

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390249

研究課題名(和文) 前臨床大動物モデルを用いた加齢退縮胸腺の若年化による免疫寛容誘導能の再賦活化戦略

研究課題名(英文) Attempt to induce tolerance of kidneys by pharmacologic rejuvenation of thymus in miniature swine

研究代表者

昇 修治 (NOBORI SHUJI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30433288

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに、(1) 胸腺が免疫寛容誘導に重要な役割を果たすこと、(2) 胸腺外因子が胸腺の若年化を促進することを前臨床大動物ミニブタモデルで報告した。胸腺が加齢退縮したレシピエントや、胸腺を摘出した若年レシピエントでは免疫寛容誘導が困難である。本研究は胸腺が加齢退縮している成人レシピエントの免疫寛容戦略として、胸腺若年化を誘導する LH-RH アナログ投与による免疫寛容能向上性を検討した。

研究成果の概要(英文)：We have previously demonstrated that (1) thymus plays an important role in induction of transplant tolerance, and (2) extrinsic factors predominantly promote thymic rejuvenation in preclinical MHC inbred swine. Since considerable data in the swine model have indicated that the reason for this age dependence lies in the importance of a non-involuting, functional thymus during the induction period, the proposed study aimed to examine whether pharmacologically rejuvenated thymus induced by LH-RH agonist restored ability of inducing tolerance of allogeneic renal grafts in MHC inbred miniature swine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2012 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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：移植・再生医療、トランスレーショナルリサーチ、胸腺、ミニブタ、免疫寛容、若年化再生、テストステロン、制御性 T 細胞

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、免疫寛容誘導における胸腺の役割を前臨床大動物ミニブタモデルで検討し、胸腺が加齢退縮したレシピエントや、胸腺を摘出した若年レシピエントでは免疫

寛容誘導が困難であることを報告した (Yamada K. J Exp Med 1997; Transplantation 1999)。これらの現象を基に、加齢退縮した胸腺を若返らせることで、胸腺固有の能力が再生し、免疫寛容誘導能が

再賦活化されるのではないか？という仮説を立て研究に着手し、これまでに、(1) 加齢に伴いミニブタ胸腺が退縮し、皮質の割合が髓質に比し低下する(皮質<髓質)、(2) 加

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013年度

課題番号：22390249

研究課題名(和文)

前臨床大動物モデルを用いた加齢退縮胸腺の若年化による免疫寛容誘導能の再賦活化戦略

研究課題名(英文) Attempt to induce tolerance of kidneys by pharmacologic rejuvenation of thymus in miniature swine
研究代表者

昇 修治 (NOBORI SHUJI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30433288

齢退縮した胸腺を若年ホストに移植すると、退縮した胸腺が若年胸腺と同様な構築へ若返る(Nobori S. PNAS 2006)、(3) LH-RH アナログ投与により、加齢退縮したブタ胸腺が若年化するという結果を得ている。

2. 研究の目的

本申請研究ではこの研究を更に発展させ、LH-RH アナログ投与による加齢胸腺若年化がもたらす免疫寛容能向上性を、MHC の背景が確立したミニブタを用いた大動物実験系により以下の3つの目的による実験を行い、臨床移植の大多数を占める成人(加齢)レシピエントに対する革新的な免疫寛容誘導戦略として薬剤による胸腺若年化による免疫寛容誘導の可能性を検討する。

目的 1) LH-RH アナログ投与による胸腺若年化がもたらす免疫寛容誘導能の再賦活化を検討する。

目的 2) 胸腺若年化による免疫寛容誘導能の再賦活化に基づく臨床治療戦略を確立する。

目的 3) 胸腺若年化による免疫寛容誘導能の再賦活化メカニズムを検討する。

3. 研究の方法

(1) 動物:組織適合性抗原確立ミニブタ

(2) 胸腺の若年化:

①血管茎付胸腺移植法(Vascularized Thymic Lobe Transplantation: VTL Tx)を用い、加齢胸腺を若年レシピエントへ移植。

②LH-RH アナログの投与:LH-RH アナログ3か月 Depot (45mg) を皮下注。

(3) 胸腺の若年化ならびに加齢促進の評価:

