

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390422
 研究課題名（和文） M H C 確立ミニブタ同種腎移植モデルを用いた慢性移植腎血管病変に対する H G F の効果
 研究課題名（英文） Effect of HGF on chronic changes in renal allografts in partially inbred miniature swine
 研究代表者
 佐田 正晴（SADA MASAHARU）
 国立循環器病センター研究所・再生医療部・室長
 研究者番号：20162399

研究成果の概要： 鹿児島大学中西名誉教授（現山田研究分野特任教授）により国内で開発された組織適合性抗原の確立したクラウンミニブタを用い、肝細胞増殖因子（HGF）による腎移植拒絶反応抑制効果の検討、並びにドナー特異的な末梢性免疫寛容の導入を目指した実験を行った。初年度（平成 19 年度）は、ミニブタ細胞免疫アッセイと同種間腎移植急性・慢性拒絶反応モデルを確立し、平成 20 年度は本移植モデルを用い、HGF 投与による導入期拒絶反応抑制効果を確認する成果を得た。その成果は、国際移植学会および米国腎臓学会において口演演題として採択され、また *in vitro* 培養試験およびミニブタ腎移植モデルの第一・二報はそれぞれ米国移植学術誌に掲載された。また HGF の効果については論文投稿の段階に至っている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：(1) 免疫寛容 (2) 腎移植 (3) ミニブタ (4) HGF (5) タクロリムス

1. 研究開始当初の背景

免疫抑制療法の進歩により移植後急性拒絶を効果的に抑制することが可能となったが、慢性期の臓器喪失率に顕著な改善傾向はな

く、この主因である慢性移植腎症（Chronic Allograft Nephropathy：CAN）の克服は臨床腎移植における重要課題である。更に、拒絶反応を抑えるための永続的な免疫抑制剤の

使用の結果生ずる感染症の誘発や悪性腫瘍の発生等の軽減は、腎移植に限らず移植領域全般における大きな課題であり、免疫抑制剤を使用することなくドナー抗原特異的に免疫反応が欠如し移植臓器が十分に機能する状態、即ち免疫寛容の誘導は移植医療の究極の目標の一つである。

Hepatocyte growth factor (HGF) は血管新生因子であり、更に樹状細胞(DC: Dendritic cell)機能抑制効果をもつことが小動物を用いた実験により報告されている。CAN が内皮細胞傷害に起因する事、移植拒絶反応における抗原提示細胞の主役が DC であること、更に慢性期の免疫反応では宿主の抗原提示細胞(血管内皮細胞)を介する間接経路(Indirect pathway)が主役であることから、HGF は拒絶反応抑制に対し有効であると期待される。また HGF は免疫担当細胞への作用も報告されている。HGF の特異的受容体である c-Met は DC に発現しており、HGF は DC の抗原提示能力を抑制し、抗原依存性の Th1 および Th2 免疫応答が抑制される(J Immunol 175: 4745-4753, 2005)。また、HGF により単球由来 DC が制御性 DC に分化し、ナイーブ T 細胞が抗原依存性 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞に誘導される(Blood 108: 218-227, 2006)ことが示されている。これらの作用に基づいた HGF 投与による移植腎機能および免疫反応抑制機序の検討は、新しい免疫抑制戦略の確立において重要である。

2. 研究の目的

本研究の Overall Goal は、臨床応用を視野に入れた HGF による新しい移植治療戦略を確立することであり、このためには translational research として大動物を用いた実験は不可欠である。移植実験においては、

拒絶反応の主役である組織適合性抗原(MHC)が確立した実験動物を用いることは、結果の再現性・解析において大きな信頼性・優位性をもつ。本申請研究は、鹿児島大学中西喜彦名誉教授(現・山田研究室、研究分野特任教授)が中心となり開発した組織適合性抗原純系(MHC inbred) クラウンミニブタを用い、(1) クラウンミニブタ同種腎移植モデルの確立、(2) 米国 Sachs 教授らにより確立された MHC inbred ミニブタ(MGH ミニブタ)との移植腎拒絶反応・免疫寛容性の比較検討、(3) 前記した HGF の効果に基づく HGF によるクラウンミニブタ移植腎拒絶抑制効果の検討、及びドナー特異的免疫寛容の導入戦略の確立、そして(4) HGF の免疫担当細胞への作用および HGF の免疫抑制効果の検討、を主目的として実験を行った。

