

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 23 日現在

機関番号： 14401
 研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2010～2012
 課題番号： 22390246
 研究課題名 (和文) 臨床応用を目指した死体臓器移植グラフトの免疫寛容に関する実験的検討
 研究課題名 (英文) Experimental research of immunological tolerance in allograft from cadaveric donors for clinical trial
 研究代表者
 福嶋 教偉 (FUKUSHIMA NORIHIDE)
 大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授
 研究者番号： 30263247

研究成果の概要 (和文)：

実験期間中に、抗ヒト胸腺細胞製剤 (ATG) が、アカゲザル胸腺細胞を減少させることを明らかにし、X、Y プローブを用いた FISH 染色によるキメラ解明方法を確立し、骨髄灌流を用いた骨髄移植手技を確立した。術後は、ATG、などの免疫療法を行い、末梢血リンパ球のキメラは確認されなかったが、ドナー球に対する MLR は 3rd party と比較して有意に低下していた。実験期間内に腎臓移植を行うことはできなかった。

研究成果の概要 (英文)：

During the study period, it was revealed in Rhesus monkeys that anti-human thymocyte globulin may reduce the number of T-cell, that chimerism of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) can be detected and that bone marrow transplant can be done by perfusion technique. Although chimerism of PBMC was not observed, mixed lymphocyte reaction (MLR) against the donor lymphocytes was significantly reduced compared to that against lymphocytes of third party monkey

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2012 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野： 医師薬学

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： 移植外科学

1. 研究開始当初の背景

臓器移植は末期的臓器不全患者の外科治療として確立されてきている。しかし、移植した臓器はホストの激しい拒絶反応に曝され、その反応を抑制するために免疫抑制剤を生涯使用する必要がある。これらの薬剤はホストの免疫機能を抑制するため、悪性腫瘍の発生が増加したり、細菌、真菌

やウイルスなどに感染しやすくなったり、あるいは小児では深刻な生長障害をきたす原因となっている。また、急性期の拒絶反応を逃れたとしても、慢性期には移植片 (グラフト) 内の血管などの管腔の狭窄や閉塞をきたし、グラフト機能を失うことも多い。従って、移植における分野では、どの臓器においても、免疫抑制剤を使用しなくても移植グラフトが生着している状態、つまり、免疫寛

容状態（トランス）を以下に作り出すかが重要なテーマとなっている。しかし、未だ拒絶反応を完全に抑制することは一部の場合（双生児からの移植、小児生体間肝臓移植など）を除いて臨床的に達成されておらず、特に死体臓器移植において臨床的に免疫寛容に至る方法は開発されていないのが現状である。

これまで小動物においては、様々な臓器移植の分野において、免疫寛容状態を達成できたという実験的研究がなされている。特にマウスを用いた実験であるが、抗 LFA/ICAM-1 抗体を用いた免疫寛容の誘導の成功は、移植免疫の世界では画期的な発表であった（Isobe M, et al. Science 1992;255:1125-1127）。その後、副刺激シグナル伝達分子に対する抗体を用いて研究は一気に加速し、種々の抗体を用いて免疫寛容を誘導したという報告が発表された（Lenschow DJ, et al. Science 1992;257:789-792; Bashuda H, et al. Transplant Proc 1996;28:1039-1041）。これに引き続いて、臨床応用を目指して、霊長類を用いた実験が行われたが、抗 CD80/CD86 抗体を用いた実験では 21~35 日（Vincenti F, et al. N Engl J Med 2005;353:770-781）、CTLA4-Ig を用いた実験では 20~30 日（Ossenvoort MA, et al. Transplantation 1999;69:1010-1018）と長期の生存は得られなかった。唯一、抗 CD40L 抗体を用いた実験で免疫抑制剤を中止後 1 年以上生存した霊長類を得ることができた（Kirk AD; Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:8789-8794）が、抗 CD40L 抗体は血小板減少の原因となるため、臨床応用することは困難（Kawai T, et al. Nat Med 2000;6:114）であり、現時点では副刺激シグナル伝達分子に対する抗体を用いたこれ以上の成果を上げた実験的検討はない。

