慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	リンパ球ホーミングをターゲットとしたサル小腸移植免疫抑制プロトコールの最適化
Sub Title	Optimal immunosuppressive protocol targeting lymphocyte homing for intestinal transplant utilizing non-human primates
Author	星野, 健(Hoshino, Ken) 山田, 洋平(Yamada, Yōhei) 木須, 伊織(Kisu, Iori) 石垣, 宏仁(Ishigaki, Hirohito)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	MHCミスマッチのカニクイザルを用いた小腸移植モデルを確立し、そのグラフト機能および免疫機能を解析した。従来のタクロリムスとステロイドによる平均Rejection Free Survivalは23.3日であった。拒絶反応によるアロ反応性をELISPOTと抗ドナー抗体の出現で観察した。拒絶片におけるMadcam-1の発現やα4β7integrin陽性のリンパ球浸潤を免疫染色にて確認した。さらには、ドナー細胞の存続と拒絶反応の間の相関があることが示唆された。今後、新規免疫抑制剤Anti-α4β7integrinの効果を判定するモデルが確立された。 In this study, nonhuman primate-model of small bowel transplantation has been established and immunological monitoring for CD4 helper T cells in peripheral blood and immunohistochemistry for α4β7integrin positive T lymphocytes in the allografts were performed. Average rejection-free survival of small bowel grafts with conventional immunosuppression (consisting of Tacrolimus and steroids) was 23.3 days. Increased anti-donor response was observed in mixed lymphocyte reaction tests, which were measured by ELISPOT assay. In addition, the duration and the extent of peripheral chimerism, which was measured by the percentage of donor lymphocytes among total lymphocytes, was correlated with the rejection-free survival days after transplantation.
Notes	研究種目：基盤研究 (B) (一般) 研究期間：2016～2018 課題番号：16H05490 研究分野：臓器移植
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16H05490seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月　 ２ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｈ０５４９０

研究課題名（和文）リンパ球ホーミングをターゲットとしたサル小腸移植免疫抑制プロトコールの最適化

研究課題名（英文）Optimal immunosuppressive protocol targeting lymphocyte homing for intestinal transplant utilizing non-human primates

研究代表者
星野　健（Ken, Hoshino）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任准教授

研究者番号：７０１９０１９７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,400,000円

研究成果の概要（和文）：MHCミスマッチのカニクイザルを用いた小腸移植モデルを確立し、そのグラフト機能および免疫機能を解析した。従来のタクロリムスとステロイドによる平均Rejection Free Survivalは23.3日であった。拒絶反応によるアロ反応性をELISPOTと抗ドナー抗体の出現で観察した。拒絶片におけるMadcam-1の発現やα４β7integrin陽性のリンパ球浸潤を免疫染色にて確認した。さらには、ドナー細胞の存続と拒絶反応の間の相関があることが示唆された。今後、新規免疫抑制剤Anti-α４β7integrinの効果を判定するモデルが確立された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
小腸移植は2018年に保険承認され、腸管不全に対する根治的治療である小腸移植が普及すると考えられる。小腸移植の最大の障壁はその中長期予後であり、予後改善のための新規免疫抑制剤の効果を検証する必要がある。カニクイザルを使用した臓器移植モデルは多く報告されているが、小腸移植モデルの報告はほとんどなく、本研究にて確立された異所性小腸移植モデルによって、臨床応用可能な免疫抑制剤の効果をin vivoで評価可能となった。新規免疫抑制剤と従来の免疫抑制剤の指摘な組み合わせの考案や拒絶反応早期発見研究のプラットフォーム、さらにはヒト臨床に近似した腸管でのアロ免疫応答の解明に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, nonhuman primate-model of small bowel transplantation has been established and immunological monitoring for CD4 helper T cells in peripheral blood and immunohistochemistry for α4β7integrin positive T lymphocytes in the allografts were performed. Average rejection-free survival of small bowel grafts with conventional immunosuppression (consisting of Tacrolimus and steroids) was 23.3 days. Increased anti-donor response was observed in mixed lymphocyte reaction tests, which were measured by ELISPOT assay. In addition, the duration and the extent of peripheral chimerism, which was measured by the percentage of donor lymphocytes among total lymphocytes, was correlated with the rejection-free survival days after transplantation.

