

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591525

研究課題名 (和文) ケモカイン及びそのレセプターを標的とする抗体療法及び遺伝子療法の開発

研究課題名 (英文) Research of antibody therapy and gene therapy targeting to chemokine and its receptor

研究代表者

上野 豪久 (UENO TAKEHISA)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10456957

研究成果の概要 (和文)：

ケモカインのアンタゴニストである TAK776 と FK506 の効果をラットの小腸移植モデルにて研究した。レシピエントは FK506 と TAK779 の投与を行った。グラフト生存率と免疫学的反応は MLR と $INF\gamma$ の生成にて評価を行った。グラフト生存期間は同種移植群、FK506 投与群、TAK779 投与群、2 剤投与群にてそれぞれ 7.0, 12.0, 9.8, 18.0 日であった。MLR と $INF\gamma$ の生成は FK506 群にて、顕著に TAK779 群に対して抑制されていた。CD4+ と CD8+ 陽性の細胞は FK506 群、TAK779 群ともに顕著に抑制されていた。今後、TAK779 の効果を研究することによって、小腸移植に対する新しい抗拒絶療法の開発が期待される。

研究成果の概要 (英文)：

The effects of FK506, and TAK-779, antagonists of CCR5 and CXCR3, were investigated using a rat intestinal transplantation model. Small intestines from DA rats were heterotopically transplanted into LEW rats. The recipients were treated with FK506 (1mg/kg/day, day 0-5) and TAK-779 (10mg/kg/day, day 0-10). Graft survival and immunological responses to these materials were estimated by mixed lymphocyte reactions and $IFN-\gamma$ production. The expression of chemokine receptors on lymphocytes was also examined. The average duration of survival was 7.0 ± 0.3 , 12.0 ± 1.0 , 9.8 ± 0.5 and 18.0 ± 1.5 days in the allogeneic, FK506, TAK-779 and the two-drug combined groups, respectively. Cell proliferative responses and $IFN-\gamma$ production were suppressed to a significant extent in the FK506 group compared with the TAK-779 group. In addition, the two-drug combination showed a tendency for stronger suppression than FK506 alone, correlated with in vivo and histopathological data. The numbers of both CD4+ and CD8+ cells were significantly suppressed in the blood of the recipients of both the FK506 and the TAK-779 groups, and in Peyer's patches of the graft of the TAK-779 group, but the FK506 group was not, as evidenced by FACS analysis. In addition, double-staining of graft-infiltrating lymphocytes showed a significant reduction in lymphocyte numbers, expressing CCR5 and CXCR3 in the TAK-779 group, but not evident in

the FK506 group, compared to the allogeneic group. While FK506 suppresses cell proliferation and effector function, it has less effect on the expression of CCR5 and CXCR3 in lymphocytes. Further exploration of the effects of a combined therapy with TAK-779 could represent a novel treatment for intestinal transplantation

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：(1) 小腸移植 (2) 虚血再還流 (3) 急性拒絶 (4) ケモカイ (5) ELISA
(6) フローサイトメトリー (7) TECK, Fractalkine

1. 研究開始当初の背景

腸管機能不全や短腸症候群に対する根本的な治療として、小腸移植が1960年代より臨床応用が行われるようになってきた。さまざまな免疫抑制剤の出現により、次第に小腸移植の成績が上昇してきた。本邦でも1990年代より臨床応用が始まっているが、いまだに17例にとどまっている。臨床小腸移植が浸透しない理由として、小腸自体が免疫原性に富んだ臓器であり、いまだにその免疫抑制に難渋するため、他の固形臓器移植に比べてその成績が極端に悪いことが原因である。したがって、小腸移植の成績の上昇には拒絶反応の早期発見、より強力な拒絶抑制法の開発が必要である。

2. 研究の目的

今回、固形臓器の中でも独特なリンパ機構を持つ小腸の免疫特性の視点から、ケモカインレセプターを制御することによりグラフトの保護、さらに小腸移植の成績に効果的な検

証を行うことを目標としている。ケモカインレセプターに対する抗体療法、さらには、グラフトへ対する遺伝子治療の応用が期待される。

3. 研究の方法

体重 150-200g の生後 8 週以内のラットより 30cm の小腸を取り出して、レシピエントに異所性（両端を人工肛門）に移植する。

ケモカイン 小腸移植、小腸炎症に特異的なもの (CCR6-LARK/MIP-3 CCR9-TECK、CXCR1-Fractalkine) の抗体を用意してある。とくにラットで報告のないものに関してはRT-PCRにてmRNAをとって遺伝子配列を決めペプチド抗体を作成した。

まず、ラットの小腸移植モデル、虚血再還流モデルを作成して、ケモカインレセプターの発現を、Real Time PCRにてmRNAの定量を行い、経時的に発現量を見ていく予定である。

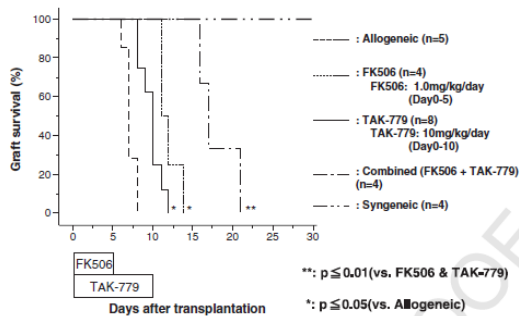
次に、Tacrolimus, CyA, FTY-720の免疫抑

制剤をラットの小腸移植モデルに投与して、Real Time PCRにてmRNAの定量も行う予定である。薬剤同士の総合作用を見ていくため、いくつかのケモカイン抗体を投与し発現量を経時的に見ていく予定である。