さて、免疫寛容を誘導するアプローチの一つとして、ドナー抗原に対して反応しない細胞（アナジー細胞）を *in vitro* で作成してレシピエント移植コーディネーターに戻す方法（adoptive transfer）がある。アナジー細胞を作成するには、様々な方法がある。代表的なものに、ドナーとレシピエント脾臓を摘出し、各々から得た T リンパ球を混合培養（ドナー T 細胞には放射線照射）する方法がある。混合培養する際に、前述の副刺激シグナル伝達分子に対する抗体を用いると、ドナー抗原に反応しないレシピエントの T リンパ球を得ることができる。この細胞を、腎臓移植する際に戻した霊長類実験では、副刺激シグナル伝達分子に対する抗体として、抗 CD86/80 抗体を用いると、6 例の腎臓移植後 3 例が生存している（Bashuda H, et al. J Clin Invest 2005;115: 1896-1902）。この実験系では、2 週間前から混合培養をしなければならないので、生体腎臓移植に応用できても、死体腎臓移植や心臓移植には応用できない。移植時にレシピエントの脾臓を摘出し、混合培養している間は通常免疫抑制剤を使用することも考えられるが、まだ実験的に証明されるには至っていない。次の方法として、ドナーの胸腺を臓器移植と同時に移植する方法が検討されている。腎臓移

植の場合には、ドナーの腎臓に予めドナーの胸腺の一部を移植して thymokidney を作成しておき、その腎臓を移植すると免疫寛容が得られるという報告がある（Yamada K, et al. Transplant 2003;76:530-536）が、腎臓以外には利用できない上に、死体移植ではできない方法である。

そこで Vascularized 胸腺を臓器と同時に移植する方法も開発されているが、腎臓、心臓で生着期間の延長は見られているが免疫寛容には至っていない（Nobori S, et al. Transplant 2006;81:26-35）。研究分担者の奥見はこれら一連の研究の共同研究者である（研究業績 2006 (1, 3, 4)）、主に class-I の異なるミニチュアブタ間におけるドナー抗原の役割の研究を行ってきた（Okumi M; Transplant 2008; 85: 270-280）。

次の方法として、ドナー骨髄細胞の移入がある。これは、Starzl らが提唱する mixed chimerism（ドナーとレシピエントの造血細胞の共存）を作成して、免疫寛容を誘導する方法である。この実験を長期に渡り、精力的に実施してきたのが、Sykes, Sachs らのグループであるが、分担研究者の奥見はその一員で、ブタ、霊長類を用いて実験を行ってきた（上記並びに研究業績 2008 (1, 3)）。マウス（Sharabi Y, et al. J Exp Med 1989;169:493-502）、ミニチュアブタ（Fuchimoto Y, et al. J Clin Invest 2000;105:1779-1789）を経て、カニクイザルでも免疫寛容が得られている（Kawai T, et al. Transplant 1995;59:256-262）。概略を述べると、移植前にサイクロフォスファミドを数日間投与し、移植当日に抗 CD2 抗体の投与と、胸腺への放射線照射を基本としている。ドナーから骨髄と腎臓を採取し、骨髄細胞を移植後、腎臓を移植する方法である。この結果に基づいて、臨床的腎臓移植が行われた（Kawai T, et al. New Engl J Med 2008;358:353-356）。上記の方法を用いて、5 例中 4 例で免疫抑制剤を中止し、2.0-5.3 年間の生着を認めている。しかし、この方法では、予め 5 日間の免疫抑制剤を必要としており、死体移植には応用できない。

以上をまとめると、生体腎臓移植において、ようやく免疫寛容の可能性が見えてきたが、突然のドナーの現れる死体腎臓移植では、未だに臨床応用できるような治療戦略は開発されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、死体臓器移植（腎臓・心臓）に臨床応用可能な免疫寛容誘導法を、霊長類を用いて開発することである。

これを実現するポイントは、①いかに骨髄細胞の巣窟を作成するか（つまり、レシピエントの骨髄細胞の一部を排除し、ドナーの骨髄細胞が生着できるようにするか）と、②レシピエントの胸腺細胞の機能を低下させるかの 2 つであると、我々は考えている。ドナーが見つかった後、移植までにこの二つのポイントを実現できれば、死体臓器移植にも応用可能と考えている。

