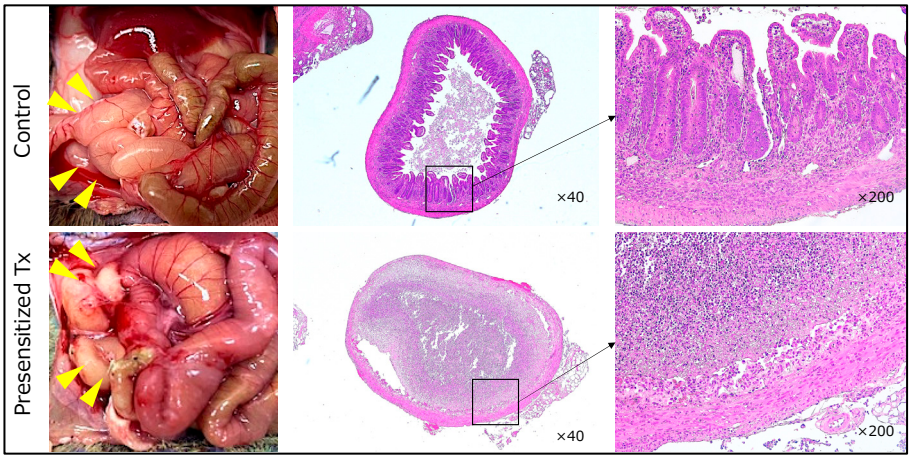
190　小腸移植における抗体関連型拒絶反応のメカニズム解明	松島　肇

【目的】小腸移植において抗体関連型拒絶はグラフト喪失の主な原因の一つであるが、小腸移植後抗体関連型拒絶のメカニズムおよび診断根拠となり得る病理組織像は未だ確立されていない。しかし小腸移植後ドナー特異的抗体（DSA）と慢性拒絶の発生率やグラフト生着率低下との関連も報告されており、抗体関連拒絶反応のメカニズムやその特徴的病理像を解明することは今後の小腸移植後成績の向上に大きく貢献できるものと考える。近年、マウス腎臓移植モデルにおいて、術前にあらかじめドナーマウスの皮膚の一部をレシピエントマウスの背部に移植し感作させることでレシピエント体内に preformed DSA を作製し抗体関連型拒絶反応を再現することが可能であると報告された。本研究では、同様の手法で preformed DSA を作製したマウスを用いて小腸移植を行い抗体関連型拒絶反応誘導し、小腸移植後の抗体　関連型拒絶反応のメカニズムの解明することを目的とした。

【方法】MHC ハプロタイプの異なる 25〜30 g のマウス間で同種異系間移植を行った。B6 マウスの皮膚 8〜10×10 mm^2 を C3H マウスの背部に移植した。2 週間後、C3H マウスの末梢血を採取し、B6 の splenocytes（0.5×10^6）と室温で反応させ抗体価（IgG）をフローサイトメトリーにて測定した。B6 マウスの小腸 10 cm 長採取し、皮膚移植後 2 週間目の C3H マウスに異所性小腸移植を行った。移植後 2 日目、4 日目、7 日目でグラフト摘出し、急性拒絶反応の程度を、皮膚移植を行っていないマウスと比較評価した。

【結果】B6 マウスの皮膚を C3H に移植し 2 週間経過すると、皮膚移植グラフトは拒絶された。その時点で C3H マウスは B6 マウスに対する DSA を保有していることをフローサイトメトリーで IgG 抗体価の上昇で確認した。皮膚移植により前感作させ preformed DSA を有した C3H マウスに B6 マウスの小腸を移植すると、preformed DSA を有さないコントロールマウスと比較して移植後 2 日目では急性拒絶反応に差は認められなかったが、4 日目、7 日目（下図参照）では有意に拒絶反応が促進され、抗体関連型拒絶が誘発されていることが示唆できた。これによりマウス小腸移植抗体関連型拒絶モデルの作製に成功した。現在、グラフトの詳細な病理学的所見の評価や免疫染色で補体 C3、C4d、C5 などの血管壁への沈着や CD8 陽性細胞の粘膜固有層への浸潤程度を比較しており、これにより小腸移植における抗体関連型拒絶の診断根拠となり得る特徴的病理所見像の提唱が可能となることが期待される。また、それらの結果に基づき、有効な可能性のある治療（抗補体抗体など）を用いた治療実験を行うことで新規治療法の確立を目指す。