研究分野：臓器移植

キーワード：小腸移植　拒絶反応　免疫抑制剤　カニクイザル

１．研究開始当初の背景

難病である腸管不全に対する唯一の根治的治療である腸管移植が保険承認を控え、他の臓器移植と比して高率に発症する急性拒絶反応の予防と中長期における安定したグラフト機能の維持が喫緊の課題であった。全世界的にもっとも高頻度に用いられている免疫抑制プロトコールは thymoglobulin による induction therapy に加えて、タクロリムスとステロイドによる維持療法であるが、このプロトコールによっても長期成績が不良（５年のグラフト生存率は 50-60%程度）であり、更に 90 日以内の急性拒絶反応の発生率が 40−60%以上と他の臓器移植とは比較にならないほど高頻度である。 粘膜上皮の剥奪をきたす重度の急性拒絶反応のみならず、晩期に発症する原因不明の潰瘍形成や狭窄は移植腸管における慢性拒絶反応の一型と考えられ、エビデンスのある効果的治療法が存在しない。

２．研究の目的

本研究の目的は、慶應義塾大学小児外科が確立したカニクイザルにおける小腸移植モデルを用いて適切な導入維持療法としてのホーミングをブロックする Anti-α４β７の効果と安全性を明らかにすることである。カニクイザルを用いた腸管移植の報告は世界的にもほとんど存在せず、MHC の統御されたカニクイザルの供給・飼育・管理体制が整備された滋賀医科大学動物生命科学センターで、臨床応用可能な免疫抑制剤の効果を免疫モニタリングとともに解析する。また、ドナーとレシピエント細胞を区別できる MHC 抗体を利用して、血液及び腸管リンパ組織での再構築及びキメリズムを解析し、特にケモカインレセプターに着目した CD4T 細胞の詳細な解析を行い、腸管拒絶反応との関連性を明らかにする。

３．研究の方法

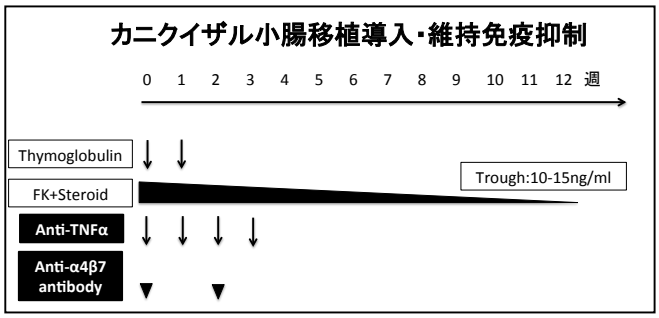
手術施設である滋賀医科大学動物生命科学センターは、国の管轄施設であり、実験計画書や倫理委員会の審査は厳重に行われ、国内トップレベルの設備を完備した動物センターである。カニクイザルの供給は（株）イナリサーチの協力を得て、飼育・管理は全て滋賀動物生命科学センターで行われた。研究統括は慶應義塾大学小児外科准教授：星野健が担当し、分担者として同科助教：山田洋平が実務を担当した。カニクイザルの MHC タイピングは東海大学基礎医学系分子生命科学講座に依頼して行われた。子宮移植グループリーダーである木須伊織（慶應義塾大学産婦人科特任助教）と慶應義塾大学小児外科の大学院生４名および実験助手１名が動物の管理や手術をサポートし、免疫機能解析は滋賀医科大学病理学教室生体防御の石垣宏仁先生が担当した。

（１）新規免疫抑制剤の効果判定に対する対照群の設定

新規免疫抑制剤の効果判定のための、対照群として２つの免疫抑制剤治療群を設定した。

Group A: FK (target トラフレベル 10-15)+Steroid+MMF

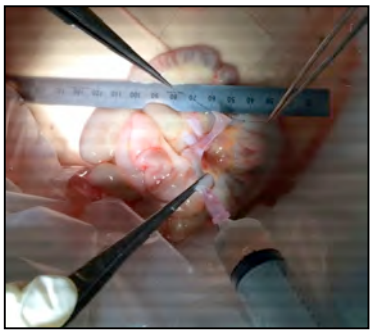
Group B: FK(target トラフレベル 10-15)+Steroid



<手術方法>

① 術式は移植腸管両側断端をストーマとして体外へ誘導し、サルの経口摂取を妨げないような術式を選択した。＜右図１＞

② 拒絶反応は内視鏡的にモニターし、生検にて診断した。（移植直後１ヶ月間は週１回、以後は２週間に１回の間隔とする）拒絶反応は軽度の場合でも拒絶としてカウントするが、ステロイドパルスにて治療を行った。ステロイドにてコントロールできない拒絶反応が見られた時点で安楽死として移植腸管を摘出し、解析を行った。



