

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461945

研究課題名(和文) 小腸移植における補体制御による新たな免疫抑制療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel immunosuppression to regulate complement in intestinal transplant

研究代表者

上野 豪久 (UENO, Takehisa)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10456957

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)：小腸移植は他臓器の移植に比べるといまだにその生着率が悪く、現行の免疫抑制法では不十分である。特に液性拒絶が拒絶に関与しているため、それをコントロールする新たな免疫抑制剤の必要性に迫られている。近年、小腸移植においては補体産生と補体制御因子の発現がT細胞関連拒絶反応に重要である事が報告されている。今回、ラット小腸移植モデルを使い、補体と補体制御因子の発現を中心に、移植小腸を模した虚血再灌流モデルにおいてその関係を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Intestinal transplant is poor result comparing with other organ transplant. Current immunosuppression cannot regulate rejection. Especially antibody has a role for rejection so that novel immunosuppression to control them. Recently it was reported that expression of complement and complement regulatory factor have a major role for T cell related rejection. We investigated expression of complement and complement regulatory factors, then the relationship was revealed using ischemia and reperfusion rat model mimicking intestinal transplant.

研究分野：小児外科

キーワード：小腸移植 拒絶 補体 補体制御 ラット 虚血再灌流

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに移植小腸に抗体を投与し MADCAM の発現・作用を抑制することが生着に有効であることを明らかにした。(Transpl Immunol. 2007;17:271-7.)
 ・また CCR5・CXCR3 インヒビター, TAK-779, の全身投与が graft 生着に有効では有るが、リンパ球の活性化を抑制する作用は乏しいこと。(Transplantation. 2008;86:1810-7.)
 ・逆に、カルシニューリンインヒビターである FK506 はリンパ球の活性化を抑制する作用はあるが、ケモカインの発現には作用しないこと。(Transpl Immunol. 2011; 25: 49-55.) などの研究を行ってきた。

一方近年、移植小腸の補体産生と補体制御因子の発現が、液性拒絶反応だけでなく、細胞性拒絶反応に重要である事が、多くのノックアウトマウスを使った実験で明らかになって来た。加えて、実際の臨床でも液性拒絶と補体の C4d の発現が予後を決定する因子である事が報告されている。

今回我々は、過去のケモカインに対する研究をふまえて、補体系特に化学伝達物質でもある C5a に着目し、移植小腸内で C5a を完全に抑制する事で移植小腸に対する補体系の関与を調べ、小腸移植における拒絶の制御を研究する。

加えて、補体系が抗原提示細胞 (DC) -T 細胞間での第三シグナルである可能性を考慮して、細胞性拒絶に関する Th1 や Treg の産出を調べる。

2. 研究の目的

小腸移植は他臓器の移植に比べるといまだにその生着率が悪く、現行の免疫抑制法では不十分である。特に液性拒絶が拒絶に関与しているため、それをコントロールする新たな免疫抑制剤の必要性に迫られている。我々は今までに、リンパ球の移植小腸への回帰の観点から、接着因子 MadCAM の制御、ケモカイン CCR5・CXCR3 の抑制による移植小腸への効果を検討してきた。一方近年、小腸移植においては補体産生と補体制御因子の発現が T 細胞関連拒絶反応に重要である事が臨床でも報告されている。今回、ラット小腸移植モデルを使い、補体と補体制御因子の発現を中心に、移植小腸における補体系の制御によって、移植小腸の拒絶を軽減することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物には 体重 150-200g の 5 週令 Lewis ラットを用いて実験を行った。補体阻害剤としてメシル酸ナファモスタット (フサン) を 5% ブドウ糖に溶解して 1mg/kg で血管内投与を行った。コントロールとしては同

量の 5% グルコースの投与を行った。

(2) 腸管内の発現量の測定には小腸の切除標本のうち 5mm の腸管全体、パイエル小体、腸管粘膜を NucleoSpin RNA (Takara, Osaka, Japan) で RNA を抽出し、RT-PCR にて cDNA を調製した。これをリアルタイム PCR 法に使用した。

