

令和元年6月18日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19927

研究課題名(和文) トロンボモジュリンの低下抑制による冠動脈内膜肥厚抑制効果の解析

研究課題名(英文) Graft protective effect and induction of CD4+Foxp3+ cell by Thrombomodulin on allograft coronary arteriosclerosis

研究代表者

松山 重文 (Matsuyama, Shigefumi)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：90713420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：臓器移植における最大の課題である拒絶反応の中で長期生着の阻害要因である慢性拒絶反応を制御する薬剤の探究のため、血管内蛋白の一つであるトロンボモジュリン(以下、TM)に注目した。TMをマウス心臓移植モデルに投与(128U、12.8U、1.28U/匹)すると、生着期間は無治療群7日間に対して、128U投与群50日間、12.8U投与群24日間、1.28U投与群17日間と著明な延長を示した。さらに、TM投与群の移植2週と4週後の組織評価において、心筋組織構造は比較的保たれFoxp3+制御性T細胞が多く誘導されていた。また、冠血管構造は保持され、冠動脈周囲のTM発現も保たれていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トロンボモジュリンによる冠動脈内膜の微小血栓形成抑制効果、制御性T細胞の誘導とTM製剤による抗炎症作用による急性拒絶反応の制御、慢性拒絶反応の原因となる微小血管循環障害の抑制効果を解明することは、非特異的な免疫抑制剤の減量と慢性拒絶反応制御の解明にも繋がり、現代移植医療にとって望ましい結果をもたらす。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the vessel-protective effect of Thrombomodulin in the survival of fully MHC-mismatched murine cardiac allograft transplantation. CBA recipients transplanted of a C57BL/6 heart received intraperitoneal administration of 1.28, 12.8 and 128U/day of Thrombomodulin from the day of transplantation to 7 days afterward. CBA recipients exposed with 1.28, 12.8 and 128U/day of Thrombomodulin had significantly prolonged allograft survival (MSTs, 17, 24 and 50 days, respectively). IHC studies on 4 weeks after grafting showed more Foxp3+ cells and lower myocardial damage in the allografts from Thrombomodulin-exposed CBA recipients. In conclusion, Thrombomodulin could induce the prolongation of fully MHC-mismatched cardiac allograft through the accumulation of regulatory CD4+Foxp3+ cell in the coronary arteries. This study has been published in Journal of Cardiothoracic Surgery.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：トロンボモジュリン 心臓移植 冠動脈 制御性T細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

- [1] 急性拒絶反応に関してはシクロスポリン等の免疫抑制薬やステロイドの使用により、一定の制御が可能になった。しかし、慢性拒絶反応に関しては、上記の薬剤では制御が困難であり、慢性拒絶反応を制御可能にすることが最新の移植医療の命題である。
- [2] ヒトの血管内には血液の無秩序な凝固を防ぐために、以下の抗凝固（抗血栓）作用が備わっている。①ヘパラン硫酸、②組織プラスミノゲンアクチベーター、③プロスタサイクリン、④一酸化窒素、⑤トロンボモジュリン[Thrombomodulin. 以下、TM]等である。特に⑤の TM は 1984 年頃より注目され、鈴木宏治（鈴鹿医療科学大学教授）により血液中の抗凝固能を示す血管内皮タンパクとして研究されてきた。また、このトロンボモジュリンは体内のすべての血管内皮に存在するが、敗血症等の重症感染症や解離性大動脈瘤等の血管病変により減少し、血栓が形成されやすい状態となる。
- [3] 全ての血管内皮に存在するとされる TM に関して、その抗凝固作用・抗炎症作用が冠動脈微小循環障害に関与するかは不明であった。

## 2. 研究の目的

マウス心臓移植モデルを用いて、TM の効果を以下の点において評価し、拒絶反応抑制に関わる冠血管内皮 TM の関連性と TM 製剤投与による生着延長効果について解析する。

