

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791753
 研究課題名（和文） CCR5/CXCR3 阻害による急性および慢性腎拒絶反応の制御

研究課題名（英文） Blocking of CCR5 and CXCR3 Suppresses Acute and Chronic Renal Allograft Rejection

研究代表者

奥見 雅由 (OKUMI MASAYOSHI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60512978

研究成果の概要（和文）：

ラット腎移植急性拒絶反応モデルにおいて、CCR5/CXCR3 拮抗薬はシクロスポリン（CsA）との併用により著明な生着率の延長効果が認められた。作用機序として T 細胞の移植腎への遊走抑制効果とマクロファージの尿細管への浸潤抑制効果、活性化の抑制効果が考えられた。CCR5、CXCR3 の阻害は腎移植後拒絶反応の有効な治療手段となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

A combined therapy involving cyclosporin A (CsA) and CCR5/CXCR3 antagonist resulted in decreased macrophage infiltration, and graft survival was substantially prolonged in a rat kidney transplant model. The dual blocking of CCR5/CXCR3 can be useful in decreasing rejection. This mechanism acts, not only to block T cell recruitment to a kidney graft but also to suppress the infiltration of macrophages to tubules, which leads to tubulitis. Thus, the dual blocking of both receptors has the potential to serve as a new therapeutic target in the future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：移植学

キーワード：腎移植、拒絶反応、ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

近年の免疫抑制剤の進歩によって腎移植の長期成績は飛躍的に改善した。しかし、急性拒絶反応（AR）は依然として長期生着率に影響を与える大きな危険因子の一つである。AR はマクロファージなどによって抗原提示をうけた T 細胞が活性化され、移植腎へ誘導されることが必要であるが、その T 細胞の活

性化や誘導に関与しているのがケモカインである。ケモカインの受容体のひとつである CCR5 が欠損している患者は、腎移植の成績が非常に良好であることが知られており、AR を抑制する手段としてケモカイン受容体を阻害する方法が注目を集めている。その中でもケモカイン受容体である CCR5 および CXCR3 はこれらの免疫反応を引き起

こす重要な役割を担っている。CCR5/CXCR3 への拮抗阻害作用を有する、合成非ペプチド分子である TAK-779 が開発された。TAK-779 を用いて、ラット同種小腸移植モデルおよびマウス心移植モデルにおいて、移植臓器への T 細胞浸潤抑制効果が報告されている。しかしながら、共に非機能的臓器移植モデルにおける TAK-779 単独投与による急性期病変での解析である。免疫抑制効果においては、TAK-779 はカルシニューリン阻害薬を凌駕するものではないと推測され、TAK-779 の有する T 細胞浸潤抑制の機序は十分に解明されていない。この観点から、ラット同種腎移植モデルを用いて CCR5/CXCR3 アンタゴニスト (TAK-779) 投与によりアロ免疫応答における CCR5/CXCR3 の役割を検討する。

2. 研究の目的

ケモカイン受容体のうち AR 抑制に最も効果的であると考えられているのが CCR5 と CXCR3 の阻害である。T 細胞とマクロファージは両者とも発現しており、T 細胞においては移植臓器への遊走に関与していることが報告されている。マクロファージは AR 発症時の移植腎に浸潤している細胞のうち 30~60% を占めているが、AR におけるマクロファージの CCR5 と CXCR3 の役割についてはよく分かっていない。そこで、ケモカイン受容体拮抗薬である CCR5/CXCR3 拮抗薬 (TAK779、以下 TAK) のラット腎移植急性拒絶反応モデルに対する効果を、マクロファージを中心に検討した。

3. 研究の方法

我々はこれまでに、Dark Agouti (DA : RT1avl) ラットをドナー、Lewis (LEW : RT1l) ラットをレシピエントとした同種腎移植モデルにおいて、免疫抑制剤無投与群において移植後 1 週間以内に全例が急性拒絶するライフサポーターモデルを確立している。ここにシクロスポリン (CsA) を 3mg/kg 投与すると 40~60 日と著明な生着延長効果が認められた (CsA delayed rejection モデル)。この CsA delayed rejection モデルは最終的には CD8 陽性 T 細胞またはマクロファージによって拒絶されると考えられたため、我々は CsA を 2mg/kg × 6 日間という低容量、短期間で投与し (低容量 CsA モデル)、初期