(3) 補体発現の測定にはリアルタイム PCR 法を使用した。下記のように C3, C4, C5, C6 のプライマーを作成し、Primix Taq (Takara) を使用して反応させた。GAPDH の発現量を基準値として各々の遺伝子の発現を比較した。

IL-6	TGATGGATGCTTCCAAACTG	GAGCATTGGAAGTTGGGGTA
TNF- α	ACTGAACTTCGGGGTGATTG	GCTTGGTGGTTTGCTACGAC
GAPDH	GTATTGGGCGCCTGGTACC	CGCTCCTGGAAGATGGTGTAGG

C1B	GCGGTGATTATTACAAGCAACCA	GCACGAAGTACTCGGACACCA
C3	GACCTGCGACTGCCCTACTCT	CTGTGAAAGTGGTTGAAGACG
C4	AGACCCGCAACTTTCGTGTCC	TGAGCTCAGGGATCCAGAGTC
CD55	CTGTGGACTGGGATGACGTATTC	TCACCGACTGTCTATATGCGTAGGA

(4) 虚血再灌流モデルは、ラットをイソフルランで麻酔したのちに、腸間膜根部を血管監視で阻血して 15 分間阻血を行った。そののちに血管鉗子を取り除き、再灌流を行った。阻血再灌流モデルを作成した。

(5) 補体の発現を検出するために、腸管のパラフィン切片を作成し、H&E 染色と、補体の免疫染色を行った。

(6) 小腸移植モデルは、ドナーのラットに麻酔をかけたのちに、10 cm の小腸を上腸間膜動脈と門脈を付けたまま摘出し氷冷とした。レシピエントの大動脈と下大静脈に上腸間膜静脈と門脈をそれぞれ吻合した。ストマを造設し腸管の観察に供した。

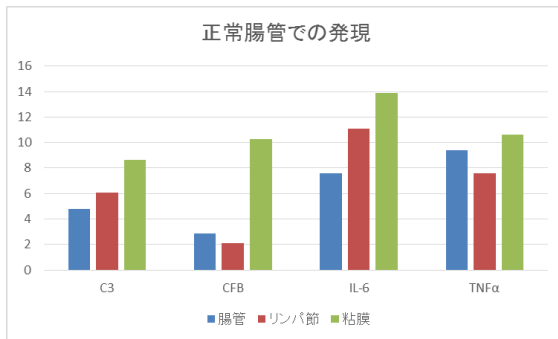


(7) 小腸移植モデルでの補体の発現も虚血再灌流モデルと同様に測定した。

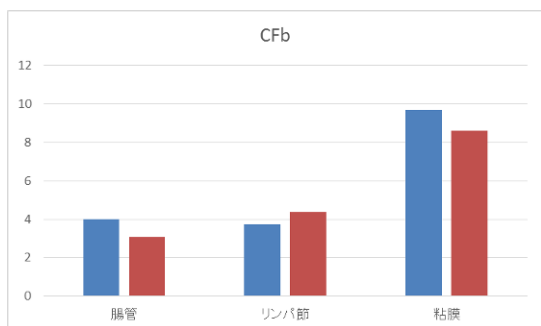
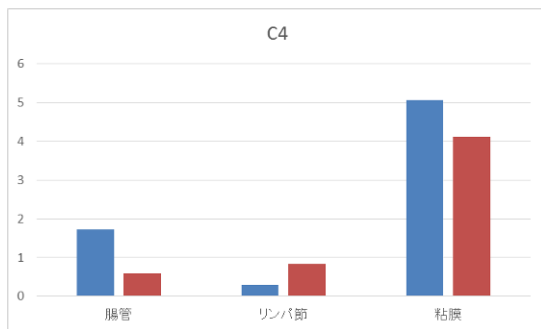
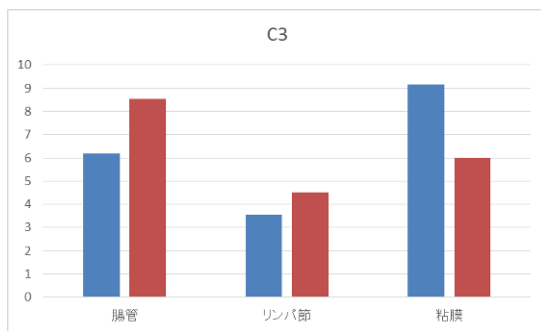
4. 研究成果

