

機関番号：32665

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19591497

研究課題名 (和文) 小腸移植拒絶反応制御を目的とした集学的治療法の確立

研究課題名 (英文) Establishment of intensive care for immunologic tolerance of small bowel transplantation in rat

研究代表者

杉藤 公信 (SUGITO KIMINOBU)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：10328750

研究成果の概要 (和文) : MAdCAM-1 が、小腸移植拒絶反応の進行や制御においても重要な鍵を握っていることを確認し、FK506 や FTY720 や ex vivo graft irradiation を組み合わせ、小腸移植の術前から術後にかけて集学的治療を行った。FK506 と FTY720 を使用したグループでは CD4 陽性細胞の浸潤を抑制、PPs における HEVs の MAdCAM-1 発現を抑制、LP における ECVs の MAdCAM-1 発現を増強させた。

研究成果の概要 (英文) : We studied the effect of the combined treatment with FK506, FTY720, and ex vivo graft irradiation. FK506 and FTY720 prevented the infiltration of CD4 positive cells, the down-regulation of MAdCAM-1 expression on HEVs in PPs, and the up-regulation of MAdCAM-1 expression on ECVs in LP during the early phase of SBT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学系臨床医学・外科学一般

キーワード：移植外科学、小腸移植、拒絶反応制御

1. 研究開始当初の背景

小腸移植が他の臓器移植に比して生着が困難である原因の1つは、小腸が大量のリンパ組織を有する臓器である点である。加えて、食物・微生物等の膨大な量の外来抗原に絶えず暴露されている消化管粘膜は生体防御機

転として特異的な免疫機構が発達しているが、拒絶反応や過度の免疫抑制などがこの防御機構の破綻の引きがねとなることも、移植腸管の生着が困難である原因の1つであると考えられる。我々は以前より、ラット小腸移植・肝移植の急性拒絶反応モデルを用いて、

浸潤リンパ球phenotypeの解析(Fujisaki S, et al. The Nihon University Journal of Medicine 33, 87, 1991) や接着分子(Fujisaki S, et al. J Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery 5, 196, 1998)や細胞外マトリックス(Fujisaki S, et al. Transplantation Proceedings 32, 1316, 2000)の発現動態について解析を行い、拒絶反応におけるリンパ装置や血管内皮の関与について論じてきた。さらに、HEV-like venuleといわれる絨毛底部の小血管は、小腸移植のantibody-mediated rejectionの標的であることを示した(Fujisaki S, et al. Transplantation Proceedings 28, 2484, 1996)。これらの検討の中から、腸管の臓器特異的な免疫機構が小腸移植拒絶反応に大きく関与している可能性を考えた。さらに最近では、腸間膜リンパ節やパイエル板などの腸管付属リンパ組織(gut associated lymphoid tissue; GALT)において特異的な細胞接着(リンパ球ホーミング)に重要な役割を果たす接着因子MAdCAM-1に着目し、小腸移植拒絶反応へのかかわりについて検討した。ここでも小腸絨毛底部の小血管”HEV-like venule”における発現増強を示した(Fujisaki S, et al. Transplantation Proceedings 34, 1045, 2002)。そして、新規免疫抑制剤FTY720を用いて小腸移植拒絶反応を抑制し、接着因子MAdCAM-1の発現について検討した(Sugito K, et al. Transplantation Proceedings 37, 4472, 2005)。

2. 研究の目的

小腸移植はリンパ組織が多いことからGVHDの発生が懸念され、passenger leukocyteを抑えることを目的としてirradiationが検討されたものであるが、実際には臨床的に問題となることは少なく、irradiationは廃れていた。しかしながら、近年alloreconitionを

