

令和 6 年 5 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16443

研究課題名（和文）臓器移植における新規免疫寛容誘導法の開発

研究課題名（英文）Development of a Novel Method for Inducing Operational Tolerance in Organ Transplantation

研究代表者

佐々木 一樹（Kazuki, Sasaki）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20745442

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、炎症性疾患モデルや肝硬変モデルなどにおいて、免疫調整作用や組織修復作用などの効能が証明されているHMGB1ペプチドを用いて、肝移植後急性拒絶モデルにおける治療効果を検討することを目的とした。研究期間内にラット肝移植モデルに樹立した。この樹立したラット肝移植急性細胞性拒絶モデルを用いてHMGB1ペプチドの有用性を、全生存期間、生化学データ、組織像の観点で、生理食塩水投与群と比較検討したが、検討したHMGB1ペプチドの投与方法においては明らかな抗炎症作用、免疫調整能は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初、移植医療において問題となっている免疫抑制剤長期内服の有害事象を避けるべく、新規治療法開発を目標として研究に取り組んだ。骨髄中より間葉系幹細胞を炎症部位に遊走させ抗炎症作用や免疫調整能を発揮するというこのユニークなHMGB1ペプチドは本研究で検討したラット肝移植急性細胞性拒絶モデルにおいては明らかではなかったが、様々な疾患モデルでその有用性が示されており、今後の臨床現場での応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research project was to investigate the therapeutic effects of HMGB1 peptide, which has proven efficacy in immunomodulation and tissue repair in inflammatory disease and cirrhosis models, in a model of acute rejection after liver transplantation. Within the study period, a rat liver transplantation model was established. Using this established rat liver transplant acute cellular rejection model, the usefulness of HMGB1 peptide was examined in terms of overall survival, biochemical data, and histology in comparison with the saline group, but no obvious anti-inflammatory or immunomodulating effects were observed in the HMGB1 peptide administration methods examined.

研究分野：移植免疫

キーワード：肝移植 間葉系幹細胞 制御性T細胞 免疫寛容 HMGB1ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

移植医療において術後に免疫抑制剤を内服することは拒絶反応のコントロールに必須であるが、長期内服に伴う慢性的な臓器障害など有害事象の発生が問題となっている。そのため、免疫抑制剤の内服期間を可能な限り短期間とし免疫抑制剤からの離脱を目標に、宿主の免疫機構を操作してグラフトの生着を促す operational tolerance の試みがなされている。

中でも、制御性T細胞 (Treg) や骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) を用いた免疫寛容誘導の臨床試験は世界的に行われている。MSC や Treg をレシピエント、あるいはドナーより採取した後、体外で培養し、移植の前後に投与することで一定の効果を認めている。しかし、培養操作に伴う細胞刺激により変異を誘発させるリスクや、生体外と生体内とで表現型が変化する可能性、また、培養操作に伴う労力やコスト、保存方法などの問題が山積している。

そこで、我々は、HMGB1 に着目した。元々は、HMGB1 は核内に存在する 215 アミノ酸残基からなるタンパクで、細胞障害の際に核外に放出され、炎症反応を惹起し、炎症細胞を組織損傷部位へと遊走させると同時に組織修復を促す。HMGB1 は構造的に炎症を惹起するドメインと骨髄由来 MSC を血液中に動員するドメインに分かれる。炎症を惹起するドメインを除いた HMGB1 ペプチドを合成し (図 1) PDGFR 陽性骨髄間葉系幹細胞株 (MSC-1) に対するマイグレーション活性を確認した。HMGB1 ペプチドをマウスに投与後、末梢血中の PDGFR 陽性骨髄間葉系幹細胞 (MSC) の比率が上昇することを確認した。PDGFR 陽性 MSC は多分化能を持つことから、表皮水疱症モデルマウスに HMGB1 ペプチドを投与した所、骨髄より PDGFR 陽性 MSC が血液中に動員され ( " in vivo mobilization " ) 表皮の再生に関与していることを示した (Tamai K. et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2011)。現在、表皮水疱症の患者を対象に HMGB1 ペプチド (レダセムチド、特許第 6336549 号) の臨床試験を進めており (UMIN000029962)、さらに、心筋梗塞、脳梗塞、肝硬変などの疾患に対しても適応拡大を行っている。

