

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08273

研究課題名(和文)小腸上皮自家オルガノイド移植は、小腸移植後の拒絶反応を回避できるのか？

研究課題名(英文) Can small intestinal epithelial autologous organoid transplantation avoid rejection after small intestinal transplantation?

研究代表者

黒羽 正剛 (Kuroha, Masatake)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：70709469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小腸移植は拒絶反応が起こりやすくグラフトの生着率は低い。生着率に関与する因子を検証では、11人のレシピエントにおいて小腸移植後の、1年、5年、10年の移植片生存率は、90.0%、78.8%、56.3%であった。IL-2RaおよびATG群における移植片生存率は、それぞれ、83.3%、66.7%、33.3%および100%、100%、100%であった($p=0.08$)。中等度および重度の拒絶反応のない5年生着率は、IL-2Ra群およびATG群でそれぞれ0%、80%であった。ATGが最も重要な因子であり、ドナー小腸の上皮のレシピエント由来細胞に置換は長期生着に関与は限定的であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小腸移植は難治性小腸疾患の究極的な治療法であるが、その生着率が低いことが社会的な問題である。本研究では、移植後の小腸グラフトの生着率に関連する因子を調べ、拒絶反応の回避に必要な因子を明らかとした。生着率に関連する因子を明らかになったことで、移植小腸の長期的な生存率の改善が期待され、小腸移植術の治療成績向上が期待される。また、小腸移植術の治療成績向上は難治性腸疾患の新たな治療戦略の可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Small bowel transplants are prone to rejection and graft survival is low. In testing the factors involved in survival rates, the graft survival rates after small bowel transplantation in 11 recipients were 90.0%, 78.8% and 56.3% at 1, 5 and 10 years. The graft survival rates in the IL-2Ra and ATG groups were 83.3%, 66.7%, 33.3% and 100%, 100%, 100%, respectively ($p = 0.08$). The 5-year survival rates without moderate and severe rejection were 0% and 80% in the IL-2Ra and ATG groups, respectively. ATG was the most important factor, and replacement with recipient derived cells in the epithelium of the donor small intestine was only slightly involved in long-term engraftment.

研究分野：消化器内科

キーワード：小腸移植

1. 研究開始当初の背景

小腸移植の現状と問題点

2018年4月本邦で小腸移植が保険適用となった。小児の先天性疾患である腸軸捻転、先天性小腸閉鎖症、腹壁破裂、ヒルシュスプリング病、成人ではクローン病による短腸症候群など、小腸移植以外治療法がない疾患に対する究極的な治療法であり、今後症例数の増加が見込まれる。しかしながら、リンパ組織の豊富な小腸は他臓器と比較し移植後の拒絶反応が起こりやすく、グラフト生着率は75%(1年)、55%(5年)と低値である(Arq Bras Cir Dig. 2013 Jul-Sep;26(3):223-9)。小腸移植後の拒絶反応の特徴は、陰窩底部のアポトーシスや粘膜固有層の肉芽腫形成、小腸上皮のびらん、潰瘍形成である。上皮幹細胞が存在する陰窩底部の免疫反応が最も強いことから、レシピエントの免疫担当細胞とドナーの腸管上皮(上皮幹細胞)の免疫応答が拒絶反応の要因の一つと推定される。小腸移植の治療成績向上のため、グラフト廃絶のリスク因子の検証やグラフト生着率を向上する新規手法の開発が望まれる。

腸管上皮オルガノイド培養の確立と、再生ツールとしての応用

長らく腸管上皮の *in vitro* 長期培養は不可能であった。腸管上皮は数日間で分化脱落してしまうため、培養には腸管上皮幹細胞を維持する必要がある。2011年、腸管上皮幹細胞の維持に必要なニッチ因子(R-spondin, EGF, BMP 等)(Gastroenterology,2011.141:1762-1772)が同定され、これらを培地に添付する事で腸管上皮幹細胞の培養維持が可能であることが報告された。2016年にはマトリゲル内3次元オルガノイド培養によりほぼ全ての消化管上皮(癌含む)の *in vitro* 長期培養が可能となった(Cell Stem Cell, 2016,Jun 2;18(6))。この手法は消化管領域の *in vitro* 研究を大きく変革させ、これまでの cell line の実験系とは異なる新たな研究ツールとして注目されている。わずかな検体量から患者由来の腸管上皮や癌細胞を培養増殖することが可能なため、癌の個別化医療への応用や、患者由来上皮を用いた消化管再生医療への応用が期待されている。