移植後 7 日目での急性拒絶反応



190. 小腸移植における抗体関連型拒絶反応のメカニズム解明

松島　肇

長崎大学病院 移植・消化器外科

Key words：マウス，小腸移植，抗体関連型拒絶反応，ドナー特異的抗体

緒　言

小腸移植は経静脈的栄養継続が困難な短腸症候群や腸管機能不全患者に対する救命治療である。本邦では2018 年 4 月に小腸移植が保険収載され今後移植数の増加が期待されている。その一方で小腸移植は他の臓器移植と比べ高率に拒絶反応を引き起こすため小腸グラフトの 5 年生着率は 50～60%程度にとどまる。小腸移植後の拒絶メカニズムは未だ不明な点が多く、今後さらなる治療成績改善にはより詳細な拒絶メカニズムの解明が急務である。

近年の免疫抑制療法の進歩により小腸移植後急性細胞性拒絶の多くは抑制または治療が可能となった。しかし、小腸移植においても最もグラフト喪失につながると思われる慢性拒絶に関しては現時点で有効な治療法はない。臓器移植後の慢性拒絶の多くは液性免疫を主体とした抗体関連型拒絶が大部分を占めると考えられているが、他の臓器移植と異なり、小腸移植後の抗体関連型拒絶のメカニズムおよび診断根拠となり得る病理組織像は未だ確立されていない［1］。しかし小腸移植後ドナー特異的抗体（DSA）の存在が慢性拒絶の発生率やグラフト生着率低下と関連しているとの報告もあり［2，3］、抗体関連拒絶反応のメカニズムやその特徴的病理像を解明することは今後の小腸移植後成績の向上に大きく貢献できるものと考える。また他の臓器移植において抗体関連型拒絶の発生抑制およびその治療としての抗 CD20 抗体（リツキシマブ）の有効性が示されている。抗 CD20 抗体は B リンパ球の CD20 抗原と結合することで B 細胞溶解を誘導する。それにより B 細胞から抗体産生能を有する形質細胞への分化が抑制されることで抗体産生が制御される。小腸移植においても抗体関連型拒絶の制御および治療を目的とした抗 CD20 抗体の有効性が示唆されているが、未だ十分なデータおよびエビデンスは得られていない。

移植免疫の研究領域においてマウスを用いた移植モデルは非常に有用であり、他の臓器移植領域では幅広く使用されている。一方、マウス小腸移植モデルは非常に強力な研究ツールであるにも関わらず小腸グラフトの脆弱性や高度な手術手技を要するため、限られた研究室でのみ施行されているのが現状である。自身は、米国クリーブランドクリニックの研究室でマウス小腸移植モデルの手技を習得、確立し同モデルを用いた研究を帰国後も続けている（現在論文執筆中）。さらに近年、マウス腎臓移植モデルにおいて、術前にあらかじめドナーマウスの皮膚の一部をレシピエントマウスの背部に移植し感作させることでレシピエント体内に preformed DSA を作製し抗体関連型拒絶反応を再現することが可能であると報告された［4］。そこで本研究では、自身のマウス小腸移植モデルを用いて抗体関連型拒絶反応を誘導し、小腸移植後の抗体関連型拒絶反応のメカニズムの解明とそれに対する抗 CD20 抗体をはじめとする抗体産生抑制の治療効果を検討する。

方　法

1. マウス皮膚移植および Preformed DSA の作製

B57BL/6（以下 B6）マウスの皮膚 8～10×10mm^{2}を C3H/HeNCrl（以下 C3H）マウスの背部に移植した［4］。皮膚移植後 2 週間後、C3H レシピエントマウスの末梢血を採取し血清分離し、皮膚移植を行っていない C3H マ

ウスの血清をコントロールとして B6 マウスの splenocytes と反応させ、IgG 抗体価をフローサイトメトリーにて測定し B57BL/6 マウスが DSA を保有していることを確認した。

2. マウス異所性小腸移植

吸入麻酔による全身麻酔下に B6 マウスの回腸を回腸末端より約 10 cm 長採取し、グラフトの上腸間膜動脈を 11-0Nylon で C3H レシピエントマウスの腹部大動脈に、グラフト門脈を 10-0Nylon で下大静脈に端側吻合し、グラフト口側断端をレシピエントの空腸に 8-0Nylon で端側吻合し肛門側を人工肛門とした［5，6］。この移植手技を用いて、皮膚移植後 2 週間後に小腸移植を施行した群（Preformed DSA 群）と、コントロールとして皮膚移植を行わずに皮膚移植を行った群（Wildtype）の 2 群に分けた。

