

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16286

研究課題名（和文）カニクイザル小腸移植モデルを用いた新規副刺激阻害剤CD40抗体の拒絶反応抑制効果

研究課題名（英文）Blocking CD40 costimulation in intestinal transplantation utilizing non-human primates

研究代表者

山田 洋平（YAMADA, Yohei）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：60383816

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）：2018年に保険収載された小腸移植は、今後需要が増加するものと予測される。しかしながら、従来の免疫抑制プロトコルでの長期成績は満足いくものではなく、新規免疫抑制剤の効果や拒絶反応の早期診断など多くの課題が存在する。本研究では、慶應義塾大学小児外科が開発した、カニクイザル小腸移植モデルを用いて、拒絶反応の診断と新規免疫抑制剤であるCD40阻害抗体の効果判定のプラットフォームの確立を行った。MHCミスマッチのカニクイザルにおける小腸移植における拒絶反応までの平均生存期間は4週間であり、ELISPOTを用いたドナー反応性・抗ドナー抗体の存在・ケモカインレセプターの詳細な解析が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管不全管理の改善による生存率の向上とともに、腸管不全患者の絶対数の増加が予測される。また、2018年に小腸移植の医療技術が保険収載されたことによって、小腸移植を希望される患者が増加してくることが考えられ、その長期成績の改善が期待される。本研究によって、小腸移植の最大の課題、すなわち長期成績不良の主要因の一つである拒絶反応制御に関わるトランスレショナルリサーチのプラットフォームが確立された。

研究成果の概要（英文）：Intestinal transplantation (ITx) plays a pivotal role in the management of intestinal failure and has been approved by national health care system since two years ago. The number of patients who are in need of ITx is expected to rise, however the long term outcome of ITx remains unsatisfactory. In this study, we aimed to assess the efficacy of novel immunosuppression, known as anti-CD40 antibody, in ITx utilizing non-human primates. The average rejection free survival of intestinal graft was about 4 weeks. Anti-donor immune response was monitored by mixed lymphocyte reaction assessed by ELISPOT, the presence of anti-donor antibody, histological analysis, and chemokine receptor of CD4 T lymphocytes.

研究分野：小児外科・臓器移植

キーワード：小腸移植 免疫抑制剤 抗ドナー抗体 ケモカイン 拒絶反応

### 1. 研究開始当初の背景

難病である腸管不全に対する唯一の根治的治療である腸管移植が保険収載され、他の臓器移植と比して高率に発症する急性拒絶反応の予防と中長期における安定したグラフト機能の維持が喫緊の課題であった。全世界的にもっとも高頻度に用いられている免疫抑制プロトコールは **thymoglobulin** による **induction therapy** に加えて、タクロリムスとステロイドによる維持療法であるが、このプロトコールによっても長期成績が不良（5年のグラフト生存率は **50-60%** 程度）であり、更に **90** 日以内の急性拒絶反応の発生率が **40-60%** 以上と他の臓器移植とは比較にならないほど高頻度である。粘膜上皮の剥奪をきたす重度の急性拒絶反応のみならず、晩期に発症する原因不明の潰瘍形成や狭窄は移植腸管における慢性拒絶反応の二型と考えられ、エビデンスのある効果的治療法が存在しない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、慶應義塾大学小児外科が確立したカニクイザルにおける小腸移植モデルを用いて適切な導入維持療法としての **CD40** をブロックする **Anti-CD40** の効果と安全性を明らかにすることである。カニクイザルを用いた腸管移植の報告は世界的にもほとんど存在せず、**MHC** の統御されたカニクイザルの供給・飼育・管理体制が整備された滋賀医科大学動物生命科学センターで、臨床応用可能な免疫抑制剤の効果を免疫モニタリングとともに解析する。また、ドナーとレシピエント細胞を区別できる **MHC** 抗体を利用して、血液及び腸管リンパ組織での再構築及びキメリズムを解析し、特にケモカインレセプターに着目した **CD4T** 細胞の詳細な解析を行い、腸管拒絶反応との関連性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

手術施設である滋賀医科大学動物生命科学センターは、国の管轄施設であり、実験計画書や倫理委員会の審査は厳重に行われ、国内トップレベルの設備を完備した動物センターである。カニクイザルの供給は（株）イナリサーチの協力を得て、飼育・管理は全て滋賀動物生命科学センターで行われた。カニクイザルの **MHC** タイピングは東海大学基礎医学系分子生命科学講座に依頼して行われた。免疫機能解析は滋賀医科大学病理学教室生体防御の石垣宏仁先生が担当した。

