

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2007~2008

課題番号:19591486

研究課題名(和文)

ラット膵脾合併症移植における、制御性 T 細胞を用いたドナー特異的免疫寛容の誘導

研究課題名(英文)

The induction of donor specific tolerance by regulatory T lymphocytes in rat pancreas-spleen transplantation

研究代表者

杉谷 篤(ATSUSHI SUGITANI)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号:00294934

研究成果の概要:

昨年度までに、膵脾合併移植によるグラフト保護効果破綻期の免疫抑制療法併用によって可能になることを示した。最終年度は、そのメカニズムがドナー、レシピエントいずれの由来の Treg が機能しているかを解明する実験を行った。

実験は High responder combination である DA, LEW を用いた。レシピエントである LEW には術前に STZ を静注し糖尿病を誘発した。手術はドナーの膵、脾、十二指腸を一塊にレシピエントの腹腔内に移植した。評価は、graft survival に関しては血糖が再上昇した時点で拒絶と判断し、制御性 T 細胞は CD4,25 を FACS で、Foxp3 を RT-PCR と FACS で解析し、制御性 T 細胞 (Treg) の動向を調べた。またドナー由来の細胞を検出するためにドナーの MHC に特異的な抗体を用いた。

膵移植群と膵脾移植群を作成し、それぞれにタクロリムス(Tac)を術後 4 日間投与した群を作り Control 群と併せて 5 群で比較検討したところ、膵脾合併移植 + Tac 術後 4 日間投与した群でのみ有意なグラフト生着期間の延長を認め、組織でも膵グラフトの構築が保たれていた。そのグラフト保護効果と Treg の関与について RT-PCR で見てみると、生着延長群では脾グラフト内に Treg がより長期間保たれており、ドナー由来の Treg も自己脾、脾グラフト内により長期間存在していた。

レシピエントの Tcell が持続的にグラフト脾にさらされると、Treg に変化することが判明した。移植直後導入期に重要なのは、レシピエント脾臓に移行するドナー細胞のキメリズムとともに、むしろグラフト自身の抗原性が持続的に提示されることとそこに集族するレシピエント由来の Treg である可能性が示された。

交付額

(金額単位:円)

|          | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|----------|-----------|-----------|-----------|
| 平成 19 年度 | 2,200,000 | 660,000   | 2,860,000 |
| 平成 20 年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 年度       |           |           |           |
| 年度       |           |           |           |
| 年度       |           |           |           |
| 総計       | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野:外科学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・外科学一般

キーワード:免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

膵腎同時移植は、若年性糖尿病による末期腎不全に対して施行され、若年性糖尿病患者の生命予後を著明に間然することに寄与している。しかしながら、移植後の拒絶反応の制御は、非特異的な免疫抑制剤に頼らざるを得ず、その副作用や易感染性は、移植医療の臨床で強く解決が望まれている問題の一つである。

以前より、移植された脾臓グラフトには他移植臓器のドナー特異的な保護効果がある事が報告されてきた。脾臓は二次リンパ組織で、本来、自己反応性 T 細胞に対する末梢性寛容誘導の場であり、網内系を通じて何らかのグラフト保護効果を発揮していると考えられるが、その機序の解明は未だなされてはいない。

その末梢性免疫寛容について最近注目されている一つに「制御性 T 細胞による抑制」がある。2003 年に坂口らにより Foxp3 遺伝子が制御性 T 細胞のマスター遺伝子である事が発表され (Science,299:1057-1061,2003)、2005 年には CD4+CD25- のヘルパー T 細胞に Foxp3 を遺伝子導入することで CD4+CD25+ の制御性 T 細胞を誘導し、その細胞を静注して皮膚グラフトの免疫寛容を得たとの報告がなされており (Transplantation,79:1310-1316,2005)、現在注目されている機序の一つである。そこで、我々は脾臓のグラフト保護効果とその機序における制御性 T 細胞に着目し、それらがドナー特異的免疫寛容の誘導に寄与しうるとの仮説を立てた。膵脾は一塊に移植可能な臓器であり、脾臓によるドナー特異的免疫寛容誘導の機序が解明され、その応用が可能となれば、安全な臨床膵移植に大きく貢献できる。