抑える(graft immunogenecityを抑える)ことを目的に再びirradiationは見直され、実際に良好な成績がではじめている。また新規免疫抑制剤FTY720を併用することによりさらなる小腸移植後の免疫抑制効果を発揮するものと考えられる。MAdCAM-1は主にパイエル板や腸間膜リンパ節の高内皮細静脈(high endothelial venule)と腸管粘膜固有層の細静脈に発現が見られ、通常の血管内皮細胞には全く発現がみられず、いわゆるGALTに発現が限局しているとされる。抗MAdCAM-1抗体を前投与しておくことにより、パイエル板HEVでのリンパ球のrollingとstickingが阻害されることが示されている(Bargatze RF, et al. Immunity 3, 99, 1995)。これらのことを踏まえ、ラット小腸移植拒絶反応モデルにおいて、MAdCAM-1の発現動態がいかに変化するか、抗MAdCAM-1抗体の投与により拒絶反応がいかにか修飾されるかについて検討することを検討し、FK506やFTY720やex vivo graft irradiationを組み合わせ、小腸移植の術前から術後にかけて集学的治療(拒絶反応制御)を行い、その治療効果を評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)小腸移植におけるex vivo graft irradiationの影響について検討する。DonorとしてBrown Norwayラット(control; Lewisラット)、recipientとしてLewisラットを用いて、同所性小腸移植を行う。

(2)Ex vivo graft irradiationのモデルとしては、donorから全小腸graftを摘出し、137Csにて、2.5分間に5Gy, 10Gy, 20Gyの各線量のirradiationを行う。照射後直ちに、recipientに同所性小腸移植を行う。移植後経時的にsacrificeすることにより、graftの腸間膜リンパ節、パイエル板、小腸壁の標本(凍結およびパラフィン固定)を作製する。

(3)H-E染色にて、graftの組織変化（細胞浸潤、crypt cell apoptosis、arteriopathy、fibrosisなど）を検討する。免疫組織化学の手法を用いて、単染色にて、graftにおけるリンパ球の表面マーカーおよびMAdCAM-1、ICAM-1、VCAM-1をはじめとする接着分子の局在の変化について検討する。腸管壁の支持組織の変化については、細胞外マトリックスの変化について、免疫組織学的に検討する。In Vitroにおけるリンパ球とHEVのbindingする局在についても検討する。

(4)移植腸管のMortalityについては、graft (telemeter近位側) 壁に小動物用の埋め込み式発信機を取り付けtelemeterにて腸管運動を受信するというシステム（スターメデイカル）を用いて、そのirradiationの影響について検討する。

(5)小腸移植後にFK506とFTY720とを組み合わせ術後の拒絶反応制御への影響や免疫抑制剤の適用量について検討する。DonorとしてBrown Norwayラット（control; Lewisラット）、recipientとしてLewisラットを用いて、同所性小腸移植を行う。移植後のgraft survivalについて検討する。それらのgraftに対してH-E染色にて、graftの組織変化（細胞浸潤、crypt cell apoptosis、arteriopathy、fibrosisなど）を検討する。免疫組織化学の手法を用いて、単染色にて、graftにおけるリンパ球の表面マーカーおよびMAdCAM-1、ICAM-1、VCAM-1をはじめとする接着分子の局在の変化について検討する。腸管壁の支持組織の変化については、細胞外マトリックスの変化について、免疫組織学的に検討する。In Vitroにおけるリンパ球とHEVのbindingする局在についても検討する。

(6)小腸移植におけるex vivo graft irradiationとFK506とFTY720とを組み合わせ拒絶反応制御の影響について検討する。DonorとしてBrown Norwayラット（control; Lewisラット）、

recipientとしてLewisラットを用いて、同所性小腸移植を行う。それらのgraftに対してH-E染色にて、graftの組織変化（細胞浸潤、crypt cell apoptosis、arteriopathy、fibrosisなど）を検討する。免疫組織化学の手法を用いて、単染色にて、graftにおけるリンパ球の表面マーカーおよびMAdCAM-1、ICAM-1、VCAM-1をはじめとする接着分子の局在の変化について検討する。腸管壁の支持組織の変化については、細胞外マトリックスの変化について、免疫組織学的に検討する。In Vitroにおけるリンパ球とHEVのbindingする局在についても検討する。

