

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791241

研究課題名(和文) 小児移植医療発展のためのグラフト急性炎症を標的とした
新規治療戦略の開発研究課題名(英文) Developing a novel therapy targeting graft inflammation in pediatric
organ transplantation.

研究代表者

藤代 準 (FUJISHIRO JUN)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：60528438

研究成果の概要(和文)：臓器移植の際には、移植時操作・虚血再灌流障害・免疫反応が複雑に関係し、移植臓器に重篤な炎症を惹起し、短期的・長期的な移植臓器障害を生じる。本研究では、1)ラット小腸移植時に移植直後から筋層において非特異的炎症とT細胞性の活性化が生じ、タクロリムスとラパマイシンは移植直後から炎症の抑制に関与し、腸管運動機能の改善に寄与する、2) 長期間作用型のエリスロポイエチン誘導体ダルベポエチンはラット肝虚血再灌流障害モデルにおいて臓器保護効果を有する可能性があることを示した。

研究成果の概要(英文)： Graft manipulation, ischemia/reperfusion injury and acute rejection all initiate a severe cellular and molecular inflammation in graft organ, which would impair short- and long-term graft function. In this study, I showed that 1) non-specific and T cell mediated inflammation process occurred in graft muscle layer just after reperfusion in rat small bowel transplantation, tacrolimus and sirolimus both reduced above-mentioned complex inflammation and improved graft motility and 2) long-acting erythropoietin analog darbepoetin had promising organ-protecting effect in rat liver ischemia/reperfusion injury model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：移植外科学、小児外科学

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：虚血再灌流障害、グラフト炎症、免疫抑制剤、拒絶反応、臓器保存

1. 研究開始当初の背景

臓器移植は肝臓・腎臓・心臓・肺・小腸等の生命維持に必須な臓器における末期臓器不全に対する唯一の救命治療として 20 世紀後半より臨床の場に登場した。免疫抑制療法を中心とした集学的治療の進歩と共にその成績は向上し、現在では実験的医療ではない一治療手段として全世界で施行されている。また、移植患者の良好な quality of life(QOL) が広く認識されると共に、臓器移植は瀕死の重症臓器不全に対する救命治療から臓器不全により QOL が著しく低下した患者に対する QOL の改善を目的とした治療という側面も有するようになってきている。

現在の移植医療が抱える問題点には、深刻なドナー不足、長期的グラフト生存率の更なる向上が挙げられる。近年の移植医療の成績向上や臓器移植が医療費抑制につながる事が広く認識されるにつれて移植待機患者数は拡大の一途を遂げている。その結果移植待機中の死亡患者数は移植を受けた患者数に迫りつつあり、ドナー不足の解消・ドナー拡大は急務である。ドナー拡大の方策として高齢者・全身状態不良例・心停止例等のマージナルドナーの拡大と臓器保存時間の延長が考えられており、その実現のためには主に虚血再灌流障害による移植直後のグラフト障害・グラフト不全に対する総合的な治療法の確立が望まれる。免疫抑制療法が進歩した現在の移植医療においても、長期成績を規定する主要な因子は拒絶反応の制御である。比較的成績が安定している腎移植では急性拒絶反応は良好にコントロールされつつあるが、血管閉塞と線維化を主体とする慢性拒絶反応による長期的なグラフトロスはまだ解決されていない。また、高い免疫原性と感染症の問題から至適免疫抑制が極めて困難な小腸移植においては、移植後短期の生存率は向上したものの移植後 1 年以降の長期生存率は 1985 年以降全く改善しておらず、急性・慢性拒絶反応の制御による長期成績の向上が必要であることを端的に示しており、更なる研究が望まれている。

2. 研究の目的

従来の移植領域研究の中では、虚血再灌流障害、臓器保存、急性・慢性拒絶反応というテーマはそれぞれ独立して捉えられることが多い。本研究では、“移植後のグラフト急性炎症”が虚血再灌流障害、臓器保存、急性・慢性拒絶反応の全てと密接に関連している点に着目した。本研究“移植医療の革新のためのグラフト急性炎症を標的とした包括的