- [1] マウス移植心の生着延長期間の測定と制御性 T 細胞の誘導の有無の確認
- [2] 冠動脈内膜の微小血栓形成抑制効果
- [3] 長期生着移植心の冠血管周囲への炎症性・抗炎症性細胞浸潤評価

## 3. 研究の方法

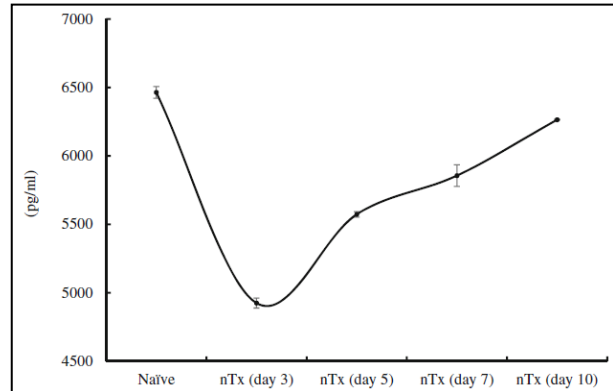
実験モデルはマウスの異所性心臓移植モデルである。方法は原著論文（Niimi M. The technique for heterotopic cardiac transplantation in mice: experience of 3000 operations by one surgeon. J Heart Lung Transplant 2001;20(10):1123-8.）で詳細に記載されている。手術用顕微鏡は 6 台あり、その内 1 台は Teaching 可能な眼科脳外科手術用顕微鏡システムであり、多くの国内、国外留学生が実験に使用している。使用するトロンボモジュリン（以下、TM）製剤は医薬品の原末を購入している。移植心血管内膜評価に使用する免疫学的解析設備は既に整備された状態である。

- [1] C57BL/6 マウス心臓を手術用顕微鏡を用いて CBA マウスの腹部に移植すると、無処置（無治療）では中央値が 7~8 日で拒絶される。このモデルの移植実験は現在までに 1000 組以上が行われ、英文論文として多数報告している。
- [2] 無治療群の移植心の血管内皮障害を評価するために、血中の TM 濃度を測定する。また同時に、血管内皮表面 TM の病理染色（CD141 染色）も行う。
- [3] 無治療群の血管内皮 TM 変化を調べた後、TM 製剤を術後 7 日間 1 日 1 回（ヒト通常量 380U/kg/day[マウス換算 8.5~9.5U/mouse]）投与し、生着延長期間と移植心冠動脈内膜肥厚径を測定する。また、移植後 7 日目、14 日目、28 日目の冠血管内皮 TM の病理染色を行う。
- [4] TM 製剤による移植心生着延長効果が確認できた場合、生着延長効果の原因を調査する。TM そのものの効果であるかどうか、免疫制御細胞（制御性 T 細胞; Regulatory T cell; 以下、Treg）によるものかどうかを免疫組織染色を用いて検証する。

#### 4. 研究成果

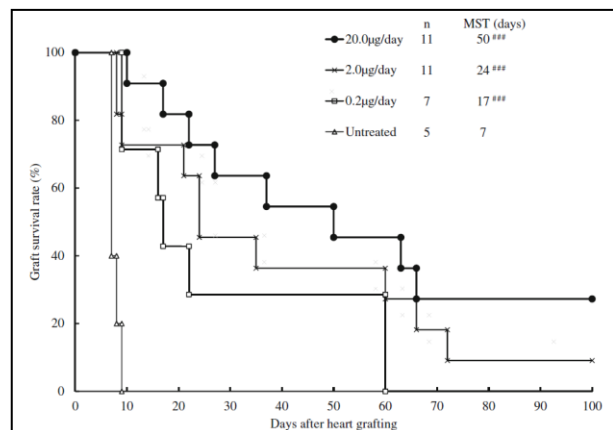
##### [1] マウス移植モデルにおける TM の血中濃度変化 (Fluctuation of TM)

