

令和元年6月17日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19884

研究課題名(和文)慢性拒絶反応における血管平滑筋細胞に対する制御性T細胞の効果の検討

研究課題名(英文)The effect of regulatory T cell for vascular smooth muscle cells at chronic rejection

研究代表者

財津 雅昭(Zaitu, Masaaki)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：20768981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、免疫抑制剤の進歩により拒絶反応の抑制はできているものの、一度慢性拒絶反応を引き起こすと免疫抑制剤だけでは効果なく、グラフト血管が閉塞していき機能不全に至る。免疫応答を抑制することで、グラフト血管の閉塞を減弱させられることは理解されている。一方で、グラフト血管が閉塞し始めてからの効果的な治療法は示されたことはない。

そこで、本研究は免疫応答が惹起されない状況でグラフト血管が閉塞している病態を作り上げるモデル作りから着手した。ヒト化マウスモデルや再移植モデルを用いて研究を行ったが、アロ免疫応答のない慢性拒絶状態のグラフトの再現をマウスの体内で作成するには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は未解決問題である慢性拒絶反応に対する治療法の確立を目指して、制御性T細胞が血管平滑筋細胞に与える直接効果を明らかにし、臨床応用へ繋げることを目指した。制御性T細胞は免疫応答を抑制することが確認されているが、血管平滑筋細胞に対する効果については不明であるため、直接の作用で血管平滑筋の増殖抑制する場合は細胞治療での慢性拒絶反応の治療に応用できると思われた。血管平滑筋細胞への反応をin vivoで評価を行うために、免疫応答のないマウスのモデルの作成に取り組んだが、残念ながらモデル作成にまでは至らなかった。慢性拒絶反応が惹起された状態で免疫応答を引き起こさないモデルの作成の方法が必要である。

研究成果の概要(英文)：Despite improvements in the short-term survival of organ allografts after transplantation as a result of the development of immunosuppressants, that have reduced acute rejection rates, the long-term attrition rates for all solid organ transplants have not significantly changed. The major cause of late allograft deterioration and loss is thought to be due to the development of graft arterial disease, for which a treatment has not yet been established. In this study, we tried to make a model of chronic rejection without allo-immune responses. Unfortunately, we were not able to make a chronic rejection model without all-immune responses.

研究分野：移植免疫

キーワード：慢性拒絶反応 制御性T細胞 血管平滑筋細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 臓器移植後の最後の乗り越えるべき壁として慢性拒絶反応の克服が必要である。慢性拒絶反応は主にグラフトの血管が徐々に閉塞していき機能不全に至る進行性の病態である。その機序は、アロ免疫応答により血管内皮細胞が障害を受け、その修復過程において血管平滑筋細胞が血管内腔に遊走し細胞外マトリックスを分泌および血管平滑筋細胞が集積することを繰り返していくことで、最終的にグラフト血管内腔狭窄に至るとされている。アロ免疫応答を抑制することでグラフト血管内腔狭窄を軽減できることは動物実験で証明されてきたが、実際に臨床においては免疫抑制治療下でも慢性拒絶反応は進行する。免疫抑制療法の発達とともに各臓器の短期グラフト生着率は改善しているが、長期グラフト生着率に改善がないことから拒絶反応の抑制だけでは不十分と考えられる。血管平滑筋細胞はアロ免疫応答のない状況でも interferon(IFN)- γ の刺激により増殖しグラフト血管狭小化をきたすため、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞を標的とした治療が必要であると考えている。

(2) アロ免疫応答を抑制する制御性 T 細胞が移植後に免疫抑制剤が不要となる免疫寛容の誘導に中心的な役割を担っていることが示されてきている。しかし、慢性拒絶反応が発症した時に制御性 T 細胞がどのような役割を担うかは不明である。