治療戦略の開発”は、グラフト急性炎症における虚血再灌流障害と拒絶反応の相互作用のメカニズムを包括的に解析し、更に単なる基礎研究に終わることなく臨床応用可能性の高いグラフト急性炎症の制御法を確立することにより、移植医療の現場でのドナー拡大と長期成績の向上に貢献することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 移植腸管筋層における急性炎症に関する検討

①動物実験プロトコール

Brown Norway ラットをドナー・レシピエントに用いた同系間、または Brown Norway ラットから Lewis ラットへの異系間の同所性小腸移植を行った。保存液には UW 液を用い、移植時の冷阻血時間、温阻血時間はそれぞれ約 30 分、25 分とした。異系間小腸移植を施行したレシピエントラットは、タクロリムス群 (Tac: 1mg/kg/day, 筋注)、シロリムス (ラパマイシン) 群 (Sir: 2mg/kg/day, 腹腔内投与)、異系移植コントロール群 (Allo: 無治療) に分けた。タクロリムス・シロリムスの投与量・投与方法は、文献的に用いられている方法に従い決定した。同系間小腸移植を施行したレシピエントラットは、同系移植コントロール群として治療は行わなかった。レシピエントラットは移植後 24 時間、7 日で犠牲死させ、移植小腸をサンプリングした。サンプリングした移植小腸片からは、腸管筋層を分離し、組織化学的・免疫組織化学的検討と mRNA の抽出、in vitro 収縮能測定を施行した。

②組織学的・組織化学的・免疫組織化学的検討

移植小腸片の組織学的検討にはホルマリン固定、ヘマトキシリン・エオジン染色したものをを用い、急性拒絶反応の重症度は Wu らの報告 (Transplant. 2003) に従って分類した。

TUNEL 染色はキット (In situ cell death detection kit, Roche Biochemicals) を用いて、マニュアルに記載された方法で行い、腸管筋層の TUNEL 陽性細胞数をカウントした。

移植片の T 細胞の免疫染色には抗ラット CD3 抗体 (Serotec)、LSAB2 system-HRP (Dako) を用いてマニュアルに記載された方法で施行した。

移植小腸片から実体顕微鏡下に粘膜組織を剥離し、腸管筋層の whole mount 標本作製し、ミエロペルオキシターゼ染色、ED1 染色に用いた。好中球を染色するミエロペルオキシターゼ染色は過去の文献に報告された方法で施行し、陽性細胞数を顕微鏡下に計測

した。マクロファージ・単球を染色する ED1 (Serotec) 免疫組織化学では、蛍光顕微鏡下に陽性細胞数を計測した。

③Real time RT-PCR

移植腸管の筋層から total RNA を抽出し cDNA を作成、TaqMan プローブを用いて 18S, CD4, CD8a, IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ , MCP-1, ICAM-1, Cox-2, iNOS の mRNA 量を定量した。TaqMan Gene Expression Master Mix, AbiPrism7900 (Applied Biosystems) を用いて PCR 反応は行い、 $\Delta \Delta$ CT 法で定量比較を行った。移植を行っていないコントロール腸管筋層での mRNA 発現量との比で表示した。

④移植腸管筋層の機能的検討

腸管筋層の収縮能は organ bath 法を用いて測定した。最初に 10 分間の自発収縮を測定した後、0-300 μ M のベタネコール刺激による収縮を測定、収縮反応は $g/mm^2/s$ で計算・表示した。

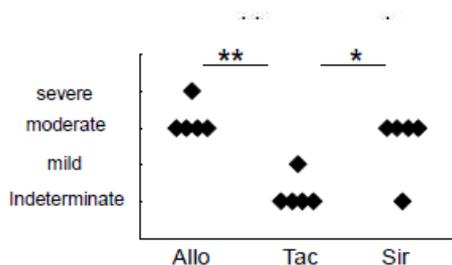
(2) 長時間作用型エリスロポエチン誘導体ダルベポエチンの肝虚血再灌流障害に対する作用の検討