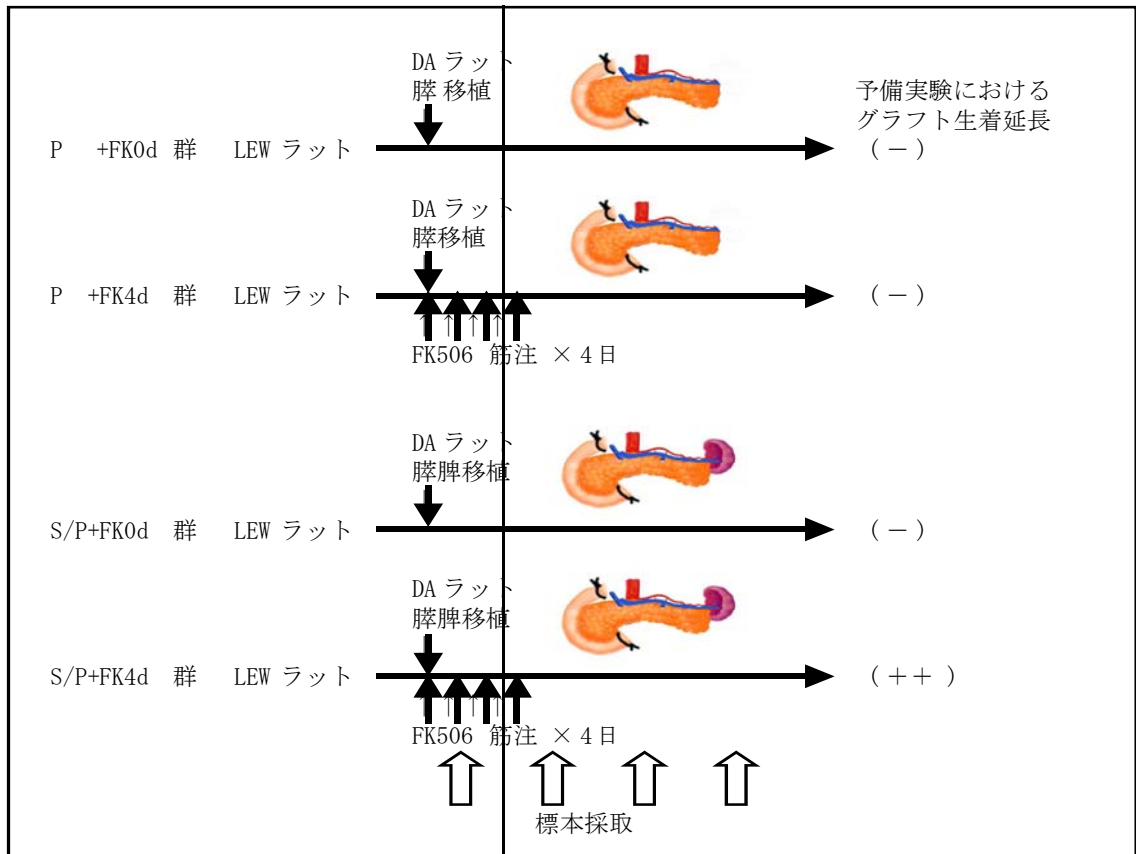
## 2. 研究の目的

2003 年に坂口らにより Foxp3 遺伝子が制御性 T 細胞のマスター遺伝子である事が発表され (Science,299:1057-1061,2003)、2005 年には CD4+CD25- のヘルパー T 細胞に Foxp3 を遺伝

子導入することで CD4+CD25+ の制御性 T 細胞を誘導し、その細胞を静注して皮膚グラフトの免疫寛容を得たとの報告がなされており (Transplantation,79:1310-1316,2005)、現在注目されている機序の一つである。そこで、我々は脾臓のグラフト保護効果とその機序における制御性 T 細胞に着目し、それらがドナー特異的免疫寛容の誘導に寄与しうるとの仮説を立てた。膵脾は一塊に移植可能な臓器であり、脾臓によるドナー特異的免疫寛容誘導の機序が解明され、その応用が可能となれば、安全な臨床膵移植に大きく貢献できる。

