

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659607

研究課題名(和文) マウス肝移植における抗体プローブイメージング法を用いた拒絶反応の診断と病態解析

研究課題名(英文) Diagnostic bioimaging for acute cellular rejection using antibody probes in mouse liver transplantation

研究代表者

細田 充主 (Mitsuchika, Hosoda)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：40443931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：当研究では、抗体プローブを用いた肝移植後拒絶反応の検出法を開発することを目的とし、発光タンパクを結合した抗体プローブの全身投与により、グラフトへの浸潤細胞の検出を試みた。我々は異系統間マウス肝移植により、急性細胞性拒絶反応を誘導することに成功した。浸潤細胞にはCD3発現が確認されたが、抗CD3抗体を全身投与により浸潤細胞に結合させることは出来なかった。さらに臓器灌流装置による抗CD3抗体のデリバリーを試みたが、浸潤細胞への結合は確認できなかった。浸潤細胞は免疫染色では良好に染色された。当研究では、抗体を血行路経由で肝臓グラフトへの浸潤細胞まで到達させることは、困難であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We conducted this study to develop a new diagnostic method for allograft rejection in liver transplantation where infiltrating T-cells were quantified using antibody probes. We succeeded in inducing an acute cellular rejection in a mouse model of allogeneic liver transplantation. Immunohistologically, we confirmed that CD3 was strongly expressed on the infiltrating T-cells. However, a biological imaging after systemic injection of anti CD3 antibody probes could not detect the infiltrating T-cells. To deliver antibody probes to the infiltrating T-cells directly, we developed an extracorporeal perfusion machine for mouse liver and administered antibody probes to liver graft via the perfusion fluid. Even in this method, anti CD3 antibody probes could not detect the infiltrating T-cells.

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：肝移植 拒絶反応

1. 研究開始当初の背景

肝移植は、1963年にスターツルらにより臨床第1例目が施行されて以来、半世紀におよぶ進歩を続け、現在では末期肝不全、代謝性肝疾患および肝細胞癌に対する標準治療として確立されるに至っている。

本邦においても、平成24年末までに7064例の肝移植が施行されている。また、平成22年7月の改正臓器移植法施行後は脳死肝移植症例数も著明な増加傾向にあり、肝移植は、今後、生体、脳死とも更なる普及が見込まれている。

このような肝移植の歴史の中で、拒絶反応は常に中心的課題の一つであり、免疫抑制剤の開発とプロトコルの改良により拒絶反応によるグラフト喪失および免疫抑制剤の有害作用による合併症の発生頻度は大きく低下し、現在はドナー特異的免疫寛容に向けてさらなる進歩を遂げようとしている。

一方、拒絶反応の克服のためには、このような治療法の開発とともに、その診断技術の進歩も求められている。臨床的には、拒絶反応による肝機能障害と過剰な免疫抑制による感染性肝機能障害に対する治療方針は正反対であり、その鑑別は非常に重要である。しかしながら、現在においても拒絶反応診断のゴールドスタンダードは肝生検であり、その患者負担の大きさと合併症のリスクが臨床問題となる。また、肝生検で得られる組織検体はグラフトのごく一部であり、サンプリングエラーによる偽陰性の可能性が少なからず存在する。

このような背景から非侵襲的で、なおかつグラフト全体のグローバルな状態を反映する拒絶反応診断法の開発は肝移植領域において極めて有用であると考えられる。

そこで、我々は抗体プローブによる細胞表面抗原認識を原理とする標的細胞の光イメージング法を応用し、肝移植後の拒絶反応にともないグラフトに浸潤する炎症性細胞を検出する新しい診断法を開発するため当研究を計画した。また、この方法は、拒絶反応のみならず、虚血再灌流障害、感染、原疾患再発など炎症性細胞を介する様々な肝移植後グラフト障害の新規診断法の開発にもつながるものと考えられた。

2. 研究の目的

当研究では、抗体プローブを用いた生体イメージング法により、肝移植後拒絶反応においてグラフトに浸潤した炎症細胞を検出する拒絶反応の新規診断法の開発に向けての動物実験系の構築を目的とする。

具体的にはマウス肝移植後急性細胞性拒絶反応モデルにおいてグラフト内に浸潤したT細胞を抗体プローブによる生体イメージングを用いて描出するという実験モデルである。マウスにおける肝移植は、技術的に難易度が極めて高い動物実験系として知られているが、科学的にも経済的にもマウスを用い

ることによる利点は大きい。

現在肝移植における急性細胞性拒絶反応の診断は針生検により行われているが、当診断法が臨床応用されれば針生検とは特性の異なった情報が得られる。生体イメージング法は安全かつ簡便であり、ルーチン検査や経時的観察への応用が可能であることや大域的情報が得られることから、針生検の補助診断法として有望である。