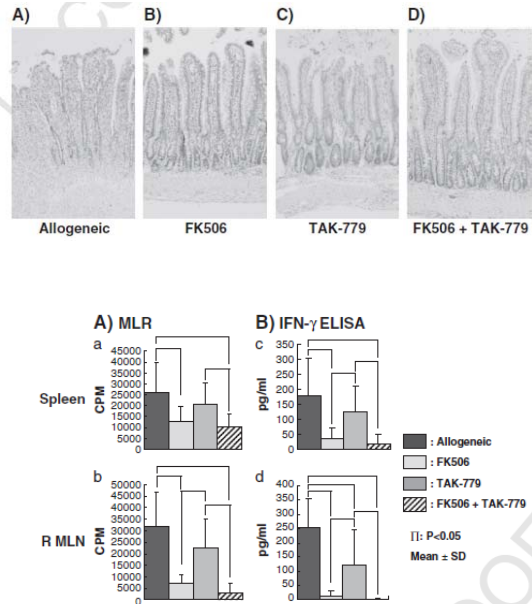
さらに、上記の実験系にてケモカインレセプターの発現を測定したのちに、実験モデルラットに対してケモカイン抗体を術後数日間投与し、グラフトの延着効果を見る。そのためにはグラフトの生存を経時的に人工肛門の排泄、色調等によりモニターリングを行う。術後6日目に擬死させて、Real Time PCRにてグラフト組織側での以下のケモカインの測定を行い、抗体投与による効果をコントロール群と比較する。

4. 研究成果

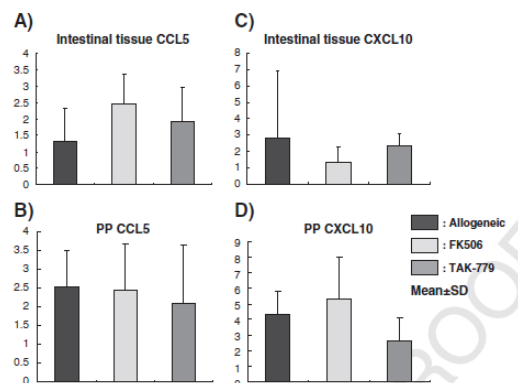
ケモカインである CCR5 と CXCR3 のアンタゴニストである TAK776 と FK506 の効果をラットの小腸移植モデルにて研究した。DA ラットの腸を異所性に LEW ラットに移植した。レシピエントは FK506 を 5 日間投与し、また TAK779 を 10 日間投与を行った。グラフト生存率と免疫学的反応は MLR と INF γ の生成にて評価を行った。リンパ球のケモカインレセプターの生成も評価した。グラフト生存期間は同種移植群、FK506 投与群、TAK 7 7 9 投与群、2 剤投与群にてそれぞれ 7.0 \pm 0.3, 12.0 \pm 1.0, 9.8 \pm 0.5、18.0 \pm 1.5 日であった。



MLR と INF γ の生成は FK506 群にて、顕著に TAK779 群に対して抑制されていた。2 剤投与群はさらに in vivo、病理所見にて抑制されていた。



CD4+ と CD8+ 陽性の細胞は FK506 群、TAK779 群ともに顕著に抑制されていた。小腸移植片のパイエル板は TAK 7 7 9 群では抑制されていたが、FK 5 0 6 群ではそれほど抑制されていなかったことが FACS にて確認された。小腸移植片内のリンパ球に対する二重染色では CCR5 と CXCR3 が TAK-779 群にて顕著に減少していたが FK506 群ではそれほどではなかった。このように、FK506 はリンパ球増殖の機能を抑えるものの CCR5 と CXCR3 の発現に対しては大きな影響を与えなかった。



今後、TAK779の効果を研究することによって、小腸移植に対する新しい抗拒絶療法の開発が期待される。

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2件)

① Effects of a calcineurin inhibitor, FK506, and a CCR5/CXCR3 antagonist, TAK-779, in a rat small intestinal transplantation model

Yuichi Takama, Shuji Miyagawa, Aki Yamamoto, Sabere Firdawes, Takehisa Ueno, Yoshiyuki Ihara, Akihiro Kondo, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki

Otsuka, Masahiro Fukuzawa

Transplant Immunology 2011 Apr 15. Epub ahead of print. 査読あり

② Current status of intestinal transplant
Takehisa Ueno and Masahiro Fukuzawa
Surgery Today 2010 Dec;40(12):1112-22 査読あり

[学会発表] (計6件)

① Effects of a calcineurin inhibitor, FK506, and a CCR5/CXCR3 antagonist, TAK-779, in a rat small intestinal transplantation model 学会名 第23回国際移植学会 発表年月日 2010年8月16日 発表場所 バンクーバー カナダ

② Effects of a calcineurin inhibitor, FK506, and a CCR5/CXCR3 antagonist, TAK-779, in a rat small intestinal transplantation model
学会名 第11回国際小腸移植学会 発表年月日 2009年9月11日 発表場所 イタリア

ア、ボローニャ 他

6. 研究組織 (1) 研究代表者

上野 豪久 (UENO TAKEHISA)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 10456957

(2) 研究分担者

福澤 正洋 (FUKUZAWA MASAHIRO)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 60165272

宮川 周士 (MIYAGAWA SHUJI)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 90273648

高間 勇一 (TAKAMA YUICHI)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 50467560