

機関番号：32666  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591900  
 研究課題名(和文) 免疫寛容導入による自然抗原ノックアウトミニブタからヒヒへの異種腎臓移植の免疫応答  
 研究課題名(英文) Xenotransplantation from GalT-KO miniature swine to baboon in tolerance induction protocol  
 研究代表者  
 清水 章 (SHIMIZU AKIRA)  
 日本医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号：00256942

研究成果の概要(和文)：自然抗原を完全に除去した GalT-KO MGH ミニブタからヒヒへの臓器移植実験の異種移植心臓と腎臓を用いて移植臓器の廃絶機序を検討した。免疫抑制療法による異種移植では、ブタ移植心臓や移植腎臓の機能廃絶には、自然抗原に対する抗体以外の獲得性抗ドナー抗体による急性抗体依存性拒絶反応が関連した血栓性微小血管傷害が主要な原因であることを明らかにした。長期生着した移植臓器には、細胞傷害性 T 細胞の浸潤による急性細胞性拒絶反応や、慢性拒絶反応の進展も認めた。一方、これらの拒絶反応は、安定した免疫寛容導入が行われた場合の移植腎臓には観察されず、同種移植よりも強力に拒絶反応が誘導される異種移植には、積極的な免疫寛容導入療法が必要であると結論した。

研究成果の概要(英文)：Xenotransplantation could provide a solution to the critical shortage of organs for transplantation in humans. In attempt to prevent hyperacute rejection (HAR) and acute humoral xenograft rejection (AHXR),  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase gene knockout (GalT-KO) pigs have been produced in Massachusetts General Hospital, Boston, USA. In heart xenotransplantation from GalT-KO pig into baboon, heterotopic heart grafts could beat in abdominal cavity by 179 days (median 78 days). In kidney xenotransplantation, GalT-KO kidney grafts rejected by day 34 in chronic immunosuppression protocol, but grafts could survive up to 83 days in tolerance inducing protocol. GalT-KO heart and kidney xenografts did not develop hyperacute rejection. However, all GalT-KO heart and kidney grafts in the chronic immunosuppression group were rejected by AHXR with thrombotic microangiopathy. Acute cellular xenograft rejection (ACXR) and chronic rejection also developed. However, in the kidney grafts in tolerance inducing protocol, AHRX, ACXR, and chronic rejection could not be detected in the grafts. Therefore, we conclude that the tolerance inducing protocol is necessary for success the heart and kidney xenotransplantation from GalT-KO pig into baboons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：移植病理

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腎臓移植、異種移植、拒絶反応

## 1. 研究開始当初の背景

Massachusetts General Hospital (MGH), Harvard Medical School, Boston, MA, USA の移植研究センター(Transplantation Biology Research Center)は、異種移植臓器の生着を困難としている自然抗原 galactose  $\alpha$ 1,3-galactose (Gal) を完全に除去した自然抗原ノックアウト MGH ミニブタを開発した。World Health Organization から 2005 年に、今後の異種移植における指針が発表され (Transplantation 79: 636-637, 2005)、日本でも世界でも異種移植の臨床応用を現実のものとするための研究が積極的に進められている。MGH の移植研究センターでは、自然抗原ノックアウトミニブタから異種移植の臨床応用を前提としたヒトへの異種移植実験を盛んに行なっている。ヒト・ブタ間の異種 T 細胞反応は、同種移植のそれと同等か、もしくはそれ以上であることが示されていることから、異種移植の成功には長期の大量の免疫抑制剤の使用が必要になると考えられる。そこで、異種移植の実現に向けて、免疫抑制剤を短期間使用する免疫寛容の導入による臓器移植が必要となる。MGH の移植研究センターでは、自然抗原ノックアウトミニブタをドナーに用い、さらに同種実験移植では免疫寛容の導入が可能な胸腺移植を併用した異種臓器移植実験を行なっている。

## 2. 研究の目的

MGH で行われた長期免疫抑制療法による心臓移植と、長期免疫抑制療法と免疫寛容導入療法による腎臓移植の移植臓器の解析を行い、自然抗原ノックアウトミニブタを用いた異種移植における移植臓器の機能低下・廃絶の機序を解明する。異種移植の移植臓器内で起こっている免疫反応や臓器傷害の特徴を