①組織病理学的検討:胸腺の若年化を、皮質/髓質面積比の計測、構築(H&E染色)に加え、免疫病理学的に検討。胸腺細胞の細胞分画(CD1, CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, Class I, Class II, CD44, CD45RA, CD62L)を検討。

②胸腺・末梢リンパ球検体を用いた胸腺の若

年化過程の細胞学的検討:胸腺の若年化過程での胸腺細胞およびの末梢リンパ節・末梢血での細胞分画の解析を上記免疫病理検討と同様の抗ブタ抗体を用いFACSによる多色染色解析を行い、特に若年過程でのThymopiesisおよび制御性T細胞(CD4/CD25/FoxP3)、ナイーブT細胞(CD4/CD45RAhigh)およびの変化を観察。

③ナイーブT細胞の分子生物学的解析:胸腺から末梢へ出たばかりのナイーブT細胞を特にT-cell receptor rearrangement excision circles (TRECs)を指標として定量的RT-PCRにより評価。

(4) 免疫寛容に関する免疫学的検討:

①若年化した胸腺のIn Vivo性能試験を腎移植において確認し、更に抗ドナー免疫反応は、末梢血でのCFSE-MLR、PKH26-CMLおよびFACSによる抗ドナー産生、液性細胞性試験により経時的に検討。

4. 研究成果

我々は、これまでに免疫寛容誘導における胸腺の重要性をミニブタモデルで立証し(J Exp Med 1997; Transplantation 1999)、血管茎付胸腺移植法(Vascularized Thymic Lobe Transplantation: VTL Tx)を確立した(Transplantation 2004)。本VTL Tx法を用い、加齢退縮した胸腺を若年個体へ移植することで胸腺が若返らせることを明らかにし更にその胸腺固有の能力が再生し、免疫寛容誘導能が再賦活化されることを報告した(Nobori S. PNAS 2006等)。更に本結果は胸腺の若年化には局所因子より外因子が重要な役割を果たすことを示唆した。

成果(1) Pharmacologic castrationであるLH-RHアナログを前臨床大動物モデルであるミニブタに投与することで、加齢退縮胸腺の若年化を確認した(目的1)。

LH-RH投与による加齢退縮ミニブタ胸腺若年化効果を病理学的morphometric studyを進め、LH-RH投与2-3月後に最大の若年化を呈することを確認し、その成果の一部を米国移植学術誌に報告した(Transpl Immunol 2010)。

成果(2) LH-RHアナログ投与による胸腺若年化がもたらす免疫寛容誘導能の再賦活化を腎移植モデルで検討した(目的1)。

LH-RH投与により胸腺若年化を得た加齢動物4症例に対し、MHC完全不適合腎移植を行い、胸腺若年化による免疫寛容誘導能の評価を行った。4症例とも術前生化学検査・FACSデータからは胸腺若年化が得られたが、予想に反して移植腎は生着の若干の延長を認めたものの拒絶された。このことは今後の検討として(1) AdultのメモリーT細胞と胸腺の若年化によるNaïve T細胞のバランスを考慮した、メモリーT細胞の一過性除去戦略またはLH-RH投与期間の延長によるNaïve T細胞の増加の必要性、ならびに(2) 薬剤

性に誘導した組織学的胸腺の若年化と、若年ホストへの VTL Tx による胸腺の若年化について、若年に伴う胸腺上皮等の変化の相違を検討する必要性が示唆された。

成果 (3) 胸腺若年化による免疫寛容誘導能の再賦活化とそのメカニズム (目的 2、3) 組織適合性抗原 (MHC) 確立ミニブタを用いた胸腺血管移植実験系で、胸腺若年化による免疫寛容賦活能 (4 例) および胸腺加齢化による免疫寛容喪失能 (対照群 3 例) を検討した。

①若年化における宿主胸腺の役割：加齢胸腺の若年化と免疫寛容賦活能を検討するに当たり、MHC 不適合モデルでは、ホスト胸腺の存在が移植胸腺の若年能を阻害することを確認した。

②胸腺の若年化と免疫寛容能：宿主胸腺摘出後、加齢胸腺を若年宿主に移植した症例で、移植胸腺の若年化を細胞解析 (FACS)、組織所見で確認し、in vitro 試験で免疫寛容を確認した。

