

令和元年6月10日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05432

研究課題名(和文) 血管内皮障害に基づく炎症・自然免疫活性化の制御による同種・異種肺移植成績向上戦略

研究課題名(英文) Modulation of inflammation and innate immune responses subsequent to endothelial cell damage in lung allo and xenotransplantation

研究代表者

佐原 寿史 (SAHARA, Hisashi)

鹿児島大学・総合科学域総合研究学系・准教授

研究者番号：90452333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：臓器不足の抜本的解消と長期予後の改善には、血管内皮障害を契機とする炎症・凝固系/自然免疫系の活性化を制御することは必須である。本研究では、同種・異種肺移植時の障害により生ずる炎症促進因子の制御に着目した研究を実施した。1) 前臨床MHC確立ミニブタ肺移植モデルを用いて、移植肺生着延長効果を認める薬剤を同定し(一酸化炭素、アデノシンA2A受容体アゴニスト)、2) 異種肺移植研究に応用した結果、一酸化炭素による炎症軽減を介して組織学的に良好な結果が得られ、さらに、3) マクロファージ活性を制御するためのヒトCD47導入が、異種肺移植生着延長に寄与する(世界最長の異種移植肺生着)という成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回実施した大動物実験は、同種肺移植から異種肺移植への計画的かつ戦略的な研究展開によって、急性期のみならず移植臓器の長期成績までもを評価する研究体制のもとで実施したものである。かつ今回の研究成果は、肺移植だけでなく、他の臓器移植に応用が可能である。臨床移植医療の問題解決として、ドナー適応拡大や移植長期成績の向上、新たな免疫抑制療法による負担を強いることのない免疫寛容誘導までもを見据えた有力な新規治療戦略の確立という点において、学術面のみならず社会的意義の高い成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this translational research using swine and non-human primate (NHP), we established the new strategy to improve the results of both allo and xeno lung transplantation (LTx) especially focused on the protection of endothelium and reducing inflammatory damage following LTx. In Study 1, we showed that A2AR agonist has beneficial effects on pulmonary allograft survival using MHC-defined CLAWN miniature swine. In Study 2, we showed the perioperative inhalation of low-dose carbon monoxide (CO) has beneficial effects on porcine lung xenografts in NHP. Histology showed less inflammatory cell infiltrates, intravascular thrombi, and hemorrhage in the CO-treated animal. In Study 3 using pig-to-NHP xeno-lung transplantation, histologically viable porcine lung grafts beyond 7 days in baboons were achieved. hCD47 expression of donor lungs was detected in both alveoli and vessels only in the 3 grafts surviving >7, 9, and 10 days.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：移植・再生医療 肺移植 異種移植 自然免疫 一酸化炭素 ミニブタ 霊長類 CD47

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重篤な臓器不全に対する移植医療の効果は広く認知されるが、ドナー不足は極めて深刻である。ドナー適応拡大としてマージナル・心停止ドナーなど条件の悪い臓器を用いた移植が期待されるが、虚血再灌流障害 (Ischemia-reperfusion injury: IRI) をはじめとする急性臓器不全の危険に加え、免疫因子活性化による急性・慢性拒絶の誘因となりうる。また、術後永続的な複数の免疫抑制剤服用にも関わらず、抗体性拒絶や細気管支炎など慢性期の移植臓器機能不全のため臓器移植の長期予後は必ずしも改善していない。ドナー適応拡大によるドナー不足の解消や、移植後長期予後の改善を図るためには、条件の悪いドナー臓器を保護・修復し、術後の機能回復促進をはかること、永続的な免疫抑制剤を必要としない免疫寛容誘導戦略を確立すること、は必須の課題である。更に、これらの課題を克服しえた先には、究極のドナー不足解消戦略といえる異種肺移植の実現も近づくと考えられる。

