

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08654

研究課題名(和文) 複合組織移植における拒絶反応の網羅的解析 マウス顔面移植モデルを用いてー

研究課題名(英文) Monitoring of immune response after face transplantation in mice

研究代表者

中川 美和(森田美和)(Nakagawa, Miwa)

福岡歯科大学・口腔歯学部・客員教授

研究者番号：90329699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚、粘膜、血管、骨など複数の組織を含む複合組織移植は、手術後の各組織における免疫反応が明らかでないために拒絶反応の診断基準が十分確立されていない。そこで本研究では複合組織移植後の免疫反応を網羅的に解析するために、さまざまな解析に適応可能な実験動物であるマウスを用いて複合組織の一つである顔面組織移植モデルを確立した。このモデルはこれまでに報告されているマウス顔面移植モデルと比較して、移植片の虚血によるダメージは少なく、レシピエントへの侵襲も少ないと考えられる。また移植片にはより多種の組織が含まれているため、移植後の経時的拒絶応答を網羅的に解析するために大変有用なモデルであると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床における複合組織移植後の拒絶反応の判定は現在のところ暗中模索であり、移植後の免疫応答の正確な判定及びバイオマーカーの開発は急務であることから、動物実験モデルを用いた前臨床的な免疫病理学的解析が有用である。そこで本研究では、様々な免疫学的解析が可能な実験動物であるマウスを使用して複合組織移植の一つである顔面組織移植手技を確立した。このマウスモデルを用いてさらに解析を進めることで得られる免疫反応の詳細な情報は、今後の顔面移植を含めた複合組織移植の診断基準、治療方針、予後の改善に大きく貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Features and mechanisms of acute or chronic rejection hasn't been fully elucidated in vascularized composite allotransplantation (VCA). It is an urgent task that an establishment of a reliable criteria for a diagnosis and a control the rejection response in VCA. To evaluate the unique VCA rejection features in each of the component tissues of the graft, we established a model of facial transplantation, one of VCA, using mice, which have abundant immunological experimental tools for detailed analysis of immune responses to VCA grafts and the histological change was tracked overtime. This model can be useful for elucidating the features and mechanisms of an acute and a chronic rejection, and establishing tolerance induction methods or VCA.

研究分野：移植免疫学

キーワード：複合組織移植 マウス 拒絶反応

1. 研究開始当初の背景

複合組織移植の一つである顔面移植は悪性腫瘍や事故などで顔面の一部が欠損、変形した患者に対して行われる移植手術で、骨、軟骨、腱、靭帯、筋肉、神経、血管、皮膚などの複合的な組織が移植片として用いられる。2005年に世界で初めて顔面移植が行なわれて以来、マイクロサージェリーによる再建術の進歩や、CT画像のコンピューター解析技術の発展による詳細な術前検査の施行、免疫抑制剤の服用などにより、顔面移植患者の社会生活への復帰は後押しされている。ただ、移植組織片への拒絶反応を抑制するために使用される免疫抑制剤は、生体の免疫系が正常に機能することを妨げるため、移植患者は半永久的に悪性腫瘍や感染症などの発症の危険に晒され、十分なQOLが得られたとは言い難い。顔面移植を含む複合組織移植後の病理学的拒絶反応判定基準は「the Banff 2007 Working Classification」に報告されている (Am.J. Transplant. 8:1396, 2008) が、皮膚のリンパ球浸潤と有棘細胞のアポトーシス及び組織壊死に基づく分類であり、本分類が移植片全体の拒絶応答を反映しているかどうか、拒絶応答時の各組織の感受性の hierarchy はどのようになっているのか、本拒絶スコアが拒絶反応の治療応答性を反映しているのかは不明である。この様に、複合組織移植後の拒絶反応の判定は暗中模索のため、拒絶応答の正確な判定法及びバイオマーカーの開発は急務となっている。臨床の多彩な複合組織移植片、レシピエント及びドナーの多彩な遺伝学的背景、経時的な移植片全体の組織が入手困難な事等を考慮に入れると、ヒトの検体のみで複合組織移植における拒絶応答の分子免疫学的機序の詳細な解明や基礎免疫病理学的理論の構築は困難であると言わざるを得ない。これを打破するために、動物実験モデルを用いた前臨床的な免疫病理学的解析が有用であるが、未だ複合組織移植拒絶応答の根本的な基礎免疫学的知見が不足しているため、実験施行に費用がかかり大きな施設が必要とされるコモンマームセット、ブタや犬などの大動物実験よりも、遺伝学的に均一で、様々な遺伝子改変動物や抗体が入手容易なマウスモデルの確立とそれを用いた詳細な拒絶メカニズムの解明が有用と考えられる。現時点において、大動物実験や臨床応用可能な基礎免疫学的知見を提供できる系統立ったマウスモデルは未だ確立されていない。