#### （1）新規免疫抑制剤の効果判定に対する対照群の設定

新規免疫抑制剤の効果判定のための、対照群として2つの免疫抑制剤治療群を設定した。

**Group A: FK (target トラフレベル 10-15)+Steroid+MMF**

**Group B: FK(target トラフレベル 10-15)+Steroid**

#### <病理組織学的評価>

それぞれの生検組織を HE 染色にてクリプト内での Apoptosis の定量化と組織での  $\alpha 4 \beta 7$  integrin 陽性のリンパ球の免疫染色とリガンドである Madcam-1 の染色を行った。

#### （2）免疫モニタリング

アロ反応性モニタリングの手法として、interleukin-2 および interferon  $\gamma$  の ELISPOT を使用し、自己に対するドナー細胞への相対的反応として Stimulation Index を算出した。また、拒絶反応が発生した時点で、TNF $\alpha$  の ELISPOT を施行した。

#### （3）ドナーキメリズム存在の定量化とリンパ球の解析

ドナー特異的抗 **MHC** 抗体を使用したキメリズムをフローサイトメトリーを用いて解析した。レシピエントリンパ球の解析は、**CD3・CD4・CD8・CD95・CD28・CXCR3・CCR6・CXCR5・CCR4・FOXP3・CD45RA・HLA-DR・CD16** を使用した。

### 4. 研究成果

#### （1）対照群の Rejection Free Survival

新規免疫抑制剤である anti-CD40 抗体の主評価項目は Rejection Free Survival であるため、まずは従来の免疫抑制剤を使用しての拒絶反応の評価が確実に行えるかどうかの判定を行った。図1に示すごとく、術式の安定化および内視鏡所見、さらには生検採取手技も問題なく施行されることを確認した。

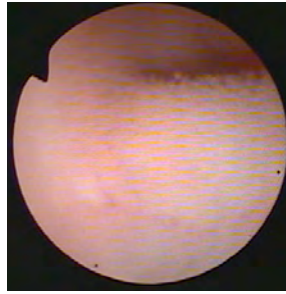


図 1a： 移植直後のストマ  
外観写真（左）と内視鏡所  
見（右）



図 1b： 拒絶反応時のストマ  
外観写真（左）と内視鏡所見  
（右）

<病理組織学的評価>

拒絶反応の診断および Rejection Free Survival の組織学的診断は、下図 2 に示す絨毛 crypt の apoptosis の数や血管壁の肥厚・閉塞所見および外観所見・内視鏡所見・抗ドナー抗体の有無で診断した。また、グラフト粘膜内での MadCAM-1 及び  $\beta 7$  integrin 陽性リンパ球の染色を行った(図 3)。