我々はこれまでに自身の実験からミニブタで抗炎症効果を示した一酸化炭素 (Carbon monoxide: CO) に注目し (Sahara H et al. J Thorac Cardiovasc Surg 2010, Transplantation 2010)、ドナーに対する短期 CO 投与による障害臓器の炎症制御が、移植成績の改善につながることを明らかにしてきた。CO が樹状細胞の成熟抑制 (抗原提示能低下) や制御性マクロファージ誘導能を有するという *in vitro* 実験による論文報告 (Eur J Immunol 2015) とあわせ、ドナー由来抗原提示細胞 (Antigen presenting cell: APC) の制御、即ち CO によるアロ MHC 抗原の直接認識経路の阻害が長期予後に結びつくことを示唆する重要な結果であった。

一方、異種間超急性拒絶反応の標的抗原である自然抗原 (galactose-1,3-galactose: Gal) を発現しない GalT-KO ブタの開発を契機に、異種腎臓移植では 100 日以上、異所性異種心臓移植では 500 日以上の上生着が得られ臨床応用が期待されるなか、異種移植肺の生存は 5 日にも満たないのが現状であった。

これらの結果は、マージナル・心停止ドナー、あるいは異種ドナーなどを障害の強い肺を用いた際には、肺に豊富に存在する血管内皮細胞の障害や活性化を契機とする炎症・凝固の更なる制御の必要性を強く示唆するものであった。加えて移植後の拒絶機構には、前述のドナー由来 APC からのアロ主要組織適合性抗原 (Major histocompatibility complex: MHC) の直接認識経路以外に、レシピエントの APC によるドナー抗原の間接認識経路があり、より長期の拒絶制御、免疫寛容まで至るには間接経路を含めた免疫制御が必須である。そこで、同種肺移植モデルを用いて、激しい血管内皮障害を契機とする炎症・凝固/自然免疫系の活性化を、患者負担を増やすことのない周術期短期治療で制御することによって、移植肺生着から免疫寛容誘導にいたる新規治療の探索と臨床応用性の検討を行い、更にその結果を異種肺移植へ応用することによって、異種肺移植の飛躍的な成績向上をはかることができないかと考え、研究計画を立案した。

2. 研究の目的

条件の悪いドナー肺や、異種肺を用いた肺移植においては、移植時の虚血や虚血後再灌流は重篤な血管内皮障害を引き起こし、いわゆる障害関連分子 (Damage-associated molecular pattern: DAMP) といわれる High mobility group box-1 protein (HMGB1) や補体の放出から炎症・凝固系の異常亢進をもたらす、更には自然免疫系、獲得免疫系の活性化を惹起する。生体は炎症・凝固反応に対する制御機構を有しているが、虚血や血管内皮障害によりこの内因性の制御機構が破綻した際には、更に強い炎症・凝固反応が進行する。豊富な肺血管内皮細胞の障害により惹起される障害促進因子の放出や、内因性制御因子の枯渇のコントロールにより重篤な炎症を制御することは、同種・異種肺移植での重要な治療標的となりうる。

そこで、血管内皮障害を起点とする炎症・凝固制御因子系を制御することによって、ミニブタを用いた同種肺移植実験モデルにおいて、短期のみならず長期的な効果が得られるかについて明らかにすることを目的 1 とし、次いで、同種肺移植実験から得られた炎症・凝固制御因子系の制御を標的とする治療戦略が、ブタ・霊長類間の異種肺移植実験モデルによって、異種肺移植の成績向上につながりうるかを明らかにすることを目的 2 とし、研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 目的 1 では、ドナー臓器障害から移植後虚血再灌流障害 IRI や拒絶促進を惹起する脳死ドナーからの同種肺移植モデルを用いて、移植前ドナーおよび移植後レシピエントへの薬物投与による長期効果を評価した。本研究では特に、移植肺虚血再灌流障害 IRI に対する抑制効果が報告されるものの、特に大動物での長期効果は明らかでないアデノシン A2A 受容体アゴニスト (CGS21680) に着目した研究を行った。12 日間 FK506 を唯一の免疫抑制療法とするクラウン系ミニブタ MHC 完全不適合脳死肺移植モデルを用い (硬膜外バルーン拡張により脳死を誘導し、瞳孔散大、対光反射消失、無呼吸で脳死判定を行った 6 時間後に移植を実施) 移植肺静脈血液ガス分析、胸部 X 線、肺生検を主とする移植肺機能や拒絶評価について、CGS21680 投与の有無により比較検討した。CGS21680 はドナーに対し脳死誘導 3 時間後から 3 時間、レシピエントに対し再灌流 30 分前から 3 時間持続投与を行った (0.5 µg/体重 × 3 時間)。

