The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Effect of a C5a receptor antagonist on macrophage function in an intestinal transplant rat model
Author(s)	Toyama, Chiyoshi
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/89482
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨

Synopsis of Thesis

氏　名 Name	當山　千巌
論文題名 Title	Effect of a C5a receptor antagonist on macrophage function in an intestinal transplant rat model （C5a受容体阻害薬によるラット小腸移植モデルのマクロファージ機能への効果の検証）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

小腸移植は、腸管不全患者に対する治療だが、小腸のもつ免疫原性により拒絶反応や易感染状態となる。このため移植手術施行後も明確な予後改善に至っておらず、更なる免疫抑制剤の開発が必要である。現在の移植後の免疫抑制剤は、カルシニューリン阻害薬等によるリンパ球の制御に主眼がおかれており、他の免疫細胞の役割や制御については不明な点が多い。補体因子C5aは、免疫細胞上のC5a受容体（C5aR1）を介して移植免疫のアロ反応を促進する。免疫細胞の中でも、自然免疫系細胞の好中球やマクロファージではC5aR1を高発現している。今回、我々はC5a受容体阻害薬（C5aR1阻害薬、PMX53）を使用して、小腸移植における拒絶抑制効果を検証するとともにマクロファージに及ぼす影響を解析した。

〔方法(Methods)〕

ラットはドナーDA(RT-1a)、レシピエントLewis（RT-1l）(MHC Full Mismatch)として約20cmの回腸を異所性に移植してモデルを作成した。モデルは、コントロール群、非治療群、PMX53投与群とした。PMX53の投与方法は、術当日から術後7日目まで2mg/kgを腹腔内投与とした。まずグラフト生存期間を比較し、次に移植後6日目に組織学的評価として腸管のHE染色、細胞機能的評価としてリンパ球混合反応試験（MLR、腸管膜リンパ節由来T細胞とドナー脾臓細胞の混合培養）を行った。そして拒絶時の補体活性化を確認するために、移植後６日目の血清C5aを測定し、移植グラフトリンパ節とグラフトパイエル板のC5のmRNAを測定した。続いてグラフトに浸潤する免疫細胞の評価として、T細胞とマクロファージをFACSで測定した。In vitroでマクロファージへのPMX53の効果を検証するために、骨髄細胞からL929細胞培養液を用いてマクロファージを分化誘導(BMDM)する過程でPMX53を投与し、マクロファージ分化に対する効果をFACSで検証した。更に、分化したBMDMに対して移植拒絶反応状態を模擬してLPSとATP及びPMX53を添加し、炎症性サイトカインのmRNAをRT-PCRで測定して、マクロファージの活性化への効果を検証した。

〔結果(Results)〕

ラット小腸グラフト生存は、非治療群に対してPMX53投与群で有意に延長した(6.6 vs 13.7日, $p<0.0001$)。また、PMX53投与群では、拒絶によるグラフト腸管の絨毛短縮は有意に抑制され、MLRのStimulation Indexは非治療群に対して有意に低下した(5.1 vs 2.2、$p<0.0001$)。拒絶反応時の補体活性化について、術後6日目の血清C5aは、コントロール群と比較して、非治療群で上昇し（52.0 vs 127.0 ng/mL, p=0.0001）、グラフトリンパ節及びグラフトパイエル板のC5のmRNAはどちらも上昇していた（0.100 vs 10.55, p=0.004, 0.977 vs 2.82, p=0.0079）。続いて移植グラフトに集積する免疫細胞について、PMX53投与群では、非治療群と比較してT細胞の集積には変化がなかった（29.0 vs 26.9%, p=0.975）のに対し、マクロファージの集積は有意に抑制された（17.7 vs 7.9%, p=0.0007）。In vitroであるBMDMの分化への効果について、非投与群に対してPMX53投与群（10μM）では有意に分化が抑制された（CD11b/c+RT1-b+細胞：56.5 vs 22.5%, p=0.001）。続いて、BMDMの活性化への効果について、PMX53の投与(10μM)で、IL-1βとTNFαは抑制されている一方で（138 vs 45.8, p=0.0001, 15.1 vs 4.22, p=0.0055）、IL-10は増加していた（514.3 vs 1226, p=0.0009）。

〔総　括(Conclusion)〕

C5a/C5aR1経路の阻害は、マクロファージの制御を介して移植免疫の拒絶反応を抑制した。この結果は、補体因子の制御という既存の免疫抑制剤とは全く異なった観点からの免疫制御の有用性を示すとともに、それらの新規治療法の開発や応用へ繋がる可能性も示唆している。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）當山　千嵯

		（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	奥山宏臣
	副　査	大阪大学教授	竹田潔
	副　査	大阪大学教授	宮川繁

論文審査の結果の要旨

本学位論文の審査は、提出論文の内容、口頭発表、および口頭試問の質疑応答に基づき、3名の審査員（主査：　奥山教授、副査：　竹田教授、宮川教授）によって行われた。

小腸移植手術は、腸管不全患者に対する治療だが、小腸のもつ免疫原性により拒絶反応や易感染状態となる。このため移植手術の施行後も明確な予後改善に至っていない。このことから、更なる免疫抑制剤の開発が検討されている。C5aは補体因子の一つであり、多くの免疫細胞に発現するC5a受容体を介して炎症を活性化する。小腸移植免疫におけるC5a/C5a受容体阻害による拒絶反応への効果は不明である。

本論文はラット小腸移植モデルを用いて、C5a受容体阻害薬（PMX53）を投与し、拒絶反応抑制効果を検証する内容である。C5a受容体阻害により、小腸移植グラフトの生存は有意に延長し、マクロファージの集積を抑制していた。本研究の結果は、補体因子の制御という、既存の免疫抑制剤とは全く異なった観点からの免疫制御の有用性を示すとともに、それらの新規治療法の開発や臨床応用へ繋がる可能性も示唆していた。

以上より、学位論文として十分な内容を有すると判断した。