

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861146

研究課題名(和文) ヒト化マウス血管移植モデルにおけるヒトアナージー細胞の慢性拒絶反応抑制効果の検討

研究課題名(英文) The effect of immunosuppressive anergy cells on transplant arteriosclerosis in humanized mouse model

研究代表者

後藤 了一 (Goto, Ryoichi)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：10645287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ドナー抗原特異的な免疫抑制細胞が慢性拒絶、血管病変を制御しえるかについて検討した。最初に健康成人のリンパ球から当科から既報の抗原特異的抑制免疫細胞が誘導できた。また繁殖した免疫不全マウス(NSGマウス)にヒト免疫が構築できることを確認した。構築の過程をCFSEラベル法で観察した。この構築したヒトリンパ球のヒト抗原への反応をKi-67にて観察した。またヒト血管移植マウスモデルの作成の前段階としてマウスでの血管移植モデルを作成した。さらに血管病変の原因としてドナー特異的な抗体の関与が報告されていることから当院での肝移植後患者からの臨床検体を用いて抗体の産生状況と慢性拒絶の有無についてまとめた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effect of donor antigen specific immunosuppressive anergy cells on chronic rejection such as transplant arteriosclerosis. First, we confirmed that the immunosuppressive anergy cells were successfully generated from lymphocytes of healthy volunteer. Next, the severe immunodeficient NSG mice were reconstituted human PBMC and investigated the proliferation of human PBMC in vivo by CFSE labeling technique. Also when another irradiated human lymphocytes were injected into reconstituted mice as a donor antigen stimulation, the immune responses were observed by Ki-67 staining after stimulation. Further, to establish a human vessel transplant model, murine aortic transplant model has been established. In addition we evaluated the relationship between anti-donor antigen antibody and chronic rejection in liver transplant clinical setting.

研究分野：移植免疫

キーワード：抗原特異的 免疫抑制細胞 ヒト化マウス NSGマウス 血管移植モデル

1. 研究開始当初の背景

臓器移植は周術期管理の改善、免疫抑制剤の改良等により短期成績は著明に改善したが、未だに長期成績は不良である。その主原因は慢性拒絶反応の制御が不十分であるためと考えられている。慢性拒絶反応の主病変はグラフト血管内膜肥厚であり、これに引き続く線維化、グラフト機能不全である。しかし血管内膜肥厚の原因が多岐にわたるために、これまでの汎免疫抑制剤投与による治療戦略では十分に制御できていない。最近、制御性T細胞などの細胞治療による血管病変制御の可能性が報告されている (Nadig S., Nat Med 2010)。また臓器移植の最終目的である免疫寛容が誘導されれば理論的には慢性拒絶反応は生じない。我々の施設ではレシピエントのリンパ球を移植1週間前より2週間ドナー抗原刺激と抗CD80/86抗体による副刺激経路遮断下に混合培養し、ドナー抗原特異的な抑制効果をもつアナージー細胞を作成することに成功した。これを細胞治療として生体肝移植レシピエントに投与すると約7割の症例で移植後免疫寛容が誘導されることが明らかになった (Yamashita K, World Transplant Congress 2014, San Francisco, plenary sessionにて発表)。この免疫抑制性アナージー細胞を用いて慢性拒絶反応の制御が可能であることが示されれば、移植医療における最大の問題である慢性拒絶反応の制御、移植グラフトの長期成績向上に福音となると考えられる。

2. 研究の目的

ドナー抗原特異的なアナージー細胞を作成し、その血管内膜肥厚の抑制効果をヒト化マウス血管移植モデルにおいて検証する。

3. 研究の方法

研究代表者が留学先のOxford大学にて確立した方法を用いてヒト化マウス血管移植モデルを確立する。

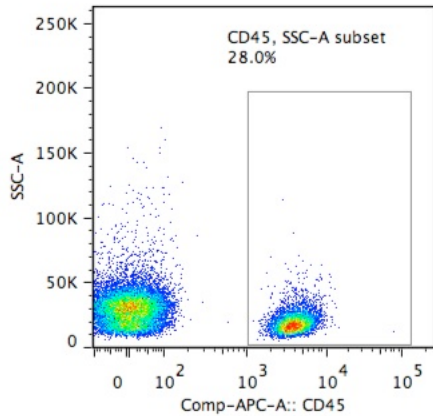
- (1) NOD/Scid IL-2Rg null マウスを我々の研究室で繁殖する。
- (2) NOD/Scid IL-2Rg null マウスへのヒト免疫細胞の構築を確認する。
 - ① 採血後速やかに処理したヒトリンパ球 5×10^6 個での構築の検討
 - ② 採血後速やかに処理したヒトリンパ球 10×10^6 個での構築の検討
- (3) NOD/Scid IL-2Rg null マウスへのヒトリンパ球構築後 (ヒト化) 他者のヒト抗原に対して特異的な免疫反応が得られるかどうかの検討
 - ① CFSE を用いた構築後のヒトリンパ球の増殖反応の検討
 - ② Ki67 の染色によるヒト抗原投与後の