明確にし、自然抗原ノックアウトの次に標的とすべき蛋白や遺伝子を示し、異種移植の今後の展開の方向性を具体的に示す。

## 3. 研究の方法

異種移植心臓及び移植腎臓のホルマリン固定パラフィンブロックと凍結材料を用いて病理学的に検討した。(1)光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて、移植臓器傷害の程度や傷害部位を解析し、また、抗体・補体依存性臓器傷害や炎症細胞性臓器傷害の程度、急性拒絶反応、慢性拒絶反応の程度を検討した。(2)抗体関連拒絶反応を免疫グロブリン(IgG, IgM)と補体(C3, C4, C4d, C5b-9)で確認した。(3)臓器傷害を TUNEL 法を用いて確認した。(4)高度の臓器傷害は血管内皮細胞障害と血小板やフィブリンの析出がみられる。

CD31(PCAM)を用いて免疫組織染色を行い、血管内皮細胞を同定し、血管系の傷害の程度を観察した。さらに、傷害異種移植臓器における、フィブリン血栓や血小板血栓の形成を CD41 の免疫染色、CD41 と免疫グロブリンや補体との二重染色を用いて検討した。血栓性微小血管症の進展機序として、凝固系や線溶系に関連している蛋白の変化を確認した。免疫染色で、内皮細胞における (a) 凝固経路の factor VII の受容体として働き、直接的に血管内凝固を誘導する tissue factor の発現、

(b) 細胞外 ATP と ADP を AMP に分解し、血小板活性化の抑制に働く CD39 の減少を確認した。急性細胞性拒絶反応の進展を、CD3、CD4、CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞、パーフォリンなどの細胞傷害顆粒陽性細胞、マクロファージ、B 細胞を組織免疫染色により解析した。慢性拒絶反応を形態的に確認し、その進展過程への免疫学的機序の関与について検討した。

#### 4. 研究成果

ブタ臓器をヒトに移植する異種移植では、超急性拒絶反応により移植臓器は急速に機能廃絶に陥る。MGH の移植研究センターでは、超急性拒絶反応の原因分子である自然抗原 [galactose  $\alpha$ 1,3-galactose, (Gal)抗原] を完全に除去した GalT-KO MGH ミニブタを作製し、臨床応用を考慮しヒトへの心臓や腎臓の移植実験を行っている。現在までのところ、腎臓移植は免疫抑制療法では1ヶ月の生着が、免疫寛容療法では83日間の正常の腎機能を保ちながらの生着が得られている。また、心臓移植では免疫抑制療法により約6ヶ月間の生着が得られた。

##### (1) 免疫抑制療法の異種移植心臓の病理学的検討

腹腔内へ異所性に移植された心臓は約6ヶ月間拍動を続けたが、最終的には臓器機能廃絶に陥った。その機能廃絶の機序について病理的に解析を行った。機能低下を伴う移植心臓には、心筋組織内の毛細血管を主体に、移植後早期より IgM と補体(C3、C4c、C4d、C5b-9)の沈着が確認され、IgM や補体の沈着の増強に IgG の沈着も加わり心機能が低下した。IgM、IgG、補体の沈着の増強に伴い、毛細血管内の TUNEL 染色陽性内皮細胞の増加を認めた。毛細血管内には血栓形成もみられ、血栓形成が小動脈にもおよぶと、心筋の虚血性変化や心筋の脱落と肉芽形成がみられ、心筋梗塞とともに血清中のトロポニン T の上昇、心拍動の低下を認めた。抗体・補体依存性の毛細血管内皮細胞傷害は、内皮細胞の細胞死ばかりではなく、内皮細胞における tissue factor の発現増強や CD39 の発現減少を誘導し、内皮細胞の活性化が血栓形成に関与して

いることを明らかにした。自然抗原ノックアウト MGH ミニブタからヒトへの長期免疫抑制療法による異種心臓移植では、自然抗原に対する抗体である抗 Gal 抗体以外の non-Gal 抗体が移植臓器血管内皮細胞に結合し、補体が活性化され、急性抗体依存性拒絶反応により機能廃絶が起こっていることを明らかにした。急性抗体依存性拒絶反応により、移植臓器内の微小血管の内皮細胞の細胞死と、残存内皮細胞の凝固能の亢進状態が関連した微小血栓形成が誘導された。さらに比較的長期間にわたり生着した移植心臓には、急性細胞性拒絶反応や慢性拒絶反応も認められた。