Naïve マウスとマウス心臓移植モデルの術後 3 日目、5 日目、7 日目、10 日目の血中 TM 濃度を測定した。右図のように、naive マウスと比べて、移植モデル術後 3 日目には TM 濃度は急激に減少しており、急性拒絶反応によって全身の血管内膜 TM が消費されていることが示唆された。しかし、この減少は一時的なものであり、術後 10 日目には血中濃度は回復していた。但し、移植心臓も 10 日目には拍動が停止し拒絶がほぼ完了していることから、TM 濃度と急性拒絶反応の期間は相関することが判明した。この実験は急性拒絶反応期間に TM を補充する根拠となるデータであった。



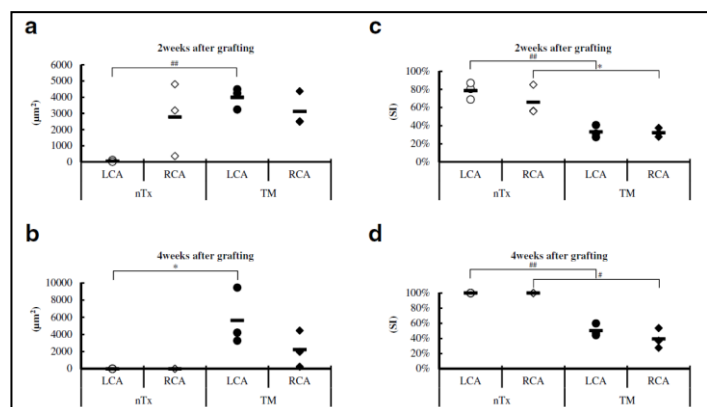
##### [2] TM 投与によるマウス移植心生着延長効果 (Significant prolonged allograft survival)

TM 補充によるマウス移植心生着延長効果を調査した。TM は移植日から 7 日間腹腔内投与とし、TM の titration (投与量 20.0 $\mu$ g/day、2.0 $\mu$ g/day、0.2 $\mu$ g/day) も行い、各群での中間生存期間 (median survival time, 以下、MST) を測定した。右図のように、MST は容量依存性に延長し 20.0 $\mu$ g/day 群で 50 日となった。以上の結果から、20.0 $\mu$ g/day  $\cdot$  7 日間でマウスを作成することとした。



##### [3] TM による移植心冠動脈内膜肥厚抑制 (Suppression of intimal hyperplasia in coronary arteries)

TM 補充治療によって生着延長を来したマウスの移植心臓冠動脈を形態学的に評価した。右図に示すように、無治療群 nTx と TM 治療群の術後 14 日目と 28 日目の冠動脈 (LCA  $\cdot$  RCA) 内膜肥厚 [a, b] と狭窄率 (stenosis index: SI) [c, d] を

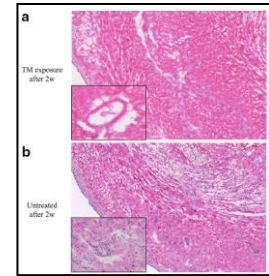


測定した。図 a/b が示すように、術後 14 日目から無治療群の LCA は完全に狭窄しており、28 日目には RCA も完全狭窄していた。対して、TM 治療群は 28 日目の RCA

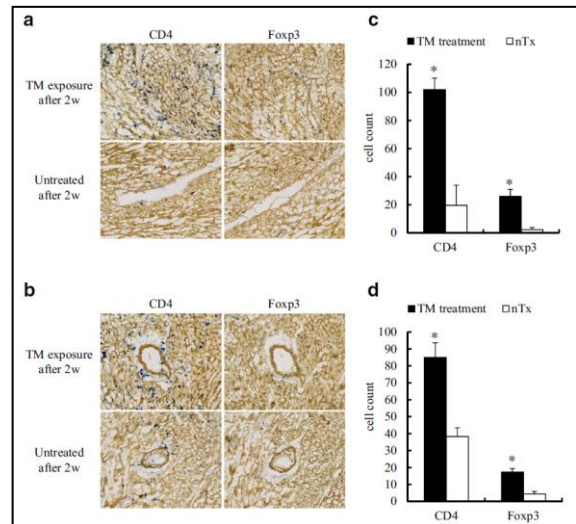
は若干の狭窄を認めるものの、血管内腔は保たれていた。図 c/d でも同様に無治療群の 28 日目の SI は 100%であるのに対して、TM 治療群の SI は 40~50%に留まっていた。TM 補充療法による移植心冠動脈内膜の肥厚抑制効果が示された。しかし、TM 自体の炎症抑制効果は免疫抑制薬やステロイドに比べて大変弱いことは確認されているため、TM 補充自体の効果もあるが、別の要因が血管保護、臓器保護に作用している可能性も示唆された。