3. 研究の方法

当研究では、まず、種々の異系統マウス間での肝移植モデルに関する組織学的検討を行い、肝移植後の急性細胞性拒絶反応を再現するマウス実験モデルを確立した。

次にこの急性細胞性拒絶反応モデルにおける肝臓グラフトへの浸潤細胞を免疫組織学的に解析し、抗体プローブの標的分子として適切な表面分子を選択した。

続いて、急性細胞性拒絶反応を発症したレシピエントに抗体プローブの経静脈的全身投与を行い、肝臓グラフトへの浸潤細胞表面の標的分子に対する抗体プローブの結合を、生体発光イメージング、免疫組織学的検索および蛍光イメージングを用いて検索した。

さらに、抗体プローブをより直接的に浸潤細胞まで送達するため、マウス肝臓グラフトの灌流装置を開発し、この装置上で体外酸素化灌流状態の肝臓グラフトに灌流液を介して蛍光抗体プローブを投与し、浸潤細胞への結合を検索した。

4. 研究成果

(1) **マウス肝移植モデルの確立**：当研究ではまず、マウス肝移植モデルを確立した。このモデルの術式は以下の通りである。

ドナー手術は、全身麻酔下に逆T字切開にて開腹する。肝鎌状間膜を切離し、胆嚢切除を行う。副腎静脈および腰静脈を切離し、右腎静脈を10-0ナイロン糸により結紮切離することにより肝下部大静脈を剥離する。総胆管を切開し、胆管ステントを挿入して切離する。固有肝動脈と幽門上静脈を結紮切離し、門脈を臍頭部から剥離する。陰茎静脈よりヘパリンを静注した後、脾静脈を結紮する。24Gサーフローを門脈に挿入し、胸腔内下大静脈および肝下部大静脈を切開し、冷温乳酸リンゲル液を用いて経門脈的にドナー肝臓をフラッシュした後にグラフトを摘出する。摘出後にグラフトの門脈および肝下部大静脈に血管カフを装着し、冷温乳酸リンゲル液を用いて再度フラッシュを行う。肝下部大静脈の仮結紮し、肝上部大静脈に針付き10-0ナイロン糸を2本かける。

レシピエント手術は全身麻酔下に正中切開にて開腹し、肝鎌状間膜を切離する。副腎静脈および腰静脈を切離し、右腎静脈より頭側の肝下部大静脈を遊離する。総胆管を切開し、仮ステントを挿入し切離した後に固有肝動脈を結紮切離する。背側を剥離して肝臓を

受動し、牽引用糸を肝上部下大静脈にかける。肝下部下大静脈、門脈および肝上部下大静脈にクランプをかけ、肝臓を摘出する。グラフトを挿入し、肝上部下大静脈を 10-0 ナイロン糸で縫合再建する。続いて、門脈をカフ法により再建し、門脈および肝上部下大静脈のクランプを解除し再灌流を行う。その後肝下部下大静脈をカフ法にて再建し、胆管をステント法により再建する。(図 1)



図 1 マウス肝移植終了時の腹腔内所見

(2) マウス肝移植モデルにおける急性細胞性拒絶反応の誘導：確立したマウス肝移植術を系統の異なるマウス間で行い、急性細胞性拒絶反応を再現する実験系の構築を行った。C57BL/6、BALB/c および C3H/HeJ の各組み合わせで肝移植を行い検討したところ、ドナーマウスを C57BL/6、レシピエントマウスを C3H/HeJ とする異系統間マウス肝移植において、門脈域を中心とする肝臓グラフトへの高度な炎症性細胞浸潤と良好な術後生存が得られた。(図 2)

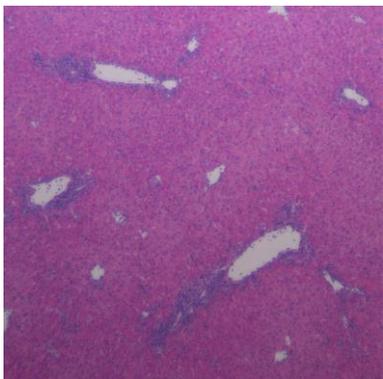


図 2 異系統間移植後 5 日目のグラフト

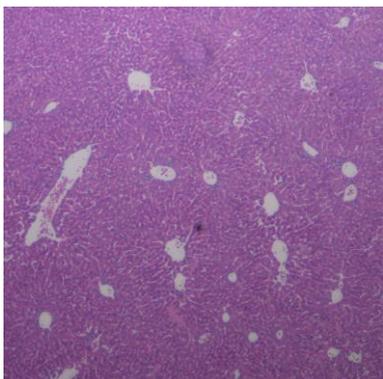


図 3 同系統間移植後 5 日目のグラフト

一方、C3H/HeJ を用いた同系統マウス間肝移植では、移植後の肝臓グラフトへの炎症性細胞浸潤は認められず、コントロールとして適切であった。(図 3)