3. 研究の方法

(1) クラウンミニブタ同種腎移植モデルの確立、および(2) MGH ミニブタとの移植腎拒絶反応・免疫寛容性の比較検討: 本課題研究分担者の山田は、MHC 確立ミニブタとして世界的に認知されている MGH ミニブタを用い、MHC 完全不適合間同種腎移植において独自に開発した 12 日間 高濃度 FK506 持続投与法(血中濃度: 35-45 ng/ml)により再現性のある免疫寛容誘導を報告している(*Transplantation* 2001;71:1368)。本基盤研究では、鹿児島大学で開発された MHC 確立クラウンミニブタを用い、MGH ミニブタと同様の MHC 完全不適合の組み合わせとして、SLA(ブタ MHC) C1 タイプをドナー、C2 タイプをレシピエントとした同種腎移植を同様の 12 日間 高濃度 FK506 持続療法下で行った。腎移植後の腎機能は腎生検および血液生化学的検査により検討した。

更にクラウンミニブタ腎移植後の免疫反応の経時的観察およびMGHミニブタとの免疫反応の比較を目的とし、放射性同位元素を用いない同種免疫反応試験として、CFSEやPKH26を用いたリンパ球混合試験（CFSE-MLR）、細胞障害試験（PKH26-CML）をミニブタ末梢リンパ球で行うための条件設定を行った。抗ドナー抗体に関してはフローサイトメトリー（FACS）および免疫染色で検討した。

(3) HGF 移植腎内投与による CAN 抑制効果の検討、および HGF 投与による同種移植免疫寛容の誘導の試み： 上記 FK506 短期間高濃度持続療法を用いたクラウンミニブタ MHC 完全不適合実験系を対象群（I 群）とし、HGF 併用効果（II 群）を検討するために、対象群で拒絶反応が生じる腎移植後 11 日から移植腎動脈に留置したカテーテルよりヒト HGF を 7 日間または 14 日間の移植腎へ選択的に投与した。HGF 投与濃度は、連携研究者坪内らのこれまでのラットモデルでの投与量を参考として、0.015mg/kg/日または 0.03mg/kg/日に設定した。

(4) HGF の免疫担当細胞への作用および HGF の免疫抑制効果の検討： HGF の免疫担当細胞への影響を評価するため、腎移植レシピエントの末梢血を用いて、FK506 単独投与群（I 群）と HGF 併用群（II 群）における制御性 T 細胞分画（CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺）の経時的推移および制御性 T 細胞の *in vitro* での抑制効果を FACS および共培養試験で検討した。

4. 研究成果

(1) クラウンミニブタ MHC 完全不適合モデルによる移植腎急性および慢性拒絶病変モデルの確立、および (2) MGH ミニブタとの移植腎拒絶反応・免疫寛容性の比較検討：

クラウンミニブタ SLA C1 タイプをドナー、C2 タイプをレシピエントとした MHC 完全不適合間同種腎移植を 12 日間高濃度 FK506 持続静脈投与下（血中濃度：35-45 ng/ml）に 6 症例に行った。この 1 FK506 持続静脈投与療法は、研究分担者である山田が、MGH ミニブタ MHC 完全不適合腎移植モデルで免疫寛容を誘導しえることを報告した免疫抑制療法である。しかし、クラウンミニブタを用いた本腎移植例（n=6）では、全例で術後 1 ヶ月以内に高度の血清 Cre 上昇あるいは移植腎の慢性移植血管症を伴った拒絶病変を呈することを確認した（図 1、図 2 黒線）。

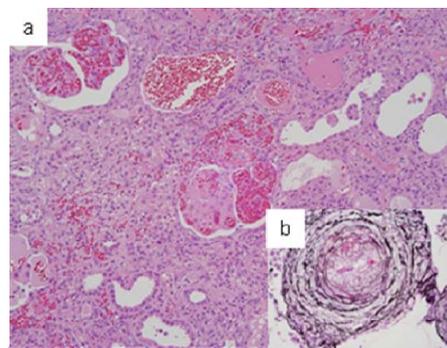


図1. 12日間高容量FK506投与下におけるクラウンミニブタMHC完全不適合腎移植の術後第29病日での急性拒絶反応病変(a; PAM×200)および慢性移植血管症(b; PAM×800)