従って、本研究の目的は、具体的には、特注の抗胸腺細胞製剤の静脈内投与と胸腺・骨髄の放射線照射により、①②を移植直前に達成し、アカゲザルの死体腎移植及び心移植後の免疫寛容を誘導することである。

3. 研究の目的

1) リンパ球分画の検討

移植前の実験として、アカゲザル 14 頭 (4 頭は 2 回) のリンパ球分画を調査した。ヒトの CD2, CD 3 CD, 4, CD 19, CD 22 などに対する抗体を用いて、FACS をおこなった

2) 骨髄灌流法を用いた骨髄液採取・骨髄移植の手技の確立

関西医科大学病理学第一講座池原進教授に、骨髄細胞の髄内移植法の手技の指導を受け、最初骨髄穿刺針をも用いて、骨髄液採取を試みたが、アカゲザルの大腿骨は非常に硬く、用手的には穿刺針を骨髄腔内に留置できなかった。

次に骨髄輸液路確保用骨髄ニードル穿刺システム使用して、穿刺・骨髄液採取を施行した (概要を以下に記す)。

骨髄採取を行う骨の表面の毛髪を刈り、イソジンで消毒する。大腿骨又は脛骨の片方端 (骨端線より中央寄り) に 5mm 程度の皮膚切開し、皮下組織を剥離して、骨の表面を露出する。術者 (清潔術衣・手袋着用) が骨髄輸液路確保用骨髄ニードルの先端を穿刺部にあて、電動ドライバーをニードルの尾端に実験補助者 (清潔術衣・手袋は着けない) が装着し、ニードルを髄腔内に留置する。

髄腔内に先端が入ると抵抗がなくなる。髄腔液が返ってくることを 5ml 注射器 (ヘパリン活水入り) で確認し、専用のコネクター (逆流防止弁つき) を装着し、ヘパリン活水 (予め 500ml 生食水に 1ml のヘパリンを混注したヘパリン活水を作成しておく) でフラッシュする。反対側端にも同様にニードルを穿刺する。先のニードルから、ヘパリン活水を 30ml 注射器で注入しながら、対側のニードルから骨髄液を採取する。採取ができにくくなるか、ヘパリン活水で採取液が赤色でなくなった時点で骨髄採取は終了する。採取した骨髄液は、清潔の遠心分離用チューブ (Falcon) 50ml に入れる。他の骨も同様の操作で骨髄液採取を行う。

止血確認後、マスクを外し、半覚醒を確認の後、アカゲザルをケージに収納する。

3) Y 染色体染色を用いたリンパ球キメラの検討

① Y 染色体染色を用いたリンパ球キメラの検討

まず、以下の理由から、雄の末梢血リンパ球 (PBMC) ・骨髄細胞を用いて、Y プローブを用いて末梢血リンパ球から FISH 染色を行った

X プローブ染色は可能で、XX であれば 2 つ dot

として光るようであるが、background の調整が難しく、また染まらない細胞もある。一方、Y プローブは非常に specific に光るので、メス→オスへの移植で chimera が成立すれば、Y プローブが光らない細胞をメス由来と判断し、chimera の%を計算する事とする。(実際、オス、メスの血液をある比率で混合して PBMC で FISH を行うと、その比率通りにオス、メスの細胞が出ることが確認されている。) 問題点として、chimera の%が低い場合、Y プローブが光らない細胞を探すことが困難な可能性は存在する。

② X, Y 染色体染色を用いたリンパ球キメラの検討

①の方法で、雌のPBML、骨髄細胞、雄のPBMLの染色を行ったところ、オスの末梢血PBMC, Bone Marrow、メスの末梢血PBMCを用いて、Y染色体をFISH法染色したが、雄ではノンスペも多く、雌のPBMCでも一部反応するような結果となってしまったため、Xプローブを用いて染色を行う事とした。プローブのバックグランドを下げ、DAPIの対比染色を青で示していたが、シグナルが見にくいので今回からDAPI染色の色を白に変更した。