4. 研究成果

(1) graft survival について

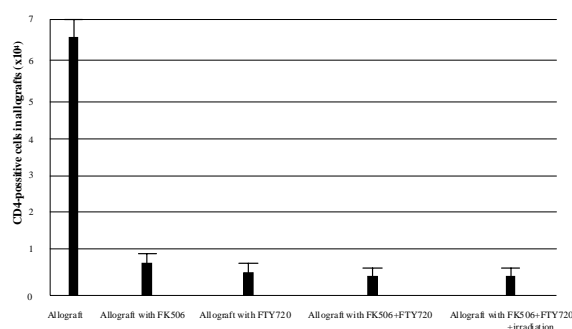
Table 1. Graft Survival after SBT

Group	n	Individual survivals	Mean±SD	p value
Untreated allograft	5	10, 10, 11, 11, 12	10.8±0.8	
Allograft with FK506	5	14, 15, 15, 16, 16	15.2±0.8	<0.05*
Allograft with FTY720	5	15, 16, 16, 17, 17	16.2±0.8	<0.05*
Allograft with FK506+FTY720	5	16, 17, 17, 18, 19	17.4±1.1	<0.05*
Allograft with FK506+FTY720+irradiation	5	17, 17, 18, 19, 19	18.0±1.0	0.40

*Statistically significant differences between untreated allograft, allograft with FK506, allograft with FTY720, allograft with FK506+FTY720. There was no apparent combined supplemental protective effect between FK506+FTY720 and irradiation and FK506+FTY720+irradiation (p=0.40).

FTY720とFK506を投与した群では有意にgraft survivalは延長した。しかし、Ex vivo graft irradiationを加えた群では、graft survivalの延長効果は認められなかった。

(2) graftにおけるCD4 positive cellsの発現について



control 群と比較して、FTY720 と FK506 を投与した群では graft 内の CD4 positive cells は有意に減少していた。FTY720 と FK506 を組み合わせた群においても同様の

結果であったが、Ex vivo graft irradiationを加えた群では、明らかな graft 内の CD4 positive cells の変化は認められなかった。

(3) graft における MAdCAM-1 の発現について (HEVs in PPs)

Table 2. Changes of MAdCAM-1 Expression: Median Grade of MAdCAM-1 Expression on HEVs in PPs

Group	Day3	Day 5	Day7
Untreated allograft	4	2	1
Allograft with FK506	4	4*	3*
Allograft with FTY720	5*	4*	4*
Allograft with FK506+FTY720	5*	5*	4.6*
Allograft with FK506+FTY720+irradiation	4.8	4.6	4.6

On day3, *statistically significant differences between untreated allograft and allograft with FTY720, allograft with FK506+FTY720. On day5, *statistically significant differences between untreated allograft and allograft with FK506, allograft with FTY720, allograft with FK506+FTY720. On day7, *statistically significant differences between untreated allograft and allograft with FK506, allograft with FTY720, allograft with FK506+FTY720. There was no apparent combined supplemental protective effect between allograft with FK506+FTY720 and allograft with FK506+FTY720+irradiation.

3日目ではcontrol群と比較して、FTY720、FTY720+FK506投与群において有意にMAdCAM-1の発現を認めた。5日目ではcontrol群と比較して、FK506、FTY720、FTY720+FK506投与群において有意にMAdCAM-1の発現を認めた。7日目ではcontrol群と比較して、FK506、FTY720、FTY720+FK506投与群において有意にMAdCAM-1の発現を認めた。FK506+FTY720とFK506+FTY720+Ex vivo graft irradiationの群では有意な差は認められなかった。

(4) graftにおけるMAdCAM-1の発現について (HCV in LP)

Group	Day3	Day 5	Day7
Untreated allograft	1.5	2	4
Allograft with FK506	1.5	1.5	2*
Allograft with FTY720	1.5	1.5	1.5*
Allograft with FK506+FTY720	1.5	1.2	1.2*
Allograft with FK506+FTY720+irradiation	1.5	1.5	1.2

*Statistically significant differences between untreated allograft and allograft with FK506, allograft with FTY720, allograft with FK506+FTY720 on day7. There was no apparent combined supplemental protective effect between allograft with FK506+FTY720 and allograft with FK506+FTY720+irradiation.

