

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591873

研究課題名(和文)臓器移植におけるマイクロキメリズム誘導を目指したIL-10メカニズムの解明

研究課題名(英文)Study of the mechanism of IL-10 to induce microchimerism in organ transplant model.

研究代表者

吉村 了勇(YOSHIMURA, NORIO)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00191643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：(目的)免疫寛容の誘導におけるIL-10とマイクロキメリズムの効果について検討した。(方法)放射線照射したBalb/cマウスをレシピエントとして、B6をドナーに異所性心移植を行い、IL-10遺伝子導入したB6幹細胞を3週毎に投与した。(結果)幹細胞3週毎投与群(86.3 days)は、単回投与群(46.3)、コントロール群(11.5)に比べて有意に生着期間が延長した。またレシピエント胸腺、肝臓、肺にマイクロキメリズムが認められた。(結語)IL-10はマイクロキメリズムの成立及び移植臓器の生着期間延長に大きく関与しており、IL-10が免疫寛容導入への一端を担うことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：(AIMS)We investigated that transduction of the human Interleukin-10 (IL-10) gene in mouse foetal liver stem cells (hIL-10-TFLs) protects them from rejection in an allogeneic host and the effects of these cells in organ transplantation.(METHODS)Balb/c mice were sublethally irradiated before receiving vascularized heterotopic heart grafts from C57BL/6 mice. TFLs from C57BL/6 mice transduced with hIL-10, were injected on the day of transplantation, every 20 days.(RESULTS)Heart transplants survived 86.25 versus 46.3 or 11.5 days, in mice which received repeated injections, a single injection, or in control mice. Expressions of H-2b and hIL-10 were found in thymus, liver. Foxp3+ cells present inside the transplanted heart.(CONCLUSIONS)We have shown that repeated injections of hIL-10-TFLs are efficient in impairing transplant rejection. This"prope tolerance"was associated with survival of donor haematopoietic cells in the host.

研究分野：医歯薬学

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：マイクロキメリズム IL-10 マウス異所性心移植モデル 免疫寛容

## 1. 研究開始当初の背景

臓器移植において、拒絶反応は今なお最大の障壁である。様々な免疫抑制剤の開発により臓器生着率の改善が見られているが未だ生着率 100%にはいたっておらず、また長期間の免疫抑制剤の使用は様々な副作用を引き起こしている。移植臓器に対する免疫寛容の誘導は移植免疫学にとって最大の目標であり、そのために拒絶反応のメカニズムを解明することが急務となっている。拒絶反応のなかでも急性拒絶反応においては、リンパ球による関与がメインであり、現在の免疫抑制剤の多くはこれらリンパ球の活動を抑えることを目的とした物が多い。

IL-10 はサイトカイン合成阻害因子 (CSIF) とも言われており、マクロファージや Th2 細胞から分泌され、免疫反応を抑制的に制御する働きを持っている。具体的には Th1 細胞からのサイトカイン合成 (特に IL-2 や IFN- $\gamma$ ) を抑制し、また MHC class II の発現を強く抑制し、またその他にも IL-1,2,6,8, TNF- $\alpha$ , や GM-CSF などのモノカインの産生を抑制している。移植臓器拒絶反応においては IL-2 が拒絶反応の主たる役目を果たしていることがわかっているが、しかしそれとて単独で行われているわけではなく、その他の多くのサイトカインや CTLA-4、ICAM-1 などの接着分子によって複雑な関与を受けて調節されている。動物モデルを用いた Major mismatched allodonor の移植時において免疫寛容が誘導されたモデルでは明らかな Th2 サイトカインの強発現が見られるとされて

おり、Th2 サイトカインの拒絶反応に対する大きな関与が考えられている。また免疫制御性 T 細胞は自己免疫抑制機構を持つことが知られているが、拒絶反応においても移植臓器拒絶を抑える方向に働くと考えられている。しかしこの T 細胞が移植免疫制御に働くためには IL-10 の存在が必要であると言われており、最近になり minor mismatched antigen に対する拒絶反応においては Th2 サイトカインが特に大きく関与し、これが T 細胞のアポトーシスに関連するとの興味深い報告もされている。