2. 研究の目的

上記の背景の中、本研究では複合組織移植の一つである顔面異系移植片を用いたマウスモデルを確立し、以下に掲げる主要項目を明らかにし、大動物実験や臨床応用可能な基礎免疫学的知見の礎を築く。

- (1) 複合組織を含むマウス異所性半顔面移植手術を確立する。
- (2) 各組織における経時的拒絶応答を画像形態学的・分子病理学的に解析し、複合組織移植の基礎免疫病理学的理論の構築と免疫病理学的拒絶スコアの構築を行う。
- (3) 動物実験及び臨床応用可能な複合組織移植のドナー組織特異的免疫寛容誘導法を樹立する。

3. 研究の方法

- (1) 複合組織を含むマウス異所性半顔面移植手術を確立する。
- (2) 各組織における経時的拒絶応答を画像形態学的・分子病理学的に解析し、複合組織移植の基礎免疫病理学的理論の構築と免疫病理学的拒絶スコアの構築を行う。
- (3) 大動物実験及び臨床応用可能な複合組織移植のドナー組織特異的免疫寛容誘導法を樹立する。

4. 研究成果

(1) マウス異所性半顔面移植手技

顔面移植手技はKulahci らのラットを用いたモデル (Microsurgery. 36:230, 2016) をマウスに応用し、ドナー及びレシピエントマウスには同系組み合わせを使用した。移植片はドナーマウスの右顔面部から外耳、眼瞼、鼻腔、上顎骨、上切歯、総頸動脈、外頸静脈を全て含む皮膚片を摘出したのち外頸静脈にカフを装着し、冷ラクテック中に保存した。レシピエントマウスは右大腿動静脈部を露出させ、右大腿動脈にカフを装着し、移植片の総頸動脈および外頸静脈をレシピエントの大腿動脈及び大腿静脈にカフ法にてそれぞれ吻合したのち、移植片の皮膚をレシピエントの鼠蹊部から腹部にわたり縫合した。移植片摘出及びカフの装着に 1 時間 58 分 ± 11 分、レシピエント手術に 59 分 ± 13 分を要した。移植片の温阻血時間は 29 分 ± 13 分であった。

(2) 移植片の肉眼的観察

移植後の肉眼的観察では、移植後数日から移植片の浮腫が見られたが、数日間消失した。グラフトの虚血・鬱血、出血の有無、硬化、萎縮などは観察されなかった。洞毛は移植後約 7 日目より伸び始め、2 週間以降にはグラフト表皮に発毛が観察された。右下肢は移植直後から底屈が見られたものの約 2 週間後には正常に動くようになった。術後約 1 ヶ月からは歯が伸長し始めた。レシピエントの移植片への傷害行為は見られなかった。

