

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17001

研究課題名(和文)マクロファージ除去による小腸移植グラフト生存延長の研究

研究課題名(英文)Study on prolonging survival of small intestine grafts by inhibiting macrophages

研究代表者

児玉 匡 (Kodama, Tasuku)

兵庫医科大学・医学部・病院助手

研究者番号：60771045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：PAK-2を阻害し、サイトカイン産生とマクロファージ(M₁)の分化・増殖を抑制する新規免疫抑制剤PQA-18の効果をラット小腸移植モデルを使用して評価した。小腸移植後、レシピエントには術後1日目(POD1)から2週間までPQA-18(4 mg/kg)腹腔内注射を行った。PQA18投与群では移植片の生存期間の延長、レシピエントT細胞の増殖抑制、移植グラフトリンパ節へのM₁の浸潤抑制を認めた。また、PQA-18を骨髓幹細胞に加えて培養したところ、M₁への分化抑制を認めた。PQA-18は小腸移植片の生存を延長し、移植片やリンパ節へのM₁の浸潤を抑制することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小腸移植後のグラフト生存期間は他の臓器と比較すると芳しくない。これは小腸自体が外界と接するためマクロファージといった自然免疫が発達していることと、既存の免疫抑制剤ではしばしば腎機能障害を認めることが原因として考えられる。

今回、ラット小腸移植後にマクロファージの増殖・分化を抑制する新規免疫抑制剤であるPQA-18を投与したところ、腎機能障害といった副作用なく、小腸移植グラフトの生存期間の延長を認め、グラフトリンパ節内のマクロファージ減少を認めた。今後、既存の免疫抑制剤と併用することで、副作用を軽減し小腸移植グラフトのさらなる生存期間延長が期待できる可能性が考慮された。

研究成果の概要(英文)：The effect of PQA-18, a novel immunosuppressive agent that inhibits PAK-2 and suppresses cytokine production and macrophage (M₁) differentiation/proliferation, was evaluated using a rat small intestine transplant model. Recipients were administered PQA-18 (4 mg/kg) intraperitoneal injection from post-operative day1 (POD1) to two weeks. The survival time of the graft was prolonged in the PQA administered group (PQA) than in the non-administration group (ITx). At POD6, suppression of recipient T cell proliferation, and suppression of M₁ infiltration into graft lymph nodes were observed in the PQA group. Further, when 20 μM of PQA-18 was added to bone marrow stem cells and cultured, suppression of differentiation into M₁ was observed. It was found that PQA-18 prolongs the survival of small intestine grafts and suppresses the infiltration of M₁ into the grafts and lymph nodes.

研究分野：小児外科

キーワード：小腸移植 マクロファージ 免疫抑制 ラット

1. 研究開始当初の背景

臓器移植は1960年代より臨床応用が行われようになり、カルシニューリン阻害薬(CNI)の出現以降、その成績は上昇し施行例も増加し生存率は改善した。その一方で小腸移植においてはあまり劇的な改善は認めない。この原因として小腸自体が免疫原性に富んだ臓器でありその免疫抑制に難渋するという点やCNIの高濃度下では腎不全を来し、グラフト生存への影響といったことが考慮される。小腸移植の成績上昇には、既存の免疫抑制とは異なる新しい免疫抑制法の開発が必要であると考えられている。

PQA-18(プレニルキノリンカルボン誘導体18)は、PAK-2(p21 activated kinase 2)を阻害することにより、サイトカイン産生を抑制が報告されている新規免疫抑制剤であり、当科の研究ではヒトマクロファージ(M ϕ)の分化抑制を認めた。小腸移植の早期においては、外傷や虚血再灌流障害、腸管バリア機能低下等で自然免疫が増強されやすい状態となっており、自然免疫であるM ϕ の分化を抑制する事で小腸移植グラフトの生存延長が認められるかどうか、ラット小腸移植モデルを用いて研究した。

2. 研究の目的

ラット小腸移植モデルを使用し、小腸移植後にPQA-18を投与することで、小腸グラフトの生存期間が延長するかどうかを調べた。

3. 研究の方法

7~9週齢のオスDAラットから約15cmの腸管グラフトをレシピエントとなる同週齢のオスLewisラットに移植した。グラフトの両端は体外へと導出しストマとするThiry-Vella loopの異所性小腸移植モデルを作成した。レシピエントは術後1日目から2週間、PQA-18(4 mg/kg/日)を腹腔内投与したPQA-18群(PQA群)と非投与群(ITx群)に分けた。