2. 研究の目的

(1) アロ免疫応答が抑制されている状況で慢性拒絶反応が惹起できるモデルを確立する。

(2) (1) のモデルを用いて制御性 T 細胞を用いた細胞治療で慢性拒絶反応の抑制効果を確認する。

3. 研究の方法

(1) 承諾を得た消化器癌手術患者の検体からヒト血管を採取する。これを、6-12 週齢 NSG マウスの腹部大動脈に端々吻合しヒト血管を移植する。手術方法は Oxford 大学 Wood グループの方法に準じる⁽¹⁾。免疫応答のない動脈硬化モデル作成は Tellides⁽²⁾の方法に準じ、移植後 1 週間は吻合部周囲炎症反応からの回復を待った後、術後 1 週間目よりヒト IFN- (200 ng) を週 3 回、皮下注射にて投与し、術後 4 週目まで投与する。術後 4 週目に移植したグラフトを採取し Hematoxylin and Eosin (H&E) および Elastin Van Gieson (EVG) 染色にて動脈硬化症の程度を評価する。

で評価ができなかった場合は、ヒト化マウスから通常のマウスモデルを用いて研究する。BALB/c マウスの胸部大動脈を C57BL6(B6) マウスの腹部大動脈へ移植し、再度その動脈グラフトを BALB/c マウスへ再移植する。再移植後 4 週目に移植後動脈硬化を確認する。動脈再移植モデルは移植後 10 日目に再移植した動脈グラフトは再移植後 20 日目で十分な移植後動脈硬化の進行が確認されている⁽³⁾。グラフト動脈および再移植されたマウスは B6 由来であるため、理論上は免疫応答が収束していることが考えられる。

でも評価できなかった場合には、動脈移植を心臓移植に変更する。

(2) 上記のモデル確立後に、制御性 T 細胞を磁気ビーズで分離した後、再移植後 4 週目に 1×10^6 細胞を移植し、動脈硬化の改善を評価する。

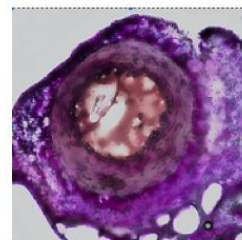
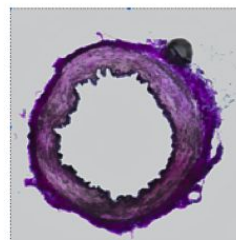
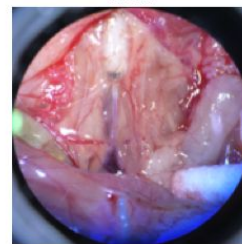
4. 研究成果

(1) ヒト化マウスモデルで血管移植を 1 年半継続させていた。初期は移植直後に両下肢の麻痺が出現し、テクニカルエラーと判断し実験を継続していた。しかし、その後、移植後は問題なく生存するが下肢麻痺は出現しないが、その後にグラフト血管が血栓症になるエピソードが続いた(右図)。保存状態や血管採取の過程を変更しながら血管移植モデルの作成を行ったが、条件を変えても成功せず、NSG マウスによるヒト化マウスモデルにおける移植後動脈硬化症によるモデル作成は断念した。

術直後



4週後



(2) 通常のマウスモデルに移行し、動脈グラフトの再移植モデルを行った。しかし、初回の移植で問題なかったが、再移植後には翌日に 9 割のグラフトが血栓を形成した。そのため、モデルとして不安定であり端々吻合を動脈グラフト再移植モデルでは目的とした免疫応答のないグラフト環境を作り出すことは困難と判断した。