## 2. 研究の目的

以上の機序から Th2 サイトカイン、特に IL-10 は臓器移植においても拒絶反応に対して抑制的に制御する方向に働いているのではないかと考えられ、また免疫寛容の誘導に大きく関与することが予想される。

我々はこれまでに human IL-10 遺伝子を胎児肝造血幹細胞に形質導入した上で、マウスに移植して高濃度の IL-10 を発現するマウスを作成するのに成功している。またそのモデルを用いて心臓移植、皮膚移植を行い生着期間の延長を確認している。そこで今期間中にはマウスの心臓移植モデルを用いて、臓器移植の究極の目標であるマイクロキメリズム誘導を目指した IL-10 メカニズムの解明を行った。

## 3. 研究の方法

混合リンパ球培養法で Human IL-10 によるリンパ球刺激増殖抑制効果を調べ、レシピエントのドナー抗原に対する細胞分裂能が変化するかを調べる。次に IL-10 を強発現さ

せたマウス心臓移植モデルで免疫寛容に関わる各種臓器で、どの臓器で、何時、どの程度のマイクロキメリズムが起こりうるかをサイトフローメトリーとRT-PCR法を用いて調べる。最終的にはマウス心臓移植モデルに対する Human IL-10 の頻回投与によつての臓器生着期間の延長（フルトレランス）が可能か否かを検討した。なおマウス心臓移植モデルは顕微鏡下手術にて行い、ドナーとして C57BL/6 マウスを、レシピエントには Balb/c マウスを用いる。手技として、レシピエントの腹腔内に異所性にドナー心臓を移植し、ドナーの上行大動脈をレシピエントの大動脈と、肺動脈を大静脈とそれぞれ端側吻合する。完全拒絶の決定はレシピエントの心臓が完全停止した日とし、触診、心電図および最終的には開腹にて判定する。術後の細胞移植は精巣静脈あるいは尾静脈より 30 ゲージの注射針を用いて  $2.0 \times 10^6$  の細胞を注入した。

#### 4. 研究成果

##### Human IL-10 導入方法)

マウス胎児肝造血幹細胞は表面抗原 Sca-1 (stem cell antigen-1) を発現しており、CBA マウスから FACS Vantage を用いて Sca-1 陽性細胞をソーティングし、IL-3, IL-6, SCF と共に混合リンパ球培養を行う。そして、レトロウイルスを用いて human IL-10 遺伝子を Sca-1 陽性細胞に形質導入する。IL-10 分泌能については、その上清を ELISA テストにて確認する。その結果 Human IL-10 が形質導入された幹細胞の培養液中では 10000pg/ml 以上の Human IL-10 を産生していたことが判明した。前述した Human IL-10 が形質導入された幹細胞を投与した、マウス心臓移植モデルで

は、移植後 14 日および 21 日後にも 750pg から 900pg の Human IL-10 血中濃度を示していたが、28 日後にはほぼ消失していた。よつて IL-10 がマウス体内で効果を発揮するのは 3 週間程度であることが判明した。

##### 生着期間)

マウス心臓移植の系において control isograft (同種同系心臓移植) control allograft および 4.5Gy の放射線を照射された Balb/c マウスをレシピエントとした群(この放射線量で血中や骨髄中のリンパ球が死滅する量であり、致死線量は 6Gy) 放射線治療を施し更に胎児幹細胞を移植した irradiated-allograft+胎児幹細胞群、3 週ごとに胎児幹細胞のみを投与する irradiated-allograft+胎児幹細胞群、Human IL-10 を形質導入した胎児幹細胞を移植した irradiated-allograft 群、3 週ごとに胎児幹細胞 + Human IL-10 群を投与する irradiated-allograft+胎児幹細胞 + IL-10 群) を作成し、各群における生着期間の差を T-Test にて用いて比較検討し、Human IL-10 遺伝子導入幹細胞 3 週毎投与群( $86.3 \pm 13.8$  days)は、IL-10 遺伝子導入幹細胞単回投与群( $46.3 \pm 4.6$ )、遺伝子未導入幹細胞 3 週毎投与群( $28.1 \pm 6.1$ )、コントロール群( $11.5 \pm 0.6$ )に比べて有意に生着期間が延長していた。