自己小腸上皮オルガノイド移植は小腸移植後グラフト廃絶を防げるのか？

小腸移植後、ドナー小腸は拒絶反応による損傷と再生を繰り返す。では、再生するドナー小腸上皮細胞はドナー、レシピエントどちら由来なのだろうか？消化管上皮は恒常性維持ため複数の制御機構が存在している。造血幹細胞移植によるGVHD腸炎後、腸管上皮はドナー骨髄由来の細胞に一部置換される事が報告されている(Nat Med 2002 Sep.8(9)1011-7)。つまり、腸管上皮の損傷時は骨髄由来細胞が腸管上皮を修復する役割があるというものである。我々は、小腸移植後でも同様の变化をきたすと推定しており、ドナー小腸の上皮は再生を繰り返す事でレシピエント由来細胞へ置換するのではないかと考えた。さらには、レシピエント由来細胞への置換成功こそがグラフト長期生存に関与しているのではないかと推定した(図1)。また、近年開発された腸管上皮オルガノイド培養技術を用いた自己上皮の移植によりグラフトの長期生着が得られるのではないかと考えた(図2)。本研究での仮説は以下の3点である。小腸移植後の拒絶反応を経て、移植されたドナー由来の小腸はレシピエント骨髄細胞由来の上皮細胞に置換される。レシピエント小腸上皮への置換率が拒絶反応やグラフトの長期生着に関与している。小腸移植後拒絶反応で形成された潰瘍に自己小腸上皮オルガノイド長期培養株を移植することで移植グラフトの長期生着が得られる。これに関しては過去に小腸移植後グラフトから過去に採取した生検検体のうちレシピエント、ドナーの性別が違う組み合わせの標本を用いて、Y染色体の *in situ hybridization* でドナー/レシピエント由来細胞を区別する手法を用いて検証可能である。これに関しては、ラット小腸移植モデルを用いて検証する。将来的にヒト小腸移植後上皮への移植再生医療の応用を視野にいれた基礎研究を行う。

2. 研究の目的

本研究の目的は、小腸移植後のドナー小腸上皮がレシピエント由来小腸上皮へ置換されることをドナー・レシピエントで性別が違う組合せで移植した検体を用いて検証し、グラフト生着率との関連を明らかとする事である。また、ドナーのグラフトにレシピエント由来自己小腸上皮を移植することで、グラフトの長期生存が可能か検証を近年確立された3次元オルガノイド培養システムを用いて検証する。これまで同様の報告はなく、腸管オルガノイドを用いた消化管再生医療の足掛かりとなる基礎研究である。

3. 研究の方法

研究方法

研究1．ドナー小腸上皮細胞のレシピエント細胞への置換率とグラフト生着率に関する研究

(1) 移植小腸標本でのY染色体FISH

男性レシピエントに女性ドナー小腸を移植した8症例を対象とする。女性レシピエントに男性小腸ドナーが移植された2症例、男性レシピエントに男性ドナー小腸が移植された2症例を染色コントロールとする。パラフィンに包埋されている過去に取得済みのドナー小腸の内視鏡生検検体組織を染色する。まずは上皮系マーカーであるサイトケラチンおよび血球系マーカーであるCD45に対するモノクローナル抗体で免疫染色を施行する。その後同一切片でY-FISHシグナルを検出する。顕微鏡下で100個の有核細胞を計数し、上皮領域の総細胞、サイトケラチン陽性細胞、CD45陽性細胞、Y-FISH陽性細胞、Y-FISH陽性/CD45陽性細胞およびY-FISH陽性/CD45陰性/サイトケラチン陽性細胞を測定する。CD45陽性細胞は腸管上皮細胞間リンパ球と考えられるため、Y-FISH陽性/CD45陰性/サイトケラチン陽性細胞を男性レシピエント由来上皮細胞と同一し、上皮細胞に占める割合を求める。