(1) 5 週令のラットを用いて、小腸の虚血再灌流モデルを作成することができた。虚血再灌流を行った腸管は後の実験に使用した。

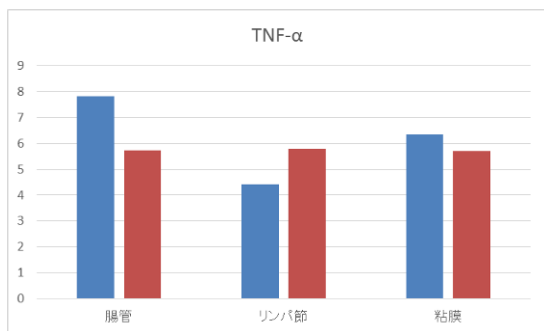
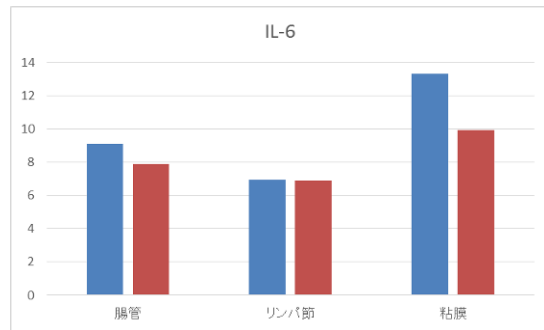
(2) 正常での補体発現をリアルタイム PCR 法にて測定をした。C4 は誤差が大きくてデータから取り除いた。また、炎症の評価としての IL-6 と TNF- α の測定も行った。C3 の発現は腸間膜粘膜で発現が最も多く、次いでリンパ節 (パウエル板) 腸管であった。



(3) つぎに小腸移植モデルの作成が極めて困難であったため、阻血再灌流モデルを作成した。阻血再灌流モデルによる各補体の発現と、炎症の評価のために IL-6 と TNF- α の発現を評価した。また補体阻害剤を投与して補体の抑制と炎症の関連について評価を行った。

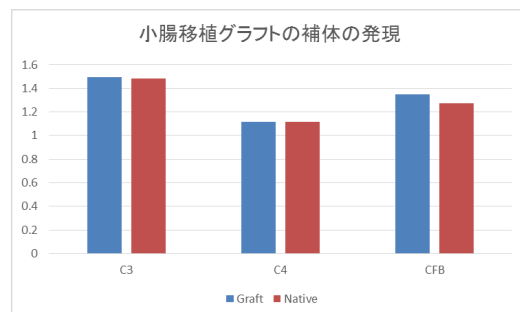


補体 C3 に関しては、補体阻害剤を使用したほうが発現が増強していた。これは、補体阻害剤にて補体が抑制されるため、代償的に体の発現が増加したと考えられる。



補体阻害剤の効果の評価に用いた IL-6 と TNF- α は発現量が低下され補体の抑制によって虚血再灌流後の炎症、ゆくゆくは小腸移植後の腸管炎症や拒絶などがコントロールできる可能性が示唆された。