＜病理組織学的評価＞
それぞれの生検組織を HE 染色にてクリプト内での Apoptosis の定量化と組織でのα４β7integrin 陽性のリンパ球の免疫染色とリガンドである Madcam-１の染色を行った。

（２） 免疫モニタリング
アロ反応性モニタリングの手法として、interleukin-2 および interferon γの ELISPOT を使用した自己に対するドナー細胞への相対的反応として Stimulation Index を算出した。

（３）ドナーキメリズム存在の定量化とリンパ球の解析
ドナー特異的抗 MHC 抗体を使用したキメリズムをフローサイトメトリーを用いて解析した。レシピエントリンパ球の解析は、CD3・CD4・CD8・CD95・CD28・CXCR3・CCR6・CXCR5・CCR4・FOXP３・CD45RA・HLA-DR・CD16 を使用した。

４．研究成果

（１）対照群の Rejection Free Survival
新規免疫抑制剤である anti-a4b7 抗体の主評価項目は Rejection Free Survival であるため、まずは従来の免疫抑制剤を使用しての拒絶反応の評価が確実に行えるかどうかの判定を行った。図１、２に示すごとく、術式の安定化および内視鏡所見、さらには生検採取手技も問題なく施行されることを確認した。

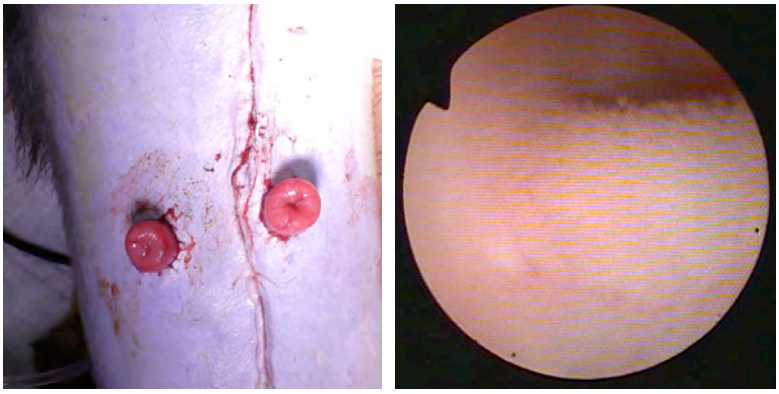


図 2a： 移植直後のストマ外観写真（左）と内視鏡所見（右）

図 2b： 拒絶反応時のストマ外観写真（左）と内視鏡所見（右）

＜病理組織学的評価＞
拒絶反応の診断および Rejection Free Survival の組織学的診断は、下図に示す絨毛 crypt の apotosis の数（図２c）および外観所見・内視鏡所見・抗ドナー抗体の有無で診断した。

３剤併用の Group A では 1 例が PTLD（移植後リンパ増殖疾患）を発症し、比較的長期にグラフトが維持されたため、２剤併用の Group B を対照群とした。平均 Rejection Free Survival は 23.3±8.1 日であった。（図２d）

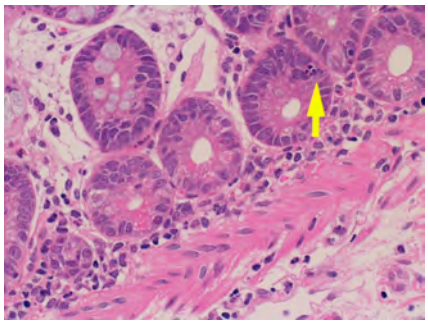


図２c：Crypt の apoptotic body

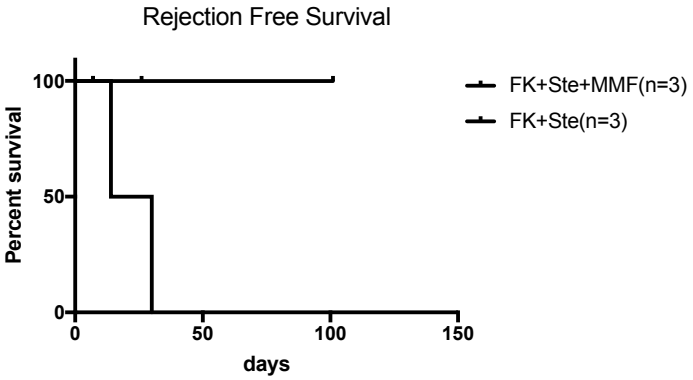
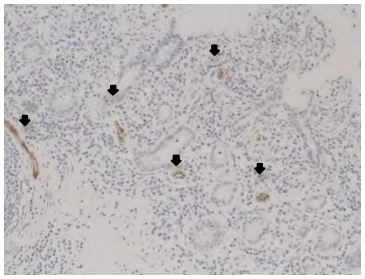
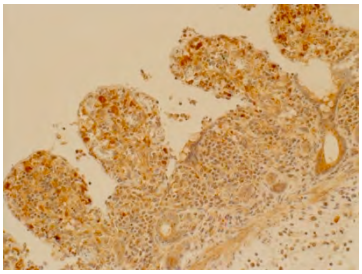


