

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670554

研究課題名(和文) 異種移植における拒絶反応克服の治療戦略 - 異種細胞の同種細胞への置換の試み -

研究課題名(英文) The treatment to reduce the rejection in xenotransplantation - Pretransplant replacement of donor liver grafts with recipient liver cells.

研究代表者

上本 伸二 (UEMOTO, Shinji)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：40252449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラット同種間強拒絶肝移植モデルを用いて、肝移植術前にレシピエントの骨髄細胞をドナーに移植することにより、拒絶が軽減するかどうか検討した。肝移植術前に骨髄細胞移植を行うことで肝移植術後の拒絶反応が軽減された。肝グラフト内に移植骨髄由来の細胞の生着を認め、それらはKupffer細胞に分化していた。ドナーに対するレシピエント由来の骨髄移植によるKupffer細胞置換は肝移植後の拒絶抑制に有用な治療となる可能性がある。今後、異種移植モデルで検討を行っていく。臨床でのブタ/ヒト異種移植を想定し、ハムスター/ラット間の異種肝移植モデルの手技を確立した。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether preoperative transplant of recipient-derived bone marrow cells (BMCs) to the donor attenuated the rejection after liver transplantation in the rat acute rejection model. Rats in the BMC group experienced prolonged survival. Serological and histopathological analyses revealed that the rejection of the liver graft was attenuated in the BMC group. X-gal staining and immunohistostaining of the liver graft revealed that transplanted BMCs were engrafted in the sinusoidal space and differentiated into Kupffer cells. Preoperative transplantation of recipient BMCs to LT donors replaced donor Kupffer cells and attenuated post-LT rejection, indicating that this strategy may increase the success of LT. We are planning further investigations with xenotransplantation models. We established the hamster/rat liver xenotransplantation model, which is similar to pig/human xenotransplantation.

研究分野：肝移植

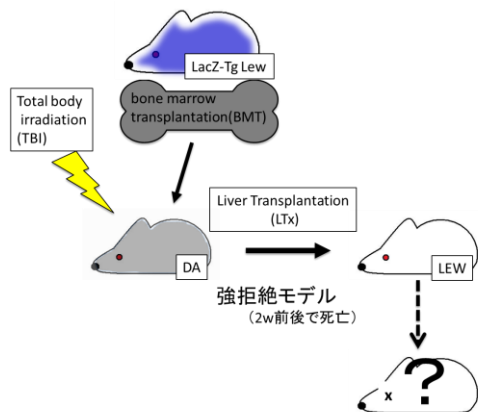
キーワード：肝移植 異種移植 骨髄細胞移植 Kupffer細胞

1. 研究開始当初の背景

肝移植は肝不全に対する有効な治療法であるが、ドナー不足が深刻な問題である。移植臓器の不足の問題を解決するべく、様々な取り組みや研究がなされているが、その中で我々は異種動物の臓器を利用する異種移植に着目した。異種移植はドナーソースの観点から非常に有望な治療であり、大きな期待が寄せられている。しかし、現時点では異種に対する強い拒絶反応等が問題となり臨床応用に至っていない。我々は異種の細胞を同種由来細胞によって置換する事で、この問題を解決できないかと考えた。また、肝再生において骨髄由来細胞が関与するとの報告がある事から、肝移植術前のドナーに対して骨髄移植を施行する事で細胞置換および拒絶の軽減が得られないか検討した。

