様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ６ 月 １０ 日現在

機関番号：３２６４４
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：１９Ｋ０９１０４

研究課題名（和文）小腸移植におけるNotchシグナルの免疫応答制御とメカニズムの解明

研究課題名（英文）Notch signaling in small bowel allograft rejection

研究代表者
森　昌玄（Masaharu, Mori）

東海大学・医学部・助教

研究者番号：００４４５３８９

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）：Notchシグナル経路は小腸虚血再灌流モデルのin vivoでは、Notch経路遮断により生存日数の延長が認められ、組織学的にも虚血再灌流障害の軽減が認められた。in vitroの系では、炎症性サイトカインはNotchリガンド抗体治療群においてはTNF-αとMCP-1のmRNA発現は抑制され、Western Blot法により治療群においてHemeoxidase-1(HO-1)の著明な減少が認められた。Notchリガンド抗体治療群は無治療群に比べ小腸粘膜上皮のTUNEL染色陽性の細胞の増加を抑制していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
短腸症候群を呈し小腸機能不全に陥った患児は、肝不全が進行した場合は小腸移植が唯一の救命治療である。強力な免疫抑制療法での拒絶反応の制御は限界に達しており、これまでと違う免疫制御の新戦略が必要である。Notchシグナル経路は発生・分化・ 増殖などさまざまな生命現象に関与する重要なシグナル経路である。臓器移植領域では、NotchリガンドであるDll1およびDll4が細胞性・液性免疫の両者を不活化させることなど、Notchシグナル経路はこれまでにない新規の拒絶反応抑制効果・免疫調節作用を示すことから、小腸虚血再灌流障害、小腸移植において従来の治療法の弱点を克服する新規治療法として期待できる。

研究成果の概要（英文）：In vivo of the small bowel ischemia reperfusion model, the Notch signaling pathway was observed to extend the number of days of survival by blocking the Notch pathway. Histologically too, a reduction in ischemic reperfusion disorders was noted.
In vitro systems, inflammatory cytokines suppressed mRNA expression of TNF-α and MCP-1 in the Notch ligand antibody treatment group. Western Blot methods showed a marked reduction in Hemeoxidase-1 (HO-1) in the treatment group. The Notch ligand antibody treatment group suppressed an increase in TUNEL-stained positive cells in the small intestinal mucosal epithelium compared to the untreated group.

研究分野：移植免疫

キーワード：小腸移植　虚血再潅流障害　Notchシグナル　免疫応答

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

１．研究開始当初の背景

（１）小児における短腸症候群と小腸移植の治療成績

短腸症候群を呈し小腸機能不全に陥った患児は、長期に渡る中心静脈栄養管理を余儀なくされ、中枢ルートの喪失や小腸機能不全関連肝機能障害による肝不全が進行した場合は小腸移植が唯一の救命治療である。急性期拒絶反応の予防に細胞性免疫あるいは液性免疫をも消去あるいは無機能化させる induction therapy が導入され、短期的な成績は向上したものの、強力な免疫抑制療法による敗血症や拒絶反応より長期成績は満足できる水準とは言えず、臨床小腸移植の成績は伸び悩んでいる。小腸は最も虚血再灌流障害に脆弱な臓器であり、小腸移植の成績向上には、虚血再灌流障害の制御に加え、強力な免疫抑制療法で拒絶反応を無理やり押さえ込む方法での拒絶反応の制御はもはや限界に達していると考えられ、今後の小腸移植の成績向上のためには、これまでと違うアプローチによる免疫制御の新戦略が必要である。