図２d：Kaplan Meier 曲線





左図３a.b に示すように、移植された小腸の炎症粘膜内にα４β7integrinのリガンドである Madcam-1 の発現をみとめた。また、その領域でのα４β7integrin陽性のリンパ球の存在が確認された。

図３a: 炎症領域での MadCAM-1 発現

図３b：炎症領域でのβ7 陽性リンパ球浸潤

（２） 移植前後での Mixed lymphocyte Reaction の結果

図４は Interleukin-2 の ELISPOT によるアロ反応性の免疫解析の結果である。拒絶群である Group B の代表的な結果と、非拒絶群である Group A の結果を示す。拒絶群において、著明なアロ反応性の増加が認められており、本手法が拒絶の免疫モニタリングにおいて有用であることを示唆している。また、拒絶群すべてに抗ドナー抗体が検出された。

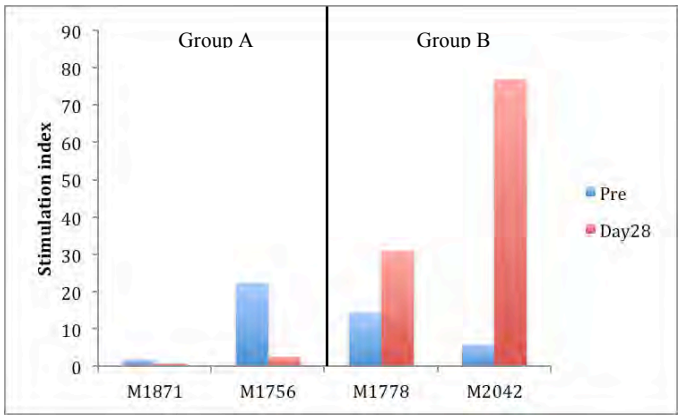
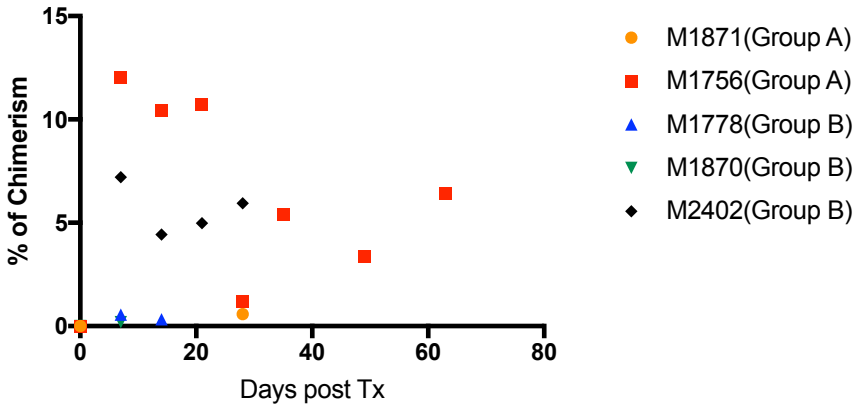


図４：個体 M1871・M1756 は Group A。個体 M1778・M2042 は Group B に属する。青いバーは移植前のアロ反応性を示し、赤いバーは移植後の反応性を閉めす。

（３） ドナーキメリズムの評価

抗ドナー特異的 MHC 抗体によるリンパ球内でのドナーキメリズムを定量化した。拒絶反応が早期に認められた Group B では早期にキメリズムが消失する傾向が見られた一方で、免疫抑制が強化された Group A ではキメリズムが長く残存する傾向が見られた。