の CD4、CD8 陽性細胞の浸潤を抑えた上でマクロファージの浸潤のみを残すモデルの作成を試みた。

4. 研究成果

(1) 低容量 CsA モデルにおける生着率の検討: 低容量 CsA 投与によって生着率はコントロール群 (無治療群) の 6.0~7.0 日 (中央値 6.5 日) に対し、7.0~10.0 日 (中央値 9.0 日) と有意差をもって延長した (図 1)。病理組織検査ではコントロール群においては高度な血管炎、間質への細胞浸潤、間質の出血といった非常に高度な拒絶反応像が認められたが、低容量 CsA 投与によって特に血管炎の所見が抑制され、間質の細胞浸潤や尿細管炎の所見が中心の拒絶反応像となった (図 2)。免疫組織染色では CD4 および CD8 陽性 T 細胞の移植腎への浸潤は、低用量 CsA 投与によって十分に抑制されていたが、マクロファージの浸潤は徐々に増加傾向にあった (図 3)。

図 1 : 腎移植後生着率 (コントロール群 vs 低容量 CsA 群)

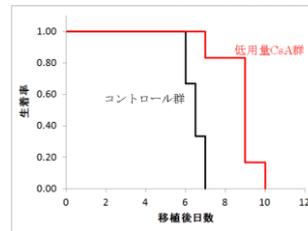


図 2 : HE 染色 (移植腎、5 日目) コントロール群 低容量 CsA 群

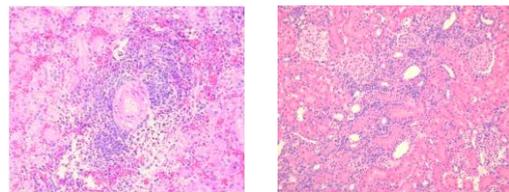
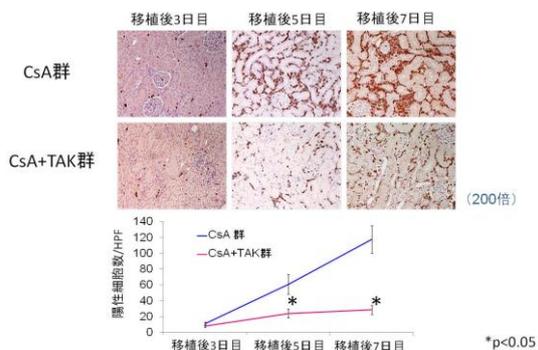


図 3. ED-1 染色 (移植後 3, 5, 7 日目)

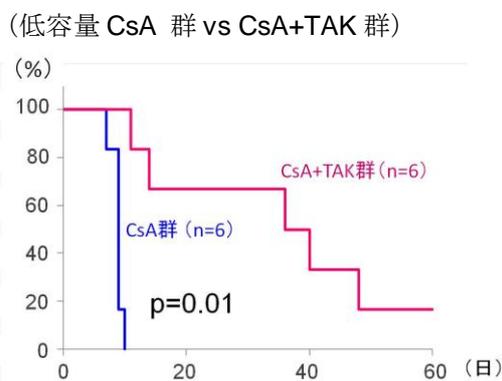


(2) 低容量 CsA モデルにおけるマクロファージ関連サイトカイン・ケモカインの評価：

CsA 低容量モデルでは RT-PCR にて CD4 または CD8 に関連する $INF\gamma$ 、IL-2、グランザイム B、パーフォリンなどの発現はコントロール群と比較して有意に抑制されていたが、マクロファージ関連サイトカインである IL-1 β 、IL-18 およびマクロファージ関連ケモカインである CCL2~3 はコントロール群との間に差は認められなかった。