（２）多彩な役割を果たす Notch シグナル経路と関連する国内外の研究動向

Notch シグナル経路は発生・分化・ 増殖などさまざまな生命現象に関与する重要なシグナル経路である。Notch 受容体に細胞間接触を介して隣接する細胞膜上に発現するリガンド分子が結合すると，ヘテロダイマーで構成される受容体の細胞内ドメインが切断され，これが活性型 Notch として核内に移行することで 伝達される。核内に移行した活性型 Notch は特定の標的遺伝子の転写調節因子として機能し、細胞内遺伝子発現パターンを広範に変化させることにより細胞の分化・増殖を制御することが血液・神経細胞の分化において明らかとされ、造血幹細胞の自己複製や T 細胞の分化では必須の役割を担っていることが解明された。東海大学医学部生体防御学の穂積研究室では、胸腺環境要因としての Notch リガンドの役割解明を目指し、胸腺上皮細胞に特徴的に発現する Notch リガンドの１つ：Delta-like 4（Dll4）が、胸腺での T 細胞分化決定に必須であることを示し、T 細胞の性状を分子的に理解することから免疫応答全体の理解へ発展させ、免疫応答に関連した数多くの難病に対する新たな治療のヒントになるような研究を継続している。臓器移植領域では、機能獲得の面からのアプローチで免疫寛容の誘導因子として、機能喪失の面からのアプローチで移植片の拒絶反応や GVHD における T 細胞活性化の中心的な調節因子として Notch シグナルの役割を明らかにされつつある。移植周術期の短期的な Notch シグナル阻害が長期に継続する移植片保護効果を認める、Notch リガンドである Dll1 および Dll4 が細胞性・液性免疫の両者を不活化させる、など Notch シグナル経路はこれまでにない新規の拒絶反応抑制効果・免疫調節作用を示すことから、小腸虚血再灌流障害、小腸移植において従来の治療法の弱点を克服する新規治療法として期待できる。

２．研究の目的

短腸症候群を呈し小腸機能不全に陥った患児は、肝不全が進行した場合は小腸移植が唯一の救命治療である。臨床小腸移植では強力な免疫抑制療法による敗血症や拒絶反応より長期成績は伸び悩んでいる。強力な免疫抑制療法での拒絶反応の制御は限界に達しており、これまでと違う免疫制御の新戦略が必要である。Notch シグナル経路は発生・分化・ 増殖などさまざまな生命現象に関与する重要なシグナル経路である。臓器移植領域では、移植周術期の短期的な Notch シグナル阻害が長期に継続する移植片保護効果を認めることや、Notch リガンドである Dll1 および Dll4 が細胞性・液性免疫の両者を不活化させることなど、Notch シグナル経路はこれまでにない新規の拒絶反応抑制効果・免疫調節作用を示すことから、小腸虚血再灌流障害、小腸移植において従来の治療法の弱点を克服する新規治療法として期待できる。小腸における Notch シグナル経路の研究はまだ極めて数が少ない。東海大学医学部生体防御学のバックグラウンドと我々のマウス顕微鏡下臓器移植技術を融合させることにより世界的にもまだ実現されていない「オンリーワン」研究を展開できる点に独自性がある。内因性炎症反応に対する応答制御機構のメカニズムと有効性を明らかにしていくことは、小児における小腸・結腸疾患であるヒルシュスプルング病、ヒルシュスプルング病類縁疾患、腸閉鎖症、短腸症、壊死性腸炎、炎症性腸疾患、などの有効な治療法のない難治性疾患における疾患特異的な炎症制御機構の解明や新たな創薬開発の道を拓く創造性のある研究である。

３．研究の方法

＜小腸虚血再灌流モデル＞

（１）小腸虚血再灌モデル

イソフルレン麻酔下に、ヘパリン(100U/kg)を腹腔内投与後、正中切開にて開腹し全腸管を 配置。上腸間膜動脈、回結腸動脈をマイクロクリップにて把持、および空腸と回腸末端の辺縁動脈を結紮して全小腸の血流を遮断し創部を仮閉鎖する。45 分後にマイクロクリップを開放して小腸血流を再開する。生存率観察群は術後 48 時間まで、分析群は術後 4 時間と 24 時間 に犠牲死させる。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

