、PAK-2を阻害することにより、サイトカイン産生とM ϕ 分化を抑制する新規免疫抑制剤である。ラット小腸移植モデルを用いPQA-18投与による免疫抑制効果の評価を行う

4. 研究成果

(1)抗補体薬

後述する薬剤の評価を先行させたため検証に至らなかった。

(2)抗マクロファージ(M ϕ)薬投与

抗M ϕ 薬(クロドロロン酸)を上記ラットモデルに通常量を投与(手術前日より手術日、手術後

3日にかけて)したが、グラフト生存期間の有意な延長は見られなかった。

(3)PQA-18

in vitro

ラットとは別にヒト末梢血単核球(Mo)を GM-CSF で M₁ に分化させ、M₁ のブタ血管内皮細胞(PEC)に対する反応(異種)を検討した。PQA-18 は PEC 細胞に対する M₁ の細胞障害反応を有意に抑制した。また MLR にて T 細胞の反応も有意に抑制した。

in vivo

同種ラット小腸移植モデルでは PQA-18 投与群(術後1日目より術後2週間まで 4mg/kg/day・腹腔内投与) 非投与群に分け、免疫抑制効果を検討した。

グラフト生存期間については PQA-18 群で有意な延長を認めた($p < 0.001$)。

血液検査において、白血球数、単核球数、顆粒球数、リンパ球数のいずれも、移植前には PQA-18 群/非投与群で差を認めないものの、移植後6日目では PQA-18 群で有意な低下を認めた。

また移植後6日目にレシピエント腸間膜リンパ節から T 細胞を分離し、MLR を WST-8 assay で評価したところ、PQA-18 投与群では有意に増殖率低下を認め($p = 0.02$)、PQA-18 による有意な免疫抑制効果が示された。また MLR の共培養時にも PQA-18 を加えると同じく有意な T 細胞の増殖抑制効果が得られた($p = 0.03$)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Lo Pei-Chi, Maeda Akira, Kodama Tasuku, Takakura Chihiro, Yoneyama Tomohisa, Sakai Rieko, Noguchi Yuki, Matsuura Rei, Eguchi Hiroshi, Matsunami Katsuyoshi, Okuyama Hiroomi, Miyagawa Shuji	4. 巻 224
2. 論文標題 The novel immunosuppressant prenylated quinolinecarboxylic acid-18 (PQA-18) suppresses macrophage differentiation and cytotoxicity in xenotransplantation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunobiology	6. 最初と最後の頁 575 ~ 584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.imbio.2019.04.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroshi Eguchi, Akira Maeda, Rei Matsuura, Afifah Mod Shabri, Pei-Chi Lo, Tasuku Kodama, Yuki Noguchi, Tomohisa Yoneyama, Chiyoshi Toyama, Yuko Tazuke, Hiroomi Okuyama, Shuji Miyagawa.	4. 巻 -
2. 論文標題 Human CD200 suppresses the HL-60 mediated xenocytotoxicity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplant Proc	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松浦玲
2. 発表標題 異種移植におけるヒトCD200の好中球誘導拒絶反応の抑制効果の検討
3. 学会等名 第54回日本移植学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	宮川 周士 (Miyagawa shuji)		
研究協力者	児玉 匡 (Kodama Tasuku)		