#### [4] TM による制御性 T 細胞の誘導 (Prominent accumulation of CD4+Foxp3+ Treg)

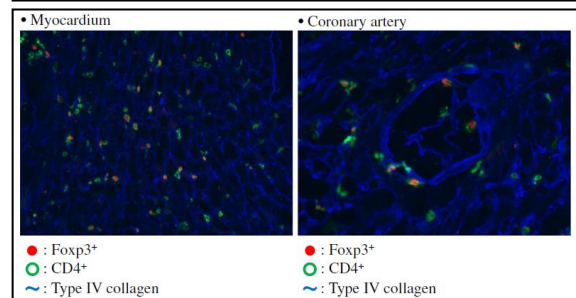
TM 補充療法による生着延長をさらに解明するために、移植心臓を免疫組織染色で評価した。まず、無治療群と TM 治療群の生着移植心を HE 染色し、心筋組織や冠動脈構造とリンパ球浸潤の程度を評価した。右上図で示すように、明らかに TM 治療群の移植心は組織血管構造が保たれており、心拍継続の根拠となる結果であった。



次に、その心筋組織や冠動脈周囲に浸潤したリンパ球を評価するために、CD4 と Foxp3 を染色した。右中図[a,c]に示すように、心筋組織への CD4+または Foxp3+細胞の絶対数は無治療群に比べ、TM 治療群で有意に増加していた。この傾向は冠動脈周囲でも同様の結果となった[b,d]。但し、この染色では CD4+細胞が effector T 細胞である可能性もあり、拒絶反応抑制に働いたのか、逆に促進に作用したのか判断することは困難であった。



次に、その浸潤細胞をさらに詳細に評価するために、蛍光組織染色を行った。右下図に示すように、CD4+Foxp3+細胞が心筋や冠動脈の CD4+細胞近くに存在していることが示された。



TM 補充によって生着延長効果が示された可能性として、過去の文献から TM 自体の炎症反応抑制効果や抗凝固効果も挙げられるが、今回の検討内では、急性期の TM 投与による移植心の心筋組織や冠動脈への制御性 T 細胞の誘導が臓器保護効果を示し、生着期間延長に繋がったことが示された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- [1] Enzhi Yin, Shigefumi Matsuyama, Masateru Uchiyama, Kento Kawai, Masanori Niimi. Graft Protective Effect and Induction of CD4+Foxp3+ cell by Thrombomodulin on allograft arteriosclerosis in mice. Journal of Cardiothoracic

Surgery 2018;13:48. DOI: 10.1186/s13019-018-0731-8. 査読有

- [2] Tomohiro Imazuru, Masateru Uchiyama, Shigefumi Matsuyama, Mitsuru Iida, Tomoki Shimokawa. Surgical treatment of a huge hepatic artery aneurysm without revascularization - Case report. International Journal of Surgery Case Reports 2018;51:95-8. DOI: 10.1016/j.ijscr.2018.08.020 査読有
- [3] Enzhi Yin, Shigefumi Matsuyama, Masateru Uchiyama, Michitaka Kono, Masanori Niimi. Administration of Thrombomodulin (CD141) could improve cardiac allograft survival in mice. Transplantation Proceedings, 2018; 50: 2794-2797. DOI: 10.1016/j.transproceed.2018.02.204 査読有
- [4] Enzhi Yin, Xiangyuan Jin, Masateru Uchiyama, Qi Zhang, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Yu Guo, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Masafumi Kawamura, Masanori Niimi. Seven Japanese Herbals Prolonged Cardiac Allograft Survival. Transplantation Proceedings, 2018; 50: 2789-93. DOI: 10.1016/j.transproceed.2018.04.015 査読有
- [5] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Takako Yanagisawa, Xiangyuan Jin, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Koichiro Uchida, Masafumi Kawamura, Masanori Niimi. Yogurt Feeding Induced the Prolongation of Fully MHC-mismatched Murine Cardiac Graft Survival by induction of CD4+Foxp3+ cells. Transplantation Proceedings. 2017;49:1477-82. DOI: 10.1016/j.transproceed.2017.03.092. 査読有