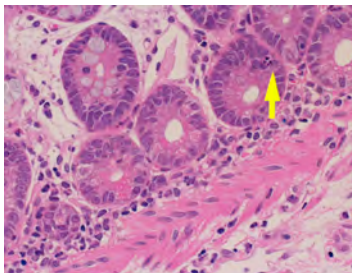


図 2a: クリプト内のアポ  
トーシス

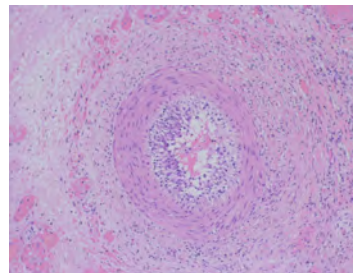


図 2b: 摘出腸管筋層内の  
血管壁の肥厚

<左図 2a 移植された小腸の炎症  
粘膜内のアポトーシスを認める。  
図 2b では摘出腸管筋層内の血管  
内皮の増生と血管壁の肥厚を認  
めた。>

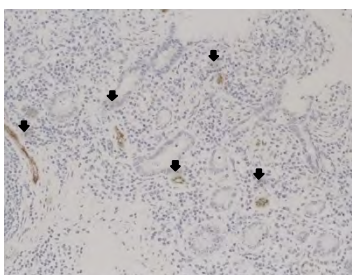


図 3 a: 炎症領域での  
MadCAM-1 発現

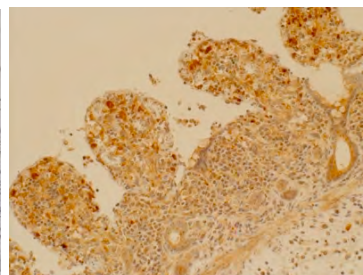
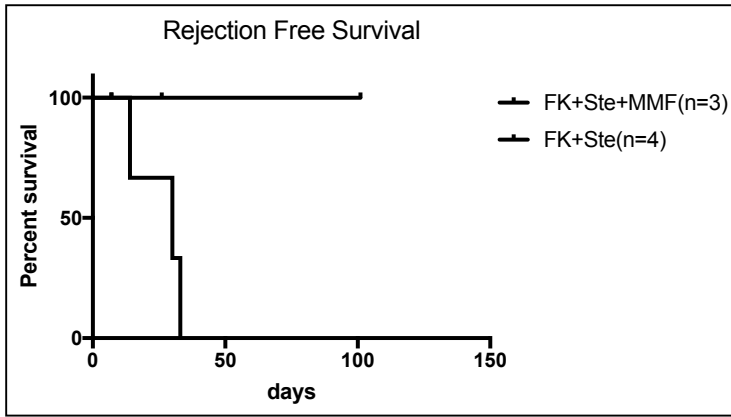


図 3 b: 炎症領域での  $\beta 7$   
陽性リンパ球浸潤

<左図 3 a. b に示すように、移  
植された小腸の炎症粘膜内に  
 $\alpha 4 \beta 7$  integrin のリガンドで  
ある Madcam-1 の発現をみとめ  
た。また、その領域での  $\alpha 4 \beta$   
7 integrin 陽性のリンパ球の存  
在が確認された。>

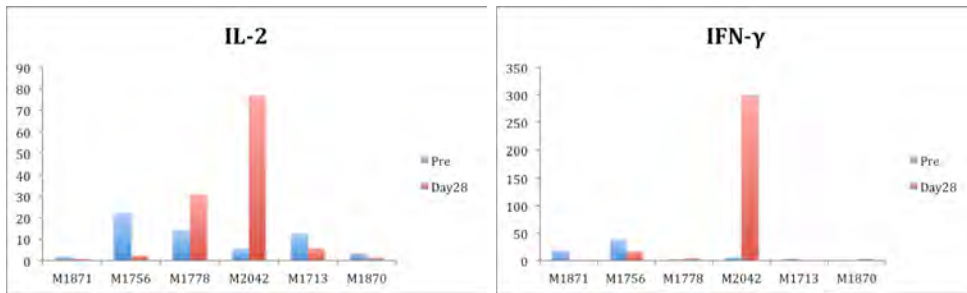
3 剤併用の Group A では 1 例が PTLD (移植後リンパ増殖疾患) を発症し、比較的長期にグラフ  
トが維持されたため、2 剤併用の Group B を対照群とした。Group B の平均 Rejection Free  
Survival は 30 日であった (図 4)。



< 図 4: Rejection Free survival. 3 剤併用療法 = FK+Ste+MMF (Group A), 2 剤併用療法 = FK+Ste (Group B) >

(2) 移植前後での Mixed lymphocyte Reaction の結果

図 5 は Interleukin-2 及び IFN- $\gamma$  の ELISPOT によるアロ反応性の免疫解析の結果である。拒絶群である Group B の結果と、非拒絶群である Group A の結果を示す。拒絶群において、著明なアロ反応性の増加が認められており、本手法が拒絶の免疫モニタリングにおいて有用であることを示唆している。また、拒絶群すべてに抗ドナー抗体が検出された。



< 図 5: 個体 M1871・M1756 は Group A。個体 M1778・M2042・M1713・M1870 は Group B に属する。青いバーは移植前のアロ反応性を示し、赤いバーは移植後の反応性を示す。M1778/M2042 は拒絶反応を発症した。M1871/M1870/M1713 は DSA 陽性かつストマ粘膜の障害がみられたが、graft 内部の障害は比較的軽度であった。M1756 は PTLD を発症した。 >

(3) ドナーキメリズムの評価

抗ドナー特異的 MHC 抗体によるリンパ球内でのドナーキメリズムを定量化した。拒絶反応が早期に認められた Group B では早期にキメリズムが消失する傾向が見られた一方で、免疫抑制が強化された Group A ではキメリズムが長く残存する傾向が見られた。

(4) CD4 リンパ球の細胞表面ケモカインレセプターとサイトカイン分泌

CD4 リンパ球を CXCR3、CCR4、CXCR5、CCR6 染色で分類した。さらに、PMA/Ionomycin で刺激を行って、5 匹のカニクイザルを用いてサイトカイン分泌能を評価した。