(3) 標的とする表面分子の選定：移植後肝臓グラフトに浸潤した炎症性細胞の表面に発現する分子の中から、抗体プローブの標的として用いる分子を選定するため、候補分子に関する免疫染色を行った。急性細胞性拒絶反応における浸潤細胞は主に T 細胞であると考えられたため、CD3、CD4 および CD8 の免疫染色を行った。その結果浸潤細胞の大部分が CD3 抗体により強く染色された。(図 4) CD4 および CD8 抗体を用いた免疫染色でも多数の陽性細胞が認められたが、CD3 には染色細胞数および染色強度とも及ばなかった。コントロール群から摘出したグラフトで CD3 免疫染色を行ったが、陽性細胞は認められなかった。(図 5)

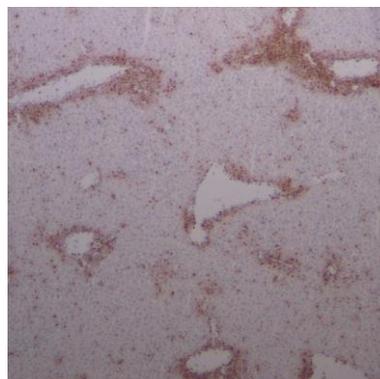


図 4 異系統間移植後の CD3 免疫染色

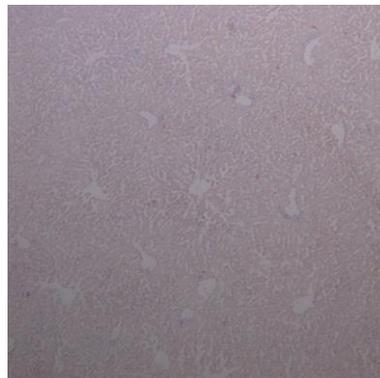


図 5 同系統間移植の CD3 免疫染色

(4) 抗体プローブの In vivo 投与：前述の結果より、レシピエントマウスを C3H/HeJ、拒絶反応群のドナーマウスを C57BL/6、コントロール群のドナーマウスを C3H/HeJ としたマウス肝移植モデルに対し、抗 CD3 抗体プローブを種々の条件で静注し、イメージングを行ったが、拒絶反応群に優位なシグナルを確認することはできなかった。このため、抗体プローブを被修飾の抗 CD3 抗体に変更して生存状態のレシピエントマウスに静注し、投与後 6 時間目に摘出したグラフト検体において、抗体プローブの存在を二次抗体を用いて検索したが、拒絶反応群より

摘出したグラフトにおける浸潤 T 細胞上にも抗体プローブは確認できなかった。

さらに抗体プローブとして、Cy5 結合型抗 CD3 抗体をレシピエントに投与し、摘出グラフトにおいて蛍光顕微鏡を用いた直接的な検索を行ったが、浸潤 T 細胞上に抗体プローブは確認できなかった。

(5) 体外灌流装置を介した抗体プローブの

Ex vivo 投与：前述の結果より、レシピエントの全身循環系を介した浸潤 T 細胞への抗体プローブの送達は困難であることが明らかとなったため、より直接的に抗体プローブを経脈管的に送達するため、体外灌流装置を介した抗体プローブの Ex vivo 投与系を確立した。これは、異系統間移植により急性細胞性拒絶反応を誘導した肝臓グラフトを血管系を温存したまま摘出し、グラフトの門脈を流入系、肝下部大静脈を流出系とする灌流回路に接続して体外酸素化灌流を持続的に行うものである。(図6) この灌流装置では、2～3 mL という少量の灌流液で長時間のグラフト灌流が可能であり、この灌流液に Cy5 結合型抗 CD3 抗体を混入し、3 時間の灌流を行った。灌流後グラフトにおいて蛍光顕微鏡を用いた抗体プローブの検索を行ったところ、ごくわずかに蛍光を示す浸潤 T 細胞が認められたものの、その染色細胞数は全体の 0.1%にも満たず、染色強度も弱く、肝細胞の自家蛍光を超えるものではなかった。



図6 体外機械灌流による Ex vivo 投与系

(6) **まとめ**：当研究では、マウス肝移植モデルを応用した肝移植後急性細胞性拒絶反応誘導モデルを確立し、CD3 は標的蛋白として拒絶反応群とコントロール群間で非常に高いコントラストを示すことが明らかとなった。一方、抗体プローブを経門脈的に浸潤 T 細胞に送達することは非常に困難であり、類洞内からの移行がより良好なプローブが必要であることが明らかとなった。

当研究では実験動物としてマウスを使用しているためその拡張性は高く、当研究における成果は、肝移植における拒絶反応の非侵襲的検査法の開発において今後も極めて有用である。

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 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細田 充主 (HOSODA MITSUCHIKA)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：40443931

(2) 研究分担者

尾崎 倫孝 (OZAKI MICHITAKA)

北海道大学・保健科学研究所・教授

研究者番号：80256510

(3) 連携研究者

なし