抗原特異的な反応の検討

- (4) ヒト血管移植の前段階としてのマウスの血管移植モデルの確立。
 - ① 血管移植手技; AllograftとしてBALB/cマウスの胸部大動脈を採取し、C57BL/6マウスの腹部大動脈へ置換グラフト移植する。Syngenic graftとしてはC57BL/6マウスの胸部大動脈を使用する。顕微鏡下 (20倍) において10-0ナイロン糸で結節縫合による端々吻合を上下に施行する。マウスの麻酔は気化麻酔下に施行する。
 - ② 血管グラフトの病理; 血管グラフト移植後30日目に摘出し、OCTコンパウンドに包埋し液体窒素で固定する。組織は $5 \mu\text{m}$ に薄切し、プレパラートに採取、乾燥させた後アセトンで処理し、Elastica van Gieson染色、またはH&E染色にて観察する。内膜肥厚の程度をphotoshop®にて処理し元々の内腔に定める新生内膜の程度の割合を算出して評価する。
 - (5) ヒト血管は消化器癌の手術検体から病理診断に影響を及ぼさない腸間膜動脈を採取する。上記に必要な当院倫理審査委員会への提出書類を作成する。
 - (6) 抗原特異的なアナージー細胞の作成と検討
 - ① Healthy volunteer から採取したリンパ球を照射した他者のリンパ球と抗CD80/86抗体による副刺激経路遮断下に2週間共培養し、ヒトアナージー細胞を作成する。
 - ② 作成したヒトアナージー細胞が共培養した抗原特異的な免疫抑制機能を有するかをリンパ球混合培養試験において検討する。
 - (7) 移植グラフトの血管病変の主要原因としてグラフトに対する抗体が関与していると報告されている。抗体が関与する血管病変に対してもヒト抗原特異的な抑制を有するアナージー細胞が病変抑制効果を有するかを検討する。まず我々の施設でフォローしている肝移植後の患者さんが実際に抗体関連の慢性拒絶反応を生じているかどうか臨床データを用いて検討する。
- ### 4. 研究成果
- (1) ヒト化マウス作成のためにヒト化効率が良いNOD/Scid IL-2Rg nullマウスをジャクソン研究所より購入し、繁殖に成功した。
 - (2) NOD/Scid IL-2Rg nullマウスにヒトリンパ球を 5×10^6 個輸注した結果、主にヒトT細胞をNSGマウスに構築できた (図

1)。

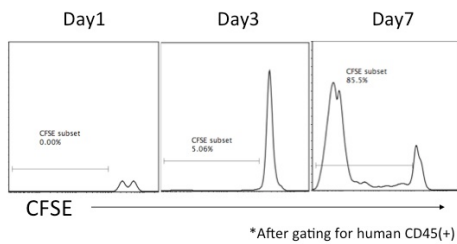
図1 PBMC 5million/mouse投与後2週間



(3) NOD/Scid IL-2Rg null マウスへのヒトリンパ球構築後の検討

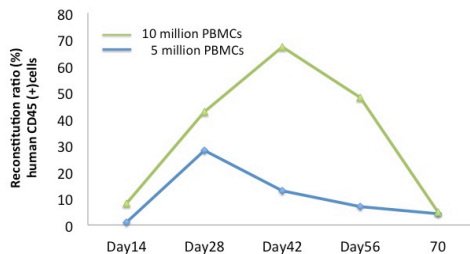
- ① ヒトリンパ球構築の過程を観察する目的で CFSE ラベルしたヒトリンパ球を腹腔内投与し、分裂を投与1週間目の腹腔内洗浄液で観察した。投与リンパ球の分裂は急速であることが明らかになった (図2)。