3. グラフト評価

Preformed DSA 群、Wild type 群で、移植後 2、4、7 日目の移植グラフトの拒絶の程度を組織学的に比較検討した。

結　果

1. マウス皮膚移植による preformed DSA

C3H の背部に移植された B6 マウスの皮膚は移植後 10 日目から 14 日目にかけて拒絶された（図 1）。皮膚移植後 2 週間後の C3H マウスの血清中の B6 splenocytes に対する抗体価（IgG）は皮膚移植を行っていない C3H マウスの抗体価より上昇していた。

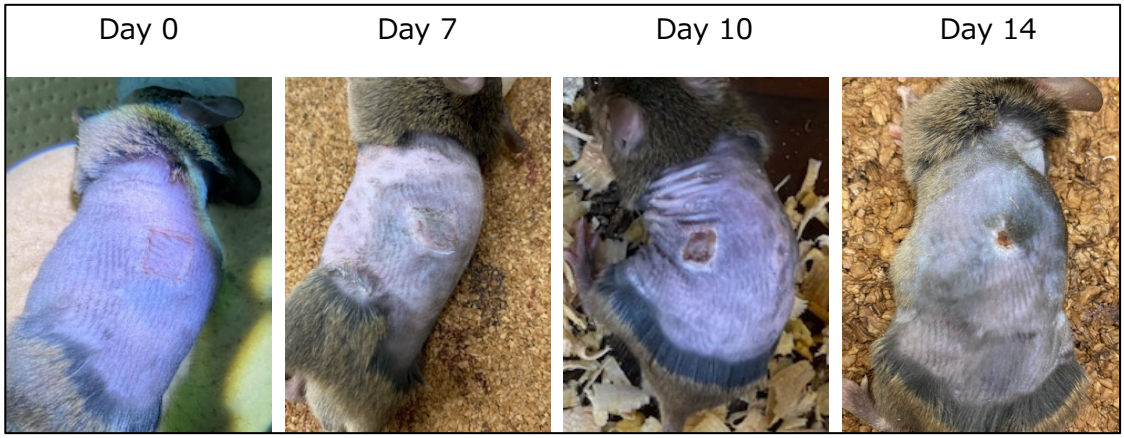


図 1. 皮膚移植（B6→C3H）後の移植グラフトの肉眼的変化
移植 10 日目には移植グラフトの退縮が始まり、14 日目には拒絶によりほぼ完全に移植グラフトが拒絶された。

2. マウス異所性小腸移植、グラフト評価

マウス異所性小腸移植の手技確立を行った。移植後 2 日目、4 日目、7 日目の各タイムポイントで移植グラフトを摘出し、4% PFA で固定し、パラフィン包埋処理を行ったのち、HE 染色でグラフトの拒絶反応の評価を行った（図 2）。グラフトの拒絶の程度の評価には、過去の文献［6～9］を参考に、グラフト粘膜固有層へのリンパ球浸潤の程度、Crypt のアポトーシス数、粘膜絨毛構造の破壊の程度をもとに 0～5 段階でグレーディングした。移植後 2 日目では、皮膚移植を行っていないコントロール（Wildtype）群（N＝3）では拒絶グレート 0～1 であった。また、皮膚移植を行った Presensitized 群でも移植後 2 日目の拒絶程度はグレード 0～1（N＝4）であった。移植後 4 日目では、コントロール（Wildtype）群（N＝5）では拒絶グレート 1～2 であったが、Presensitized 群（N＝2）ではグレード 4 と拒絶程度がより強く（図 3）、移植後 7 日目では、コントロール（Wildtype）群

（N＝1）では拒絶グレート 3 であったが、Presensitized 群（N＝1）ではグレード 5 と拒絶程度は severe であった（図 4）。この結果より、マウス小腸移植において Preformed DSA の存在は移植後早期の拒絶反応を促進することが示唆され、Presensitized 群での病理組織像は抗体関連型拒絶メカニズム解明に有用である可能性が示唆された。