(2) 目的 2 では、これまでの研究から、血管内皮細胞保護効果により抗炎症作用を介した同種移植肺生着延長効果が得られた CO が異種肺移植生着に及ぼす効果、およびその機序の解明に焦点をあてた研究を、GalT-KO ブタをドナー、サルをレシピエントとする肺移植モデルを用いて

行った。ドナーに対しては摘出前 180 分、レシピエントに対しては移植前から移植肺再灌流 2 時間後までの計 360 分間 CO 吸入を行い (血中の COHb 濃度は 15-20%) CO 吸入の有無に応じ、ドナーのみ吸入、ドナーおよびレシピエントともに CO 吸入、CO 無吸入の 3 群に分け移植肺の生着を評価した。さらに GaIT-KO ブタを基盤に様々な遺伝子改変を加えたブタをドナーとし、サルをレシピエントとする異種肺移植実験を行った。マクロファージを介した自然免疫系の応答を制御することによって、異種肺移植の生着が延長しうるかを評価するため、特に hCD47/GaIT-KO ブタをドナーとして用いた場合の異種移植肺生着延長効果に焦点をあて検証した (ヒトマクロファージに発現する signal regulatory protein (SIRP) はドナーブタに発現する CD47 を認識せず、ブタ細胞に対し著しい貪食機構が働きうる。そこで、ヒト (h) CD47 導入によって SIRP- を介した自己寛容機構を誘導することによって、マクロファージの異常活性を制御しうる) 。改変された遺伝子によってヒト (h) CD47 および hCD55 導入、hCD47/hCD46 導入、および hCD47 の導入されていない 3 つの群に分けた評価を行った。

4 . 研究成果

(1) 目的 1 の研究では、CGS21680 非投与群では術後 35 日までに同種移植肺は拒絶された。一方 CGS21680 投与群では、非投与群に対し術後グラフト肺静脈血液ガスは良好であり (552 ± 22 vs. 414 ± 106 : 術後 2 時間 ; 553 ± 19 vs. 349 ± 28 mmHg : 術後 2 日) また術後 2 時間、2 日の病理学的 IRI 像や炎症性サイトカイン (IL-1 / IL-6) の mRNA 発現も軽減された。投与群の 1 例は術後 21 日に肺炎で失ったものの、他の 2 例はドナー特異的細胞性免疫反応の低下状態で、120 日以上移植肺生着を得た。この結果は、CGS21680 に投与によって、移植肺 IRI 抑制効果だけでなく、短期 FK506 療法との併用下で免疫寛容を導きうることを、世界で初めて大動物モデルにより明らかにしたものであった。Adenosine A2A receptor は、自然免疫や獲得免疫をつかさどる様々な免疫担当細胞に発現しており、今後どのような機序により長期予後改善が得られているのかについて評価を進め、詳細な作用機序を解明するとともに、免疫寛容誘導のための最適な投与方法の検討が課題となる。

(2) 目的 2 の研究では、ドナーおよびレシピエントともに CO 吸入を行った 1 例でレシピエントは 80 時間、一方 CO 吸入を行わない 1 例でも 75 時間の長期生存が得られた。しかし、CO 吸入群では無吸入群に比べ、組織学的に炎症細胞の浸潤や血栓、出血の軽減を認めた。また CO 吸入の有無による群間の比較では、生存率において有意差を認めなかったものの、ドナーおよびレシピエントの CO 吸入により移植肺再灌流 2 時間後の血小板減少は抑制され、また血清の炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6) の上昇程度は抑制されたうえ、組織学的にマクロファージや好中球の浸潤も軽減していたことから、CO 吸入による炎症抑制が異種移植肺に効果的であることが示唆された。

(3) さらにブタ・サル間異種肺移植実験では、最長 10 日となる世界最長の異種肺移植生着が得られた。特にドナーの肺胞や血管に hCD47 の発現が認められた 3 例では、7 日以上、9 日、10 日の生着が得られた一方、認められなかった症例では広範な出血や抗体・補体の沈着を伴い生着は 7 日以下にとどまった。hCD47 導入によるマクロファージ制御が、異種移植肺生着延長効果に寄与することが示唆される結果であった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Watanabe H, [Sahara H](#), Nomura S, Tanabe T, Ekanayake-Alper DK, Boyd LK, Louras NJ, Asfour A, Danton MA, Ho SH, Arn SJ, Hawley RJ, [Shimizu A](#), Nagayasu T, Ayares D, Lorber MI, Sykes M, Sachs DH, [Yamada K](#). GaIT-KO pig lungs are highly susceptible to acute vascular rejection in baboons, which may be mitigated by transgenic expression of hCD47 on porcine blood vessels. *Xenotransplantation*. 2018 Sep;25(5):e12391. 査読有.

DOI: 10.1111/xen.12391.

[Sahara H](#), Sekijima M, Ariyoshi Y, Kawai A, Miura K, Waki S, Nathan L, Tomita Y, Iwanaga T, Nakano K, Matsunari H, Date H, Nagashima H, [Shimizu A](#), [Yamada K](#). Effects of carbon monoxide on early dysfunction and microangiopathy following GaIT-KO porcine pulmonary xenotransplantation in cynomolgus monkeys. *Xenotransplantation*. 2018 Jan;25(1). 査読有.

DOI: 10.1111/xen.12359.

[Sahara H](#), Watanabe H, Pomposelli T, [Yamada K](#). Lung xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2017 Dec;22(6):541-548. 査読有.

DOI: 10.1097/MOT.0000000000000465.

[学会発表] (計 6 件)

[佐原寿史](#). 異種肺移植成績向上を目指した挑戦 ~ 日米における前臨床異種移植実験から見てきた課題. 第 35 回日本肺および心臓移植研究会. 2019 年

[佐原寿史](#). 世界最長の GaIT-KO ブタ・霊長類間異種移植肺生着への道のりと今後の課題. 第 44 回日本臓器保存生物医学学会学術集会. 2017 年

Sahara H. Successful induction of tolerance of fully allogeneic lung graft with adenosine A2A receptor (A2AR) agonist in MHC-defined CLAWN miniature swine. American Transplant Congress 2017. 2017 年

佐原寿史. MHC 確立クラウンミニブタを用いたアデノシン A2A 受容体アゴニスト (CGS21680) 投与による移植肺免疫寛容誘導. 第 34 回日本呼吸器外科学会総会. 2017 年

Sahara H. Effect of perioperative treatment with adenosine A2A receptor agonist on pulmonary allograft survival in MHC-inbred CLAWN miniature swine. International Society for Heart and Lung Transplantation 37th Annual Meeting. 2017 年

佐原寿史. GaIT-K0 ブタ・ヒヒ間異種肺移植 早期異種移植肺廃絶の回避とその生着. 第 19 回日本異種移植研究会. 2017 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~xenotx/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：山田 和彦

ローマ字氏名：(YAMADA, kazuhiko)

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：総合科学域総合研究学系

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：40241103

研究分担者氏名：清水 章

ローマ字氏名：(SHIMIZU, akira)

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：大学院医学研究科

職名：大学院教授

研究者番号 (8 桁)：00256942

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：関島 光裕

ローマ字氏名：(SEKIJIMA, mitsuhiro)

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。