

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592065

研究課題名（和文） 小腸移植におけるグラフト腸管の障害・再生機構の解明とその制御

研究課題名（英文） Mechanism of graft injury and regeneration in small bowel transplantation

研究代表者

金廣裕道 (KANEHIRO HIROMICHI)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30204580

研究成果の概要：

小腸移植において、グラフト腸管の障害過程を、マウスモデルを用いて検討した。特に慢性拒絶モデルにおいて、グラフト内に浸潤するメモリーT細胞と調節T細胞は有意に増加しており、これらの機能的な意義が示唆された。血管新生促進因子 VEGF は、慢性拒絶モデルおよび虚血再灌流障害モデルにおいて、障害促進因子として機能することが明らかとなった。治療実験では、VEGF 受容体阻害により、有意に障害が抑制し得ることを見いだした。また、ケモカインや核内受容体もこれらの障害に関与していることを新たに見いだした。さらに血管新生阻害因子 Endostatin の投与により、慢性拒絶反応の抑制を図れ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
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：先天性消化器疾患学

1. 研究開始当初の背景

臨床小腸移植は、短腸症候群や腸管機能不全など多岐にわたる重症及び末期疾患に対する根治治療として、全世界的に実施され、その適応患者は増加している。また近年、新規免疫抑制剤も導入され、臓器移植の移植臓器生着率、患者生存率も向上している。特に最近の短期成績の向上はめざましく、他の臓器移植と比べて、遜色のないものとなっている。しかしながら、移植小腸には元来リンパ

節やパイエル板などの豊富なリンパ組織が存在し、粘膜上皮の免疫原性が極めて強いといった小腸特有の免疫的特徴があり、5年生存率40%程度と未だ長期成績は不良である。しかし、小腸移植において長期成績が不良である主要原因と考えられる慢性拒絶反応のメカニズムについては、これまでほとんど明らかにされておらず、その治療法も確立していない。また小腸移植後には、虚血再灌流障害等の innate immunity とアロ免疫応答による

acquired immunity との両者により、移植小腸上皮は障害を受けているものと考えられる。一方で、周術期の免疫抑制等の治療あるいは本来の生体の防御機構により、腸上皮再生も盛んに行われているものと考えられる。これらの移植小腸の障害および再生機構は、生体内においてダイナミックに絶えず行われているものと考えられるが、その機序の詳細は、現時点ではほぼ不明である。また全世界的にも研究が進んでいない。申請者らは、

- (1) これまでの長年にわたる移植免疫研究、
- (2) 最近教室で得られた腸管再生に関わる研究成果、
- (3) 炎症性腸疾患での腸上皮再生に関する研究結果、
- さらには (4) 最近の免疫学研究での新たな知見等を通じて、小腸移植の際の慢性拒絶反応、腸上皮障害および再生修復機構に関する以下の着想を得た。

(I) 最近の免疫学の研究により、メモリーT細胞が、多様な疾患および病態に重要な関与をしていることが示唆されている。移植免疫においては、こういった細胞が慢性拒絶反応や移植免疫寛容の阻害を行っているのではないかと考えられている。我々は、こういったメモリーT細胞が小腸移植の長期成績に重要な関与を成している可能性があると考え。さらには、(II) これらのメモリーT細胞と、逆に防御的に働く制御性T細胞とのバランスが、移植小腸上皮の障害促進や腸上皮再生の阻害をもたらしているのではないかと考えた。また、こういった細胞を阻害する事が、慢性拒絶反応の抑制や腸上皮障害の抑制、さらには小腸再生の促進に至る可能性があると考え。

2. 研究の目的

小腸移植における新たな病態の解明を試み、さらには小腸移植特異的な免疫制御法の開発を目的とする。目的の各テーマは、(1) マウス小腸移植モデルを用いて、移植後のアロ免疫応答下において、メモリーT細胞や制御性T細胞の発現を詳細に解析し、これらの細胞が小腸上皮障害および免疫抑制下での腸上皮再生に如何に関わっているかを明らかにする。(2) 慢性拒絶反応において、これらの細胞の発現を解析し、in vivo での各T細胞の動態、機能解析を行う。(3) これらの実験から、標的T細胞を同定し、抗体治療による depletion あるいは表面分子マーカー阻害により、小腸移植グラフトの着生延長効果、さらには腸上皮再生促進効果を検討し、臨床応用の可能性を探索する。(4) さらに、これらの制御により、免疫寛容を誘導し得るかを明らかにする。以上の研究を通じて、臨床導入に向けて、従来型とは異なる新規免疫

