

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591855

研究課題名(和文) 腸管マクロファージをターゲットとした新たな小腸移植免疫抑制療法の検討

研究課題名(英文) New immunosuppressive therapy targeted to the intestinal macrophage for intestinal transplantation

研究代表者

仁尾 正記(Nio, Masaki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70228138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：小腸移植の中長期成績向上のために、新たな免疫抑制の標的として腸管マクロファージに着目した。フローサイトメトリーを用いて、急性拒絶反応時の腸管マクロファージサブセットと性質について解析した。Lewis、Brown-Norwayラットを用い、2群(非拒絶、拒絶)で異所性小腸移植を施行し、グラフト回腸から採取した細胞を用いて検討した。

本実験にて、拒絶反応時に4つのサブセットが存在し、なかでもED2+ED3+サブセットが拒絶反応時に増加し、炎症性の性質も有するため、急性拒絶反応と強く関わっていることが示唆され、新たな免疫抑制療法の標的になりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：As a new target of immunosuppression therapy for intestinal transplantation, we focused on intestinal macrophages. In this study, we used flow cytometry to analyze subsets of intestinal macrophages during acute rejection. Ectopic Ix was performed in rats; the transplant groups were syngeneic and allogeneic. We defined four subsets of rat intestinal macrophages using three monoclonal antibodies. These data suggest that the ED1+ macrophages contain four subsets, with the ED2+ED3+ subset strongly correlating with AR. This subset may be a novel target of immunosuppression therapy.

研究分野：小腸移植

キーワード：小腸移植 自然免疫 マクロファージ 移植免疫

## 1. 研究開始当初の背景

**(1)小腸移植領域では、リンパ球の制御を主体とした、既存の獲得免疫に対する免疫抑制療法では成績に限界があり、新たな免疫抑制療法の開発が不可欠である。**

小腸移植は不可逆的腸管不全患者の根治的治療である。開始当初は急性拒絶反応のコントロールに難渋していたが、導入免疫抑制療法の導入により短期成績は向上し、1年生存率は80%前後に上昇した。しかし中長期的成績については未だ発展途上で、5年生存率は50 - 60%にとどまる。この原因の一つには、急性・慢性を含む拒絶反応の長期的なコントロールに難渋している点にある。一方で、免疫抑制を強化した事に起因する感染症も問題となっており、移植後死亡要因の50%は敗血症であった。これらの問題は、総じて、獲得免疫すなわちリンパ球の制御を主体とした既存の免疫抑制療法の限界を示しており、新たな免疫抑制療法の開発が不可欠となった。

**(2)新たな免疫抑制療法のターゲットとして自然免疫に着目した。**

そこで我々は自然免疫系に着目した。消化管は外界と接しているため、初期免疫反応である自然免疫が活性化されやすく、Crohn病領域では自然免疫反応の亢進が獲得免疫系を惹起し、腸炎を発症させるという説が言われている<sup>1)</sup>。小腸移植でも自然免疫系の亢進が拒絶反応の発症や拒絶反応の難治性に関与していると仮説を立て、亢進を制御する事は新たな免疫抑制療法になり得ると考えた。

**(3)腸管マクロファージに着目し、炎症性マクロファージのみを選択的に阻害し、必要な免疫能は保持しながら獲得免疫の惹起のみを抑制し拒絶反応をコントロールする。**

自然免疫のなかでも我々は、自然免疫と獲得免疫の橋渡し役であるマクロファージに着目した。腸管マクロファージには、抑制性のサブセットと炎症亢進性のサブセットが

ある事が知られており<sup>1)</sup>、炎症性サブセットのみを抑制することで、獲得免疫の異常亢進のみを選択的に制御する免疫抑制戦略が確立できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、小腸移植における腸管マクロファージの拒絶反応時の抑制性・炎症性マクロファージのサブセットの変化について解析し、炎症性マクロファージを選択的に阻害する薬剤を探索することで、拒絶反応に対する新たな治療戦略を確立することが目的である。

これまでのラットを用いた小腸移植後拒絶反応時のM細胞数の解析は、免疫組織学的にしか行われていなかった。しかし今回、フローサイトメトリーを導入することで、より再現性の高い客観的データが獲得できる。また、小腸移植の免疫抑制療法として、自然免疫・マクロファージに着目したアイデアは未だなく、新たな戦略となり得る。

本実験では、炎症性マクロファージが拒絶反応初期や直前に増加し、拒絶反応を惹起するという結果が得られる事が予想され、そのタイミングで阻害剤を投与することで、拒絶反応のコントロールが行えたという結果が予想される。予想に近似した結果が得られれば、臨床応用にも発展できると確信している。

## 3. 研究の方法

### (1)ラット小腸移植拒絶反応モデルの確立

動物:200~260gのLewisラットを用いるが、拒絶モデルのドナーには、Brown-Norwayラットを用いる。同系移植(非拒絶群)はドナー・レシピエント共にLewisラットを、異系移植(拒絶群)はドナーにBrown-Norwayラット、レシピエントにLewisラットを用いて、異所性小腸移植を施行する。この拒絶モデルでは移植後約5日で軽度拒絶を、約7日で高度拒絶を発症する事が予備実験で分かっている。また、移植後3日目よりグラフト中のマクロファージが増加してくることも

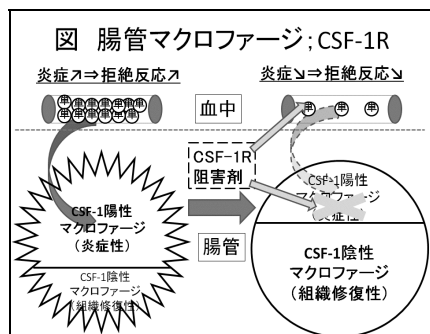
他の報告で分かっている。よって、移植後 1、3、5、7 日目に犠牲死させ、腸管を採取する。  
**(2) フローサイトメトリーを用いたマクロファージのサブセットを含めた動態解析とサブセットにおけるサイトカインの変化**