(3) 低容量 CsA モデルにマクロファージ阻害剤を投与した検討： 我々の検討では移植腎から分離してきたマクロファージでは、RT-PCR、フローサイトメトリー、蛍光免疫組織染色において、ケモカイン受容体である CCR5、CXCR3 の発現が脾臓から分離してきたマクロファージよりも増加していた。低容量 CsA モデルに TAK-779 を投与して (CsA+TAK 群)、マクロファージの浸潤を抑制して検討した。免疫組織染色では CD4 および CD8 陽性 T 細胞に関しては、CsA + TAK 群と低容量 CsA 群との間に差は認められず、両群とも十分に抑制されていた。しかし、ED-1 染色では CsA + TAK 群においてマクロファージの浸潤が抑制されていた (図 3)。また、CsA+TAK 群では移植腎へのマクロファージの浸潤は抑制されており、RT-PCR にて、マクロファージ関連のサイトカイン、ケモカインである IL-1 β 、IL-18、CCL2、CCL4 の mRNA 発現が低下していた。CsA + TAK 群の生着日数は 11~60 日 (中央値.38 日) と著明な生着延長効果が認められた (図 4)。

図 4. 腎移植後生着率



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 13 件)

1. Kakuta Y, Okumi M*, Isaka Y, Tsutahara K, Abe T, Yazawa K, Ichimaru N, Matsumura K, Hyon SH, Takahara S, Nonomura N. Epigallocatechin-3-gallate protects kidneys from ischemia reperfusion injury by HO-1 upregulation and inhibition of macrophage infiltration. **Transplant Int.** 2011; 24: 514-522
2. Fujita K, Hosomi M, Tanigawa G, Okumi M, Fushimi H, Yamaguchi S. Prostatic inflammation detected in initial biopsy specimens and urinary pyuria are predictors of negative repeat prostate biopsy. **J Urol.** 2011; 185: 1722-1727.
3. Okumi M, Kawada N, Ichimaru N, Kitamura H, Abe T, Imamura R, Kojima Y, Kokado Y, Isaka Y, Rakugi H, Nonomura N, Moriyama T, Takahara S. Safety and efficacy of administering the maximal dose of candesartan in renal transplant recipients. **Clin Exp Nephrol.** 2011; 15: 907-915.
4. Kakuta Y, Okumi M*, Miyagawa S, Tsutahara K, Abe T, Yazawa K, Matsunami K, Otsuka H, Takahara S, Nonomura N. Blocking of CCR5 and CXCR3 Suppresses the Infiltration of Macrophages in Acute Renal Allograft Rejection. **Transplantation.** 2012; 93: 24-31.
5. Oku M, Okumi M, Shimizu A, Sahara H, Setoyama K, Nishimura H, Sada M, Scalea J, Ido A, Sachs DH, Tsubouchi H, Yamada K. Hepatocyte growth factor sustains T regulatory cells and prolongs the survival of kidney allografts in major histocompatibility complex-inbred CLAWN-miniature swine. **Transplantation.** 2012; 93:148-55.