（２）実験群：

①無治療 C57BL/6 wild-type(B6 WT)：20-25gr(週齢 8-12)の雄性 B6 マウスを用いる。下記 2 群の対照群。

②Notch リガンド抗体（anti-Dll1, anti-Dll4）投与 C57BL/6 wild-type：虚血再灌流手術の１日前に 0.5mg の anti-Dll1, anti-Dll4 を B6 WT マウスに腹腔内投与。

③無治療遺伝子改変マウス Notch 関連遺伝子 KO マウス (B6 background)を用いる。

（３）検討項目

①生存率観察：術後 7 日目までマウスの生存期間を観察する。①群では 7 日生存率は 50%との報告がある。

②小腸バイアビリティー：再灌流後 4 分・10 分後の小腸色調を観察し、写真にて記録。

③Myeloperoxidase(MPO)活性：腸管凍結標本を用いて、小腸への好中球浸潤の指標として MPO 活性を測定。

④サイトカイン産生：RT-PCR 法により炎症性サイトカイン（IL-1β、TNF-α）、Th1 サイトカイン（IFN-γ、IL-2)、Th2 サイトカイン(IL-4、IL-６、IL-13）の定量を行う。

⑤タンパク発現定量：Western Blot 法により、Hemeoxidase-1(HO-1)、Bcl-2/Bcl-xl を測定する。

⑥組織学的検討：HE 染色で虚血再灌流障害をグレード分類によりスコアリングする。

⑦アポトーシス：HE 標本の高倍率像（x400）にて１crypt 当たりの apoptotic body のカウントを行う。

＜小腸移植モデル＞

（１）小腸移植モデル

顕微鏡下に異所性小腸移植手術を行う。ドナーマウスの小腸を大動脈カフおよび門脈の血管 茎を付属させて採取する。レシピエントマウスの大動脈および下大静脈にグラフト血管を #10-0 ナイロンにて端側吻合する。グラフト小腸を両端は腹壁に Thiry-Vella loop 式のストーマとして固定する。グラフト生存率観察群は術後 14 日まで、分析群は術後 4 時間と 24 時間に犠牲死させる。

（２）実験群：

①syngenic モデル群：C57BL/6 wild-type(B6 WT)から B6 WT への同種小腸移植群。

②allogenic モデル 無治療群：BALB/c WT から B6 WT への異種小腸移植を行い治療は行わない。

③allogenic モデル Notch リガンド抗体投与群： BALB/c WT から B6 WT への異種小腸移植群を行い、 anti-Dll1, anti-Dll4 を 500μg(day 0)、250μg(day 2,4,6,8,10)に腹腔内投与する。

④Notch 関連遺伝子 KO マウス： BALB/c WT から Notch 関連遺伝子 KO マウス(B6 background)、 および Notch 関連遺伝子 KO マウス(Balb/c background)から B6 WT への異種小腸移植を行う レシピエントおよびドナーの Notch 関連遺伝子 KO マウスの両者を行う。

（３）検討項目

①グラフト生存率観察：ストーマの色調を経時的に評価し、グラフト小腸の生存日数を評価。

②フローサイトメトリー：術後 7 日目にレシピエントの脾細胞を採取し、CD4+、CD8+、CD4+ Tregs (CD25+FoxP3+) をフローサイトメトリーにて急性拒絶反応におけるガレクチン 9 の発現を評価する。

③ELISPOT アッセイ：IFN-γ、IL-6、IL-17、granzyme B を産生する脾細胞を評価する。

④ドナー特異抗体の発現、GVH 実験を分析する。

⑤サイトカイン産生：RT-PCR 法により炎症性サイトカイン（IL-1β、TNF-α）、Th1 サイトカイン（IFN-γ、IL-2)、Th2 サイトカイン(IL-4、IL-６、IL-13）の定量を行う。