##### (2) 免疫抑制療法による異種移植腎臓の病理学的検討

長期免疫抑制療法による腎臓移植では34日間の生着が得られたが、最終的には機能廃絶に陥った。移植腎臓の機能廃絶の機序の特徴を検討した。機能低下には、長期免疫抑制療法による心臓移植と同様に、超急性拒絶反応は認めないものの、急性抗体依存性拒絶反応による血栓性微小血管傷害が関与していた。さらに T 細胞の浸潤もみられ、急性細胞性拒絶反応の進展も認められた。T 細胞性免疫が関与した、抗体依存性拒絶反応が進展し、移植臓器内の微小血管の内皮細胞の細胞死と、残存内皮細胞の凝固能の亢進状態が関連し、多発微小血栓が形成され、移植腎臓は機能低下や機能廃絶に陥った。

##### (3) 免疫寛容療法による異種腎臓移植の病理学的検討

免疫寛容獲得療法による腎臓移植では、移植腎臓は腎機能を保ったまま83日以上を生着を認めた。動物は拒絶反応とは関連のない合

併症で死亡してしまっただが、腎機能は正常であった。長期免疫抑制療法による移植腎臓では獲得性の抗ドナー抗体が関与した急性抗体依存性拒絶反応や細胞傷害性T細胞の浸潤による急性細胞性拒絶反応が進展していたが、これらの拒絶反応は、安定した免疫寛容導入が行われた場合の移植腎臓には観察されていない。安定した免疫寛容が得られない動物では、軽度の抗体依存性拒絶反応と細胞性拒絶反応により、軽度の慢性臓器障害が認められた。

以上の研究から、異種臓器移植においても、同種臓器移植と同様に、急性抗体依存性拒絶反応、急性細胞性拒絶反応や慢性拒絶反応により移植臓器の機能が廃絶することを明らかにした。これらの拒絶反応は、同種移植の場合には免疫抑制療法により制御することが可能である。異種移植でも制御が可能となれば、臨床応用に向けて大きく前進することになる。抗体沈着と補体の活性化による微小血管内皮細胞傷害、その後の血栓形成が移植臓器の機能低下や臓器廃絶につながるため、補体の活性化・内皮細胞死・血栓形成経路を抑制する蛋白の遺伝子を自然抗原ノックアウトブタに新たに導入することが有効と考えた。また、同種移植よりも強力に拒絶反応が誘導される異種移植では、免疫抑制療法では拒絶反応を完全には制御することは困難と思われ、積極的な免疫寛容導入療法が必要と考えられる。不安定な免疫寛容の導入では慢性拒絶反応が生じてしまう。急速に安定した免疫寛容の導入が最も重要であると結論した。

#### 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 14 件)

1. Shimizu A, Yamada K: Histopathology of xenografts in pig to non-human primate discordant xenotransplantation. Clin Transplant 24 Suppl 22: 11-15, 2010.
2. Sekijima M, Shimizu A, Ishii Y, Kudo S, Horita S, Nakajima I, Fuchinoue S, Teraoka S: Early humoral-mediated graft injuries in ABO-incompatible kidney transplantation in human beings. Transplant Proc 42: 789-790, 2010.
3. Ishii E, Shimizu A, Kuwahara N, Arai T, Kataoka M, Wakamatsu K, Ishikawa A, Nagasaka S, Fukuda Y: Lymphangiogenesis associated with acute cellular rejection in rat liver transplantation. Transplant Proc 42: 4282-4285, 2010.
4. Masuda Y, Shimizu A, Kataoka M, Arai T, Ishikawa A, Du X, Saito SK, Aki K, Nagasaka S, Mii A, Fujita E, Fukuda Y: Inhibition of capillary repair in proliferative glomerulonephritis results in persistent glomerular inflammation with glomerular sclerosis. Lab Invest 90: 1468-1481, 2010.
5. Sahara H, Shimizu A, Setoyama K, Oku M, Okumi M, Nishimura H, Oriyanhan W, Tasaki M, Scalea J, Wada H, Bando T, Date H, Yamada K: Beneficial Effects of Perioperative Low-Dose Inhaled Carbon Monoxide on Pulmonary Allograft Survival in MHC-Inbred CLAWN Miniature Swine. Transplantation 90: 1336-1343, 2010.
6. Hirakata A, Okumi M, Griesemer AD, Shimizu A, Nobori S, Tena A, Moran S, Arn

S, Boyd RL, Sachs DH, Yamada K: Reversal of age-related thymic involution by an LHRH agonist in miniature swine. *Transpl Immunol* 24: 76-81, 2010.

