

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10029

研究課題名(和文) 薬剤抵抗性小腸移植片拒絶反応に対する細胞治療法の確立

研究課題名(英文) Cell therapy for drug resistance acute rejection after intestinal transplantation

研究代表者

松浦 俊治 (MATSUURA, Toshiharu)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：10532856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ラット小腸移植モデルを使用予定であったが、研究室移転のため、マウス小腸移植モデルへ変更した。新生仔マウス(C57BL/6j)の小腸を約1cm摘出し、レシピエント(ICR)の腹直筋と腹膜の間に移植するモデルを作成した。移植後1週間の病理学的所見では、同種移植群では異種移植群と比較して、グラフトの絨毛高は有意に高く、リンパ球浸潤も軽微であった。また、乳歯歯髄幹細胞(SHED)投与群のグラフトの絨毛も異種移植群と比較して、有意に高く維持されており、リンパ球浸潤も軽微な印象であった。

研究成果の概要(英文)：At first, we planned to select the rat model of intestinal transplantation, however we had to change the animal to mouse model because of the laboratory change. About 1cm of the small intestine was obtained from a newborn of C57BL/6j mouse, and the intestine was transplanted as a graft into the abdominal wall of allogenic ICR mouse. All grafts were harvested and examined histologically one week after transplantation. The height of villus was higher and the degree of lymphocyte infiltration was more mild in autogenic transplantation group than allogenic transplantation group. Furthermore, the height of villus was significantly higher in SHED administration group than allogenic transplantation group, and the degree of lymphocyte infiltration tended to be mild in SHED group.

研究分野：小児外科学分野

キーワード：小児移植 細胞治療 拒絶反応

1. 研究開始当初の背景

小腸移植では、移植後の拒絶反応が他臓器の移植より起こりやすく、全身状態も重篤化し易い。その理由として小腸自体リンパ組織を豊富に含む臓器であることなどが挙げられる。小腸は再生力に富んでいるものの、拒絶反応で一旦粘膜バリアが破壊されると、bacterial translocation は必発である(図1)

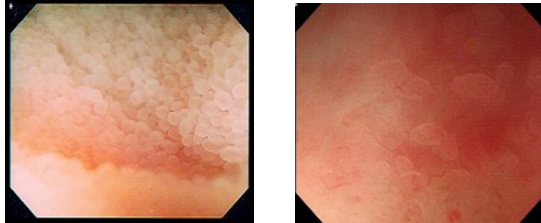


図1 拡大内視鏡所見：
正常小腸グラフト粘膜(左)
拒絶反応により著しく破綻したグラフト粘膜(右)

以上の機序から容易に拒絶反応と敗血症という治療のベクトルが全く正反対な病態を同時に生じてしまうことが、小腸移植後拒絶反応の治療を大きく困難にしている主な要因である。従って、小腸移植後の拒絶反応およびそこから容易に発症してくる bacterial translocation の制御のためには、拒絶反応を抑える免疫抑制作用と脱落した粘膜の再生誘導作用を通して敗血症の制御を行う必要があると考えられる。

ヒト間葉系幹細胞(MSC: Mesenchymal stem cell)は、T細胞やB細胞、NK細胞、抗原提示細胞といった免疫担当細胞の活性を抑制することが知られ、例えば、GVHDに対する治療として既に国内外で臨床試験が行われている。また近年では臓器移植にも応用され始め、小腸移植においても免疫抑制療法として自己骨髄由来MSCを安全に投与し得たと報告された。また小腸粘膜の再生という観点からも、小腸虚血再灌流障害や放射線による粘膜障害を受けた小腸にMSCを投与し粘膜再生が促進されたという報告も見られている。MSCは炎症や障害を受けた部位にホーミングする特性もあり、移植後、小腸グラフトに投与したMSCが集積し留まることが示されており、有効に機能するものと考えられる。以上のことから、免疫抑制と粘膜再生という2つの側面を併せ持つMSCによる治療



図2 自然脱落する乳歯に存在する歯髄組織を細胞源に活用

は小腸移植後の拒絶反応の新規治療戦略として大いに期待できるものである。

脱落乳歯歯髄間葉系幹細胞(SHED)は他の間葉系幹細胞と同様に多分化能と高い増

殖能を持つだけでなく、細胞性免疫に不可欠なHLAの発現が乏しいため、免疫寛容性が高く、同種あるいは異種の移植も可能であることがマウスで確認された。すなわち、SHEDは細胞移植による再生医療に適した特性を有すると考えられる。乳歯は従来「捨てる」ものであるため入手が容易であり、これを用いた幹細胞のバンクを作り、必要に応じて様々な細胞療法に利用できる。我々はすでにSHEDの細胞単離と増殖・分化誘導法を確立している。

2. 研究の目的

小腸移植は小腸不全患者に対する治療法として技術的な確立はあるものの、他の臓器移植と比較してその長期成績は極めて不良である。その主たる原因は、慢性期における予期不能な拒絶反応とそれに付随するBacterial Translocationである。作用機序の異なる様々な免疫抑制剤を組み合わせる治療を行う現在の治療法には限界があり、成績向上のためには新たな治療戦略の確立が不可欠である。先に我々は、乳歯歯髄から採取した幹細胞(SHED)は多分化能と高い増殖能を持つだけでなく、HLAの発現が乏しく幹細胞移植療法の移植源として適した特性を持つことを示してきた。SHEDは、他のMSCで知られる調節性T細胞誘導による拒絶反応に対する治療法として期待できる。本研究は“薬剤抵抗性小腸移植片拒絶反応に対する細胞治療法の確立”を目的とする。そこで、拒絶モデルラット(BNラット LEWラット)に対して小腸移植を行い、拒絶が発症した時点で、SHEDを投与して治療効果を判定する。ステロイドや抗胸腺細胞グロブリン(ATG)などの従来の免疫抑制剤と比較することで治療効果を判定する。

小腸移植後拒絶反応モデルラットへの投与方法の概要

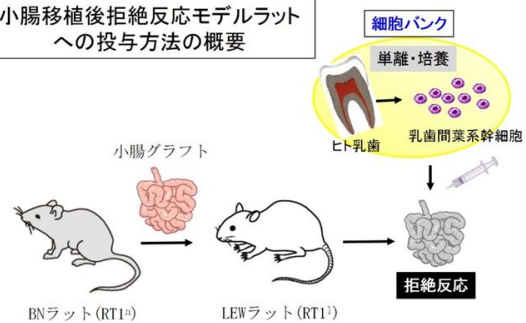


図3 拒絶反応モデルへの投与方法：
BNラット LEWラットへ小腸移植を行い、拒絶が発症する時点でSHEDを静脈内投与

3. 研究の方法

(1) ラット小腸移植拒絶反応モデルの確立
ドナーはBNラットを使用する。腸間膜動静脈および門脈を温存しながら、小腸をトライツ靭帯の方まで受動していき、トライツ靭帯から30cm肛門側の小腸を切離しグラフト

を摘出する。グラフト摘出前にはヘパリン化生理食塩水を全身投与する。

レシピエントはLEWラットを使用する。レシピエントの腹部大動脈とグラフトの上腸間膜動脈を端側吻合(8-0Nylon)し、レシピエントの下大静脈とグラフトの門脈を端側吻合(9-0Nylon)する。いずれも吻合は顕微鏡下に行う。

グラフトの口側、肛門側の両方に人工肛門を造設する。

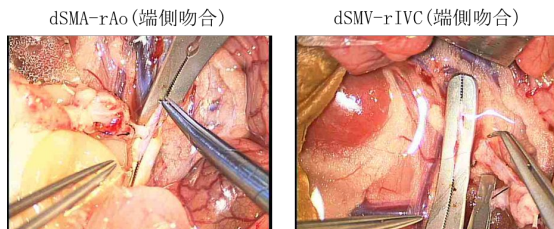
(2)拒絶反応に対するSHEDの治療効果の検討
現在までの研究であれば移植後1週間から2週間で拒絶が発症する。再度このモデルで拒絶反応を発症する時期を検討。発症時期に合わせて、SHEDを投与し、治療効果を検討する。