制御法の確立を目的とし、最終的には臨床小腸移植の治療成績向上を目標とする

3. 研究の方法

(1) 小腸移植慢性拒絶反応におけるメモリーT細胞および調節T細胞の機能解析

MHC class II 不適合間モデル (Donor: C57BL/6^{DM12}, Recipient: C57BL/6) および minor 抗原不適合間モデル (Donor: B10.D2, H-2^d, Recipient: BALB/c, H-2^d) のマウス小腸移植を行う。以上のモデルは、無免疫抑制下において、急性拒絶反応は回避されるものの、移植後8週目以内に拒絶反応が発生する。移植後経時的に犠牲死させ、移植グラフト、腸間膜リンパ節および脾臓を採取する。小腸からはコラゲナーゼ消化およびMACS systemにより、浸潤単核球を回収する。またリンパ節、脾臓からは single cell を準備し、いずれも Real-time PCR, FACS 解析を用いて、CD45R0, CD45RA, CD44, CD62L, CCR7, CD28, CD27 等によるメモリーT細胞や CD4+CD25+T細胞、および特異的とされている転写因子 Foxp3 による調節T細胞の出現等を解析する。

(2) 慢性拒絶反応における in vivo での血管新生の関与の評価

慢性拒絶モデル (MHC class II 不適合間および minor 抗原不適合間移植モデル) では、心移植後には、8週目までに慢性拒絶反応における特徴のひとつである移植後動脈硬化が自然発症し、同時に高度な線維化および細胞浸潤がみられる。同モデルにおいて、移植後2, 4, 6, 8週目に、経時的にマウスを犠牲死させて、同様の検討を小腸グラフトにおいて行う。移植後経時的にマウスを犠牲死させ、移植小腸グラフトを摘出し、HE染色により組織学的に慢性拒絶の程度を判定する。またCD31による微小新生血管、VEGF, flk-1, flt-1等の免疫組織染色および Real-time PCR を行い各々の発現について定量的に評価し、慢性拒絶反応における血管新生の関与について検討する。これらの検討において、総合的に慢性拒絶反応の発生、進展と血管新生の関連、さらには、flk-1, flt-1の各 receptor の生理、病理学的意義が明らかになる事が予想される。

(3) 抗血管新生療法による慢性拒絶反応抑制効果の評価

上記の実験結果から慢性拒絶反応における血管新生の関与および各 VEGF 受容体の病態生理学的意義が明らかになるものと予想される。それらの結果に基づいて、抗 flk-1 モノクロナール抗体(DC101)、抗 flt-1 モノクロナール抗体(MF-1)を、臓器移植後に単独あるいは併用投与を行い、in vivo におけるそれぞれの慢性拒絶反応抑制、制御効果を検討する。さらには、生理的血管新生阻害物質である Endostatin (fragment of collagen XVIII, murine Fc-endostatin)を同様に移植後に投与して、in vivo における慢性拒絶反応に対する免疫制御効果を検討する。

4. 研究成果

(1) 慢性拒絶モデルにおいて、グラフト内に浸潤するメモリーT 細胞と調節 T 細胞は有意に増加しており、これらの機能的な意義が示唆された。

(2) 血管新生は慢性拒絶モデルおよび虚血再灌流障害モデルにおいて、障害促進因子として機能し、VEGF 受容体阻害により、有意に障害が抑制し得ることを見いだした。また、ケモカインや核内受容体もこれらの障害に関与していることを新たに見いだした。

(3) 血管新生阻害因子 Endostatin の投与により、慢性拒絶反応の抑制を図れる可能性がみられた。

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 1 件)

1. Akahori T, Sho M, Hamada K, Suzaki Y, Kuzumoto Y, Nomi T, Nakamura S, Enomoto K, Kanehiro H, Nakajima Y. Importance of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. J Hepatol. 2007 47(6):784-9

[学会発表] (計 1 件)

1. 金廣裕道, 庄 雅之, 赤堀宇広, 檜塚久記, 明石 諭, 中島祥介. 小腸移植にお

けるケモカイン受容体 CCR5 を標的とした新規免疫制御の可能性. 平成 19 年 3 月 10 日. 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金廣裕道 (KANEHIRO HIROMICHI)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30204580

(2) 研究分担者

庄 雅之 (MASAYUKI SHO)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50364063

(3) 連携研究者

なし