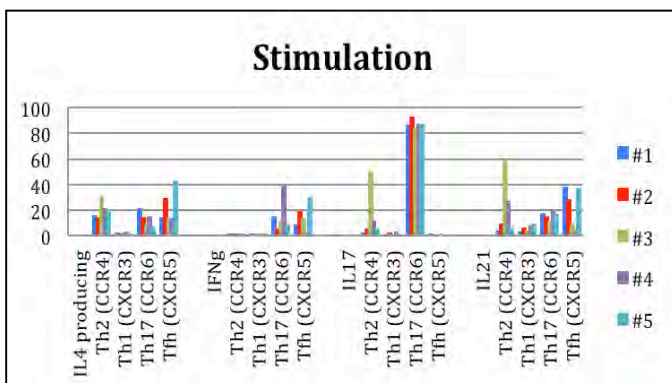


図 6 に示すように、IL-17 を分泌する Th17 はほぼ例外なく CCR6 を表出しており、特に腸管での炎症に重要な役割を持つ Th17 の同定に有用であることが示唆された。

< 図 6. 5 匹のカニクイザルを使用して、細胞表面のケモカインレセプターとサイトカイン分泌の関係性を評価。 >

#### (5) 結果のまとめ

MHC ミスマッチのカニクイザルを用いた小腸移植モデルを確立し、そのグラフト機能および免疫機能を解析した。従来のタクロリムスとステロイドによる平均 Rejection Free Survival は 30 日であった。拒絶反応によるアロ反応性を ELISPOT と抗ドナー抗体の出現で観察した。さらには、ドナー細胞の存続と拒絶反応の間の相関があることが示唆された。本研究において、新規免疫抑制剤 Anti-CD40 の効果を判定するためのプラットフォームと Th17 の動向解析が可能となった。

※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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名	山田 洋平, 星野 健, 森 禎三郎, 阿部 陽友, 高橋 信博, 藤村 匠, 松原 健太郎, 篠田 昌宏, 尾原 秀明, 日比 泰造, 黒田 達夫
2. 発表標題	ヒルシユスプルング病類縁疾患に対する移植を含めた外科治療 多臓器移植の制度化への取り組みについて
3. 学会等名	第30回小腸移植研究会（招待講演）
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	森 禎三郎, 山田 洋平, 星野 健, 阿部 陽友, 高橋 信博, 藤村 匠, 松原 健太郎, 篠田 昌宏, 尾原 秀明, 黒田 達夫
2. 発表標題	小腸移植至適免疫抑制プロトコル作成に向けたカニクイザル小腸移植モデルの確立 維持療法としてのミコフェノール酸モフェチルの効果
3. 学会等名	第30回小腸移植研究会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	山田 洋平, 星野 健, 淵本 康史, 松原 健太郎, 阿部 雄太, 八木 洋, 篠田 昌宏, 北郷 実, 尾原 秀明, 北川 雄光, 黒田 達夫
2. 発表標題	小児肝移植の現状とチャレンジ 疾患別にみた小児肝移植の現状とチャレンジ
3. 学会等名	第80回日本臨床外科学会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	森 禎三郎, 山田 洋平, 星野 健, 阿部 陽友, 高橋 信博, 藤村 匠, 松原 健太郎, 篠田 昌宏, 尾原 秀明, 黒田 達夫
2. 発表標題	ヒルシユスプルング病類縁疾患に対する生体小腸移植後の難治性潰瘍と、心理的問題点に対して管理に難渋している一例
3. 学会等名	第30回小腸移植研究会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 山田 洋平, 星野 健, 森 禎三郎, 阿部 陽友, 高橋 信博, 藤村 匠, 松原 健太郎, 篠田 昌宏, 尾原 秀明, 黒田 達夫
2. 発表標題 脳死小腸移植における当施設の課題
3. 学会等名 第31回小腸移植研究会(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本移植学会ガイドライン策定委員会 山田洋平 ほか	4. 発行年 2018年
2. 出版社 メディカルレビュー	5. 総ページ数 120
3. 書名 臓器移植抗体陽性診療ガイドライン 2018年版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学臓器移植センター 小腸移植 <a href="http://www.hosp.keio.ac.jp/annai/shinryo/organ-transplantation-center/#doctorIntroduce">http://www.hosp.keio.ac.jp/annai/shinryo/organ-transplantation-center/#doctorIntroduce</a>
--

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	木須 伊織  (KISU Iori)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	石垣 宏仁  (ISHIGAKI Hirohito)	滋賀医科大学・病理学講座 疾患制御病態学部門	
研究協力者	椎名 隆  (SHIINA Takashi)	東海大学・基礎医学系分子生命科学	