7. Weiner J, Yamada K, Ishikawa Y, Moran S, Etter J, Shimizu A, Smith RN, Sachs DH: Prolonged survival of GalT-KO swine skin on baboons. *Xenotransplantation* 17:147-152, 2010.

8. Ishikawa Y, Hirakata A, Griesemer AD, Etter J, Moran S, Weiner J, Shimizu A, Yamada K: Tolerance and long-lasting peripheral chimerism after allogeneic intestinal transplantation in MGH miniature swine. *Transplantation* 89: 417-426, 2010.

9. Griesemer AD, Hirakata A, Shimizu A, Moran S, Tena A, Iwaki H, Ishikawa Y, Schule P, Arn JS, Robson SC, Fishman JA, Sykes M, Sachs DH, Yamada K: Results of gal-knockout porcine thymokidney xenografts. *Am J Transplant* 9: 2669-2678, 2009.

10. Griesemer AD, Okumi M, Shimizu A, Moran S, Ishikawa Y, Iorio J, Arn JS, Yamada K: Upregulation of CD59: potential mechanism of accommodation in a large animal model. *Transplantation* 87: 1308-1317, 2009.

11. Hisashi Y, Yamada K, Kuwaki K, Tseng Y-L, Dor FJMF, Houser SL, Robson SC, Schuurman H-J, Cooper DKC, Sachs DH, Colvin RB, Shimizu A: Rejection of cardiac

xenografts transplanted from alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout (GalT-KO) pigs to baboons. *Am J Transplant* 8: 2516-2526, 2008.

12. Shimizu A, Hisashi Y, Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Houser SL, Robson SC, Schuurman HJ, Cooper DK, Sachs DH, Yamada K, Colvin RB: Thrombotic microangiopathy associated with humoral rejection of cardiac xenografts from alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs in baboons. *Am J Pathol* 172: 1471-1481, 2008.

13. Tonomura N, Shimizu A, Wang S, Yamada K, Tchipashvili V, Weir GC, Yang YG: Pig islet xenograft rejection in a mouse model with an established human immune system. *Xenotransplantation* 15: 129-135, 2008.

14. Tonomura N, Habiro K, Shimizu A, Sykes M, Yang YG: Antigen-specific human T-cell responses and T cell-dependent production of human antibodies in a humanized mouse model. *Blood* 111: 4293-4296, 2008.

[学会発表] (計 5 件)

1. Shimizu A, Ishii E, Ishikawa A, Arai T, Kuwahara N, Masuda Y, Nagasaka S, Fukuda Y: Acute kidney injury during hepatic failure in rats. 2010 Renal Week in Denver, 2010. 11, Colorado.

2. Shimizu A, Ishii E, Kuwahara N, Arai T, Kataoka M, Fukuda Y: The pathological characteristics of acute antibody-mediated rejection in DA to Lewis rat orthotopic liver transplantation.

XXIII International Congress of The Transplantation Society, 2010. 8, Vancouver.

3. Ishii E, Shimizu A, Arai T, Kataoka M, Ishikawa A, Wakamatsu K, Nagasaka S, Fukuda Y: Chronic antibody-mediated rejection in rat orthotopic liver transplantation. XXIII International Congress of The Transplantation Society, 2010. 8, Vancouver.

4. Ishii E, Shimizu A, Kuwahara N, Arai T, Kataoka M, Wakamatsu K, Ishikawa A, Nagasaka S, Fukuda Y: Lymphangiogenesis associated with acute cellular rejection in rat liver transplantation. XXIII International Congress of The Transplantation Society, 2010. 8, Vancouver.

5. 清水章: 腎移植の新しい治療戦略: 大動物からヒトへの臨床応用, aGal ノックアウト MGH ミニブタからヒトへの異種腎移植の病理像, 移植腎病理研究会・第 13 回学術集会, 2009. 7, 東京

6) Shimizu A, Ishii E, Kuwahara N, Arai T, Kataoka M, Fukuda Y: The pathological characteristics of acute antibody-mediated rejection in DA to Lewis rat orthotopic liver transplantation. The American Transplant Congress. 2009. 5, Boston.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

清水 章 (SHIMIZU AKIRA)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 00256942

##### (2) 研究分担者

益田 幸成 (MASUDA YUKINARI)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 70173755

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: