

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592715

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機序の解析

研究課題名(英文)effect of extra-corporeal photopheresis for introduction of antigen specific immunological tolerance

研究代表者

清水 史明(Shimizu, Fumiaki)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：50347027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：現在世界的に注目が集まっている、顔面や四肢の同種異系間複合組織移植についての研究を行った。ラットをモデルに用いて、BNラットとLEWラットの間で、遊離皮弁移植を行い、移植後の拒絶反応の様子を観察した。移植前に体外フォトフェレーシスを行ったグループではと行わなかったグループとで比較検討を行った。その結果、肉眼的検討および病理組織学的検討、さらにはin vitroの検討としておこなった体外フォトフェレーシスによる検討において、有意差をもって、拒絶反応が抑制されることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this study, the effect of extra-corporeal photopheresis for introduction of antigen specific immunological tolerance in composite tissue allo-transplantation was assessed. The animal model using rat was used for this study. BN rat was used for donor rat, and Lew rat was used for recipient. The free groin flap was elevated, and it was transferred to the recipient. After the operation, rejection response of the flap was observed using several methods. As the result of our study, significant difference of severity of rejection response between the group that the extra-corporeal photopheresis was performed before surgery and the group that the extra-corporeal photopheresis was not performed by clinical observation, pathological observation and mixed lymphocyte reaction assay.

研究分野：再建外科

キーワード：同種異系間複合組織移植

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移植を行い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は不可欠であり、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な免疫寛容導入にいたった報告は見いだせない。免疫寛容導入の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)。近年動物をモデルとした研究において、体外フォトフェレーシスにより制御性 T 細胞が活性化され、皮膚の抗原に対する過敏反応を抑制されることが知られている (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、皮膚や脂肪からなる複合組織移植においてはその有用性を調べる研究は行われていない。我々は平成 22 年より、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。今回我々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。

研究代表者が形成外科・皮膚科診療を通じて、皮膚のアレルギー反応が抗原特異的な制御性 T 細胞を活性化させることで抑制されることを学んだ。その中でも 8-MOP 投与と紫外線照射を併用した PUVA 療法などが、炎症反応抑制に効果的であることを実際に経験して学び、これが同種間移植医療に有用である可能性を常に感じていた。2005 年に患者の血液に 8-MOP を投与して、その血液に紫外線照射を行う体外フォトフェレーシスにて、制御性 T 細胞が活性化され、これにより皮膚過敏反応が抑制されるという報告が他研究者にて行われた (Maeda A. *J Immunol* 2005)。我々はこの方法を利用して同種間移植における拒絶反応を抑制できるのではないかという発想に至った。また、これと似た方法で心臓移植の拒絶反応を抑制できたという報告はあったが (Morelli AE. *Blood*. 2003)、皮膚・脂肪・筋膜からなる複合組織でこれを行った報告は見いだせなかった。過去に我々が行った虚血時間と複合組織移植後拒絶反応の関係を調べた研究では皮膚を含んだ複合組

織は、移植後組織の状態の変化を肉眼的に観察することが内臓器にくらべて容易で、微細な変化をとらえることが可能であることを学んだ (Shimizu F. *Microsurg* 2010. 業績 1)。この経験から複合組織移植が体外フォトフェレーシスが拒絶反応に及ぼす影響を観察するのに適したモデルであると着想した。平成 22 年度より本研究を開始して、後述の様に体外フォトフェレーシスにて移植後拒絶反応が抑制されるという結果を得ることができた。さらにその有効性を高めるため、その機序の解明を行う必要があると考えた。

前述のとおり、体外フォトフェレーシスが心臓移植モデルにおいて拒絶反応を抑制したという報告はすでになされている (Blood. 2003)。しかしながら、皮膚、脂肪、筋膜などを含んだ複合組織移植は形成外科の手術手技としてよく使用されているにもかかわらず、その同種間移植のモデルを用いた検討は、我々が知る限り行われていなかった。平成 22 年の研究にて我々はそのモデルを確立し、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拒絶反応が抑制されることを証明することができた。しかし、その機序はまだ不明な点が多い。体外フォトフェレーシスにより皮膚過敏反応が抑制され、その機序を調べる研究は過去に行われているが (Maeda A. *J Immunol* 2005)、ラットをモデルとして、移植後拒絶反応を抑制する機序についてはいまだ報告されていない。

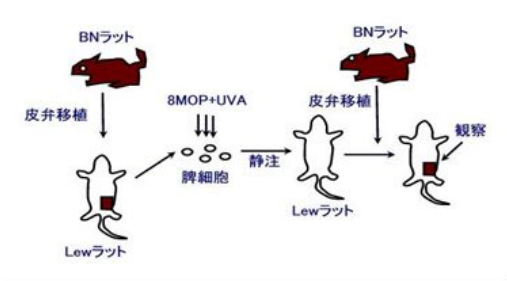
2. 研究の目的

本研究は、皮膚・脂肪・筋膜を含んだ複合組織 (鼠径皮弁) の同種間移植をラットモデルにて行い、体外フォトフェレーシスを行うことで生じる抗原特異的な免疫学的寛容獲得の機序を解明し、さらに有効な同種異系間複合組織移植における拒絶反応の有効な抑制法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