(2) 移植小腸上皮のレシピエント由来細胞への置換率とグラフト生着率との関連

当院での小腸移植後のグラフト生着率、患者生存率を右図に示す。レシピエント細胞への置換率がグラフト生着率や患者生存率に与える影響をrog-rank testで求める。他の臨床因子(免疫抑制時等)とともにcox比例ハザードモデルを用いて多変量解析する。

研究2．ラット小腸上皮オルガノイド長期培養株の樹立

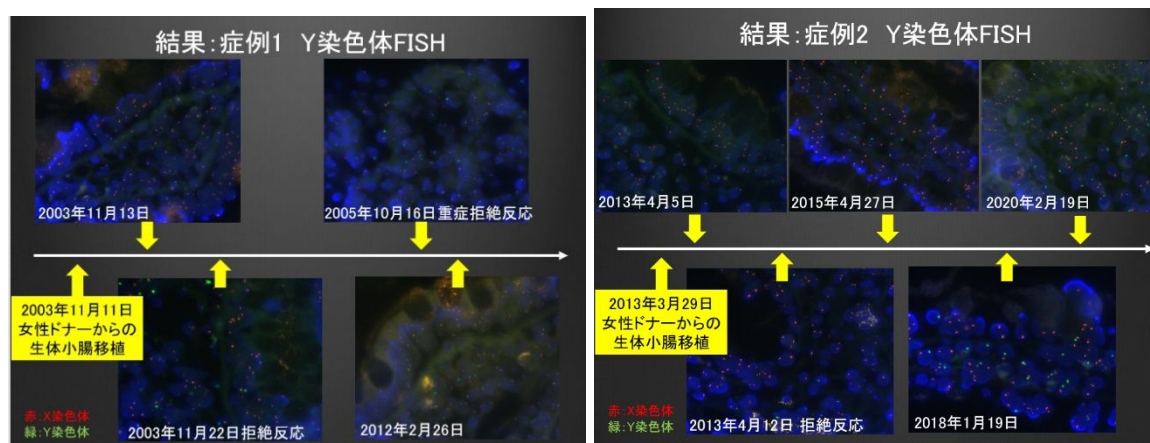
研究3のラット小腸移植モデルでドナーとして用いるLewis(LW)ラットのラット小腸上皮を単離する。単離した上皮細胞をマトリゲルに包埋しニッチ形成因子(EGF、Noggin、B-27、ガストリン等)を添加し疑似的なニッチを保つことで長期培養可能となる。筆者らはすでに別研究で最も樹立が難しいヒト腸管上皮の三次元オルガノイド株を樹立済みである(上図)。樹立したオルガノイドにウイルスベクターを用いて遺伝子導入しGFPを発現させる。

研究3．ラット小腸移植モデルへの小腸上皮オルガノイド培養の移植(担当:和田、工藤)

ラット小腸移植モデルとしてLW及びBrown-Norwy(BN)を用いる。ドナー空腸を腸間膜動静脈と共に切除しレシピエントの腹大動脈、下大静脈と端側吻合し血行再開の後グラフトをレシピエント空腸に移植する。拒絶反応群(ドナーにBN、レシピエントにLW)非拒絶群(ドナー、レシピエントともにLW)の2群を作成する。この拒絶モデルは術後5日目に軽度、7日目に中等度、10日目に高度拒絶を呈する。各群に移植翌日から研究2で作成したLW由来のGFP小腸上皮オルガノイドを注腸法で移植。オルガノイド移植群と非移植群の生存率を比較し、尾静脈からの採血で炎症性サイトカインを測定する。また、移植後移植後3,5,7日後に犠牲死させ小腸を摘出し、摘出標本を蛍光顕微鏡で観察しGFPでラベリングした移植オルガノイドの生着率を求める。