(3) 最後に、端々吻合である動脈移植モデルから端側吻合となる心臓移植モデルに変更し、

再移植モデルを行った。その代表的結果を図1および図2に示す。

図1はBALB/cの心臓グラフトをB6マウスに移植し、3日後にBALB/cマウスに心臓グラフトを再移植した。

図1

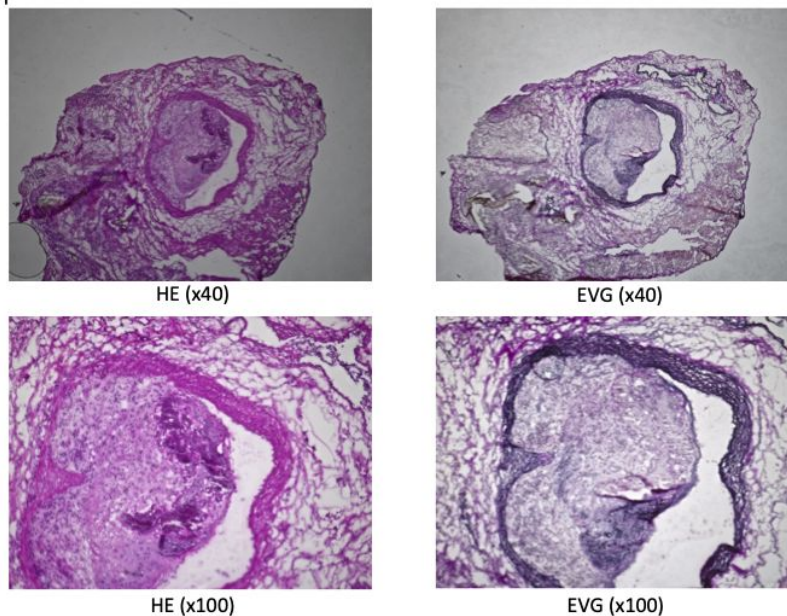
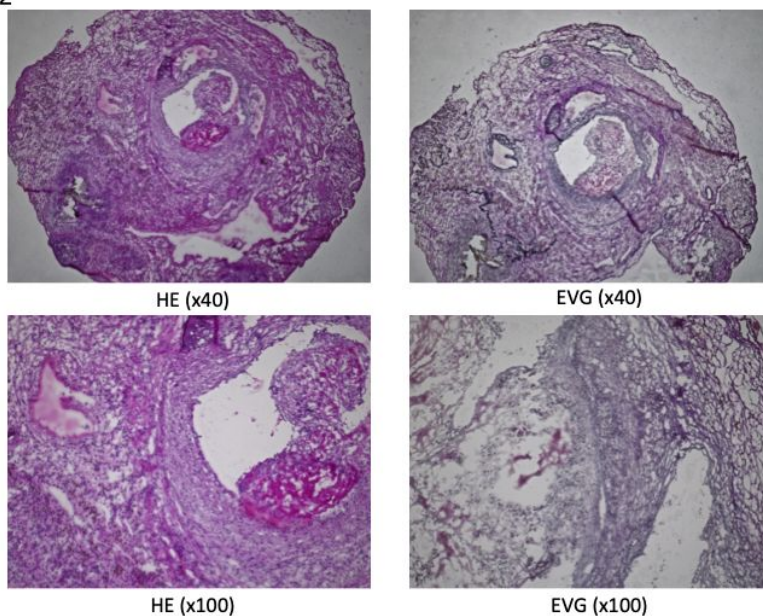


図2はコントロールとしてBALB/cの心臓グラフトをBALB/cに移植し、3日後にBALB/cマウスに心臓グラフトを再移植した。再移植28日後にグラフトの拍動を確認後、摘出し組織学的に評価を行った。

図2



心臓グラフトを用いた再移植モデルでは再移植後28日に移植後動脈硬化としての病変ははっきりしていなかった。また、心筋そのものに障害が出ており、虚血障害によるそのもののダメージが前面に出てきている像であった。

コントロールである再移植後グラフト組織像(図2)も真菌に障害を受けた像を呈しており、図1のアログラフトを行った際移植モデルと明らかな違いは見出せなかった。

以上の結果より、免疫応答のない状況にグラフトが移植されているモデルの確立ができなかった。

<引用文献>

- (1) S. N. Nadig, J. Wieckiewicz, D. C. Wu, et al. In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo-expanded human regulatory T cells. *Nat Med.* 2010;16(7):809-813.
- (2) G. Tellides, D. A. Tereb, N. C. Kirkiles-Smith, et al. Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes. *Nature.* 2000;403(6766):207-211.
- (3) U. Steger, S. Ensminger, A. Bushell, et al. Investigation into the onset and

progression of transplant arteriosclerosis in a mice aortic retransplantation model.
Microsurgery. 2008;28(3):182-186

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

特になし

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：深作 慶友

ローマ字氏名：(FUKASAKU,yasutomo)

研究協力者氏名：巖築 慶一

ローマ字氏名：(GANCHIKU, yoshikazu)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。