①実験には Wistar ラットを用い、イソフルレン麻酔下に血管クリップを用いて 30 分の全肝虚血を加えた。手術開始時 (全肝クランプ 10 分前) にダルベポエチン (15 μ g/kg) または生理食塩水を iv で投与した。再灌流 6 時間後に動物は犠牲死させ、血清を採取し、肝障害の指標として AST, ALT を測定した。

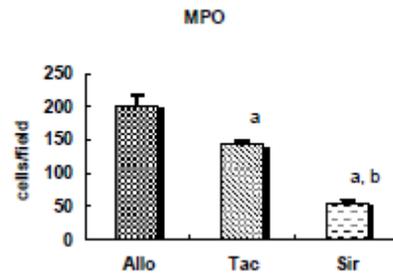
4. 研究成果

(1) 移植腸管筋層における急性炎症に関する検討

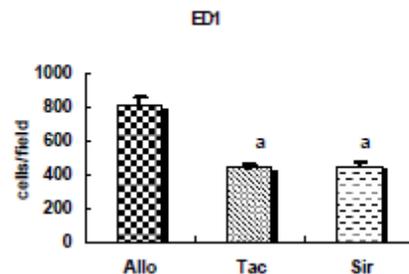
本研究で用いた急性拒絶反応の grading では、主に腸管粘膜、粘膜下層の所見から、急性拒絶反応を indeterminate, mild, moderate, severe に分類される。移植後 7 日の検討で、異系間移植コントロール群では全ての移植片が moderate 又は severe に、タクロリムス群では indeterminate から mild に、シロリムス群では indeterminate から moderate に分類され、タクロリムス群ではシロリムス群に比して急性拒絶反応は有意に抑制されていた。



タクロリムス・シロリムスがそれぞれ移植腸管筋層への好中球とマクロファージの浸潤を抑制するかどうかを検討するため、移植腸管筋層の whole mount 標本を用いてミエロペルオキシターゼ (MPO) 染色・ED1 (抗ラットマクロファージ/単球抗体) による染色を行った。MPO 染色では、異系間移植コントロール群では移植後 24 時間で著明な好中球の浸潤 (208 \pm 37cells) を認めた。タクロリムス・シロリムス治療群では浸潤好中球数はそれぞれ 73%, 26% に有意に減っていた。シロリムス群ではタクロリムス群に比べて有意に浸潤好中球数が減少していた。

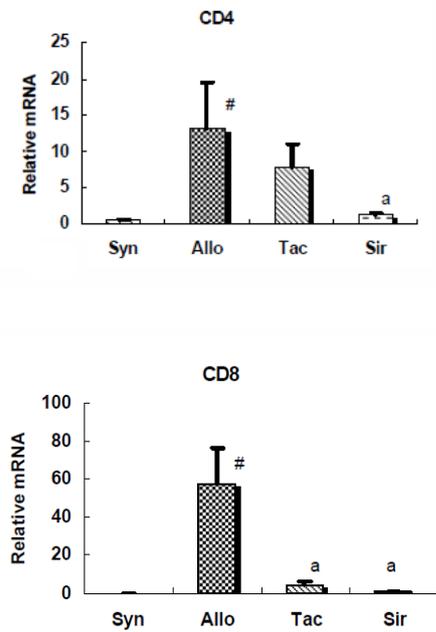


移植後 7 日では、異系間移植コントロール群では移植腸管筋層に著明なマクロファージの浸潤 (803 \pm 97cells) を認めたが、タクロリムス群・シロリムス群ではマクロファージの浸潤が抑制されていた (それぞれ 420 \pm 46 cells, 445 \pm 39 cells)。従って、異系間移植は移植後初期から著明な好中球・マクロファージの筋層への浸潤をもたらし、それは、タクロリムス・シロリムスによって軽減されることが示された。