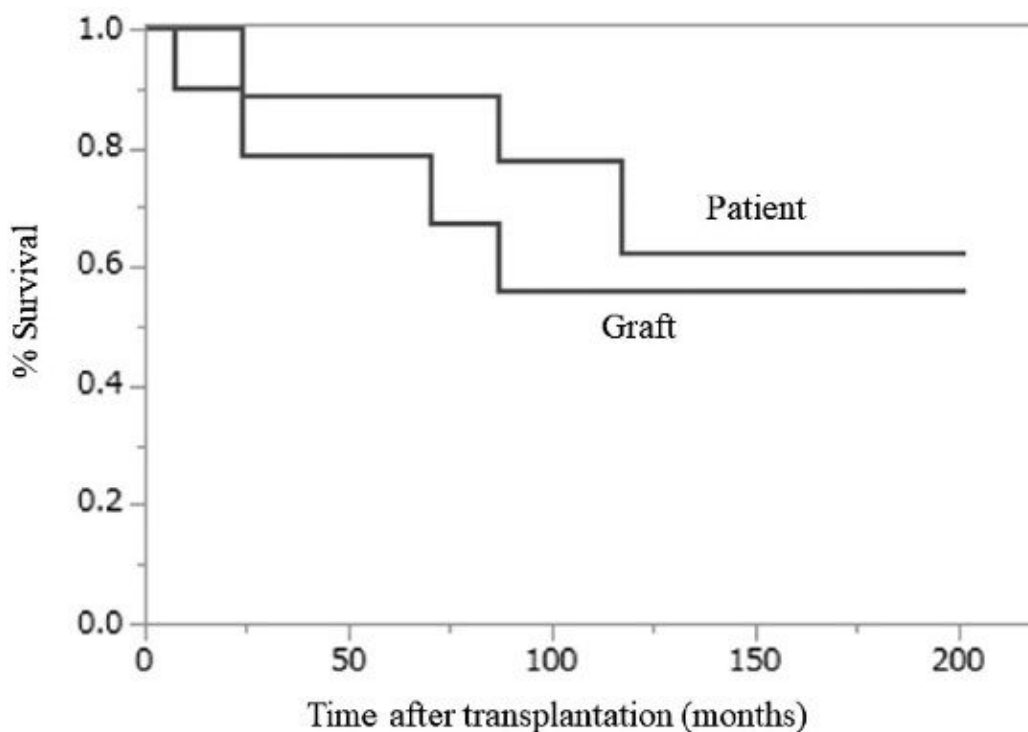
4．研究成果

移植片の自己幹細胞由来上皮への置換率と長期生着率の関連について



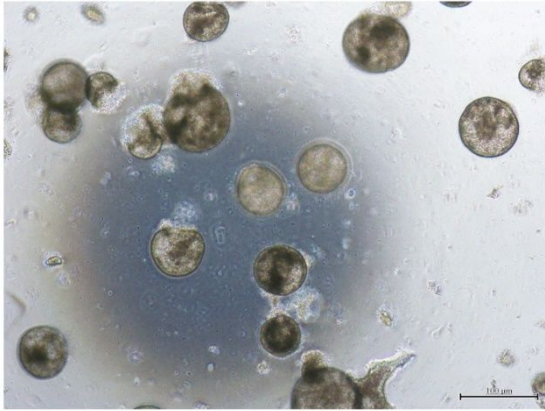
男性レシピエントに女性ドナー小腸を移植した症例を対象とし、パラフィンに包埋されている過去に取得済みのドナー小腸の内視鏡生検検体組織を染色した。まずは上皮系マーカーであるサイトケラチンおよび血球系マーカーであるCD45に対するモノクローナル抗体で免疫染色を施行する。その後同一切片でY-FISHシグナルを検出する予定であった。CD45染色、およびY染色体の染色は可能であったが、サイトケラチンの染色は困難であったため、CD45染色とY染色体を用いて検証した。図に示すように、Y染色体陽性の上皮細胞は移植後早期から晩期にわたって検出された。しかしながら、拒絶反応の程度と置換率には相関を認めなかった。移植生存散らに関連する