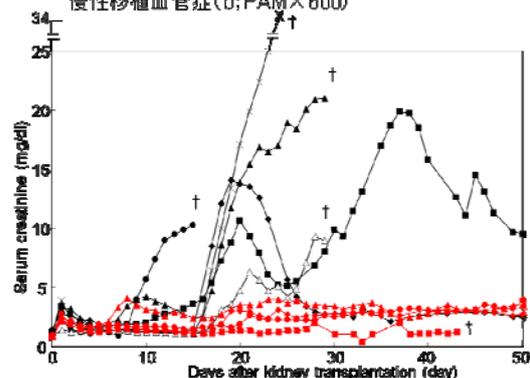


図2. 12日間高容量FK506投与下におけるMHC完全不適合腎移植後血清Creの変動(黒線: FK506単独、赤線: HGF併用症例)

クラウンミニブタの SLA 解析は DNA-typing で行われている一方、MGH ミニブタの SLA 解析は Serotyping で行われているため、MGH ミニブタでの MHC 不適合 SLA-type の一部が、DNA レベルでは sharing されている可能性が

否定できない。このように、腎移植実験の結果と併せて、クラウンミニブタのMHC不適合間はより臨床に近い完全不適合モデルであることが示唆された。更に図1に示す病理所見から、本モデルは慢性血管病変を形成する慢性拒絶腎移植モデルと成り得ると考えられる(国際学会で口演発表済。論文作成中)。

我々は、移植腎機能の評価としての血液生化学検査および移植腎病理学的検討に加え、免疫学的検討手段として、放射性同位元素を用いないリンパ球混合試験(CFSE-MLR)、細胞障害試験(PKH26-CML)および抗ドナー抗体検査をミニブタ血液検体により適正化し、抗ドナー免疫反応評価法を確立し、既に米国移植雑誌に報告した(Oku M. *Transpl Immunol.* 2008;20:78-82)。免疫学検討においても上記移植後拒絶反応の臨床経過および組織所見と呼応し、末梢血リンパ球を用いた *in vitro* 免疫学試験において、ドナーに対する高い反応を認めた。更に免疫組織学的検討においても抗ドナー抗体の拒絶腎組織血管内皮への沈着を確認した。

(3) HGF 投与方法・投与量の確立及び HGF による急性拒絶反応抑制効果： HGF は末梢循環から血管内に投与した場合に肝臓で速やかに代謝され、目的臓器での効果発現は非常に不安定である。我々は、移植腎動脈内にカテーテルを留置し移植腎に選択的にHGFを持続投与する方法を確立し、HGFが腎臓内で高濃度に保たれることを確認した。

本投与方法を用い、HGF併用群として、MHC完全不適合腎移植4症例において、12日間高濃度FK506療法下に加え、術後11日目からHGF持続投与(3症例:0.015mg/kg/day×14日間、1症例0.03mg/kg/day×7日間)を行った。

0.015mg/kg/day×14日間(低濃度群)全例においてFK506単独投与群で移植後2-3週に生じた急性拒絶反応は認められなかった。術後50日にわたり腎機能が安定し(図2赤線)、移植後第18病日血清クレアチニン値はHGF併用投与群1.9mg/dlに対しFK506単独群は8.2mg/dlで統計学的に優位な差を呈した($p=0.008$)。しかし、最終的にHGF投与終了2カ月後である80病日を超えた時点で移植腎は拒絶された。HGF高濃度療法を行った1例においても、移植腎機能は低濃度群と同様の経過を呈した。

移植腎機能の更なる検討として、免疫学的検討を行ったところ、移植後1-2カ月経過時点においても、抗ドナー細胞特異的な細胞性反応の低下を確認した。

これらの結果はHGFの拒絶反応抑制効果を大動物移植実験で示した世界初の知見である(Oku M. 第22回国際移植学会)。

(4) HGFによる制御性細胞の維持、およびT細胞の直接制御効果の検討： HGFによる免疫反応抑制効果の検討として、FK506単独投与群およびHGF併用群での末梢血中CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞の割合を経時に検討した。図3に示すように、FK506単独投与群では移植後2-3週にCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞の著明な減少を認めるのに対し(図3黒)、HGF併用投与群では本細胞群の維持または増加を認め(図3赤)、拒絶反応抑制効果への制御性メカニズムの関与が示唆された。