(4) 小腸移植ラットの作成に成功し、長期生存を得た。小腸移植モデルも抽出し同様に補体の発現を測定した。

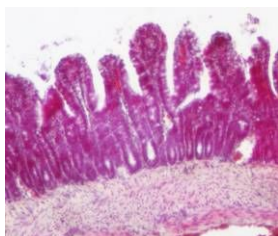


小腸移植グラフトと、Native 腸管の間で補体や補体制御因子の有意な発現の差は認めなかった。

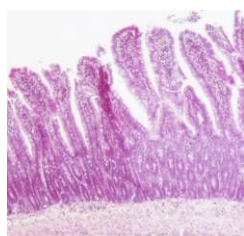
(5)腸管の H&E 染色と、補体の発現の免疫染色を行った。

H&E 染色

コントロール

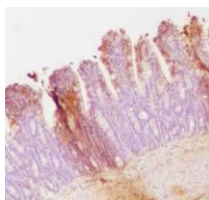


阻害剤

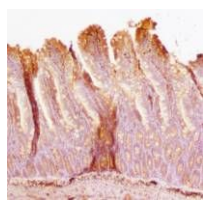


C3 染色

コントロール



阻害剤



H&E 染色ではコントロールのほうが虚血再灌流による障害を受けていることがわかる。一方 C3 のタンパクレベルの発現においてもリアルタイム PCR 法による mRNA の発現と同様に阻害剤を投与した腸管で発現が亢進していることがわかる。以上のことから補体抑制剤によって腸管の炎症、ひいては拒絶のコントロールができる可能性が示唆された。

<引用文献>

1.Y Ihara, S Miyagawa 他 Effect of blocking the mucosal address in cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in a rat small intestinal transplantation model. *Transplant Immunol* 17: 271-277, 2007

2. Takama Y, Miyagawa S 他 Effects of a calcineurin inhibitor, FK506, and a CCR5/CXCR3 antagonist, TAK-779, in a rat small intestinal transplantation model. *Transpl Immunol*. 2011 Jul;25(1):49-55

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 18 件)

1. Takehisa Ueno, Shuichiro Uehara, Kengo Nakahata, Hiroomi Okuyama. Survivin selective inhibitor YM155 promotes cisplatin-induced apoptosis in embryonal rhabdomyosarcoma. *Int J Oncol*. 2016 Mar 10. [Epub ahead of print] 査読有
2. Ueno T, Zenitani M, Yamanaka H, et.al. Impact of Donor Specific Antibody to graft fibrosis after Pediatric Living Donor Liver Transplantation for Biliary Atresia. *Transplant Proc*. 2016 in press 査読有
3. Yamamichi T, Oue T, Yonekura T, Owari M, Nakahata K, Umeda S, Nara K, Ueno T, et. al: Clinical application of indocyanine green (ICG) fluorescent imaging of hepatoblastoma. *J Pediatr Surg*. 2015 May;50(5):833-6
4. 上野 豪久,【拒絶反応における ATG(サイモグロブリン)の役割】小腸移植における拒絶反応の治療と ATG, 今日の移植 (0916-0094)28 巻 4 号 Page492-496(2015.09) 査読無
5. 上野 豪久, 松浦 俊治, 福澤 正洋, 田口 智章, 日本小腸移植研究会, 本邦小腸移植症例登録報告, 移植 (0578-7947)50 巻 2-3 号 Page191-195(2015.08) 査読無
6. 上野 豪久,【小児短腸症候群】本邦の小腸移植症例について, 外科と代謝・栄養 (0389-5564)49 巻 1 号 Page27-33(2015.02) 査読有
7. Miyagawa S, Maeda A, Kawamura T, Ueno T, et. al: A comparison of the main structures of N-glycans of porcine islets with those from humans. *Glycobiology*. 2014 Feb;24(2):125-38. 査読有
8. Maeda A, Kawamura T, Ueno T, et. al: Monocytic suppressor cells derived from human peripheral blood suppress xenogenic immune reactions. *Xenotransplantation*. 2014 Jan-Feb;21(1):46-56. 査読有
9. Miyagawa S, Maeda A, Eguchi H, Kawamura T, Kashiyama N, Ueno T, et. al: A structural analysis of N-glycans of neonatal porcine islet-like cell clusters (NPCC). *Transpl Immunol*. 2014 Jun;31(1):48-53. 査読有
10. Ueno T, Wada M, Hoshino K, Uemoto S, Taguchi T, Furukawa H, Fukuzawa M. Impact of intestinal transplantation for intestinal failure in Japan. *Transplant Proc*. 2014 Jul-Aug;46(6):2122-4. 査読有
11. Zenitani M, Ueno T, et. al: A case of