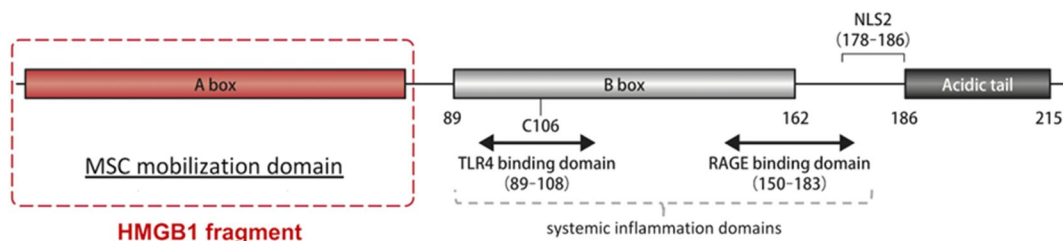


図 1 HMGB1 ペプチドの構造

この HMGB1 ペプチドが自己の骨髄由来 MSC を血液中へ動員させる機能を持つことから、移植医療においても第三者から MSC の提供を受けて生体外で培養せずとも、ペプチド投与により免疫寛容を誘導することができるのではないかと考えた。皮膚移植モデルマウスにおいて、HMGB1 ペプチド投与により、皮膚グラフトの生着期間が延長することが報告されている。

したがって、肝移植において、この HMGB1 ペプチドを肝移植の周術期に投与することで免疫寛容を誘導できるのではないかと、その結果、免疫抑制剤の使用量の減少、投与期間を短縮、さらには免疫抑制剤からの離脱ができるのではないかと、という仮説の下、本研究に着手した。

## 2. 研究の目的

本研では、炎症性疾患モデルや肝硬変モデルなどにおいて、免疫調整作用や組織修復作用などの効能が証明されている HMGB1 ペプチドを用いて、肝移植後急性細胞性拒絶モデルにおける治療効果を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

【2022 年度】

### ラット全肝移植モデルの作成

LEW ラット (>9 週、雄、250g-280g) を用いて下記の要領で同種同系肝移植モデルを作成した。ドナー：イソフルランで麻酔後、挿管し呼吸管理した。剣状突起から恥骨上縁付近まで腹部正中切開、左右横切開を行った。肝左外側葉、左内側葉を脱転し、左下横隔静脈を結紮切離した。傍食道静脈を結紮切離した。肝下部大静脈周囲を剥離した後、右副腎静脈を結紮切離した。右腎動脈を下大静脈後壁より剥離し、右腎静脈をテ

ーピングした。続いて肝門処理に移った。総胆管を剥離し、十二指腸側の胆管を結紮した後、胆管前壁を切開し、胆管ステント(24G サーフロー外筒)留置した。門脈に流入する右胃静脈、脾静脈を結紮切離した。門脈周囲より脂肪を除去した。GDAを結紮切離した。肝臓を正常位置に戻した後、陰茎静脈よりヘパリン 3000 単位を静脈注射した。腹部大動脈・下大静脈を確保し、横隔膜を切開し、胸部大動脈を確保した。クロスクランプを行った後、腹部大動脈前壁を切開し、20G サーフロー外筒をカニューレレーション後、肝上部下大静脈を切開するとともに、冷却した生理食塩水 50ml をを還流させ、肝グラフトを摘出した。

バックテーブル：4 度生食内で下記の操作を行った。12G サーフロー外筒を用いてカフを作成し、肝グラフトの下大静脈に留置した。16G サーフロー外筒を用いてカフを作成し、門脈に留置した。肝上部下大静脈に 7-0 ナイロンを 2 針かけ吻合に備えた。

レシピエント：手術前にゾシン 0.3g を筋注射した。ドナー手術と同様に、イソフルランで麻酔後、挿管し、2L/min で管理した。剣状突起から恥骨上縁付近まで腹部正中切開を行った。肝臓を脱転し、左下横隔静脈を結紮切離した。傍食道静脈を結紮切離した。肝下部下大静脈周囲を剥離した後、右副腎静脈を結紮切離した。右葉脱転した。続いて肝門部の処理に移った。総胆管、固有肝動脈を肝門部中枢側で結紮切離した。陰茎静脈より生食 2ml を静脈注射した。肝下部下大静脈、門脈、肝上部下大静脈の順に血流遮断し、レシピエント肝臓を摘出した。無肝期はイソフルランを 0.5L/min で麻酔維持した。次に、肝グラフトを put in した。肝上部下大静脈を 7-0 ナイロンで吻合後、門脈にカフを留置し再灌流した(20 分以内)。次に、肝下部下大静脈にカフを留置した。生食 2ml を静脈注射した。胆管・胆管をステントで接続した。出血がないことを確認し、4-0 ナイロンで腹壁皮膚を 2 層で閉創した。

#### 【2023 年度】

##### ラット肝移植モデルに対する HMGB1 ペプチドの治療効果の検証

1) 同種異系ラット肝移植モデル(ドナー: Dark Agouti Rat、レシピエント: Lewis Rat)に対して、術後 3 日目、6 日目、9 日目・・・と 3 日後毎に HMGB1 ペプチドを 3mg/kg/回、または、同量の生理食塩水の投与を行った。7 日以上生存したものを解析の対象とした。

2) 同種異系ラット肝移植モデル(ドナー: Dark Agouti Rat、レシピエント: Lewis Rat)に対して、術後 3 日目、6 日目に HMGB1 ペプチドを 3mg/kg/回、または、同量の生理食塩水の投与を行った。移植後 7 日目に犠死させ、血液、肝組織をサンプリングし、生化学データ(AST、ALT、T-Bil、Alb)、体重変化率(術後 7 日目体重/術前体重)、グラフト肝重量/体重比、肝組織像を比較検討した。

#### 4. 研究成果

##### 【2022 年度】

主にラット肝移植モデルの樹立に取り組んだ。冷阻血時間は 3 時間以内、温阻血時間は 20 分以内に行い、連続する 10 例中 8 例で 1 週間以上の生存が得られ、ラット肝移植モデルは確立したものと考えられた。

##### 【2023 年度】

1) 同種異系ラット肝移植モデル(ドナー: Dark Agouti Rat、レシピエント: Lewis Rat)における HMGB1 ペプチドの全生存期間への影響を検討した。その結果、全生存期間はペプチド群で 10, 11, 12, 14, 16 日、生理食塩水群で 9, 10, 17, 18 日であり、全生存期間に有意差を認めなかった。(同種同系ラット肝移植モデル(ドナー、レシピエントともに Lewis Rat)では 20 日以上生存を確認した。)