図2. CFSE label PBMC 腹腔内投与



また腹腔内投与にて再構築されたヒトリンパ球は移植後 4-6 週間をピークに末梢血に観察されることが明らかになった (図3)。

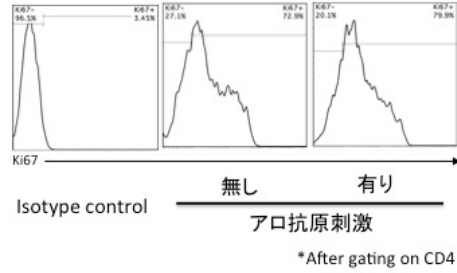
図3. ヒト細胞再構築率と経過



- ② NOD/Scid IL-2Rg null マウスへ構築されたヒトリンパ球が他者のヒト抗原特異的に反応し得るかどうかを観察した。ヒトリンパ球をマウスに構築後約 2-3 週間経過した後に他者のヒト抗原を腹腔内投与し、構築されたヒトリンパ球が反応しえるかどうかを Ki67 の染色で FACS において観察した。その結果

ヒト抗原に対し特異的な反応を観察することが出来なかった (図4)。

図4

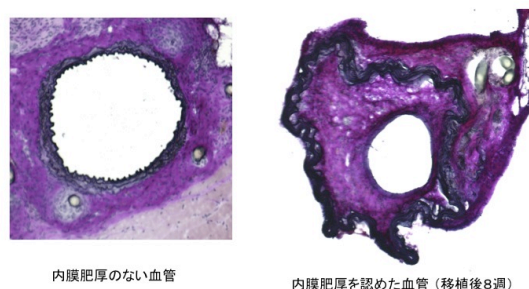


この解釈としてヒトリンパ球は構築したマウスに対しても GVHD 反応を生じ、分裂し得るためヒト抗原に対する反応のみを取り出して観察することが in vivo においては難しい可能性が示唆された。この結果からヒト血管移植の際に移植したヒト血管に対する反応がヒトに対する特異的な反応であるか、マウスに対する GVHD 反応の影響をみているかどうか重要な問題になる可能性があるが、構築したヒトリンパ球と同じドナーから採取したヒト血管を移植した場合の反応が無いことが観察され、他人のヒト血管を移植した場合に内膜肥厚が観察されればヒト抗原特異的な反応として理解されると考え、ヒト血管移植モデルにおいて今後観察する方針とした。

- (4) 次にヒト血管移植マウスモデルの作成のヒト血管での移植モデルに比べ難易度の低いマウス間での血管移植モデルが可能かどうか検討した。

- ① 最初に ddy マウスの胸部大動脈を syngenic の ddy マウスに移植し検討した。同マウスにおいて移植成功率が 90%以上となったことを確認後、MHC fully mismatch の BALB/c マウスから C57BL/6 マウスの腹部大動脈へ置換移植するモデルを検討し、血管移植成功率 90%以上で可能であることを確認した。
- ② syngenic と allo の移植血管グラフトにおける血管内膜肥厚を移植後 30 日目のグラフト病理像 (Elastica van gieson 染色) で確認した (図5)。

図5. マウス血管移植後内膜肥厚



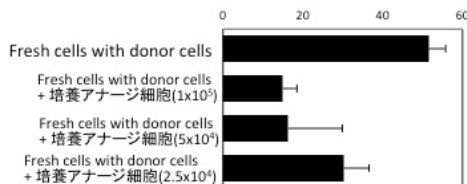
内膜肥厚のない血管

内膜肥厚を認めた血管 (移植後8週)

Allograft に対し図 5 のように約 50%の血管内膜肥厚が生じるのに対し、syngenic graft は内膜肥厚が生じないことが分かった。この結果から血管内膜肥厚はアロ特異的な反応であることが示された。これらの実験血管からヒト血管を消化器癌患者の腸間膜動脈から採取し、ヒトリンパ球を構築した免疫不全マウス（ヒト化マウス）に移植した場合にヒト血管に対する免疫反応の結果として内膜肥厚の観察が可能であると考えられた。

- (5) (1)-(4)の結果を踏まえヒト血管採取に関し当院倫理審査委員会への申請を行った。
- (6) ドナー抗原特異的なヒトアナージー細胞が健康成人のリンパ球を用いて誘導可能であるかどうかを検討した。健康成人から採取したリンパ球を他者の放射線照射したリンパ球と混合培養し、その際に抗 CD80/86 に対する抗体を加えることで一部の副刺激経路を遮断した。その状態で 2 週間培養し、作成された培養リンパ球がドナー抗原特異的なアナージー細胞であるかを同一個体間での混合リンパ球増殖検査の培養中にヒトアナージー細胞を加える検討を行った (図 6)。