2. 研究の目的

肝移植ドナーに対して術前にレシピエント由来の骨髄細胞を移植する事で、肝構成細胞をレシピエント由来の細胞に置換し、肝移植術後の拒絶反応を軽減できないかを検討した。

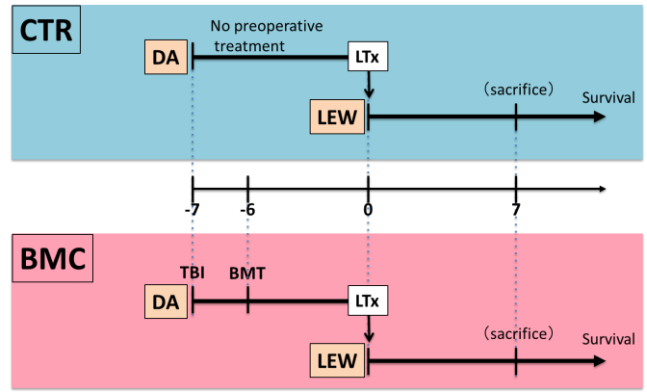


3. 研究の方法

異種移植の前段階として、ラットを使用した同種異系統間の強拒絶肝移植モデル (DA to LEW) を用いた。

肝移植後に骨髄移植ドナー由来の細胞が認識できるよう、骨髄移植のドナーには LacZ トランスジェニック LEW ラットを用いた。全身放射線照射 (TBI) と骨髄細胞移植 (BMT) による術前処置を行った群を骨髄細胞移植群 (BMC 群) とし、骨髄細胞移植から肝移植までの期間は 1 週間とした。術前処置を行わずに肝移植のみを施行した群をコントロール群 (CTR 群) とした。

評価項目：肝移植術後の生存期間、移植後 7 日目の血清および肝組織を評価した。



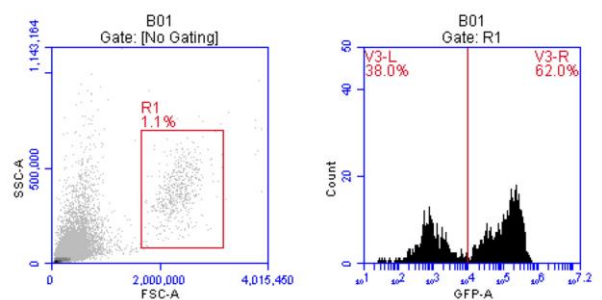
さらに、上記の同種異系統間での実験結果をふまえ、異種動物間での検討を進めた。

4. 研究成果

(1) 骨髄細胞の生着評価

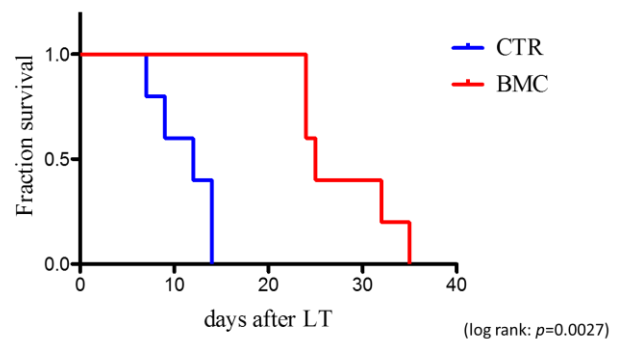
骨髄移植のドナーに GFP トランスジェニック LEW ラット、レシピエントに DA ラットを用いた。骨髄移植後 7 日目に DA ラットの血液を採取し、フローサイトメトリーで移植骨髄由来細胞の生着を評価した。末梢血液中に GFP 陽性の細胞を確認でき、移植骨髄が生着していることを確認できた。

TBI and BMC transplantation



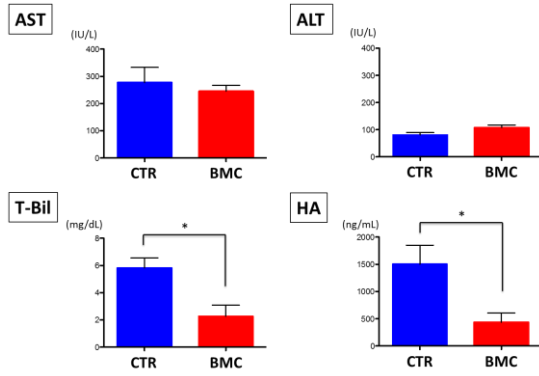
(2) 生存期間

CTR 群と比較して BMC 群で生存期間の延長を認めた ($p=0.0027$)。



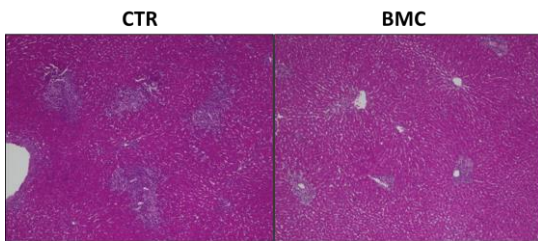
(3) 血液検査 (術後 7 日目)

総ビリルビン値と、内皮細胞障害の指標として測定したヒアルロン酸 (HA) の値が CTR 群と比較して有意に BMC 群で低値を示した。AST/ALT については両群間で有意な差を認めなかった。