③宿主 1 の自己胸腺摘出後 (n=2)、宿主 1 と MHC 適合の若年宿主内で若年化された MHC 適合加齢胸腺 (n=2) を宿主 1 に血管茎付胸腺移植を行い (n=2)、同時に MHC 不適合腎を移植した (n=2)。MHC 不適合腎は胸腺無摘出若年宿主と同様に安定した移植腎機能を示した。このことは若年化された加齢胸腺が自己若年胸腺と同様の免疫寛容機能を有することを示している

④更に胸腺移植による若年化実験において、胸腺の若年化過程での胸腺細胞の分画および制御性 T 細胞 (D4+CD25+FoxP3+) の変化を検討した。若年胸腺により、末梢血制御性 T 細胞は上昇し、胸腺グラフトの加齢化に伴いその上昇が止まることが確認した。

⑤対象群の加齢促進モデルでは、若年胸腺は、加齢宿主への移植後 2 ヶ月から FACS、組織学的検討で、加齢に伴う変化を確認し、加齢促進は移植後 4 ヶ月以降でより明らかに認められた。

⑥更に MHC 不適合胸腺による能動的免疫寛容に、その移植胸腺の若年性維持が必要かを確認した。MHC 不適合若年胸腺を加齢宿主に移植すると若年胸腺の加齢化は進むが、加齢に至る前に免疫寛容が誘導され、ドナー腎は生着した (n=2)。これらを総合すると、加齢動物では末梢メモリー細胞が免疫寛容誘導を阻害する可能性が考えられるとともに、生理的若年化と薬剤性若年化では、免疫寛容誘導能に相違があることが示唆される。

成果 (4) Extrinsic Factor の解明：LH-RH アゴニスト投与後 (胸腺若年化目的) に、テストステロン (TS) の著しい減少を確認している。

①胸腺加齢メカニズムにおける TS の役割を明らかにする目的で若年ブタに TS 投与を行

った結果、TS 投与後、早期の加齢促進効果は認めなかった。このことは胸腺の若年化は、TS の直接作用ではないことが示唆される。

②TS の検討に加え、血清 insulin-like growth factor1 (IGF1) 値と胸腺内 IGF レセプターの発現を検討した。それらはともに加齢により減少することを確認した。

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 3 件)

① Yamada K (2 人中 1 番目) . Thymic transplantation in pig-to-nonhuman primates for the induction of tolerance across xenogeneic barriers. *Methods Mol Biol.* 2012;885:191-212. 査読有

② Yamada K (4 人中 3 番目) . Signal joint T-cell receptor excision circle assay in miniature Swine. *Transplantation.* 2011 Sep 27;92(6):634-40. 査読有

③ Hirakata A, Nobori S (11 人中 5 番目) , Yamada K (11 人中 11 番目) . Reversal of age-related thymic involution by an LHRH agonist in miniature swine. *Transpl Immunol*, 24, 2010, pp76-81 査読有

[学会発表] (計 1 件)

① Villani V, Yamada K et al. The thymus is required to break tolerance of renal allografts in a miniature swine model. 24th International Congress of the Transplantation Society. 2012. 7. 15-19 (16). Berlin, Germany

[図書] (計 1 件)

① Joseph R. Scalea, Isabel Hanekamp and Kazuhiko Yamada* (* 責任著者) *InTech. Kidney Transplantation - New Perspectives: Chapter 9: Mechanisms of Tolerance: Role of the Thymus and Persistence of Antigen in Calcineurin-Induced Tolerance of Renal Allografts in MGH Miniature Swine.* 2011, pp79-192

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特記すべきことなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

昇 修治 (NOBORI SHUJI)

京都府立医科大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・助教

研究者番号：30433288

(2) 研究分担者

山田 和彦 (YAMADA KAZUHIKO)
鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研
究センター・教授

研究者番号：40241103

佐原 寿史 (SAHARA HISASHI)

鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研
究センター・特任准教授

研究者番号：90452333

(3) 連携研究者

吉村 了勇 (YOSHIMURA NORIO)

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究
院）・教授

研究者番号：00191643

清水 章 (SHIMIZU AKIRA)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00256942