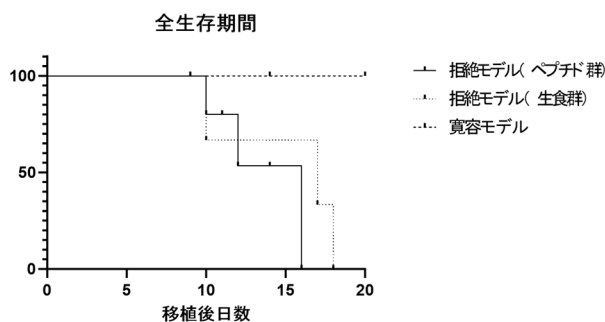


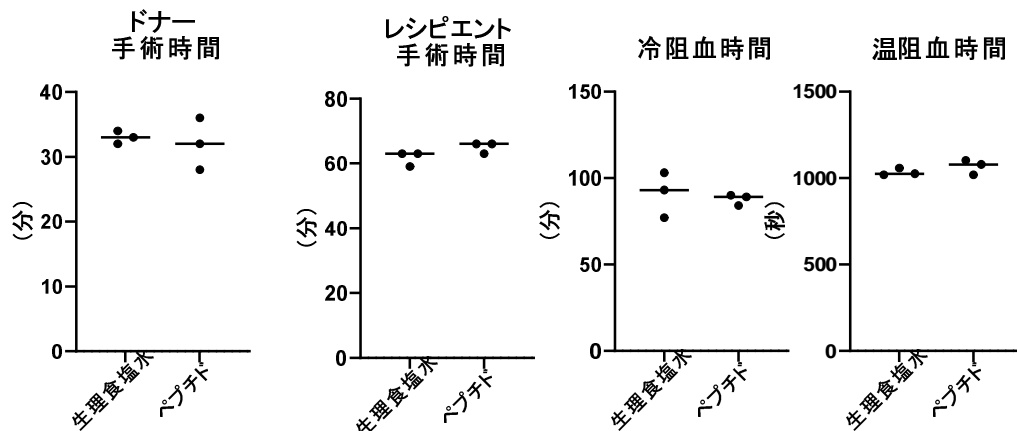
図2 肝移植モデルの全生存期間

2) 同種異系ラット肝移植モデル(ドナー: Dark Agouti Rat、レシピエント: Lewis Rat)移植後 7 日目における HMGB1 ペプチド投与の影響を検討した。(図3 肝移植急性拒絶モデル 検討項目、次ページ) i) 周術期因子、ii) 体重変化率、グラフト肝重量/体重、iii) 生化学データについて、HMGB1 ペプチドの投与の有無による有意な違いは認められなかった。iv) 肝組織では門脈域、中心静脈域に著明な細胞浸潤を認め急性細胞性拒絶の像を呈していたが、HMGB1 ペプチドの投与の有無による明らかな違いは認められなかった。

