

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10800

研究課題名(和文) 新しいガス運搬体を用いた肺移植拒絶反応軽減の基礎研究

研究課題名(英文) Amelioration of rejection after lung transplant by newly developed gas carrier.

研究代表者

大塚 崇 (Ohtsuka, Takashi)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：40306717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウス気管移植モデルにおいて、allograft ではMMP-9、MMP-13のm-RNAがIsograftに比して高発現していた。タンパクレベルでもwestern blottingにおいて同様の結果を得た。MMP阻害薬であるGM6001の投与によりallograftにおいてMMP-9、MMP-13の発現は抑制されていた。人工ガス運搬体の投与によりAllograftでの拒絶反応抑制、T細胞の浸潤の低下を認めた。T細胞は低下していたが、Foxp3 mRNAは増加していた。マウス気管移植モデルにおいて、MMPの抑制を介して拒絶反応の抑制を認めることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一酸化炭素投与により、肺移植後拒絶反応が抑制されることを示した。また一酸化炭素投与により、MMP-9、MMP-13の発現もコントロールされることが分かった。ガス運搬体により一酸化炭素を生体に投与可能な事も分かった。今後は他の臓器でもガス運搬体による一酸化炭素投与が可能で、移植拒絶反応の抑制が可能であれば移植後の拒絶反応の治療に貢献出来る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the expression of matrix metalloproteinase (MMP) 9 and 13 in mouse trachea transplant model. We showed that MMP-9 and MMP-13 m-RNA were increased in allograft compared with in those of isograft. We also found that protein of MMP-9 and MMP-13 were increased in allograft compared with in those of isograft. We administered carbon monoxide by new gas carrier and showed that MMP-9 and MMP-13 mRNA were decreased in allograft compared with those in allograft treated with control vesicle. The rejection was ameliorated in the allograft treated with carbon monoxide compared with the allograft treated with control vesicle.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺移植 拒絶反応 T細胞 制御性T細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺移植は重症呼吸不全疾患に対する唯一の根本的治療である。しかし近年の免疫抑制剤の進歩にも拘わらず拒絶反応はいまだに移植レシピエントの主要な死因である。末梢の気管支が次第に閉塞する Bronchiolitis obliterans Syndrome(BOS)は5年以上生存した肺移植後のレシピエントの内50から60%の確率で発症する病態である。現在このBOSに対する治療法は確立しておらず、ブレークスルーが求められている。BOSの原因として虚血再灌流障害、低酸素状態、Matrix metalloproteinases (MMP)のバランスの欠如が報告されている(Jiang, JCI 2011, Sato, Am J Pathol 2011)。BOSでは細胞外マトリックス (ECM)の分解、変性が強く関与しているがそのメカニズムは多くが不明なままである。肺移植後の拒絶反応に伴う線維化、炎症でのMMPとADAMの役割は現在までに検討されていない。

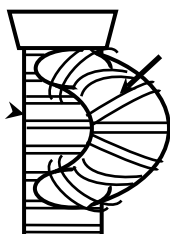
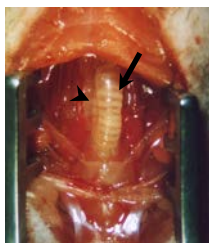
一方肺移植の研究分野ではまだ人工酸素運搬体と移植免疫の研究は行われていないが、近年開発された人工酸素運搬体の投与により、拒絶反応の抑制が腎移植の動物実験モデルでは報告されている(Thuillier, Am J Pathol 2011)。上記の論文では人工ガス運搬体を臓器保存液と併用することで短期、長期の合併症を減少させた。人工ガス運搬体による拒絶反応軽減のメカニズムは解明されていないが、臓器保存液中の虚血保存臓器の酸素化、アデノシン三リン酸(ATP)の組織内での保持により保存臓器内のエネルギー消費のバランスをとり、虚血再灌流障害を減少させると考えられている。しかし肺移植を含む臓器移植後拒絶反応で重要な役割を担うT細胞への人工ガス運搬体の影響などは現在まで検討されていない。

### 2. 研究の目的

我々は①MMP-9、MMP-13などのメタロプロテアーゼを抑制することによりT細胞の組織への浸潤を抑え、気管移植後の拒絶反応を抑えるという仮説と②移植後の拒絶反応においてADAM28が高発現していることを示し(予備実験で確認済み)、ADAM28の制御により拒絶反応を抑制することができるという仮説を検討する。さらに③ガス運搬体投与によりグラフトの組織酸素濃度を増加させることによりMMP, ADAMの発現を制御し拒絶反応を抑制するという仮説を検討する。