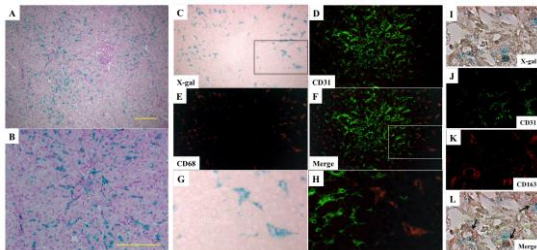


* : P < 0.05

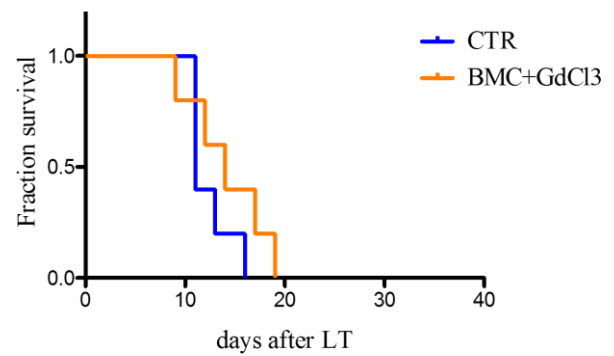
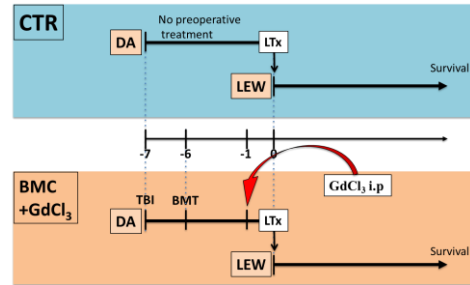
(4) 術後 7 日目の肝組織の HE 染色ではコントロール群に比較して BMC 群で肝組織の障害が軽減していた。



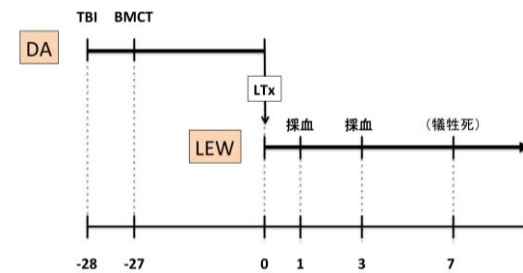
(5) 移植した骨髄細胞の肝臓内での分布を評価する為に肝組織の Xgal 染色を行ったところ、移植骨髄由来の細胞は肝組織内で類洞に分布していた。(下図 A, B) 移植した骨髄細胞が肝組織内でどのような細胞に分化しているのかを評価する為に免疫染色を行った。Xgal 陽性の移植骨髄由来の細胞は CD31 陽性細胞とは一致せず、CD68 (下図 C-H)、CD163 (下図 I-L) 陽性細胞と一致する事が分かり、この結果から骨髄由来細胞が Kupffer 細胞へと分化していると考えた。



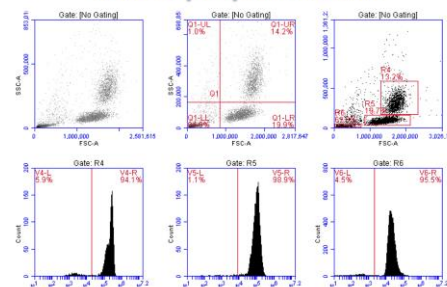
(6) Kupffer 細胞の機能を抑制する為に骨髄細胞を移植したラットに対して肝移植前日に GdCl₃ を投与し (BMC+GdCl₃ 群)、CTR 群と術後の生存を比較した。BMC+GdCl₃ 群では、CTR 群と比較して生存期間の延長を認めなかった。



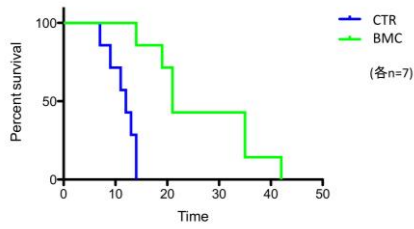
(7) 骨髄移植から肝移植までの期間を 1 週間から 4 週間に延長し、同様の実験を行った。骨髄移植のドナーに GFP トランスジェニック LEW ラットを用いた。骨髄移植から 4 週間後 (肝移植前) の DA ラットから採取した末梢血のフローサイトメトリーでは移植骨髄の比率がさらに増加していた。生存期間の延長が得られたが、その程度は 1 週間に設定した時と同程度であった。