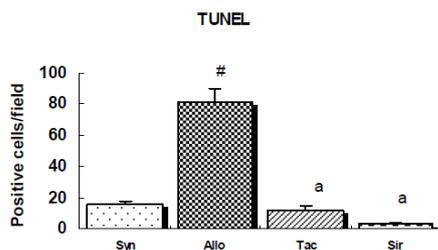


抗原によって活性化された T 細胞の浸潤を評価するために、CD3 免疫組織化学を施行した。移植後 7 日の異系間コントロール群では同系間コントロール群と比べて著明な T 細胞浸潤を認め、予想されたとおりタクロリムス・シロリムス群では筋層への T 細胞浸潤が抑制された。次に CD4、CD8 陽性 T 細胞の筋層への

浸潤傾向を定量的に評価するため、定量 RT-PCR 法を用いて筋層内の CD4, CD8 mRNA 量を比較した。異系間コントロール群では CD4, CD8 mRNA 量が著明に増加しており、タクロリムス群、シロリムス群で CD4, CD8 mRNA 量は有意に減少していた。これは CD4, CD8 陽性 T 細胞の浸潤の減少を示唆している。

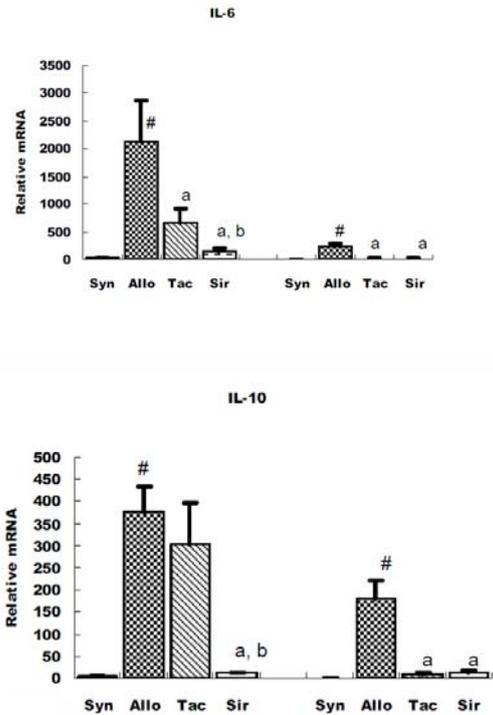


急性拒絶反応は移植片でのアポトーシスの増加を引き起こすことが知られており、移植小腸筋層のアポトーシス細胞を TUNEL 染色にて評価した。移植後 7 日では、同系間コントロール群と比べて、異系間コントロール群ではアポトーシスは有意に増加し、タクロリムス群、シロリムス群ではアポトーシスの増加が有意に抑制されていた。

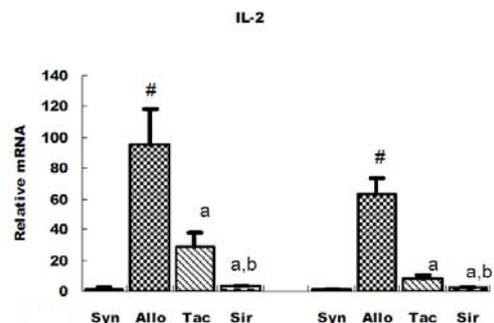


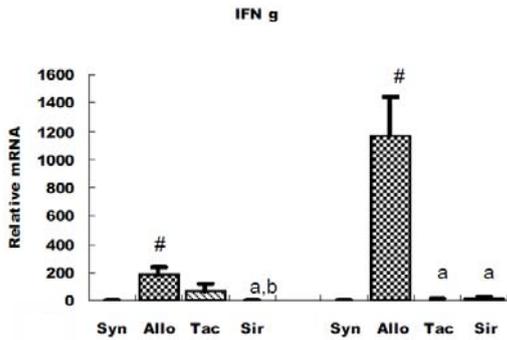
炎症性・抗炎症性サイトカインである IL-6, IL-10 の筋層での発現を定量 RT-PCR 法にて比較した。異系間コントロール群では IL-6, IL-10 は移植後 24 時間で有意に (同系間コントロール群の 2137 倍、376 倍) 増強しており、移植後 7 日でも有意な増強は持続していた。タクロリムス群では移植後 24 時間では IL-6 の発現増強は抑制されていた (649 倍) が、IL-10 の発現増強は有意差を認めなかった。