⑥組織学的検討：HE 染色で急性拒絶反応をグレード分類によりスコアリングする。

⑦アポトーシス：HE 標本の高倍率像（x400）にて１crypt 当たりの apoptotic body のカウントを行う。

４．研究成果

（１）小腸虚血再灌流モデル

①森は小動物手術モデルの研究は馴染みがなかったため、渡辺の指導下にモデル作成のトレーニングを開始した。当初の計画ではうまく阻血効果が得られなかったため、上腸間膜動脈のクリップを二重にしたところ、良好な阻血効果が得られるようになった。

②無治療群の生存日

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）
数：C57BL/6 wild-type(B6 WT)：25-30gr(週齢 10-12)の雄性 B6 マウスを用いた。無治療群の生存日数は、(0,1,1,1,2,2,3,5,12,28)（中央値 2 日）で 7 日生存率は 20%であった。諸家の報告では 50%と比べると、死亡率が高い傾向があったが、比較的安定した十分なストレス障害モデルであると判断した。
③治療群の生存日
数：虚血再灌流手術の１日前に 0.5mg の Notch リガンド抗体（anti-Dll1）を B6 WT マウスに腹腔内投与した。治療群の生存日数は、(2,3,3,4,4,5,8,10,17,30)（中央値 4.5 日）と Notch 経路遮断により生存日数の延長が認められた。
④小腸肉眼的バイアビリティー
無治療群では、再灌流後 4 分で腸管壁の浮腫が出現し、10 分後では腸管壁の発赤と浮腫増悪、腸管拡張（粘膜剥離）が認められた。治療群では、10 分後でも軽度～中等度の腸管の浮腫を認めるにとどまった。
⑤組織学的検討
術後 24 時間に検体を採取して、HE 染色で虚血再灌流障害をグレード分類（０：なし、１：軽度、２：中等度、３：重度）によりスコアリングした。無治
療群は(2,2,3,3,3)（中央値２）、治療群は(1,1,2,2,2)（中央値 3）と治療群で組織学的にも虚血再灌流障害の軽減が認められた。

（２）虚血再灌流後、24 時間でモデル動物からの in vitro アッセイ
①組織炎症指標の評価
スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)・カタラーゼ(CAT)活性・ミエロペルオキシダーゼ(MPO)、の 3 項目を検討した。無治療群では MPO 活性は増加、SOD や CAT 活性は低下していたが、治療群では逆に SOD や CAT 活性が低下、MPO 活性は増加していた。
②炎症性サイトカインの評価
無治療群では、TNF-α・MCP-1 mRNA 発現は上昇しており、IL-1β・iNOS も同様に上昇傾向を認めた。Notch リガンド抗体治療群においては、TNF-α と MCP-1 の mRNA 発現は抑制されており、同様に IL-1β・iNOS も抑制傾向を呈していた。
③タンパク発現定量
Western Blot 法により、Hemeoxidase-1(HO-1)、Bcl-2/Bcl-xl を測定した。治療群において、Hemeoxidase-1(HO-1)の著明な減少が認められたものの、Bcl-2/Bcl-xl においては両群間に有意差はなかった。
④アポトーシス
HE 標本の高倍率像（x400）にて１crypt 当たりの apoptotic body のカウントを行った。Notch リガンド抗体治療群は無治療群に比べ、小腸粘膜上皮の TUNEL 染色陽性の細胞の増加を抑制していた。

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〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	渡邉　稔彦 (Watanabe Toshihiko) (50306734)	東海大学・医学部・教授 (32644)	
研究分担者	清水　隆弘 (Takahiro Shimizu) (80626705)	東海大学・医学部・助教 (32644)	
研究分担者	穂積　勝人 (Katsuto Hozumi) (30246079)	東海大学・医学部・教授 (32644)	
研究分担者	佐藤　健人 (Kento Sato) (50235363)	東海大学・医学部・准教授 (32644)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関