摘出した腸管 10-20cm を処理し、腸管上皮を除いた腸管全層から細胞を採取する。フローサイトメトリーを用いて、ED1、ED2、ED3 サブセットマーカーの 3 種でゲーティングすることで、マクロファージの細胞数、ならびにサブセットの変化を解析する。

さらに、上記でゲーティングし採取した各サブセット細胞群を用いて、炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ )、抑制性サイトカイン (IL-10)、ケモカインレセプター (CCR-2、CX3CR1) の発現を各サブセットで評価する。

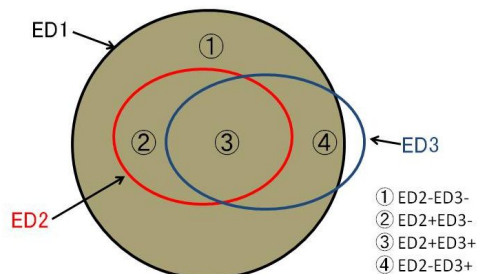
**(3) 炎症性マクロファージを選択的に阻害する薬剤の検討**

マクロファージの起源、発生過程について検討し、単球/マクロファージの分化・増殖を刺激する造血系サイトカインであるマクロファージコロニー刺激因子 (CSF-1) に関する知見を得た。CSF-1 受容体陽性マクロファージが、虚血再還流障害や急性拒絶反応において、多数組織へ移行することも知られ、腎移植のラット実験にて、同剤の投与が AR を軽減することが報告されている。よって、CSF-1 受容体阻害剤を前述のラットモデルに投与し、選択的に CSF-1 受容体陽性腸管マクロファージを枯渇させることで、小腸移植後急性拒絶反応の発症を軽減できるか否かを検討した。具体的には、移植前 1 日、移植後 7 日間、同剤を投与し、7 日目の移植腸管を摘出し病理学的に評価した。



4. 研究成果

(1) ED1+マクロファージにおける ED2、ED3 の発現状況を解析すると、4 つのサブセットが存在し、それらは、高度拒絶反応状態である術後 7 日目の異系グラフトで顕著であった。



グラフト中の ED1+マクロファージの割合は、術後 1 日から両群で正常コントロールより増加した。ED1+マクロファージの割合や細胞数は、同系群では術後 3 日をピークとし低下したが、異系群では術後 7 日まで増加し続けた。また術後 5、7 日目において、異系群の ED1+マクロファージは、同系群より 3 倍以上高かった。

**(2) 4 つのサブセットの変化**

術後 7 日目の異系群の ED2+ED3+サブセットの割合は、正常コントロール並びに術後 7 日目の同系群より有意に増加した。異系群の ED2+ED3-サブセットの術後 7 日目の割合は、正常コントロール並びに術後 7 日目の同系群より有意に増加した。

**(3) サイトカイン産生、ケモカインレセプター発現による各サブセットの特徴の解析**

TNF- $\alpha$  産生細胞の割合について比較を行ったところ、ED2 発現の有無にかかわらず ED3+マクロファージを含むサブセットで、ED3-マクロファージより有意に高い傾向を認めた。IL-10 や IFN- $\gamma$  産生細胞は、どのサブセットにおいても認められなかった。

CCR2・CX3CR1 発現も、ED2 の発現の有無にかかわらず ED3+サブセットで有意に高い傾向を示した。

本実験より、ラット小腸移植後拒絶反応に ED1、ED2、ED3 によって定義される 4 つのマ

クロファージサブセットが存在することを示した。なかでも ED1+ED2+ED3+サブセットは拒絶反応時に増加し、炎症性の性質も有するため、急性拒絶反応と強く関わっていることが示唆された。このサブセットは新たな免疫抑制療法のターゲットになりうると考えられた。

#### (4)薬剤投与実験の解析

本経過に伴う薬剤投与については、CSF-1 受容体阻害薬投与によるマクロファージ制御と拒絶反応に対する影響について検討した。正常ラットの血中単球の減少効果が確認された後、同剤をモデルに投与した所、通常では高度拒絶反応を呈するモデルにおいて、拒絶反応の程度が軽度となっており、薬剤投与の効果が示唆された。しかしながら、詳細な検討はまだ十分ではなく、今後さらなる検討が必要である。しかしながら同剤は、他疾患において臨床応用も検討されている薬剤であるため、本研究の成果は、基礎実験で終わるのではなく、臨床にも役立つ結果につながると期待される。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) Kudo H, Wada M, Nio M, et al. Flow cytometric analysis of ED1+ intestinal macrophage subsets during acute rejection after intestinal transplantation. 第 13 回国際小腸移植シンポジウム、オックスフォード(英国) 2013 年 6 月 26-29 日
- (2) 工藤博典、和田基、仁尾正記ら。フローサイトメトリーを用いた小腸移植後急性拒絶反応時の ED1 陽性腸管マクロファージサブセットの解析。第 49 回日本小児外科学会総会、パシフィコ横浜(横浜) 2012 年 5 月 14-16 日
- (3) 工藤博典、和田基、仁尾正記ら。フローサイトメトリーを用いた小腸移植後急性拒絶反応時の ED1 陽性腸管マクロファージサブセットの解析。第 24 回日本小腸移植研究会、メルパルク京都(京都) 2012 年 3 月 17 日。本発表にて研究奨励

賞を受賞した。

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
仁尾 正記 (Masaki Nio)  
東北大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：70228138

(2)研究分担者  
和田 基 (Motoshi Wada)  
東北大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：80372291