## 3. 研究の方法

DA ラットをドナー、Lewis ラットをレシピエントとする。レシピエントには術前 3-5 日前にストレプトゾシン (60mg/kg) を静注し、随時血糖が 350mg/dl 以上であることを確認し糖尿病を誘発する。Lee's technique に従ってマイクロサージェリーの技術を用い顕微鏡下にラット膵脾十二指腸移植を行う。ドナーから大動脈と門脈の血管茎をつけて全膵・脾・十二指腸を en-bloc に摘出後、Lewis の腹部大動脈・下大静脈にグラフトの腹部大動脈・門脈をそれぞれ端側吻合する。グラフトの十二指腸はレシピエントの十二指腸と側側吻合し、膵液ドレナージを行う。膵十二指腸移植群では血流再開直前にグラフトから脾グラフトを取り除く。膵単独移植群 (P 群) と膵脾移植群 (S/P 群) を作成し、それぞれに FK506 を術後 4 日間投与した群 (FK4d 群) と無投与群 (FK0d 群) を作り、計 4 群に分ける。術後は体重、血糖値を測定し、随時血糖が 300mg/dl 以上となった時点を拒絶と判定する。術後一定の期間で動物を犠牲死させ末梢血、脾臓グラフトを採取する。FACS、PCR、免疫染色を用いて制御性 T 細胞を測定し、それぞれの群において移植術後から拒絶に至るまでの制御性 T 細胞の推移と、グラフト生着延長効果との相関を解析する。



#### 4. 研究成果

- 1) P+FK0d 群に対して、P+FK4d 群、S/P+FK0d 群ではグラフト生着延長は得られず、脾臓合併移植と術後短期間の免疫抑制剤を使用した S/P+FK4d 群でのみ延長効果を認めた。
- 2) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞は、末梢血、自己脾、移植脾のいずれにおいてもほぼ全経過を通して S/P+FK4d 群に比し S/P+FK0d 群で同程度もしくは優位であった。
- 3) Foxp3 の発現は、グラフト生着期間が延長した S/P+FK4d 群で優位であった。
- 4) S/P+FK4d 群では S/P+FK0d 群と比し、長期にわたりドナー由来の制御性T細胞が自己脾、移植脾に残存していた。
- 5) 自己脾・移植脾にドナー由来制御性T細胞が長期存在することが免疫寛容の誘導に重要である可能性が示唆された。

#### 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)

[雑誌論文] (計 3 件)

① 杉谷 篤、献腎移植の現場でのHLA検査とクロスマッチ、MHC、査読無、15-1、2008、27-38

② M.Ishibashi, T.Ito, A.Sugitani、Present Status of Pancreas Transplantation in Japan-Donation

Predominantly From Marginal Donors and Modified Surgical Technique: Report of Japan Pancreas Transplantation Registry、Transplantation Proceedings、査読無、40、2008、486-490

③ 杉谷 篤、膵移植患者のQOL、移植、査読無、43-4、2008、282-290

[学会発表] (計 1 件)

Atsushi Sugitani、The Current Status of Pancreas Transplantation in Japan and at Kyushu University、The 38th Annual Congress of the Korean Society for Transplantation & The 7<sup>th</sup> Korea-Japan Transplantation Forum、October 10-11、2008、Korea

[図書] (計 2 件)

① 日本移植学会 日本病理学会、金原出版株式会社、ヒト移植臓器拒絶反応の病理組織診断基準 鑑別診断と生検標本の取扱い(図譜)、2009、115

② 出月康夫・野澤真澄 監修、シュプリンガー・ジャパン、膵臓移植 糖尿病根治を目指して、2009、446

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

杉谷 篤(ATSUSHI SUGITANI)  
藤田保健衛生大学・医学部・教授  
研究者番号:00294934

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

中野 賢二(KENJI NAKANO)  
久留米大学・大学病院・准教授  
研究者番号:00315061  
片野 光夫(MITUO KATANO)  
九州大学・医学研究科・教授  
研究者番号:10145203  
永井 英司(EIJI NAGAI)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号:30264021  
北田 秀久(HIDEHISA KITADA)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号:10403958