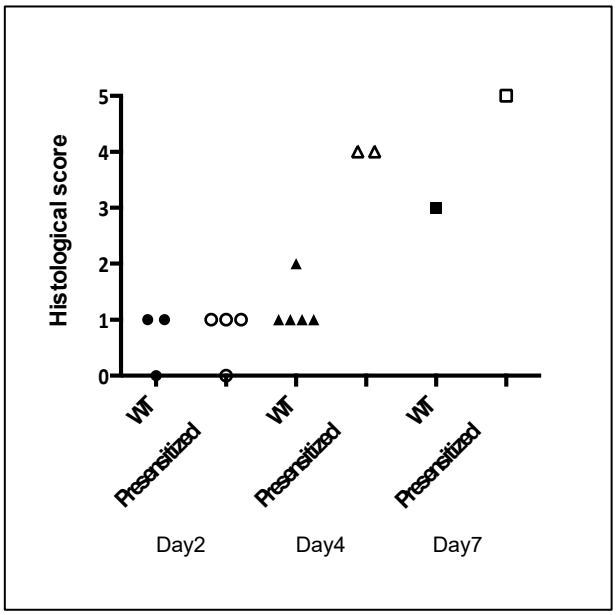


図 2. 移植後 2 日目、4 日目、7 日目の拒絶グレード
Day2 ではコントロール（Wildtype）群と Presensitized 群との間に差はみられないが、Day4 以降では、Presensitized 群でより拒絶が促進された。

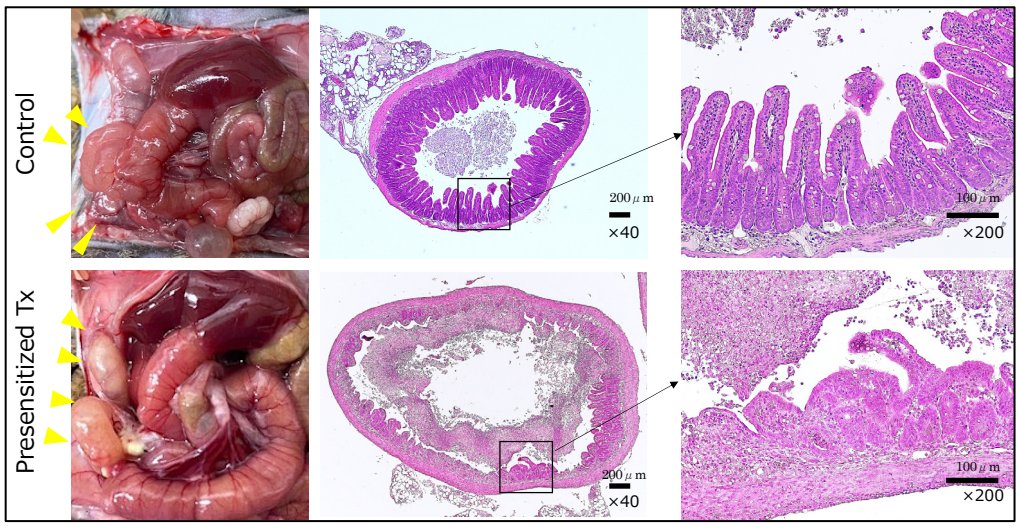


図 3. 移植後 4 日目のグラフト Gross appearance 及び HE 所見
上段（コントロール（Wildtype）群）では、グラフトの外観に異常なく、HE 染色でも絨毛構造は比較的保たれており、リンパ球の浸潤もほとんど確認できない。
下段（Presensitized 群）では、グラフトは拒絶によるダメージをきたしており、HE 染色では大部分の粘膜の脱落が生じており、粘膜固有層に強いリンパ球浸潤が認められる。