FCM of peripheral blood



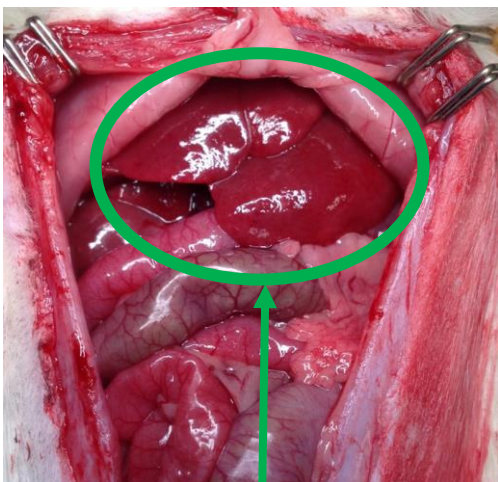
Survival after LTx-3



(8) 同種強拒絶モデルでの結果を踏まえて、異種モデルでの研究を開始した。臨床での応用を想定する場合、豚のような激烈な拒絶反応が生じる discordant からの移植を想定しなければならないが、concordant からの拒絶反応ですら同種の拒絶とは比較にならないほど強いため、開始にあたっての異種動物の組み合わせは concordant とした。また遺伝子改変動物の汎用性を考え、当初はラット/マウス間での異種移植モデルを用いて研究を予定していたが、この組み合わせでは動物サイズの不マッチが大きく、手技的な安定を得ることが困難であった。そこで異種移植モデルをマウス/ラットの組み合わせからラット/ハムスターの組み合わせに変更することとした。

まず、同所性肝移植を試みた。

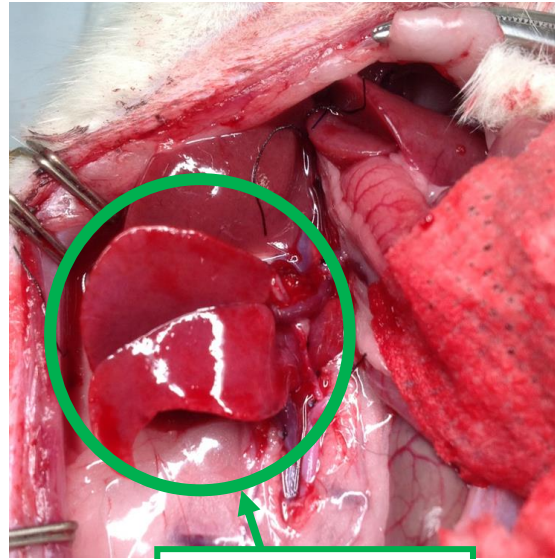
ハムスターからラット (LEW) に同所性に全肝移植を行った。



ハムスターの全肝

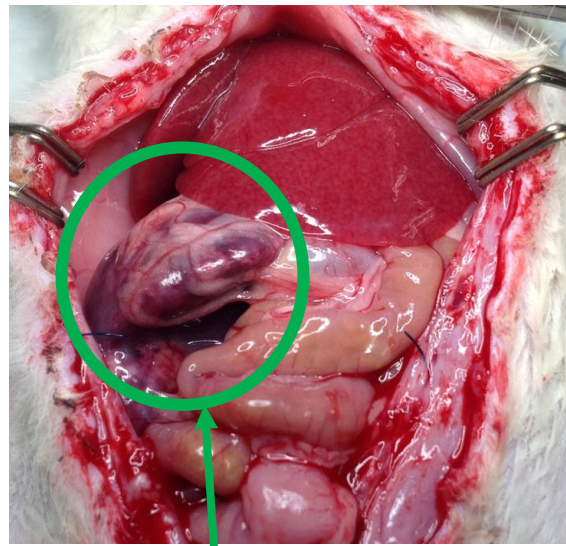
結果は、拒絶反応よりむしろ肝不全により肝移植術後の成績が安定しなかった。

この結果をふまえて、部分肝異所性移植モデルに変更した。これにより、1週間以上の生存を安定して得られるようになった。



ハムスターの部分肝

現時点では、拒絶反応のコントロールが不十分であるため、プロトコルの変更、重症免疫不全ラットの使用を検討し、実行している状況である。



ハムスターの部分肝移植後1週間
拒絶反応が強い

研究成果のまとめ

・肝移植ドナーに対して術前にレシピエントと同系統の骨髄細胞を移植する事で、肝移植術後の拒絶が軽減し、生存期間が延長した。
・肝グラフト内に移植骨髄由来の細胞の生着を認めた。内皮細胞が置換されていることを期待したが、内皮細胞は置換されておらず、Kupffer 細胞が置換されていた。
・塩化ガドリニウムの投与によって Kupffer 細胞の機能を抑制すると生存期間の延長効果が消失した。この事から移植骨髄由来の Kupffer 細胞が拒絶軽減に働いたと考えられる。
・Kupffer 細胞の置換による拒絶反応軽減は拒絶反応克服の一助となる可能性がある。
・今後はハムスター/ラット肝移植モデルなどを用いて、異種動物間での移植での本研究の検討を進める。