4) 骨髄灌流法を用いた骨髄移植による免疫寛容の検討

対象

ドナー： アカゲザル雌 1 頭 6.9Kg
レシピエント： アカゲザル雄 1 頭 11.6Kg

A. ドナーからの骨髄採取

a) ドナーの処理

手術はケタミン (50mg/ml) の筋肉注射 (15mg/kg: 0.3 ml/Kg) で導入し、手術台に仰臥位にする。疼痛を軽減するため、マスク下にセボフルレン 1-2.5%を吸入する (体動、脈拍などを観察しながら、吸入濃度を調節)。

b) 骨髄液採取

上記 2) の方法を行って、大腿骨、脛骨から骨髄液を採取した

B. 骨髄細胞液の準備

各骨から採取された骨髄液を遠心・洗浄し、細胞数をカウント後、骨髄細胞の層を集め、1ml 程度の骨髄細胞浮遊液を作成する。

C. レシピエントへの髄腔内骨髄細胞移植

a) レシピエントの処理

手術はケタミン (50mg/ml) の筋肉注射 (15mg/kg: 0.3 ml/Kg) で導入し、手術台に仰臥位にする。疼痛を軽減するため、マスク下にセボフルレン 1-2.5%を吸入する (体動、脈拍などを観察しながら、吸入濃度を調節)。前腕の毛髪を刈り、22 又は 24G の静脈留置針を留置し、ソリタを繋ぐ。

b) 免疫抑制薬の投与

静脈ルートから、ソル・コーテフ 25mg (10ml のソリタに溶いて 2.5ml) を投与し、サイモグロブリン 15mg/Kg を約 30 分間で静脈内投与する (ソリタ 100ml にサイモグロブリン 1V (25mg) を混注したも

のを作成し、投与量を調整する)。その後、大腿周囲の筋肉内に、サンディミュン 15mg/Kg を投与する。

c) 髄腔内骨髄細胞移植

レシピエントの脛骨の上端に、ドナー同様の方法で骨髄ニードルを穿刺する。髄腔内にスペースを作るために、できるだけ骨髄液を採取（もとの骨髄細胞の分画などは検査に出す）し、ドナーの骨髄細胞浮遊液を注入する。さらにヘパリン活水 1-2ml を注入し、ボーンワックスで穿刺部を閉鎖する。

止血確認後、マスクを外し、アカゲザルをケージに収納する。

D. 術後のフォローアップ

a) 免疫抑制療法

術 0, 1, 2, 3 日にサイモグロブリン 15mg/Kg を上記と同様の方法で投与する（ソル・コーテフは 0, 1 日に投与）。同時に、大腿周囲の筋肉内に、サンディミュン 15mg/Kg を投与する。これらの操作は、ケタミン (50mg/ml) の筋肉注射 (15mg/kg: 0.3 ml/Kg) で導入し、手術台に仰臥位にしておこなう。

術 4 日目から、筋肉内注射のみとなるので、ケージでアカゲザルを固定した状態で、大腿周囲の筋肉内に、サンディミュン 15mg/Kg を筋肉内投与する。CsA のターゲットトラフは、300ng/ml とし、術 0, 1, 2, 3 日と 1 週間毎に測定する。

b) 末梢血の検査

術 0, 1, 2, 3 日には、末梢血の細胞分画、CD2, 4, 8, 20, HLADR 用の採血、CsA トラフ濃度用の採血を行う。

1 週間毎に、FISH 用の採血と末梢血の細胞分画、CD2, 4, 8, 20, HLADR 用の採血、CsA トラフ濃度用の採血を行う。

移植後 2 ヶ月目に mixed lymphocyte reaction (MLR) を、ドナー・レシピエントと別の雌のアカゲザルの PMBC を用いて行った。

c) 犠牲死

chimera が消失して 1-2 ヶ月後に、採血の後、多量のネンブタールと KCl で犠牲死させる。

心停止後に骨髄液がどの程度採取できるかを確認するため、上記と同様の方法で、骨髄液の採取を行う。その骨髄液並びに、リンパ節・脾臓からもリンパ球を採取する。

免疫抑制療法などの副作用を検討するために、脳、肺、肝臓、腎臓、膵臓、胃、大小腸を摘出する。臓器内も含めて、chimera が残っているかについても検索する。

4. 研究成果

1) リンパ球分画の検討

移植前の実験として、アカゲザル 14 頭 (4 頭は 2 回) のリンパ球分画を調査した。ヒトの CD2, CD3 CD, 4, CD 19, CD 22 などに対する抗体を用いて、FACS をおこなったところ、CD2, CD20 は各々 $92.6 \pm 2.8, \%$ 、 $11.2 \pm 4.6\%$ の陽性細胞を認めたが、CD3 CD, 4, CD 19 は 0.1-0.8% と少なかった。当初の実験計画では、特注の抗胸腺細胞抗体を作成する予定であったが、アカゲザルの T 細胞に CD2 が検出されたことから、サイモグロブリン (Rabbit anti-human thymocyte globulin 製剤) の投与により、胸腺細胞を減少できると考えられた。