7日目ではcontrol群と比較して、FK506、FTY720、FTY720+FK506投与群において有意にMAdCAM-1の発現を認めた。FK506+FTY720とFK506+FTY720+Ex vivo graft irradiationの群では有意な差は認められなかった。

(5) 移植腸管の機能的解析

小腸移植の急性期拒絶反応における移植腸管のMortalityについては、graft (telemeter近位側) 壁に小動物用の埋め込み式発信機を取り付けtelemeterにて腸管運動の受信を

試みたが、腸管からの電気が弱かったためか、各群において比較検討するに至らなかった。

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3件)

- ① Sugito K, Uekusa S, Kawashima H, Masuko T, Furuya T, Konuma N, Ohashi K, Inoue M, Ikeda T, Koshinaga T: Effect of combined treatment with FK506, FTY720, and ex vivo graft irradiation in rat small bowel transplantation: expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1. *Pediatr Transplant*. 14:614-7, 2010. 査読有
- ② Sugito K, Inoue M, Ikeda T, Hagiwara N, Koshinaga T, Kusafuka T: Effect of FTY720 and ex vivo graft irradiation in rat small bowel transplantation: expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1. *Surgery Today*. 38: 38-41, 2008. 査読有
- ③ Sugito K, Inoue M, Ikeda T, Hagiwara N, Koshinaga T, Kusafuka T: Effect of FTY720 and ex vivo graft irradiation in rat small bowel transplantation: apoptosis of crypt cells and lymphocytes. *Transplant Proc*. 39:3432-5, 2007. 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① 小沼憲祥, 石岡茂樹, 池田太郎, 松本太郎. マウス ES 細胞を用いた腸管組織再生の検討. 第 31 回日本炎症・再生医学会. 2010. 8. 5 東京
- ② 小沼憲祥, 石岡茂樹, 風間智彦, 入部雄司, 松本太郎, 益子貴行, 杉藤公信, 池田太郎, 越永従道. 前駆脂肪細胞を用いた骨格筋再生の検討. 第 47 回日本小児外科学会総会. 2010. 6. 18 名古屋
- ③ 石岡茂樹, 小沼憲祥, 入部雄司, 松本太郎, 池田太郎, 越永従道. DFAT (脱分化脂肪細胞) を用いた炎症性腸疾患 (IBD) への治療検討. 第 47 回日本小児外科学会総会. 2010. 6. 19 名古屋
- ④ Konuma N, Ishioka S, Ikeda T, Koshinaga T, Matsumoto T. Mouse Embryonic Stem Cells Give Rise to Gut-like Morphogenesis, Including Intestinal Stem Cells, in the Embryoid Body Model. 3rd Pan Pacific Symposium on Stem Cells Research. 2010. 4. 17 Taichung, Taiwan

- ⑤ 小沼憲祥, 石岡茂樹, 池田太郎, 風間智彦, 松本太郎, 草深竹志: 肛門管機能の再生を念頭に置いて前駆脂肪細胞を用いた骨格筋再生の検討. 第 110 回日本外科学会総会. 2010. 4. 8 福岡
- ⑥ 石岡茂樹, 小沼憲祥, 池田太郎, 入部雄司, 松本太郎, 草深竹志: 難治性炎症性腸疾患に対する間葉系幹細胞様細胞の免疫抑制能・免疫寛容能の検討. 第 110 回日本外科学会総会. 2010. 4. 8 福岡
- ⑦ 越永従道, 浅井 陽, 大橋研介, 井上幹也, 杉藤公信, 池田太郎, 萩原紀嗣, 草深竹志: 低出生体重児における胎便関連性小腸閉塞の検討. 第 109 回日本外科学会総会. 2009. 4. 3 福岡
- ⑧ 益子貴行, 松本太郎, 小沼憲祥, 井上幹也, 杉藤公信, 池田太郎, 萩原紀嗣, 越永従道, 草深竹志: 小腸絨毛の傷害からの再生過程における骨髄由来細胞の関与の検討. 第 20 回日本小腸移植研究会. 2008. 3. 1 大阪
- ⑨ 小沼憲祥, 益子貴行, 井上幹也, 杉藤公信, 池田太郎, 萩原紀嗣, 若林久美子, 松本太郎, 麦島秀雄, 越永従道, 草深竹志: マウス ES 細胞を用いた腸管組織再生の可能性. 第 20 回日本小腸移植研究会. 2008. 3. 1 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉藤 公信 (SUGITO KIMINOBU)
日本大学・医学部・助教
研究者番号: 10328750

(2) 研究分担者

池田 太郎 (IKEDA TARO)
日本大学・医学部・助教
研究者番号: 00318396

草深 竹志 (KUSAFUKA TAKESHI)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 70263267

【H20～H21】

(3) 連携研究者

なし