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 Endo K, Hori T, Jobara K, Hata T, Tsuruyama T, Uemoto S.
Pretransplant replacement of donor liver grafts with recipient Kupffer cells attenuates liver graft rejection in rats. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2015; 30: 944-951. (査読あり)

② Endo K, Iida T, Yagi S, Yoshizawa A, Fujimoto Y, Ogawa K, Ogura Y, Mori A, Kaido T, Uemoto S.
Impact of preoperative uncontrollable hepatic hydrothorax and massive ascites in adult liver transplantation
Surgery Today 2014; 44: 2293-2299. (査読あり)

[学会発表] (計 12 件)

① 遠藤耕介、堀智英、城原幹太、畑俊行、上本伸二
Preoperative bone marrow cell transplantation to the donor reduced the rejection after the liver transplantation in the rat acute rejection model. *Digestive Disease Week* 2013. 2013/05/18-05/21 Orland, United States.

② 遠藤耕介、堀智英、城原幹太、畑俊行、上本伸二
ドナーに対する肝移植術前骨髄移植による

肝構成細胞の置換と拒絶軽減の可能性についての検討

第 25 回日本肝胆膵外科学会総会
2013/6/12-6/14 栃木県宇都宮市

③ 遠藤耕介、堀智英、城原幹太、畑俊行、鶴山竜昭、上本伸二
Impact of recursive engraftment of host bone-marrow cells into allogeneic liver grafts on subsequent rat liver transplantation characterized by strong rejection.
The 13th congress of the Asian society of transplantation.
2013/9/3-9/6 京都府京都市

④ 遠藤耕介、堀智英、城原幹太、畑俊行、鶴山竜昭、上本伸二
肝移植ドナーに対するレシピエント由来骨髄細胞移植による肝グラフト細胞置換および拒絶軽減の試み
日本外科学会学術集会
2014/4/3 京都府京都市

⑤ 奥村晋也、藤本康弘、小川晃平、政野裕紀、上本伸二 他
右葉グラフトを用いた生体部分肝移植における肝静脈再建
日本外科学会学術集会
2014/4/3 京都府京都市

⑥ 政野裕紀・上本伸二 他
ラット 15%過小グラフト肝移植、95%肝切除における門脈下大静脈シャントによる門脈圧制御の肝再生促進効果 (Hemodynamics and regeneration of the liver: modification of portal venous pressure by portocaval shunt for liver regeneration in rat liver transplantation with very small graft (15% of whole liver))
2015/6/11 日本肝胆膵外科学会総会 東京都港区

⑦ 八木真太郎・上本伸二 他
肝移植と門脈圧亢進症 肝移植手術における門脈圧制御の重要性
日本門脈圧亢進症学会
2015/9/10 神奈川県横浜市

⑧ 濱口雄平・上本伸二 他
生体肝移植における術前サルコペニアの意義
日本移植学会総会
2015/10/2 熊本県熊本市

⑨ 奥村晋也・上本伸二 他
当院脳死肝移植における予後因子の検討
日本移植学会総会
2015/10/2 熊本県熊本市

⑩八木眞太郎・上本伸二 他
血液型不適合移植(肝、腎)の現況と課題への
対応 Rituximab を用いた血液型不適合肝移
植成績

日本移植学会総会
2015/10/3 熊本県熊本市

⑪濱口雄平・上本伸二 他
当院におけるドミノ肝移植の現況と展望

日本移植学会総会
2015/10/3 熊本県熊本市

⑫海道利実・上本伸二 他
生体肝移植ドナーの安全性向上に向けた取
り組み

日本移植学会総会
2015/10/3 熊本県熊本市

〔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：
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

上本 伸二 (UEMOTO Shinji)

京都大学 医学研究科 教授

研究者番号：40252449

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：