6. Abe T, Isaka Y, Imamura R, Kakuta Y, Okumi M, Yazawa K, Ichimaru N, Tsuda H, Nonomura N, Takahara S, Okuyama A. Carbamylated erythropoietin ameliorates cyclosporine nephropathy without stimulating erythropoiesis. **Cell Transplant.** 2012; 21: 571-80
 7. Imamura R, Isaka Y, Sandoval RM, Ichimaru N, Abe T, Okumi M, Yazawa K, Kitamura H, Kaimori J, Nonomura N, Rakugi H, Molitoris BA, Takahara S. A nonerythropoietic derivative of erythropoietin inhibits tubulointerstitial fibrosis in remnant kidney. **Clin Exp Nephrol.** 2012; 16: 852-62.
 8. Abe T, Li XK, Yazawa K, Hatayama N, Xie L, Sato B, Kakuta Y, Tsutahara K, Okumi M, Tsuda H, Kaimori JY, Isaka Y, Natori M, Takahara S, Nonomura N. Hydrogen-rich University of Wisconsin solution attenuates renal cold ischemia-reperfusion injury. **Transplantation.** 2012; 94:14-21.
 9. Tsutahara K, Okumi M*, Yoichi Kakuta Y, Abe T, Yazawa K, Miyagawa S, Matsunami K, Otsuka H, Kaimori J, Takahara S, Nonomura N. The blocking of CXCR3 and CCR5 suppresses the infiltration of T lymphocytes in rat renal ischemia reperfusion. **Nephrol Dial Transplant.** 2012; 27: 3799-806.
 10. Yoneda S, Okumi M*, Yamaguchi S. Successful kidney transplantation for a dialysis patient with anthracycline-induced cardiomyopathy: a case report. **CEN case reports.** 2012 Nov 07
 11. Obi Y, Ichimaru N, Hamano T, Tomida K, Matsui I, Fujii N, Okumi M, Kaimori JY, Yazawa K, Kokado Y, Tsubakihara Y, Nonomura N, Rakugi H, Takahara S, Isaka Y. Orally active vitamin d for potential chemoprevention of posttransplant malignancy. **Cancer Prev Res (Phila).** 2012; 5: 1229-35.
 12. Obi Y, Ichimaru N, Kato T, Kaimori JY, Okumi M, Yazawa K, Rakugi H, Nonomura N, Isaka Y, Takahara S. A single daily dose enhances the adherence to immunosuppressive treatment in kidney transplant recipients: a cross-sectional study. **Clin Exp Nephrol.** 2013; 17: 310-5
 13. Weiner J, Scalea J, Ishikawa Y, Okumi M, Griesemer A, Hirakata A, Etter J, Gillon B, Moran S, Shimizu A, Yamada K, Sachs DH. Tolerogenicity of donor major histocompatibility complex-matched skin grafts in previously tolerant Massachusetts general hospital miniature swine. **Transplantation.** 2012; 94: 1192-9.
- [学会発表] (計 25 件)
1. 阿部豊文、李 小康、畑山直之、謝 琳、佐藤文平、角田洋一、葛原宏一、奥見雅由、矢澤浩治、貝森淳哉、名取道也、高原史郎、野々村祝夫。ラット腎移植モデルにおける水素含有 UW solution の腎保護作用。第 99 回日本泌尿器科学会総会。2011 年 4 月 21 日、愛知県名古屋市角田洋一、奥見雅由、葛原宏一、阿部豊文、矢澤浩治、松浪勝義、宮川周士、貝森淳哉、高原史郎、野々村祝夫。ラット腎移植急性拒絶反応モデルにおいて CCR5/CXCR3 antagonist は T 細胞およびマクロファージの recruitment を抑制する。第 99 回日本泌尿器科学会総会。2011 年 4 月 22 日、愛知県名古屋市
 2. 葛原宏一、奥見雅由、角田洋一、阿部豊文、矢澤浩治、松浪勝義、宮川周士、貝森淳哉、高原史郎、野々村祝夫。CCR5/CXCR3 antagonist のラット腎阻血再灌流障害モデルにおける腎障害抑制効果。第 99 回日本泌尿器科学会総会。2011 年 4 月 23 日、愛知県名古屋市
 3. 津田秀年、山原研一、奥見雅由、矢澤浩治、堀尾 勝、貝森淳哉、猪阪善隆、池田智明、高原史郎。腎虚血再灌流障害における卵膜由来間葉系幹細胞を用いた治療効果の検討。第 54 回日本腎臓学会学術総会。2011 年 6 月 17 日、神奈川県横浜市