シロリムス群では移植後 24 時間では IL-6, IL-10 の発現増強の有意な抑制を認めた (149 倍、12 倍)。

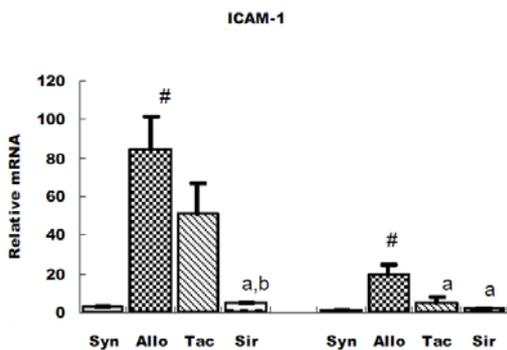
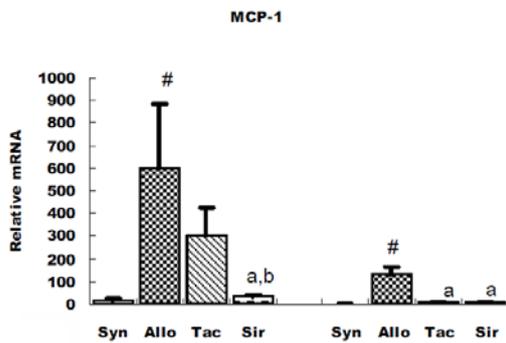


移植によって賦活化された T 細胞の指標として、Th1 T 細胞性のサイトカインである IL-2, INF γ の mRNA を定量化した。移植後 24 時間で、異系間コントロール群の移植腸管筋層における IL-2, INF γ mRNA の発現は著明に増強し (95 倍、187 倍)、これはタクロリムス群、シロリムス群では抑制されていた。移植後 7 日では急性拒絶反応を反映して、異系間コントロール群では INF γ の発現が移植後 24 時間と比較して 6.3 倍に増強していた。タクロリムス群、シロリムス群では移植後 7 日の時点でも IL-2, INF γ mRNA の発現増強は抑制されていた。





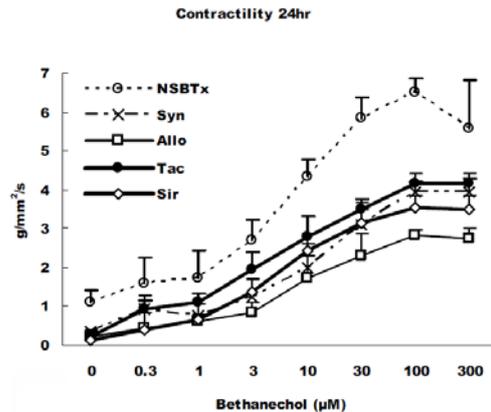
白血球の血管外浸潤に関与する因子である MCP-1 と ICAM-1 の発現は、異系間コントロール群では移植後 24 時間 (598 倍、84 倍)・7 日 (131 倍、19 倍) の時点で著明に増強していた。タクロリムス群では移植後 7 日の時点では発現増強を有意に抑制していた (5.8 倍、5.2 倍) が、24 時間後ではその効果は有意ではなかった。シロリムス群では移植後 24 時間 (31 倍、5 倍)、7 日時点 (4.3 倍、1.8 倍) で MCP-1, ICAM-1 の発現増強を有意に抑制していた。