11人のレシピエントにおける11小腸移植移植片の1年、5年、および10年患者生存率および移植片生存率は、それぞれ100%、88.9%、62.2%、および90.0%、78.8%、56.3%であった。IL-2 Ra群とATG群の追跡期間の中央値はそれぞれ197.3ヶ月と87.3ヶ月であった。患者の1年、5年、10年生存率は、IL-2 Ra群とATG群でそれぞれ100%、83.3%、50%、100%、100%、100% (P=0.25)であった。)IL-2 Ra群とATG群でそれぞれ83.3%、66.7%、33.3%、100%、100%、100% (P=0.08)であった。中等度および重度の急性拒絶反応の発生率はIL-2 Ra群で100%、ATG群で20%であった(P=0.02)。1年および5年の中等度および重度の拒絶反応のない生存率は、IL-2 Ra群で33.3%、ATG群で0%、80%、80%であった(P=0.04)。ATGはIL-2 Raと比較して中等度および重度の急性拒絶反応を有意に抑制し、それにより短期および中期の拒絶反応のない生存率が良好であることを示した(共同研究者 工藤らによる検証)。



ラットを用いた実験は新型コロナウイルス感染症のため実験の開始が大幅に遅れた。前年まで、ラット小腸、大腸オルガノイドの効率的な樹立が困難であったため、まずは本年度では効率的なオルガノイドの樹立を目標とした。ラット大腸のオルガノイド樹立の効率は、Wnt、EGF、A83-01、Rspo1、Noggin、Igf、Fgfを含む無血清培地や、市販の人オルガノイド樹立用の培地でも著変はなく効率的に培養が可能であった。一方で、ラット小腸オルガノイドの培養は非常に効率が悪く、様々な培地や条件を検証する必要がある。複数の条件を設定し、市販のヒトオルガノイド樹立用培地、自作のWnt、EGF、A83-01、Rspo1、Noggin、Igf、Fgfを含有する培地、さらには、それらの培地にFBSを0-20%の間で振り分け、樹立の効率を確認した。また、小腸絨毛の単離方法も変更した。その結果、初回の樹立では比較的効率的に培養することが可能であった。しかしながら、継代を繰り返すことで徐々にオルガノイドの数が減少し、十分量のラット小腸オルガノイドの樹立が困難であった。そのため、LEW-Tg(Gt(ROSA)26Sor-luc)11Jmsk系統を用いて同様の検証を行う予定である。共同実験者によるラット移植の手技についても同様に取得しており、今後は準備ができ次第移植実験を試みる予定である。

大腸 弱拡大

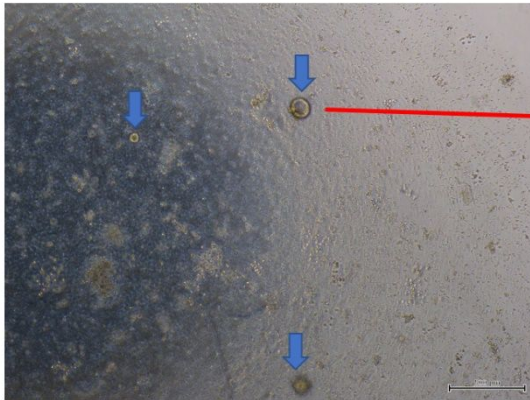


大腸 強拡大



オルガノイド構造を形成
→凍結保存へ

ラット回腸末端



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Kudo Hironori, Wada Motoshi, Sasaki Hideyuki, Fukuzawa Taichi, Ando Ryo, Okubo Ryuji, Hashimoto Masatoshi, Endo Yuki, Tada Keisuke, Nakajima Yudai, Nakamura Megumi, Yamaki Satoshi, Nio Masaki	4. 巻 53
2. 論文標題 Intestinal Transplantation at a Single Institution in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 2040 ~ 2045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2021.06.021	査読の有無 無
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0件

〔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
研究分担者	工藤 博典 (Kudo Hironori) (00723032)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	
研究分担者	和田 基 (Wada Motoshi) (80372291)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	梅田 みか (渡辺みか) (Umeda Mika) (20292344)	東北大学・大学病院・准教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------