〔学会発表〕（計 11 件）

2017年度（平成29年度）

15<sup>th</sup> CAST [アジア移植学会]（フィリピン・セブ）11月27日～30日開催

- [1] Masateru Uchiyama, Xiangyuan Jin, Enzhi Yin, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Hideo Yagita, Masafumi Kawamura, Masanori Niimi. Anti-CD272 antibody (6B2) induced prolongation of fully MHC-mismatched murine cardiac allograft and generation of Foxp3+ regulatory T cells.
- [2] Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Hideo Yagita, Masafumi Kawamura, Masanori Niimi. 7 Components of Traditional Japanese Herbal Medicines Prolonged Survival of Fully Allogeneic Cardiac Grafts in Mice.
- [3] Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Hideo Yagita, Masafumi Kawamura, Masanori Niimi. The effects of a traditional Chinese herbal medicine “Huaier” in murine cardiac allograft transplantation.
- [4] Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Hideo Yagita, Masafumi Kawamura, Masanori Niimi. Appetite Stimulation by Rikkunshito (TJ-43) Improved Reduction of Food Intake in Murine Cardiac Transplant Model
- [5] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Shigefumi Matsuyama, Xiangyuan Jin, Takako

Yanagisawa, Akira Inoue, Masanori Hara, Tomohiro Imazuru, Masafumi Kawamura, and Masanori Niimi. Administration of Thrombomodulin (CD141) could improve cardiac allograft survival in mice.

- [6] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Masanori Hara, Xiangyuan Jin, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Masafumi Kawamura, and Masanori Niimi. Graft protective effect of HMG-CoA reductase inhibitor Pravastatin in murine cardiac allograft transplantation.
- [7] Akira Inoue, Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Takako Yanagisawa, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Masafumi Kawamura, and Masanori Niimi. Glycyrrhizic acid in Licorice prolonged cardiac allograft survival in mice.

2016年度（平成28年度）

TTS[国際移植学会]（中国・香港）8月18日～23日開催

- [8] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Takako Yanagisawa, Xiangyuan Jin, Satoko Mizuno, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Hideo Yagita, Masanori Niimi. Anti-CD272 antibody (6B2) induced prolongation of fully MHC-mismatched murine cardiac allograft and generation of Foxp3+ regulatory T cells.
- [9] Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Takako Yanagisawa, Xiangyuan Jin, Satoko Mizuno, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Hideo Yagita and Masanori Niimi. A Traditional Chinese Herbal Medicine “Huaier” Induced Prolongation of Fully MHC-Mismatched Murine Cardiac Allograft.

ATC [アメリカ移植学会]（アメリカ・ボストン）6月11日～15日開催

- [10] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Takako Yanagisawa, Xiangyuan Jin, Satoko Mizuno, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Hideo Yagita and Masanori Niimi. Anti-BTLA Antibody (6B2) Induced Prolongation of Fully MHC-Mismatched Murine Cardiac Allograft and Generation of Foxp3+ Regulatory T Cells.
- [11] Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Xiangyuan Jin, Takako Yanagisawa, Xiangyuan Jin, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Hideo Yagita, Masanori Niimi. Indefinite Survival of Fully MHC-Mismatched Murine Cardiac Allografts by Combination of Anti-BTLA mAb (6B2) and Anti-PD-1 mAb (PIM-2).