図 6

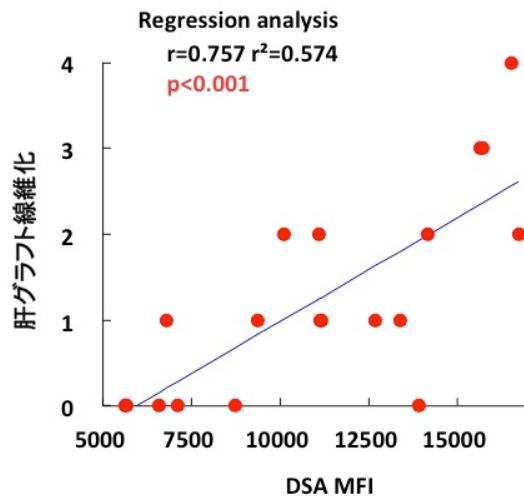


その結果、細胞数依存的にドナー抗原に対する免疫反応が抑制されることが示された。この結果は臨床試験において患者のリンパ球から誘導されたヒトアナージー細胞の結果に比べて同等の抑制効果であり、健康成人のヒトリンパ球からもドナー抗原特異的なアナージー細胞が作成できることが明らかになった。

- (7) 慢性拒絶反応には近年の報告で移植グラフトに対する抗体が影響を及ぼしていることが明らかになりつつある。我々の施設においても肝移植後レシピエントにおいて移植グラフトに対する抗体産生がみられることが近年の single antigen assay (LabScreen) の汎用性により明らかになってきた。そこで肝移植の臨床における移植グラフトに対する抗体の影響について検討した。その結果移植グラフトに対して抗体産生がみられる場合には移植グラフトの慢性拒絶反応の一形態であるグラフトの線維化が促進され

ることが明らかになった (図 7)。

図 7



特に抗体を検出する際の蛍光強度が強い程、肝移植グラフトの線維化が進行することが明らかにされた。今後この抗体をヒト血管移植マウスモデルに投与し、移植ヒト血管に対して内膜肥厚を促進するかどうかを検討する予定である。またその場合に抗原特異的な抑制効果を持つヒトアナージー細胞が抗体に対する慢性拒絶反応の制御も可能であるか検討する。

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 4 件)

- ① 後藤了一、深作慶友、腰塚靖之、川村典生、高橋 徹、青柳武史、太田稔、鈴木友己、山下健一郎、武富紹信、嶋村 剛、当院における抗体関連グラフト障害に対する戦略 移植前クロスマッチ陽性から移植後抗ドナー抗体陽性まで、第 33 回日本肝移植研究会、2015 年 5 月 28 日 - 2015 年 5 月 29 日、ホテルオークラ神戸 (神戸市)
- ② Fukasaku, Y, Goto, R, Emoto, S, Kawamura, N, Koshizuka, Y, Takahashi, T, Ota, M, Aoyagi, T, Yamashita, K, Taketomi, A, Shimamura T, The higher MFI of *de novo* donor-specific anti-HLA antibodies is correlated with graft fibrosis progression in living donor liver transplantation, American Transplant Congress. 2015.5.3 - 2015.5.6, Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, USA)
- ③ 深作慶友、後藤了一、江本慎、川村典生、腰塚靖之、高橋徹、太田稔、青柳武史、鈴

木友己、神山俊哉、山下健一郎、武富紹信、嶋村剛、当院における肝移植後 de novo ドナー特異的抗 HLA 抗体陽性症例の検討、第 115 回日本外科学会総会、2015 年 4 月 16 日-2015 年 4 月 18 日、名古屋国際会議場（名古屋市）

- ④ Nagatsu. A, Yamashita. K, Zaito M, Emoto S, Asahi Y, Ono H, Ogura M, Tsunetoshi Y, Goto R, Bashuda H, Taketomi A, Okumura K, Todo S, Ex-vivo Generation of human regulatory T cells by CD80/86 costimulation blockade, European Society for Organ Transplantation. 2013.9.8-2013.9.11, Austria Center Vienna (Vienna, Austria)

〔その他〕

北海道大学病院消化器外科 I ホームページ
<http://www.surg1-hokudai.jp/research/group/exp/details/1010.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 了一 (GOTO RYOICHI)
北海道大学・北海道大学病院・医員
研究者番号：10645287

(2)研究分担者

なし