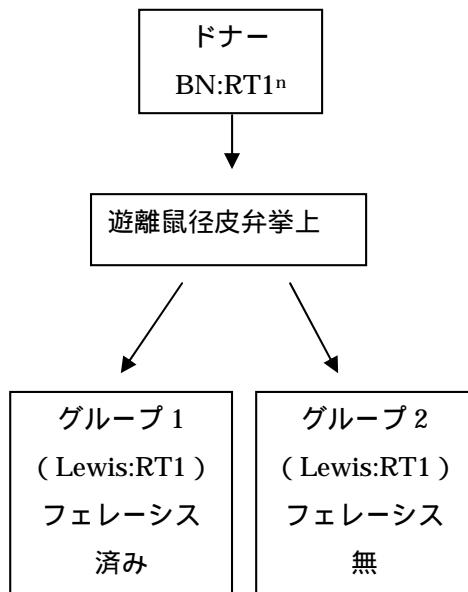
体外フォトフェレーシス

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/cm² 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)



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 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

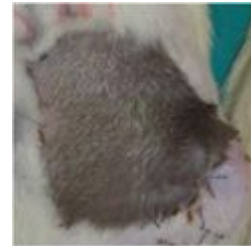
グループ2 BNラットから、フォトフェレーシスを行わなかったLEWラットへ移植

移植後は毎日皮弁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

移植後毎日移植皮弁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³H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)。

体外フォトフェレーシス処理細胞のサブタイプの役割の検討

各サブタイプの同定

CD4、CD8、CD25、CD11c、Thy1.2 を発現している細胞を、フォトフェレーシス処理細胞からフローサイトメトリーを用いて同定、計測する。

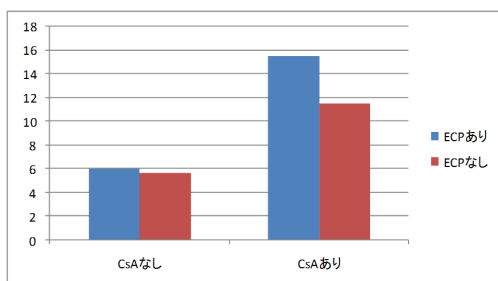
各サブタイプの役割の検討

上記サブタイプを auto MACS システムを用いて、各々を除去して体外フォトフェレーシスを行い、移植を行う。グループ1とグループ2の間での、拒絶反応抑制効果および制御性T細胞の誘導の差を観察し、どのサブタイプが拒絶反応抑制に重要な役割を果たしているかどうかを観察する。観察は24年度と同様に、肉眼的観察、病理組織学的観察、リンパ球混合試験による観察、制御性T細胞の誘導の差を観察を行い判定する。

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)

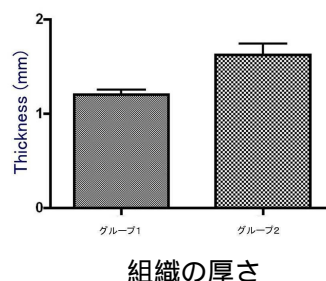


移植組織生着期間

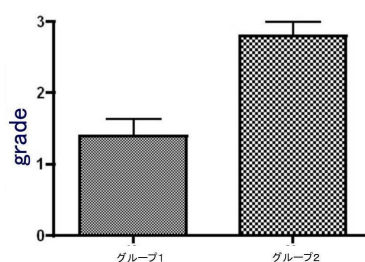
病理組織学的観察

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)



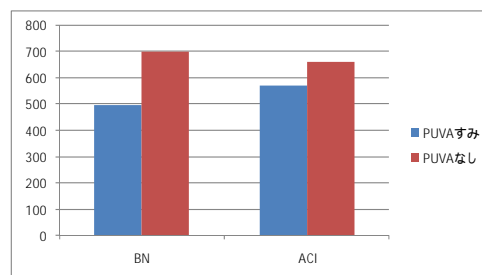
組織の厚さ



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

体外フォトフェレーシス処理細胞のサブタイプの役割の検討

各サブタイプの同定

フォトフェレーシス処理細胞をフローサイトメトリーを用いて、CD4、CD8、CD25、CD11c、Thy1.2の発現において、フォトフェレーシス処理を行わなかった群とで発現の差を比較した。しかし、これにおいては差を認めなかった。

そこで、まずアイソトープ標識をした脾細胞をレシピエントにおいて検索したところ、レシピエント脾臓に多く取り込まれていることが分かった。同脾臓細胞を検討した結果、CD11c+陽性の細胞が、体外フォトフェレーシスを行わなかった群と比較して、行った群において、有意に高値になることが分かった。現在検体数を増やしてデータ採取を継続している。

各サブタイプの役割の検討

上記サブタイプを auto MACS システムを用いて、各々を除去して体外フォトフェレーシスを行い、移植を行う予定であったが、分離の段階でうまくいかず、現在方法の調整を行っている。さらに検討を続けている段階である。

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 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 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

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・皮膚科、形成外科・講師

研究者番号：50347027

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：