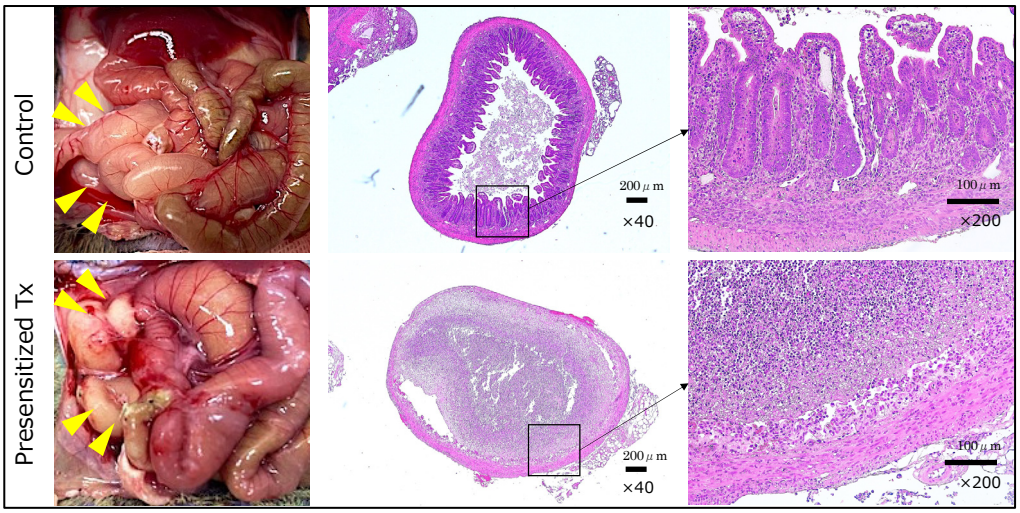


図 4. 移植後 7 日目のグラフト Gross appearance 及び HE 所見

上段（コントロール（Wildtype）群）では、HE 染色で強いリンパ球浸潤を確認でき、絨毛構造は比較的保たれている。

下段（Presensitized 群）では、びまん性の粘膜脱落、潰瘍形成が認められ、severe な拒絶の所見が認められる。

考　察

マウス小腸移植を用いて抗体関連型拒絶モデルを確立し、Preformed DSA の存在は拒絶を有意に促進させることが証明された。今後、抗体関連型拒絶に関わると思われる補体系の活性メカニズムを含め、免疫染色等の追加実験を行うことで解明する。それによって得られた結果をもとに、抗体関連型拒絶発症の予防及び治療の可能性となる治療法の確立を目指した実験を行う。

文　献

1） de Serre NP, Canioni D, Lacaille F, Talbotec C, Dion D, Brousse N, Goulet O. Evaluation of c4d deposition and circulating antibody in small bowel transplantation. Am J Transplant. 2008; 8(6):1290-6. PMID: 18444932 DOI: 10.1111/j.1600-6143.2008.02221.x.

2） Abu-Elmagd KM, Wu G, Costa G, Lunz J, Martin L, Koritsky DA, Murase N, Irish W, Zeevi A. Preformed and de novo donor specific antibodies in visceral transplantation: long-term outcome with special reference to the liver. Am J Transplant. 2012;12(11):3047-60. PMID: 22947059 DOI: 10.1111/j.1600-6143.2012.04237.x

3） Kubal C, Mangus R, Saxena R, Lobashevsky A, Higgins N, Fridell J, Tector AJ. Prospective Monitoring of Donor-specific Anti-HLA Antibodies After Intestine/Multivisceral Transplantation: Significance of De Novo Antibodies. Transplantation. 2015;99(8):e49-56. PMID: 25769071 DOI: 10.1097/TP.0000000000000614

4） Zhao D, Liao T, Li S, Zhang Y, Zheng H, Zhou J, Han F, Dong Y, Sun Q. Mouse Model Established by Early Renal Transplantation After Skin Allograft Sensitization Mimics Clinical Antibody-Mediated Rejection. Fromt Immunol. 2018;9:1356. PMID: 30022978 PMCID: PMC6039569 DOI: 10.3389/fimmu.2018.01356

5) He G, Hart J, Thistlethwaite JR Jr, Newell KA. Modified surgical model of paratopic small bowel transplantation in mice. J Surg Res. 1998 Dec;80(2):188-93. PMID: 9878312 DOI: 10.1006/jsre.1998.5434
6) Matsushima H, Morita-Nakagawa M, Datta S, Pavicic PG Jr, Hamilton TA, Abu-Elmagd K, Fujiki M, Osman M, D'Amico G, Eguchi S, Hashimoto K. Blockade or deficiency of PD-L1 expression in intestinal allograft accelerates graft tissue injury in mice. Am J Transplant. 2022 Mar;22(3):955-965. PMID: 34679256 DOI: 10.1111/ajt.16873
7) Wu T, Abu-Elmagd K, Bond G, Nalesnik MA, Randhawa P, Demetris AJ. A schema for histologic grading of small intestine allograft acute regection. Transplantation. 2003;75:1241-1248. PMID: 12717210 DOI: 10.1097/01.TP.0000062840.49159.2F
8) Yan S, Rodriguez-Barbosa JI, Pabst O, et al. Protection of mouse small bowel allgrafts by FTY720 and costimulation blockade. Transplantation. 2005;79:1703-1710. PMID: 15973172 DOI: 10.1097/01.tp.0000164501.65352.39
9) Kato T, Gaynor JJ, Nishida S, et al. Zoom endoscopic monitoring of small bowel allograft rejection. Surg Endosc. 2006;20:773-782. PMID: 16544078 DOI: 10.1007/s00464-005-0331-2