(1)グラフトの生存期間を評価した。これまでの当科での実験同様に、グラフト生存の判定にはストマ色調、腹部腫瘤の有無で判定した。PQA-18の効果を見るために、移植後6日目の末梢血分画、移植後10日目、14日目の血清CRE、BUNを測定した。

(2)次に、移植後6日目のレシピエント腸管膜リンパ節からCD3+T細胞を分離して、マイトマイシン処理したDAラットの脾細胞を混合し、4日間培養した。WST-8活性を用いてCD3+T細胞の増殖率を測定する混合リンパ球反応検査(MLR)を行った。

(3)また、同じ移植後6日目にグラフトの腸管膜リンパ節(gMLN)とパイエル板(gPP)を回収し、FITC-抗ラットMHC-class II抗体ならびに、APC-抗ラットCD11b/c抗体で二重染色し、FACSでそれぞれの浸潤M ϕ を測定した。

(4)さらに、レシピエントの骨髄細胞から骨髄幹細胞を回収し、G-CSFを加えた培地で5 μ M、10 μ M、20 μ Mの各濃度でPQA-18を投与し4日間培養し、それぞれM ϕ への分化・増殖を同様にFACSで測定した。

4. 研究成果

(1)グラフト生存期間はITx群の7.0 \pm 0.77日(n=9)に対し、PQA群では10.7 \pm 1.26日(n=10)(p<0.001)と延長を認め、組織像でも絨毛の長さに比較的確な違いを認めた。血液検査ではPQA群で好中球(p<0.001)、単球(p<0.05)(n=4)の増加抑制を認めた一方で、CRE、BUNの値には両群間に有意な差を認めなかった。

(2)MLRではITx群で9.44 \pm 1.21に対しPQA群では4.71 \pm 0.55(n=4)(p<0.05)とPQA群でレシピエントT細胞の増殖抑制を認めた。

(3)gMLNおよびgPP内のM ϕ の測定ではgMLNでITx群60.55 \pm 2.18%に対し、PQA群で45.20 \pm 3.20%(n=6)(p<0.01)、gPPでは42.42 \pm 3.61%に対し29.8 \pm 3.21%(n=6)(p<0.05)といずれもPQA群でM ϕ の減少を認めた。

(4)骨髄幹細胞の分化・培養ではコントロール群が14.45 \pm 2.40%に対し、PQA-18を20 μ M加えた群では5.01 \pm 2.09%(n=6)(p<0.05)とM ϕ への分化抑制が確認された。

PQA-18 は小腸移植グラフトの生存を有意に延長し、移植グラフトへの M₁ の浸潤および分化を抑制することが判明した。PQA-18 は従来の免疫抑制剤とは異なる経路でグラフトの生存を延長させ、腎障害を伴わない新たな免疫抑制剤としての効果が期待できた。これまでの免疫抑制剤は主に獲得免疫に対して使用されていたが、自然免疫を担うマクロファージを抑制する PQA-18 を既存の免疫抑制剤と補完することで、さらなるグラフト保護の可能性があると示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kodama Tasuku, Maeda Akira, Lo Pei-chi, Noguchi Yuki, Toyama Chiyoshi, Takama Yuichi, Ueno Takehisa, Tazuke Yuko, Eguchi Hiroshi, Matsunami Katsuyoshi, Miyagawa Shuji, Okuyama Hiroomi	4. 巻 57
2. 論文標題 The effect of a novel immunosuppressive drug, a PAK-2 inhibitor, on macrophage differentiation/polarization in a rat small intestinal transplantation model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transplant Immunology	6. 最初と最後の頁 101246 ~ 101246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.trim.2019.101246	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 児玉 匡
2. 発表標題 小腸移植における新規免疫抑制薬X-8の効果
3. 学会等名 第54回日本移植学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 児玉 匡
2. 発表標題 小腸移植における新規免疫抑制薬PQA-18の効果
3. 学会等名 第31回日本小腸移植研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tasuku Kodama, Akira Maeda, Lo, Pei-chi, Yuki Noguchi, Rieko Sakai, Yuichi Takama, Takehisa Ueno, Yuko Tazuke, Katsuyoshi Matsunami, Syuji Miyagawa, Hiroomi Okuyama
2. 発表標題 The effect of a novel immunosuppressive drug, PQA-18, in rat small intestinal transplantation
3. 学会等名 16th International Congress of the Intestinal Rehabilitation and Transplant Association (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----