

## 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 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791725

研究課題名（和文） 体外フォトフェレーシスによる抗原特異的免疫寛容の導入

研究課題名（英文） Immunological tolerance induction with photo pheresis

研究代表者

清水 史明 (SHIMIZU FUMIAKI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：50347027

研究成果の概要（和文）：

ラットを用いて同種異系間複合組織（鼠径皮弁）の移植モデルを作成した。さらにそのモデルを用いて、移植の際に体外フォトフェレーシスを行うことで拒絶反応を抑制できるかどうかを検討した。検討の際は移植後の拒絶反応の重症度を肉眼的、病理組織学的観察及び、リンパ球混合刺激試験による *in vitro* の観察を行った。その結果、体外フォトフェレーシスにより同種異系間複合組織移植における移植後拒絶反応が抑制されることが証明された。

研究成果の概要（英文）：

We could make composite tissue allo-transplantation model using BN rat and LEW rat. Using this model, we assessed the effect of photopheresis to rejection reaction after composite tissue allo-transplantation, using clinical observation, pathological examination, and mixed lymphocyte reaction assay. As the result of our study, we could prove that photopheresis can suppress the rejection reaction after composite tissue allo-transplantation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：組織培養・移植学

## 1. 研究開始当初の背景

近年熱傷や外傷により両腕を失った患者や、顔面に大きな醜状瘢痕を形成した患者に対して、他人から皮膚、脂肪、筋、腱などからなる複合組織を移植し良好な結果を得たという報告が海外でなされている (Siemionou M. *Microsurg.* 2005)。しかしこのような患者たちは、移植後生涯にわたり免疫抑制剤の投与

を受けねばならず、それによる副作用も問題となっている。それに対して、抗原特異的な免疫寛容の導入の研究は数多く行われているが、いまだ完全に抗原特異的免疫寛容の導入にいたった報告は見いだせない。免疫寛容の導入方法の一つとして抗原特異的な制御性 T 細胞を活性化させる方法があげられる (Siemionow M. *J Hand Surg.* 2002)。動物モデルを使った研究において、体外フォトフ

フェレーシスにより制御性 T 細胞を活性化し、皮膚の抗原に対する過敏反応を抑制させることが報告された (Maeda A. J Immunol. 2005)。この方法で、同種間心臓移植において拒絶反応が抑制されたという報告もなされている (Morelli AE. Blood. 2003)。しかし、皮膚・脂肪・筋膜からなる複合組織移植においてはその有用性は報告されていない。

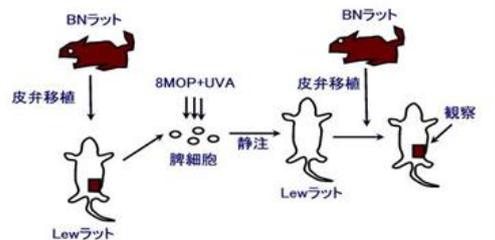
## 2. 研究の目的

本研究を行い、体外フォトフェレーシスにて同種異系間複合組織移植において拒絶反応が抑制されること確認したい。さらにはその機序を解明して、さらに有効な拒絶反応抑制法を開発したい。

## 3. 研究の方法

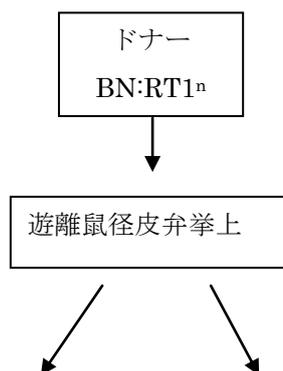
### 1. 体外フォトフェレーシス

BN ラットから遊離鼠径皮弁を採取して、Lewis (Lew) ラットに移植を行う。移植後 5 日目に移植された Lew ラットより脾細胞を分離採取して、それに 8-MOP を添加後 UVA5J/cm<sup>2</sup> 照射を行う。この PUVA 処理された細胞液を宿主となる Lew ラットに静注する (Maeda A. J Immunol 2005)。(下図)



### 2. 同種異系間複合組織移植

実験グループを下記のとおり作成し鼠径皮弁移植術 (下図) をフォトフェレーシス 5 日後に行いその拒絶反応を観察する。



グループ 1 (Lewis:RT1) フェレーシス 済み	グループ 2 (Lewis:RT1) フェレーシス 無
---------------------------------------	--------------------------------------