2) 骨髄灌流法を用いた骨髄液採取・骨髄移植の手技の確立

骨髄穿刺針をも用いて、骨髄液採取を試みたが、アカゲザルの大腿骨は非常に硬く、用手的には穿刺針を骨髄腔内に留置できなかった

骨髄輸液路確保用骨髄ニードル穿刺システム使用して、穿刺・骨髄液採取に成功した。この日は、大腿骨からの採取はうまく行かず、脛骨から施行したが、後日大腿骨からも採取可能であった。

3) X, Y 染色体染色を用いたリンパ球キメラの検討

① Y 染色体染色を用いたリンパ球キメラの検討

図1のように Y 染色体が染色され、雄の細胞であることが確認された。しかし、同様の方法で、雌の PBML、骨髄細胞、雄の PBMC の染色を行ったところ、オスの末梢血 PBMC、Bone Marrow、メスの末梢血 PBMC を用いて、Y 染色体を FISH 法染色したが、雄ではノンスペも多く、雌の PBMC でも一部反応した。

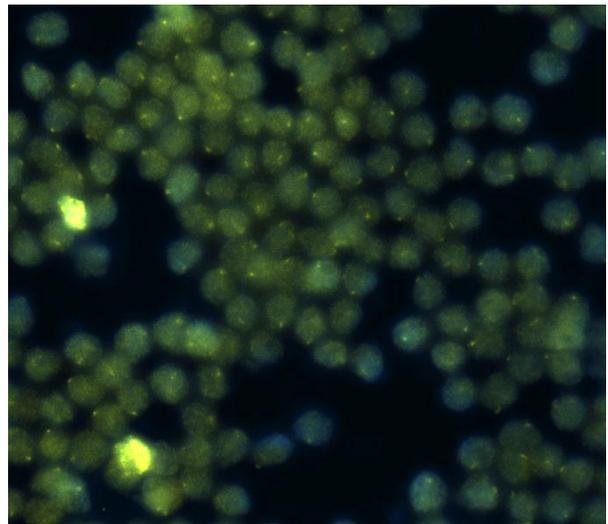


図 1. Y プローブを用いた染色 (雄 PBMC)

②X, Y染色体染色を用いたリンパ球キメラの検討

Xプローブを用いて、X染色体を染色できた。雄はX, Y各々が染色され、雌ではXが2つのdotとして染色された。Yの方が染まらない場合が多く、XOは雄と判定することにした。

下図は、メスの骨髄を移植された雄のPBMCの染色であり、XXは存在せず、キメラは否定された。

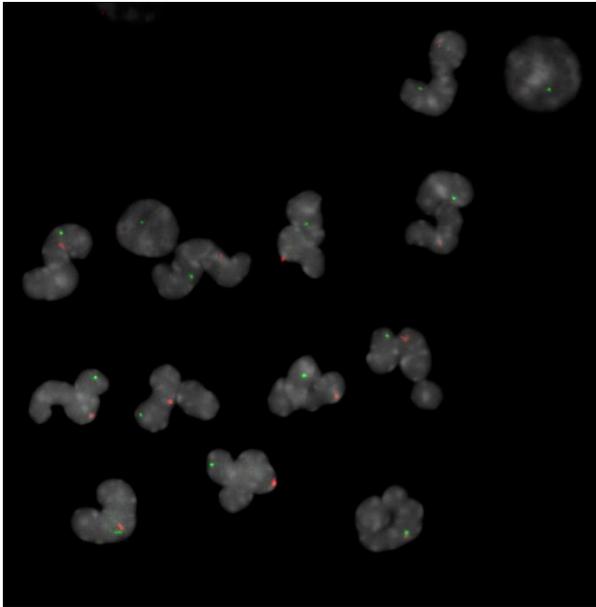


図2. X, Yプローブを用いた染色 (雄PBMC)