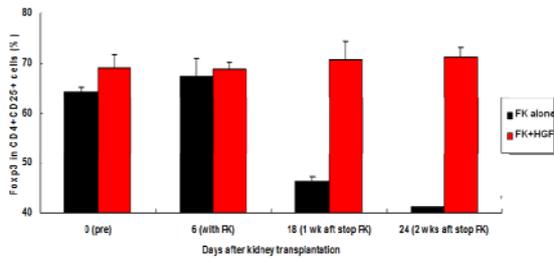


図3) 末梢血中のCD4+CD25+Foxp3+T細胞の割合の推移(黒:FK単独投与群、赤:HGF併用群)

我々は、HGFの免疫抑制効果を、更にT細胞共培養試験により評価した。共培養試験ではHGF投与レシピエントから得たT細胞は未処置T細胞の抗ドナー反応を抑制せず、また、HGF添加による未処置T細胞同種反応の抑制も認められず、HGFによるT細胞反応性に対する直接制御効果を認めなかった。これらの結果から、HGFの拒絶反応制御は、マクロファージなどT細胞以外の細胞(抗原提示細胞)からのサイトカイン産生等による抑制効果の関与が示唆された。我々は本実験結果を踏まえ、現在HGFの免疫抑制効果のメカニズムを解明するため、更に詳細な*in vitro*実験を進行している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

注: Oku M, 屋万栄; Nishimura H, 西村博昭; Griesemer A; Okumi Mは分担者山田の研究員。

[雑誌論文] (計 3件)

- ① Oku M, Okumi M, Sahara H, Hirakata A, Onoe T, Griesemer AD, Yamada K. (Yamada K: 責任著者)
Porcine CFSE mixed lymphocyte reaction and PKH-26 cell-mediated lympholysis assays. *Transplant Immunology*. 2008. 20 (1-2): 78-82. 査読有
- ② Griesemer AD, LaMattina JC, Okumi M,

Shimizu A, Sachs DH, Yamada K. (Yamada K: 責任著者)

Linked suppression across an MHC-mismatched barrier in a miniature swine kidney transplantation model, *Journal of Immunology*. 2008 181 (6): 4027-36. 査読有

- ③ Okumi M, Fishbein JM, Griesemer AD, Gianello PR, Hirakata A, Nobori S, Moran S, Samelson-Jones E, Shimizu A, Sachs DH, Yamada K. (Yamada K: 責任著者) Role of persistence of antigen and indirect recognition in the maintenance of tolerance to renal allografts. *Transplantation*. 2008 Jan 27;85(2):270-80. 査読有

[学会発表] (計 7件) (発表者のみ提示)

- ① Yamada Kazuhiko.
The Role of Primates in Translational Research, XXII International Congress of The Transplantation Society, 2008.8.9, Sydney, Australia
- ② Oku Manei.
Maintenance of Treg Population and Prolongation of Allograft Survival by Hepatocyte Growth Factor in MHC-inbred CLAWN Miniature Swine, XXII International Congress of The Transplantation Society, 2008.8.11, Sydney, Australia
- ③ 屋 万栄
MHC完全不適合間クローン系ミニブタ同種間腎移植におけるHGFの効果-制御性T細胞と移植腎機能維持効果、第44回日本移植学会総会、2008.9.21、大阪市
- ④ 西村 博昭

MHC inbredクラウン系ミニブタ腎虚血再灌流モデルにおける血清サイトカイン動態、第44回日本移植学会総会、2008. 9. 21、大阪市

⑤ Oku Manei

Hepatocyte Growth Factor sustains the Treg population and prolongs survival of kidney allografts in MHC-inbred CLAWN Miniature Swine、American Society of Nephrology Renal Week 2008、2008. 11. 7、Philadelphia, Pennsylvania, USA

⑥ 西村 博昭

MHC完全不適合間クラウン系ミニブタ同種腎移植におけるHGFの効果：制御性T細胞と移植腎機能維持効果、第97回日本泌尿器科学会総会、2009. 4. 18、岡山市

⑦ Nishimura Hiroaki

Hepatocyte Growth Factor prolongs allograft survival with maintenance of Treg population in MHC-inbred CLAWN miniature swine、104th American Urological Association Annual Meeting、2009. 4. 29、Chicago, Illinois, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐田 正晴 (SADA MASAHARU)
国立循環器病センター研究所・再生医療部室長
研究者番号：20162399

(2) 研究分担者

山田 和彦 (YAMADA KAZUHIKO)
鹿児島大学・学内共同利用施設等・教授
研究者番号：40241103