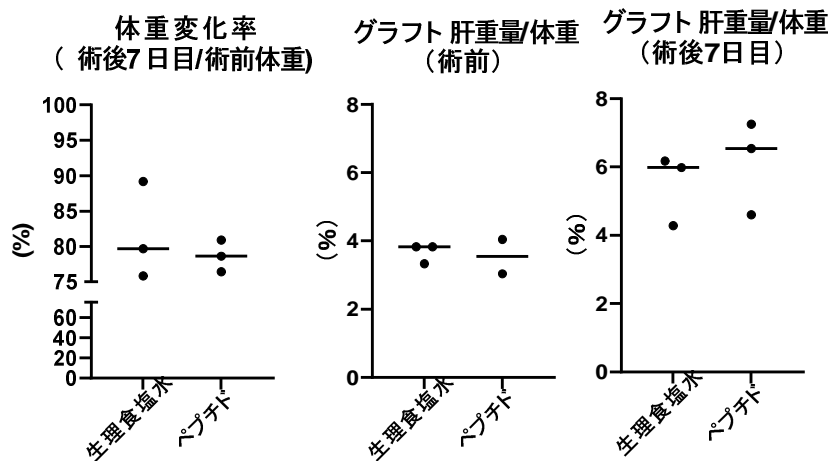
##### 【結論】

ラット肝移植細胞性拒絶モデルにおいて、検討した HMGB1 ペプチドの投与方法においては明らかな抗炎症作用、免疫調整能は認められなかった。

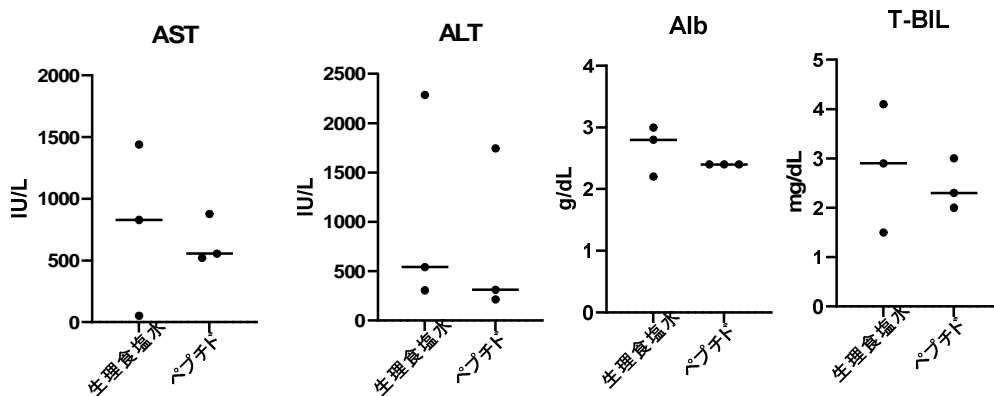
i) 周術期因子



ii) 体重変化率、グラフト肝重量



iii) 生化学データ



iv) 肝組織像

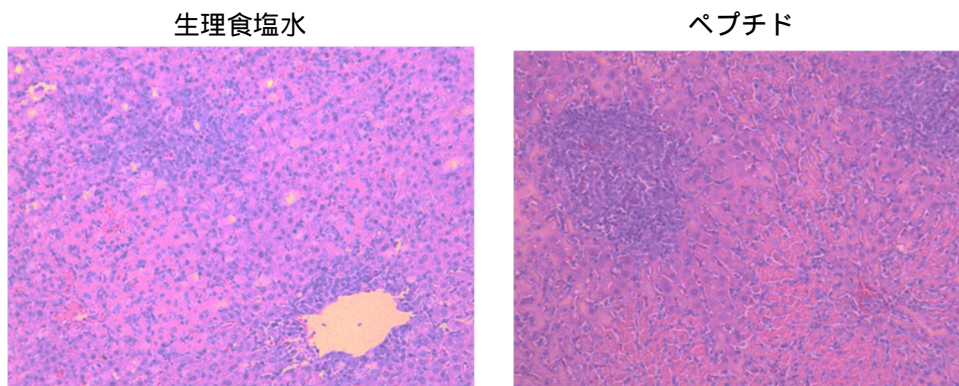


図3 肝移植急性拒絶モデル 検討項目

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Sasaki Kazuki, Asaoka Tadafumi, Kobayashi Shogo, Iwagami Yoshifumi, Yamada Daisaku, Tomimaru Yoshito, Noda Takehiro, Wada Hiroshi, Gotoh Kunihiro, Takahashi Hidenori, Maeda Noboru, Kimura Yasushi, Ono Yusuke, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Successful endovascular embolization of the common hepatic artery for pseudoaneurysm associated with pancreatic fistula after liver transplantation: a case report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Surgical Case Reports	6. 最初と最後の頁 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40792-023-01723-7	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Sasaki Kazuki, Kobayashi Shogo, Iwagami Yoshifumi, Yamada Daisaku, Tomimaru Yoshito, Noda Takehiro, Takahashi Hidenori, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Rituximab administration one week before ABO-incompatible liver transplantation due to drug-induced acute liver failure with hepatic coma: a case report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 709 ~ 714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-023-01827-5	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Sasaki Kazuki, Kubo Masahiko, Wang Yu-chao, Lu Lien, Vujevich Veronica, Wood-Trageser Michelle A., Golnoski Kayla, Lesniak Andrew, Gunabushanam Vikraman, Ganoza Armando, Wijkstrom Martin J., Humar Abhinav, Demetris Anthony J., Thomson Angus W., Ezzelarab Mohamed B.	4. 巻 105
2. 論文標題 Multiple infusions of exvivo-expanded regulatory T cells promote CD163+ myeloid cells and kidney allograft survival in non-lymphodepleted non-human primates	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 84 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2023.09.021	査読の有無 有
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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kobayashi S, Noda T, Tomimaru Y, Sasaki K, Iwagami Y, Yamada D, Takahashi H, Ueno T, Doki Y, Eguchi H
2. 発表標題 Minimally invasive surgery for living liver donor Hybrid technique and full-laparoscopic surgery
3. 学会等名 Transplantation Science Symposium Asian Regional Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sasaki K., Kobayashi S., Iwagami Y., Yamada D., Tomimaru Y., Noda T., Takahashi H., Doki Y., Eguchi H.
2. 発表標題 Acute liver failure with hepatic coma saved by ABO-incompatible liver transplantation: A case report
3. 学会等名 Transplantation Science Symposium Asian Regional Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sato H., Sasaki K., Iwagami Y., Yamada D., Tomimaru Y., Noda T., Takahashi H., Kobayashi S., Doki Y., Eguchi H.
2. 発表標題 Pure Laparoscopic Donor Hepatectomy Reduces Postoperative Analgesic Use and Pain Scale
3. 学会等名 Transplantation Science Symposium Asian Regional Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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

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