4) 骨髄灌流法を用いた骨髄移植による免疫寛容の検討

雌の骨髄液を上記の方法で採取したところ、左右脛骨は約 1.1×10^7 細胞、 1.0×10^8 細胞採取できた。この細胞を雄の左大腿骨に移植した。

移植後7日間シクロスポリン(CsA)を170mg投与し、以後トラフレベルが300 ng/ml前後になるようにコントロールした。

移植後、0, 7, 13, 20, 27日に、上記方法でキメラを解析したが、0日(XY 88.0%, XO 0%), 7日(XY 85.6%, XO 13.3%), 13日(XY 85.6%, XO 14.4%), 20日(XY 90.4%, XO 9.6%), 27日(XY 88.7%, XO 11.3%)であり、キメラは確認できなかった

移植後64日目に、髄内移植を行った側の骨髄細胞を採取し、キメラは形成されていなかった

移植後64日目に、MLRを施行した。反応させるリンパ球には、ドナー、レシピエントのPBMCと、別の雌アカゲザルのPBMCを用いた。

図3に示すように、MLRはドナー選択的に抑制されていた

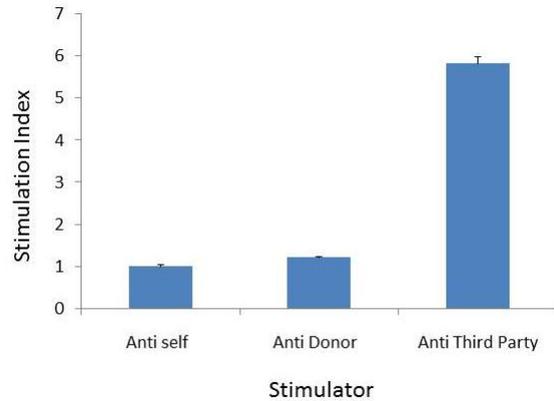


図3. 移植後64日目のMLR

2週後にMLRを再建したところ、3rd partyに対するMLRも低下しており、免疫不全状態と考え、CsAを中止して再度MLRを行う予定であったが、移植後127日目に死亡した。

【レシピエント病理解剖所見】

口腔内に出血を認めたが、舌を嚙んでおり、その奥は無傷だったので、舌からの出血と考えた。皮膚などに明らかな出血斑はなかった。すでに氷で冷却していたので、発熱などの有無は不明。

①開腹所見

血性腹水を50ml程度認めた(膵臓の周りの後腹膜に出血有)。結腸は拡張していたが、おそらく死後の変化と思われる。空調・回腸は、拡張している部分と、収縮している部分があり、一部で捻転を思わせるところがあったが、腸重積は認めなかった。Treitzから30cmくらい肛門側の空調がやや拡張(壁は薄い)し、内容物が血性だったため、その部位を一部サホルマリン固定。肝臓はのう胞を2箇所認め、右葉・尾状葉が出血のため黒色化していた(この部分をホルマリン固定)脾臓はとくにnp。膵臓は出血隗のようになっており、急性膵炎か、DICを疑わせる諸賢と考えられた(ホルマリン固定)。腎臓は左はnpであったが、右は腎皮膜から実質にかけて出血(両腎固定)。胃は拡張していたが、外表からnp。

②開胸所見

胸水はながく、緊張性気胸のように、縦隔葉は完全に虚脱し、胸膜は空気で膨らんでいた。左右葉も無気肺、肺出血、斑状出血となっていた。明らかな膿は認めなかったが、様々な箇所胸壁と癒着しており、肺炎があったものと予想された(左右肺の上下1箇所ずつを固定)

心臓はnpのように思われた(LV固定)

尚、採血はし忘れたが、血管内に凝血はほとんどなく、著明な出血傾向の状態であったと予想される。

以上より、免疫不全又は骨髄抑制に伴うDICと感染症（肺炎）が死因と考えられた

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 0 件）

研究終了直前によりやく成果が出始めたので、今後学会発表・論文発表する予定である

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福寫教偉

（大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授）

研究者番号： 30263247

(2) 研究分担者

高原史郎

（大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授）

研究者番号： 70179547

矢澤浩治

（大阪大学・医学系研究科・助教）

研究者番号： 40569109

(3) 連携研究者

なし