4. 研究成果

(1) ラット小腸移植拒絶反応モデルの確立

動物は小腸移植モデルラット(BNラットLEWラット)を使用する予定であるが、小腸移植は顕微鏡下に血管吻合を必要とし、手技の習得が必要である。手技による死亡率に差が出なくなるまでの修練が必要であり、そのため、まずは同種移植モデル(LEWラットLEWラット)で死亡率に差が出なくなるまで手技を行う方針とした。

動脈吻合は8-0Nylonを用いた連続縫合で行い、静脈吻合は9-0Nylonの結紮縫合で行った。



【図4】小腸移植の血管吻合：
動脈吻合(左) 静脈吻合(右)

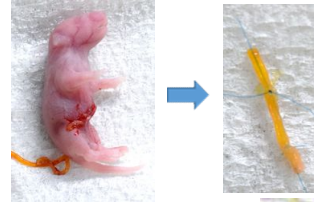
血管吻合の修練の途中で、研究室の改修に伴う移転をすることとなった。そのため、移転中は、実験室を変更する必要があった。ラットを飼育可能な動物実験施設には顕微鏡の持ち込みが困難な状態であった。そのため、顕微鏡を使用しない、新たな小腸移植モデルの作成が必要となった。

(2) マウス小腸移植拒絶反応モデルの確立

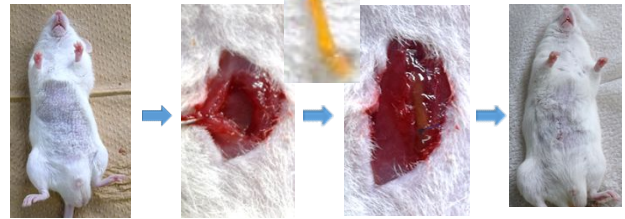
顕微鏡下の血管吻合を施行できなくなったため、血管吻合を必要としない小腸移植拒絶モデルの作成が必要となった。以前の文献では、胎仔や新生仔ラットやマウスの小腸を皮下組織や腹壁、大網内、後腹膜などに移植し、周囲からの血流増生にともない生着した報告があったため、マウスモデルで施行することとした。まず、拒絶モデルが出来ているか確認するため、異種および同種移植でグラ

フトの生着の有無を確認した。ドナーには新生仔(1生日)C57BL/6を使用した。上部空腸を1cm摘出し、内腔を生食でフラッシュした(図5上)。レシピエントはICRマウスを使用した。腹直筋を切開し、腹膜と腹直筋の間の層を剥離して、摘出した空腸を留置して、縫合した(図5下)。

【ドナー】



【レシピエント】

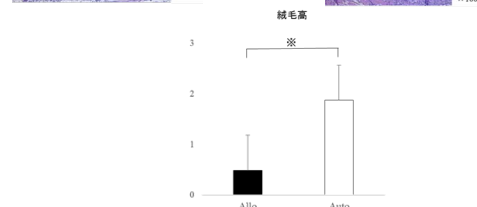
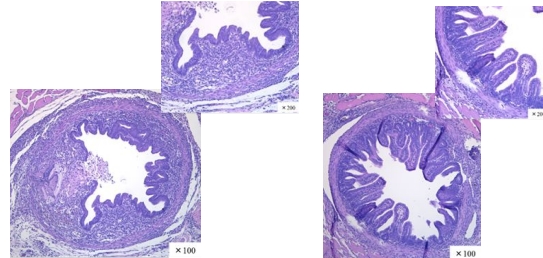


【図5】マウス小腸腹壁内移植：
ドナー手術(上)
レシピエント手術(下)

1週間後にグラフトを摘出し、生着の有無を病理学的に評価。すると、異種移植においては粘膜下層にリンパ球の浸潤を認め、絨毛高が低下していた。一方、同種移植では絨毛高はある程度維持されており、リンパ球の浸潤も認めなかった(図6上)。絨毛高をImage Jで測定した結果、同種移植の方が異種移植より高いという結果となった(図6下)。つまり、異種移植では拒絶が疑われる所見となり、マウス小腸移植拒絶モデルとして使用できる可能性が示唆された。免疫染色、血中およびグラフト中のリンパ球やサイトカインの評価は現時点では施行できておらず、今後行う方針である。

【異種移植】

【同種移植】



【図6】移植後1週間の病理学的所見：
グラフトの病理学的所見(上)
Image Jにおける絨毛高(下)