＜結果のまとめ＞
MHC ミスマッチのカニクイザルを用いた小腸移植モデルを確立し、そのグラフト機能および免疫機能を解析した。従来のタクロリムスとステロイドによる平均 Rejection Free Survival は 23.3 日であった。拒絶反応によるアロ反応性を ELISPOT と抗ドナー抗体の出現で観察した。さらには、ドナー細胞の存続と拒絶反応の間の相関があることが示唆された。本研究において、新規免疫抑制剤 Anti-α4β7integrin の効果を判定するモデルが確立された。

５．主な発表論文等
〔学会発表〕（計　12　件）

2018 年度

１、　第 31 回　小腸移植研究会　2019 年
パネルディスカッション–小腸移植における当施設の課題
山田洋平、星野健、黒田　達夫　ほか
２、　第 31 回 小腸移植研究会　2019 年
当院で施行された生体小腸移植 4 例の経過 – 免疫抑制管理に難渋している 2 例目を中心に –
森 禎三郎、山田 洋平、星野 健、黒田 達夫　ほか
３、　第 55 回 小児外科学会学術集会 2018 年
小腸移植後の至適免疫抑制プロトコル作成に向けたカニクイザル小腸移植モデルの確立
森 禎三郎、山田 洋平、星野 健、黒田 達夫 ほか
４、　第 116 回 東京小児外科研究会　2018 年
腸管蠕動不全症における腸管吻合
森 禎三郎、山田 洋平、黒田 達夫 ほか

2017 年度
５、　第 30 回 小腸移植研究会（**研究奨励賞受賞演題**）2018 年
小腸移植至適免疫抑制プロトコル作成に向けたカニクイザル小腸移植モデルの確立
–維持療法としてのミコフェノール酸モフェチルの効果-
森 禎三郎、星野 健、山田 洋平、黒田 達夫 ほか
６、　第 30 回 小腸移植研究会　2018 年
ヒルシュスプルング病類縁疾患に対する生体小腸移植後の難治性潰瘍と心理的問題点に対して管理に難渋している一例
森 禎三郎、山田 洋平、加藤 友朗、黒田 達夫 ほか
７、　第 30 回　小腸移植研究会　2018 年
パネルディスカッション-ヒルシュスプルング病類縁疾患における多臓器移植の位置付け
山田　洋平、星野　健、黒田　達夫　ほか
８、　第 53 回 日本移植学会 個別臓器ワークショップ 6「ヒルシュスプルング病類縁疾患の移植適応と術後管理」　2017 年
小腸移植後の至適免疫抑制プロトコル作成に向けて –非ヒト霊長類を用いた臨床的小腸移植モデルの確立-
森 禎三郎、星野 健、山田 洋平、黒田 達夫 ほか
９、　第 54 回 日本小児外科学会学術集会　2017 年
小児肝移植後におけるグラフト線維化・肝硬度の経時的評価 -3 年間での検討-
森 禎三郎、富田 紘史、黒田 達夫 ほか

１０、　第 44 回 日本小児栄養消化器肝臓学会　2017 年
小腸移植後の至適免疫抑制プロトコル作成に向けて –非ヒト霊長類を用いた臨床的小腸移植モデルの確立-
森 禎三郎、星野 健、山田 洋平、黒田 達夫 ほか

2016 年度
１１、　第 29 回 小腸移植研究会　2016 年
生体小腸移植後難治性潰瘍に対する抗ヒト TNF α モノクローナル抗体を組み合わせた至適免疫抑制
森 禎三郎、星野 健、山田 洋平、黒田 達夫 ほか
１２、　第 43 回 日本小児内視鏡研究会　2016 年
生体部分小腸移植後の吻合部狭窄および難治性潰瘍に対して抗ヒト TNF α モノクローナル抗体を用いて治療を行った一例
森 禎三郎、星野 健、山田 洋平、黒田 達夫 ほか

〔図書〕（計　1　件）
1. 山田　洋平・星野　健
メディカルレビュー社、臓器移植抗体陽性診療ガイドライン 2018 総ページ数 120: p23-25

〔その他〕
ホームページ等：慶應義塾大学臓器移植センター内

http://www.hosp.keio.ac.jp/annai/shinryo/organ-transplantation-center/#doctorIntroduce

第 31 回　小腸移植研究会開催　2019 年 3 月 9 日
https://site2.convention.co.jp/jssbt2019/

６．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：山田　洋平

ローマ字氏名：YAMADA, Yohei

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：特任助教
研究者番号（8 桁）：60383816

(2)研究協力者
研究協力者氏名：木須　伊織
ローマ字氏名：KISU, Iori
研究協力者氏名：石垣　宏仁
ローマ字氏名：ISHIGAKI, Hirohito

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。