**グループ1** BNラットから、フォトフェレーシスを行ったLEWラットへ移植

**グループ2** BNラットから、フォトフェレーシスを行わなかったLEWラットへ移植

移植後は毎日皮膚の色調の変化を観察し、拒絶反応の重症度を肉眼的に観察する。さらに HE 標本およびリンパ球混合刺激試験にて拒絶反応重症度の差を比較検討する。

また体外フォトフェレーシスのみではグループ 1 とグループ 2 の間で有意差が出ない場合は、両グループにシクロスポリン投与 (CsA 4mg/kg, 7day) を行い観察する。

### 肉眼的観察による体外フォトフェレーシスによる拒絶反応抑制効果の検討

移植後毎日移植皮膚の肉眼的変化を観察する。鱗屑形成、脱毛、潰瘍形成を拒絶反応の徴候とし、これらの変化が認められるタイミングの違いを各グループにて比較する。



拒絶反応なし



拒絶反応あり

## 病理組織学的観察による体外フォトフェレーシスによる拒絶反応抑制効果の検討

上記グループにおいて、術後 10 日目に組織片を採取し、拒絶反応の重症度に差がないか比較検討する。拒絶反応の重症度は肥厚した表皮の厚さおよび Banff が提唱した重症度分類を用いて比較する (Candales LC. Am J Transplant. 2008)。

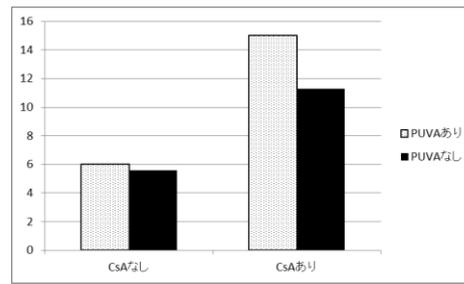
## リンパ球混合試験による抗原特異的免疫寛容導入の確認

フォトフェレーシスから7日後に宿主の脾臓からリンパ球を採取する。これと、ドナーの脾臓から採取したリンパ球を用いて混合リンパ球刺激試験を行い宿主T細胞の<sup>3</sup>Hチミジンの取り込み量を観察する。これによりフォトフェレーシスにより免疫寛容が生じたかどうかIn vitroで検討する (Siemionow M. J Hand Surg. 2002)。

## 4. 研究成果

### 肉眼的観察

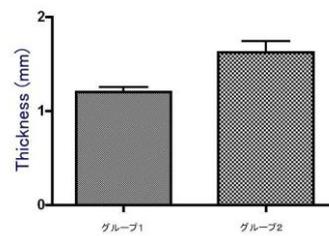
まずCsA投与なしで、グループ1とグループ2の拒絶反応の肉眼的観察を行った。その結果両グループともに移植後約6日で拒絶反応を認め、優位な差を得ることが出来なかった。次に、移植日からCsA 7mg/day 7日間両グループに投与して観察を行った。その結果体外PUVAによるフォトフェレーシスを行ったグループ1では拒絶反応が約14日後にみられ、フェレーシスなしのグループ2では約11日で拒絶反応を認め、両グループ間に優位な差が認められた。(下図)



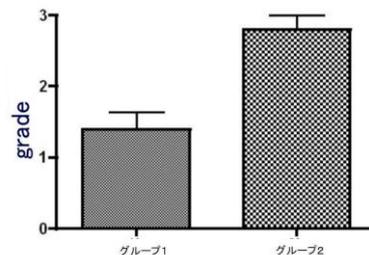
移植組織生着期間

### 病理組織学的観察

グループ1とグループ2において、両方とも術後CsAを投与した場合、術後10日目のHE組織標本では、炎症による皮膚の厚さおよび拒絶反応の重症度に優位な差を認めた。(下図)



組織の厚さ

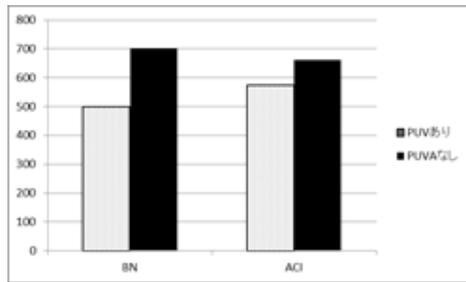


拒絶反応重症度

### リンパ球混合試験

リンパ球混合刺激試験を行い、移植組織の拒絶反応の程度の差を比較検討した。その結果体外フォトフェレーシスを行ったグループではBNラット抗原に対する拒絶反応が抑制されるという結果が得られた。さらに第3グループとしてACIラットに対する反応を調

べたところ、こちらでは抑制は確認されず、BN 抗原特異的免疫寛容であることが確認された。



リンパ球混合試験結果

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計◇件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 史明 ( SHIMIZU FUMIAKI )

大分大学・医学部・助教

研究者番号 : 50347027