(3) マウス小腸移植拒絶反応モデルに対する SHED の効果

(2)の方法で異種移植 (C57BL/6 マウス ICR マウス) を行い、SHED の免疫調節能をま
ず調べるために移植時に SHED を外頸静脈より
静脈内投与した。1 週間後にグラフトを摘
出し、病理学的評価を行った。

異種移植群と比較して、絨毛高は維持され
ており、リンパ球の浸潤もない印象であった。
Image J で絨毛高を評価すると、異種移植よ
りも有意に高く、同種移植と同等であった。
症例数が少ないため、今後のさらなる検討が
必要だが、SHED による効果が示唆された。

【異種移植 + SHED 投与】

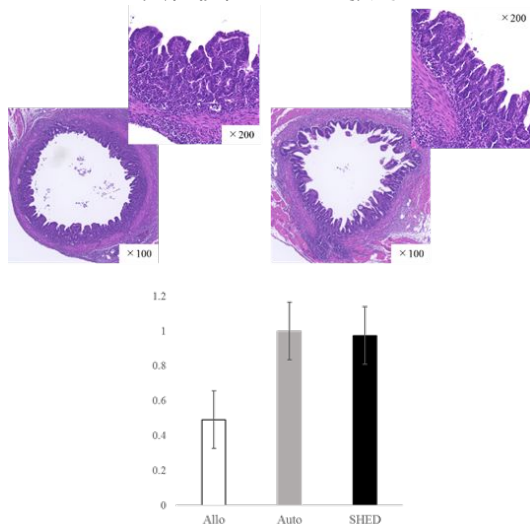


図 7 移植後 1 週間の病理学的所見：
SHED 投与群のグラフト病理学的所見 (上)
Image J における絨毛高 (下)

今後は、免疫染色、血中やグラフト中のサ
イトカインやリンパ球の評価など検討を進
めていきたい。

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 1 件)

Matsuura T, Yoshimaru K, Yanagi Y, et al., Massive pulmonary hemorrhage before living donor liver transplantation in infants., *Pediatr Transplant*, 20 巻、2016、89 - 95

〔学会発表〕(計 7 件)

松浦俊治、高橋良彰、柳佑典、吉丸耕一朗、伊崎智子、田口智章、ヒルシユスブルング病類縁疾患における外科治療の選択、第 30 回日本小腸移植研究会、2018 年 2 月 10 日、宮城
松浦俊治、地域の基幹大学病院としての小児外科のあり方、第 77 回日本臨床外

科学会総会、2015 年 11 月 28 日、福岡
松浦俊治、生体肝移植後に蛋白漏出性胃腸症を来した遅発性肝静脈吻合部狭窄の 1 例、第 42 回日本小児栄養消化器肝臓学会、2015 年 10 月 17 日、広島
松浦俊治、生体肝移植におけるグラフト門脈灌流と血中乳酸値変動の検討、第 51 回日本移植学会総会、2015 年 10 月 2 日、熊本

松浦俊治、胆道拡張症術後における肝内および膵内遺残胆管内結石の治療経験、第 38 回日本膵・胆管合流異常研究会、2015 年 9 月 12 日、新潟

松浦俊治、小児肝移植における術中門脈低灌流症例の検討、第 33 回日本肝移植研究会、2015 年 5 月 28 日、神戸

松浦俊治、新生児肝不全に対する肝移植へのアプローチ、第 52 回日本小児外科学会学術集会、2015 年 5 月 28 日、神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 俊治 (MATSUURA, Toshiharu)
九州大学・医学研究院・講師
研究者番号：1 0 5 3 2 8 5 6

(2) 研究分担者

田口 智章 (TAGUCHI, Tomoaki)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：2 0 1 9 7 2 4 7

林田 真 (HAYASHIDA, Makoto)
九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：7 0 4 5 2 7 6 1

柳 佑典 (YANAGI, Yusuke)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：3 0 5 9 6 6 6 4

吉丸 耕一郎 (YOSHIMARU, Koichiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：6 0 7 1 1 1 9 0

小林 英司 (KOBAYASHI, Eiji)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：0 0 2 4 5 0 4 4

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()