(3) 組織学的および形態学的解析

組織学的および形態学的解析には移植後 100 日以降に摘出された移植片を使用した。

組織学的解析には、移植片のパラフィン切片を用いたヘマトキシリン・エオジン

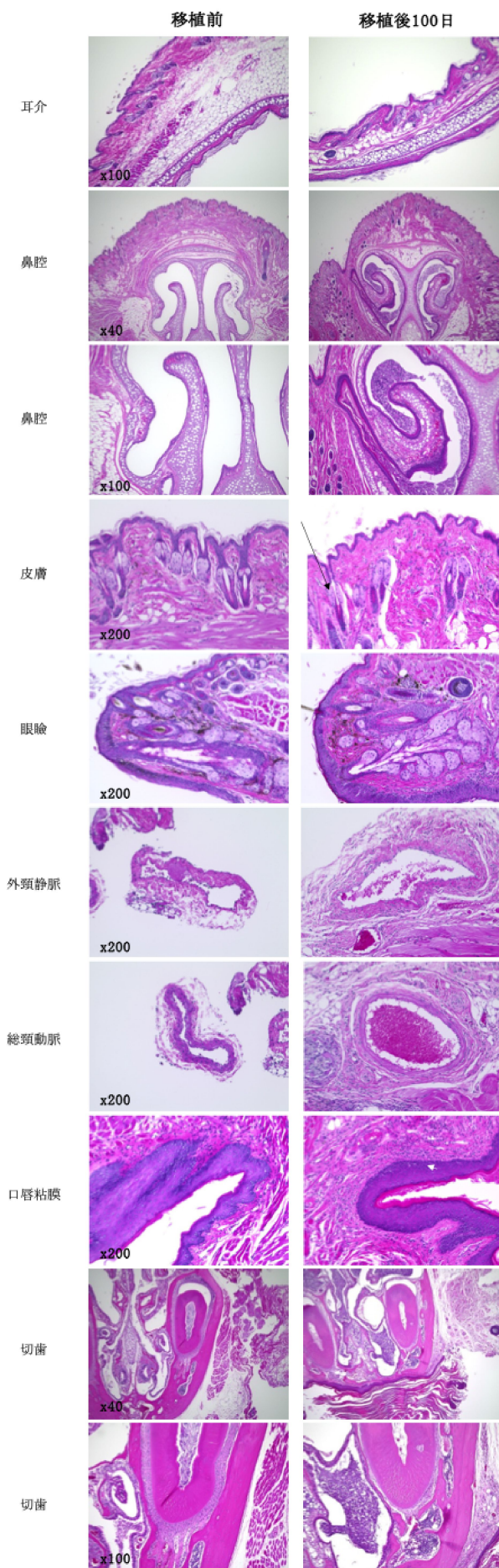


図1. 各組織における移植後のHE染色像

(HE)染色を行い、耳介、鼻腔、皮膚、眼瞼、吻合動静脈、口唇粘膜、上顎骨および切歯の組織像を移植前のものと比較したところ、粘膜を含む組織においては粘液の貯留および軽度の好中球と慢性炎症性細胞浸潤を伴う所見が見られたものの、その他の組織では移植前と比べて著明な変化は見られなかった(図1)。

移植片の上顎骨と切歯の形態、および移植片への血管走行観察にはマイクロCTを使用した。移植後100日以上経過しても上顎骨並びに切歯の形態に大きな変化は見られず(図2-A)、また移植片への血流も良好に保たれていた(図2-B)。

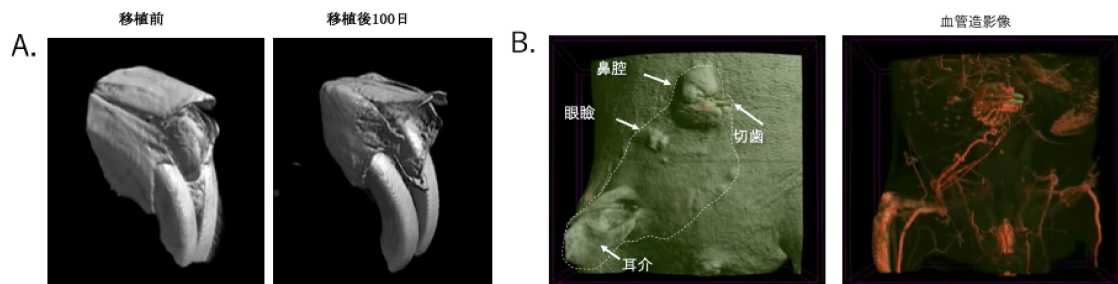


図2. 移植後100日以上経過したグラフトの形態学的観察

A. 上顎骨および切歯のマイクロCT画像. B. 移植片への血管走行のアンギオCT画像

これまで、マウスを用いた顔面組織移植は Sucher ら、Cardona らによって報告されているが (Plastic and Reconstructive Surgery 129:867,2012.)(Plastic and Reconstructive Surgery 144:115,2019)、本モデルの手術時間はそれらよりも短いことから移植片の虚血によるダメージが少なく、レシピエントマウスへの侵襲も少ないモデルであると考えられる。また、移植片にはそれらより多種の組織が含まれており、移植後の拒絶反応の経過をより多くの組織について検討することが可能である。このようなモデルの確立は国内外を含めて初めてであり、移植後の各組織における経時的拒絶応答を画像形態学的・分子病理学的に解析するために大変有用なモデルであると考えられる。今後、複合組織移植の基礎免疫病理学的理論の構築と免疫病理学的拒絶スコアの構築を行うことで、臨床における複合移植後の拒絶反応制御法の確立に大きく貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中川美和, 鍛冶屋浩, 前原喜彦, 田中芳彦, 梨井康, 岡野慎士
2. 発表標題 マウス顔面複合組織移植モデルの確立
3. 学会等名 第58回日本移植学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 M. Nakagawa, H. Kajiya, Y. Maehara, Y. Tanaka, X. Li, S. Okano
2. 発表標題 Heterotopic Hemifacial Transplantation In Mice
3. 学会等名 American Transplant congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔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	岡野 慎士 (Okano Shinji) (10380429)	福岡歯科大学・口腔歯学部・客員教授 (37114)	
研究分担者	田中 芳彦 (Tanaka Yoshihiko) (00398083)	福岡歯科大学・口腔歯学部・教授 (37114)	

6. 研究組織（つづき）

	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	鍛冶屋 浩 (Kajiya Hiroshi) (80177378)	福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授 (37114)	
研究分担者	梨井 康 (Rii Kou) (60321890)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・移植免疫研究室・室長 (82612)	

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