

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09616

研究課題名(和文)同種造血細胞移植後の閉塞性細気管支炎における組織マクロファージの解析

研究課題名(英文)Characterization of localized macrophages in bronchiolitis obliterans after allo-HSCT

研究代表者

藤井 伸治 (Fujii, Nobuharu)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：60362977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：同種造血幹細胞移植後(HCT)の致死的な合併症である閉塞性細気管支炎(BOS)において、病変局所に見られるマクロファージに着目し、治療として肺移植を受けた患者の摘出肺組織を用いて、病理像の検討、及びFISH法と免疫染色にてその由来と機能解析を試みた。病変局所にはリンパ球を含むほかの炎症細胞浸潤は乏しく、浸潤マクロファージはドナー型であり、造血幹細胞由来であった。また、病初期の細気管支に浸潤するマクロファージはM1型であった。晩期像においてM1マーカーは陰性化した。M2マーカーも認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BOSは肺の慢性移植片対宿主病と考えられおり、ドナーリンパ球を主な標的とした治療が実施されるも効果は限定的であった。そのため、原疾患が完治した後にも、患者のQOLおよび予後を著しく害する合併症であり、新規治療が待たれている。今回の検討から、造血幹細胞由来のドナー型マクロファージを標的とした治療が新しい治療戦略となる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) remain one of the most devastating complications in hematopoietic cell transplantation (HCT). We studied infiltrated macrophages in gender mismatched HCT recipients who received lung transplantation for BOS. We found that most of the infiltrated macrophages are derived from donor. As for phenotypes, the macrophages in early stage of BOS were positive for CD68 and iNOS and negative for CD163, CD206, and TGF- β suggesting M1 macrophages. On the other hand, neither CD68 and iNOS nor CD163, CD206, and TGF- β was negative in late stage.

研究分野：造血幹細胞移植後の晩期合併症

キーワード：閉塞性細気管支炎 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植 (HCT) 後の閉塞性細気管支炎 (BOS) は、同種移植後 2 年以内に全移植例の約 2-5% に発症する。頻度はそれほど高くないものの有効な治療法がなく、最終的には致死的になる。その組織像は炎症性の線維化による細気管支壁肥厚と内腔狭小化であり、浸潤する炎症細胞はリンパ球、好中球、マクロファージなどとされる。BOS は肺の慢性移植片対宿主病 (GVHD) と考えられており、従来の治療法はリンパ球を主な標的としているが、BOS の多くは従来の免疫抑制療法に抵抗性であることから、リンパ球以外の免疫担当細胞が病態の主役をなす可能性が考えられた。また既報において、細気管支内あるいは周囲の泡沫細胞の存在を記載した報告が散見される。さらに近年では、HCT 後の慢性 GVHD で見られる組織の線維化において、マクロファージの関与がマウスモデルで示唆されている。

肺移植後の慢性拒絶においても HCT 後と同様に BOS が発症することが知られている。Nayak らは、肺移植後 3.5 年が経過してもなお、多くのマクロファージが肺ドナー由来であることを示し、BOS 発症に関与する可能性を方向している (*Am J Transplant* 2016; 16(8): 2300-2311)。このような背景から、我々は BOS の細気管支に浸潤するマクロファージに着目した。

研究開始当初の仮説は、「HCT 後の BOS においては細気管支にレシピエント由来のマクロファージが多く残存し、恒常的にドナーリンパ球など免疫担当細胞との相互刺激が持続し、TGF- β などの線維性増殖促進因子をマクロファージが直接的に産生することによって病態が進行する」というものであった。

2. 研究の目的

(1) 肺移植が施行された HSCT 後 BOS 患者の切除肺組織を用いて、局所に浸潤するマクロファージの形質を解析する。さらに、「マクロファージがドナー由来か、患者由来か」について、異性間 HCT が行われた症例で検討する。

(2) 気管支肺胞洗浄液 (BALF) においても、回収されるマクロファージのキメラリズムと phenotype を解析する予定であった。しかし、研究期間において当施設での BOS 発症が少なく BALF 検体が集積できなかったため、(1) で集積したパラフィン切片を用いて、免疫関連遺伝子および線維化関連遺伝子の網羅的解析を行う方針に変更した。

3. 研究の方法

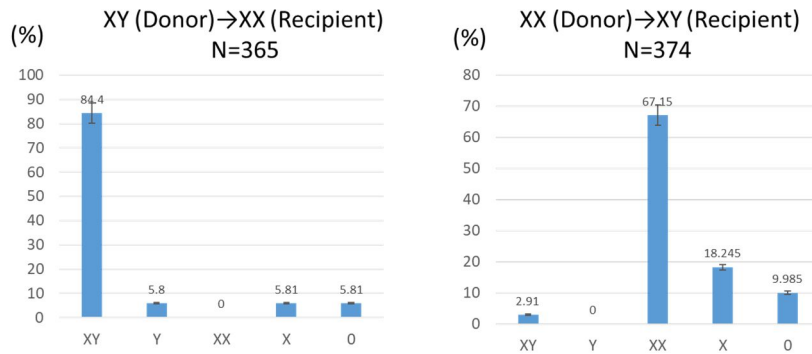
(1) HCT 後の重症 BOS に対する治療として、2000 年から 2013 年に岡山大学病院で肺移植を施行された患者の摘出 BOS 肺組織のうち、性別の異なるドナーから HSCT を受けた 7 症例を対象として検討した。Hematoxylin-Eosin (HE) 染色に加え、modified verhoeff Elastic-Masson (EM) 染色にて線維化を評価した。Phenotype の検討では、CD68, iNOS, CD163, CD206, TGF- β を検討した。由来解析については、X 染色体、Y 染色体のプロープを用いた FISH 法と CD68 の免疫染色を併用する Immuno-FISH 法で検討した。

(2) BOS 症例のパラフィン切片からマクロファージを含む細気管支領域をマイクロダイセクションで切り出し、免疫関連遺伝子パネルおよび線維化関連遺伝子パネルを用いて NanoString technology にて浸潤マクロファージの機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) 摘出肺組織では、空間的および時間的に多彩な進行度の細気管支が観察された。病初期においては CD68 および iNOS 陽性の M1 型マクロファージが細気管支内腔に見られた。中期像では、

マクロファージが細気管支基底膜を破壊し細気管支周囲へと浸潤し、晩期像では線維化により狭小化した細気管支の周囲で M1 マーカーを喪失したマクロファージが観察された。Immuno-FISH 法により、浸潤マクロファージのほとんどが HSCT のドナーに由来（造血幹細胞由来）であり、レシピエント由来の細胞はごくわずかであった。この結果は、肺移植後の慢性拒絶として発症する BOS において、肺ドナー由来のマクロファージの残存が見られることと相反する結果であった。（図 1）



(2) 浸潤マクロファージの網羅的遺伝子解析については、古いパラフィン切片からでも検討可能な RNA が抽出できることが確認できた。今後の結果により、病初期と晩期における浸潤マクロファージの機能の差異、線維化にいたる機序を検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大藤 剛宏 (OTO TAKAHIRO) (40452578)	岡山大学・大学病院・教授 (15301)	
研究分担者	前田 嘉信 (MAEDA YOSHINOBU) (60403474)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究協力者	黒井 大雅 (KUROI TAIGA)		