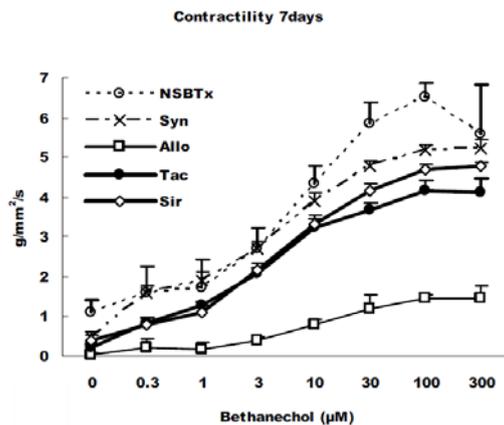
移植腸管筋層収縮能の検討

タクロリムス・シロリムスの移植腸管収縮能への影響を検討するため、筋層の収縮を organ bath を用いて検討した。異系間コントロール群では、移植後 24 時間の時点で収縮能は移植していない腸管の 43%に減少しており、これは同系間コントロールに比べて有意

に低下していた。タクロリムス群・シロリムス群では移植後 24 時間の時点でも収縮能の低下が有意に軽減されていた。



移植後 7 日では、異系間コントロール群では急性拒絶反応を反映して収縮能は更に低下していたが、タクロリムス群・シロリムス群では収縮能は改善していた。

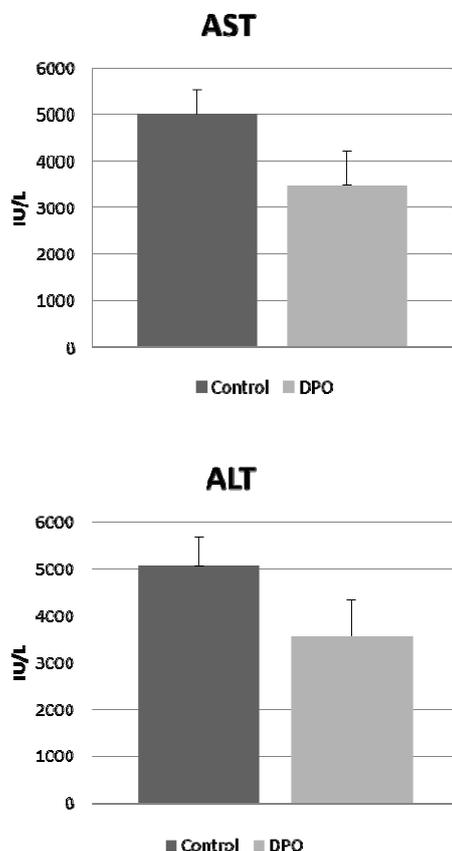


異系間小腸移植では著明な細胞性・並びに分子生物学的な炎症が移植後のごく早期から惹起され、移植片の運動機能悪化に関与することが示された。臨床で用いられている 2 種類の免疫抑制剤、タクロリムスとシロリムスはこれらの炎症の抑制し、運動機能を改善する。急性拒絶反応への効果とは対照的に、今回の検討ではシロリムスがより強く炎症を抑制する傾向が見られた。同系間移植と比較して、異系間移植において移植後 24 時間の早期においてもより激しい炎症が惹起されていることから、移植後早期の炎症をコントロールする戦略は臓器移植医療の向上に寄与する可能性がある

(2) 長時間作用型エリスロポエチン誘導体ダルベポエチンの肝虚血再灌流障害に対する作用の検討

虚血再灌流障害後 6 時間の検討では、コン

トロール群では AST, ALT の著明な上昇 (AST:5011±531IU/L, ALT:5070±613IU/L)を認め、重篤な肝障害を示唆した。DPO 投与群では、AST,ALT の上昇は軽減される傾向を認めた (AST:3497 ± 738IU/L, ALT:35877 ± 770IU/L)。



長期間作用型エリスロポイエチン誘導体ダルベエポチンの肝虚血再灌流障害に対する保護効果を期待させるものであったが、個体差が大きく今後の検討にはモデルの改良が望まれる結果であった。

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 Fujishiro J, Pech TC, Finger TF et al(他 8 名、1 番目), Influence of immunosuppression on alloresponse, inflammation and contractile function of graft after intestinal transplantation, American Journal of Transplantation, 査読有、Vol. 10、No. 2、2010、pp. 1545-1555

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤代 準 (FUJISHIRO JUN)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・

講師

研究者番号：60528438