5. 阿部豊文、李 小康、奥見雅由、矢澤浩治、貝森淳哉、高原史郎、野々村祝夫. 水素含有 UW solution は移植腎における虚血再灌流傷害を軽減する. 第 47 回日本移植学会総会. 2011 年 10 月 6 日、宮城県仙台市
6. 角田洋一、奥見雅由、蔦原宏一、阿部豊文、矢澤浩治、宮川周士、高原史郎、野々村祝夫. 急性拒絶反応におけるマクロファージのケモカイン受容体 CCR5 と CXCR3 の役割解明. 第 47 回日本移植学会総会. 2011 年 10 月 6 日、宮城県仙台市
7. 蔦原宏一、奥見雅由、加藤大悟、角田洋一、阿部豊文、矢澤浩治、宮川周士、高原史郎、野々村祝夫. CCR5/CXCR3 antagonist 投与によるラット腎阻血再灌流障害モデルにおける腎障害抑制効果. 第 47 回日本移植学会総会. 2011 年 10 月 6 日、宮城県仙台市
8. 角田洋一、奥見雅由、加藤大悟、蔦原宏一、阿部豊文、矢澤浩治、高原史郎、野々村祝夫. 腎移植後急性細胞性拒絶反応における補体制御因子 CD46 の発現が Graft Outcome に与える影響について. 第 100 回日本泌尿器科学会総会. 2012 年 4 月 21 日、神奈川県横浜市
9. 蔦原宏一、奥見雅由、角田洋一、加藤大悟、阿部豊文、矢澤浩治、高原史郎、野々村祝夫. 腎阻血再灌流障害におけるケモカインの発現と T 細胞浸潤抑制による腎保護効果. 第 100 回日本泌尿器科学会総会. 2012 年 4 月 21 日、神奈川県横浜市
10. 津田秀年、山原研一、奥見雅由、矢澤浩治、貝森淳哉、猪阪善隆、池田智明、高原史郎. 腎虚血再灌流障害における卵膜由来間葉系幹細胞の抗炎症作用の機序検討. 第 55 回日本腎臓学会学術集会. 2012 年 6 月 1 日、神奈川県横浜市
11. 宮川周士、角田洋一、奥見 雅由. 腎移植後の急性 T 細胞関連型拒絶反応における Membrane Cofactor Protein の発現. 第 49 回補体シンポジウム. 2012 年 8 月 24 日、大阪府大阪市
12. 蔦原宏一、奥見雅由、角田洋一、矢澤浩治、宮川周士、高原史郎、野々村 祝夫. CD8+NKT 細胞および CD4+T 細胞はラット腎阻血再灌流障害の形成に関与する. 第 48 回日本移植学会総会. 2012 年 9 月 21 日、愛知県名古屋市
13. 貝森淳哉、角田洋一、津田秀年、小尾義嗣、畑中雅喜、奥見雅由、矢澤浩治、猪阪善隆、楽木宏美、野々村祝夫、高原史郎. 多光子顕微鏡による Intravital live imaging を用いたラット急性拒絶モデル腎臓の観察. 第 48 回日本移植学会総会. 2012 年 9 月 21 日、愛知県名古屋市
14. 貝森淳哉、岩井聡美、小林英司、畑中雅喜、津田秀年、小尾義嗣、奥見雅由、矢澤浩治、市丸直嗣、楽木宏美、野々村祝夫、猪阪善隆、高原史郎. 心停止後ラット腎臓の functional MRI を用いた詳細な障害の検討. 第 39 回日本臓器生物保存医学会学術集会. 2012 年 11 月 16 日、福島県福島市
15. 蔦原宏一、奥見雅由、角田洋一、山中和明、加藤大悟、宮川周士、矢澤浩治、高原史郎、野々村祝夫. CD8+NKT 細胞および CD4+T 細胞はラット腎阻血再灌流障害の形成に関与する. 第 39 回日本臓器生物保存医学会学術集会. 2012 年 11 月 16 日、福島県福島市
16. 蔦原宏一、奥見雅由、山中和明、加藤大悟、矢澤浩治、市丸直嗣、高原史郎、野々村祝夫. CXCL10 による移植腎障害の予測. 第 46 回日本臨床腎移植学会. 2013 年 2 月 1 日、千葉県浦安市
17. T. Abe, X.K. Li, M. Okumi, N. Hatayama, L. Xie, Y. Kakuta, K. Tsutahara, K. Yazawa, J. Kaimori, Y. Isaka, S. Takahara, and N. Nonomura Successful Preservation of the Kidney Grafts under Desiccating Conditions with a Mixture of Carbon Monoxide and Oxygen Gases in Rat Kidney Transplantation Model. American Transplant Congress; 2011 May 3- May 5, Philadelphia, USA
18. J.R. Scalea, H. Nishimura, M. Okumi, S.G. Moran, B. Gillon, T. Cormack, D.H. Sachs, and K. Yamada. Evidence for a Balance between Peripheral Alloreactive and Regulatory T-Cells in the Maintenance of Tolerance. American Transplant Congress; 2011 May 3- May 5, Philadelphia, USA
19. H. Tsuda, K. Yamahara, M. Okumi, K.