##### 組織学的判定)

マウス心臓移植モデルの組織学的検査にて、Human IL-10 投与で組織学的破壊の著明な改善が認められ、免疫染色においても CD8 発現の抑制が認められた。Human 長期臓器生着 graft で報告されている FoxP3 細胞は 140 日生着していた graft にも強く認められた。

## マイクロキメリズムの判定)

さらに上記で述べた心移植モデルを用いて移植後レシピエントの各種臓器(末梢血、肝、肺、胸腺、脾細胞及び骨髓細胞)から IL-10 産生細胞を指標として、術 7 日、14 日、21 日、28 日後の flow cytometry を行い、また IL-10 を指標として RT-PCR を行う事で移植臓器に対する免疫寛容の誘導の最大目標であるマイクロキメリズムの解析を行い、14 日後、レシピエント胸腺、肝臓、肺でドナー細胞と IL-10 のマイクロキメリズムが認められ、140 日後でもマイクロキメリズムが認められた。

## まとめ)

IL-10 は donor、recipient 間の混合リンパ球反応を強く抑制した。生体内での IL-10 発現期間はおよそ 20 日であった。IL-10 遺伝子導入幹細胞 3 週毎投与群( $86.3 \pm 13.8$  days)は、IL-10 遺伝子導入幹細胞単回投与群( $46.3 \pm 4.6$ )、遺伝子未導入幹細胞 3 週毎投与群( $28.1 \pm 6.1$ )、コントロール群( $11.5 \pm 0.6$ )に比べて有意に生着期間が延長しており、140 日生着したマウスも認められた。この死因は麻酔死であって、グラフトはまだ生着していた。IL-10 投与で組織学的破壊の著明な改善が認められ、免疫染色においても CD8 発現の抑制が認められた。14 日後、レシピエント胸腺、肝臓、肺でドナー細胞と IL-10 のマイクロキメリズムが認められ、140 日後でもマイクロキメリズムが認められた。Human 長期臓器生着 graft で報告されている FoxP3 細胞は 140 日生着していた graft にも強く認められた。

## 結語)

IL-10 はマイクロキメリズムの成立及び移植臓器の生着期間延長に大きく関与しており、IL-10 が免疫寛容導入への一端を担うことが示唆され、IL-10 による新しい免疫抑制法の開発の可能性が期待されうる。

## 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 1 件)

Brikci-Nigassa L, Matsuyama M, Hase T, Eljaafari A, Chargui J, Sanhadji K, Inori F, Nakatani T, Yoshimura R, Touraine JL.

Prope tolerance to heart allografts in mice associated with persistence of donor interleukin-10-transduced stem cells.

Transplantation 27;93(8):761-8. 2012.

[学会発表](計 2 件)

国際学会 Award (賞)

Matsuyama M, Hase T, Yoshimura R, Brikci-Nigassa L, Chargui J, Koshino K, Sakai K, Suzuki T, Nobori S, Ushogome H, Okajima H, Touraine JL, Yoshimura N.

Prope Tolerance" The possibility of donor Interleukin-10-transduced foetal liver stem cells in mice heart allograft.

49th European Renal Association-European Dialysis and Transplantation Association Congress (Paris, France). May 26, 2012.

国内学会 シンポジウム

松山昌秀、長谷太郎、吉村力勇、仲谷達也、吉村了勇

マウス異所性心移植モデルを用いた IL-10 での免疫寛容

第 47 回日本移植学会総会 仙台 平成 23 年 10 月 6 日

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

吉村 了勇 (YOSHIMUTA, NORIO)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 00191643

(2)研究分担者

松山 昌秀 (MATSUYAMA, MASAHIDE)  
京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号: 80549767