- pediatric live-donor liver transplantation with a left lateral segment reduction by a linear stapler after reperfusion. *Pediatr Transplant*. 2014 Sep;18(6):E197-9. 査読有
12. 上野 豪久,【移植療法の現況と今後の展望】臓器移植 小腸移植,診断と治療 (0370-999X)102 巻 10 号 Page1515-1520(2014.10) 査読無
 13. 上野 豪久,【わが国における小児移植医療の現状と今後】小腸移植,小児科 (0037-4121)55 巻 9 号 Page1275-1283(2014.08) 査読無
 14. 貞森 裕, 八木 孝仁, 藤原 俊義, 上野 豪久, 福澤 正洋,【Intestinal Failure への挑戦】成人発症の短腸症候群による Intestinal Failure の病態とその予後,消化と吸収 (0389-3626)36 巻 3 号 Page311-317(2014.07) 査読有
 15. 上野 豪久, 田口 智章, 福澤 正洋, 日本小腸移植研究会,本邦小腸移植症例登録報告,移植 (0578-7947)49 巻 2-3 号 Page298-302(2014.07) 査読無
 16. 上野 豪久, 福澤 正洋,【Intestinal Failure への挑戦】全国調査に基づくわが国における Intestinal failure の現状 治療指針策定に向けて,消化と吸収 (0389-3626)36 巻 3 号 Page290-294(2014.07) 査読有
 17. Miyagawa S, Maeda A, Takeishi S, Ueno T, et. al: Lectin array analysis for wild-type and -Gal-knockout pig islets versus healthy human islets. *Surg Today*. 2013 Dec;43(12):1439-47. 査読有
 18. Ueno T, Wada M, Hoshino K, Uemoto S, Taguchi T, Furukawa H, Fukuzawa M. Impact of pediatric intestinal transplantation on intestinal failure in Japan: findings based on the Japanese intestinal transplant registry. *Pediatr Surg Int*. 2013 Oct;29(10):1065-70 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 上野豪久他、腸管不全の予後と小腸移植の適応に関する検討 第52回 日本小児外科学会定期学術集会 2015.5 神戸
2. 上野豪久他、小腸移植の国際的潮流とトピックス 第27回 日本小腸移植研究会 2015.3 岡山
3. 上野豪久他、ヒルシユスプルング類縁疾患の小腸移植 第51回 日本小児外科学会定期学術集会 2014.5 大阪
4. 上野豪久他、「腸管不全に対する小腸移植技術の確立に関する研究」の活動報告 第26回 日本小腸移植研究会 2014.3 宇都宮

〔図書〕(計 2 件)

1. 上野豪久、小腸移植、臓器移植ファクトブック 2015、単行本
2. 上野豪久 他、小腸移植、臓器移植とそのコーディネーション 2015、単行本

6. 研究組織

(1)研究代表者

上野 豪久 (UENO, Takehisa)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：10456957

(2)研究分担者

正畠 和典 (MASAHATA, Kazunori)
大阪大学・医学部付属病院・医員
研究者番号：40588381

(3) 研究分担者

山道 拓 (YAMAMITI, Taku)
大阪大学・医学部付属病院・医員
研究者番号：30715165

(4) 研究分担者

梅田 聡 (UMEDA, Satoru)
大阪大学・医学部付属病院・医員
研究者番号：60715167