- Yazawa, N. Ichimaru, J. Kaimori, Y. Isaka, T. Ikeda, and S. Takahara. Allogeneic Fetal Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cells Attenuate Renal Ischemia Reperfusion Injury in Rats. American Transplant Congress; 2011 May 3- May 5, Philadelphia, USA
20. T. Abe, X.K. Li, N. Hatayama, L. Xie, B. Sato, Y. Kakuta, K. Tsutahara, M. Okumi, K. Yazawa, J. Kaimori, M. Natori, S. Takahara, and N. Nonomura. Hydrogen-Rich UW Solution Attenuates Renal Cold Ischemia Reperfusion Injury. American Transplant Congress; 2011 May 3- May 5, Philadelphia, USA
21. Y. Kakuta, M. Okumi, K. Tsutahara, K. Yazawa, K. Matsumura, S.H. Hyon, S. Takahara, and N. Nonomura. Epigallocatechin-3-Gallate Protects Kidneys from Ischemia Reperfusion Injury by Inhibition of Macrophage Infiltration. AUA Annual Meeting; 2011 May 14-May 19, Washington D.C., USA
22. Y. Kakuta, M. Okumi, K. Tsutahara, T. Abe, K. Yazawa, K. Matsunami, S. Miyagawa, S. Takahara, and N. Nonomura. CCR5/CXCR3 Blockade Prolonged Kidney Allograft Survival with or without Cyclosporine via the Inhibition of T-Cell and Macrophage Recruitment. AUA Annual Meeting; 2011 May 14-May 19, Washington D.C., USA
23. J. Y. Kaimori, T. Abe, H. Tsuda, M. Ishii, M. Okumi, K. Yazawa, Y. Isaka, H. Rakugi, N. Nonomura, S. Takahara. Multi-Photon Microscopy Based Kidney Live Imaging Identifies a Series of Micro-Circulation Changes in a Rat Acute Kidney Rejection Model. American Transplant Congress; 2012 June 2-6, Boston, USA
24. T. Kato, K. Yazawa, M. Tanemura, Y. Kakuta, K. Tsutahara, M. Okumi, Y. Iwagami, Y. Ohmura, H. Nagano, S. Takahara, Y. Doki, M. Mori, and N. Nonomura. Adipose Tissue - Derived Stem Cells Infusion Prevents Acute Cellular Rejection in Rat Kidney Transplantation. 24th International Congress of the Transplantation Congress; 2012 July 15-19, Berlin, German
25. K. Tsutahara, M. Okumi, Y. Kakuta, T. Kato, K. Yazawa, S. Miyagawa, J. Kaimori, S. Takahara, and N. Nonomura. CD8+NKT cells and CD4+T cells mediate ischemia reperfusion injury at early phase in rat experimental model. 32nd Congress of the Société Internationale d'Urologie; 2012 Sept 30-Oct 4, Fukuoka, Japan

〔産業財産権〕 出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥見 雅由 (OKUMI MASAYOSHI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 60512978