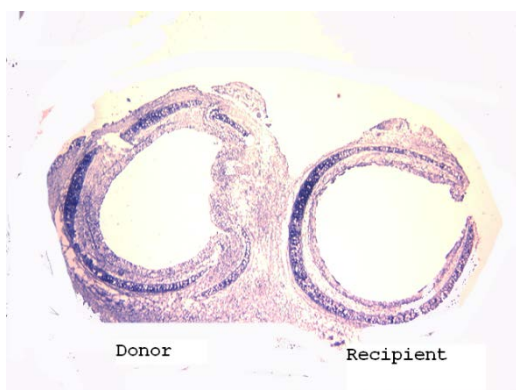
### 3. 研究の方法

- I. マウス気管移植モデルにおいてMMP阻害薬を用いた場合の炎症性サイトカインの発現の検討。
- II. マウス気管移植モデルでのMMP阻害薬(GM6001)による拒絶反応を組織で検討する。
- III. MMPノックアウトマウスを用いた気管移植モデルの拒絶反応の検討。



マウス気管同所移植モデル

気管同所移植モデルの組織HE染色



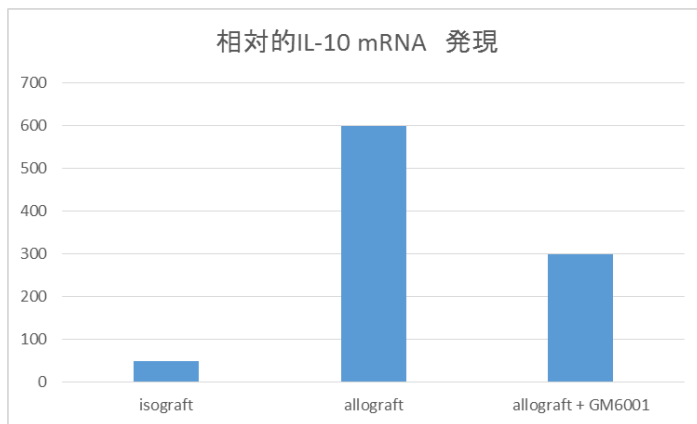
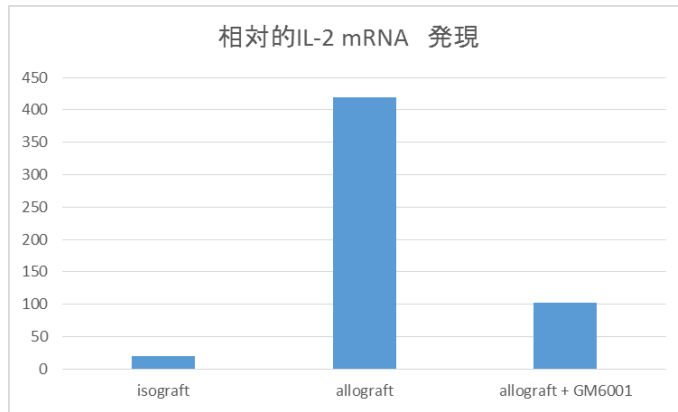
### 4. 研究成果

#### I. マウス気管移植

MMP阻害薬であるGM6001をレシピエントに投与した。Allograft+GM6001投与群ではAllograft+PBS投与群に比べてIL-2、IL-10、TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ のmRNAが低下していた。

また、Foxp3 mRNA では、Allograft (=無投与群) と Allograft+GM6001 (=MMP 阻害薬投与群) において発現が有意に高く見られた。

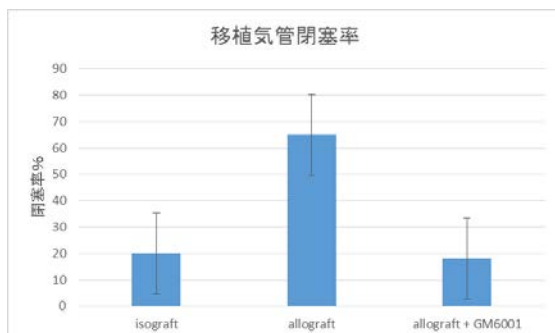
以上より炎症性サイトカインを GM6001 が抑制していると考えられた。また移植グラフトの拒絶反応も抑制していた。Foxp3 mRNA が増加していたことから制御性T細胞の関与の可能性が考えられた。

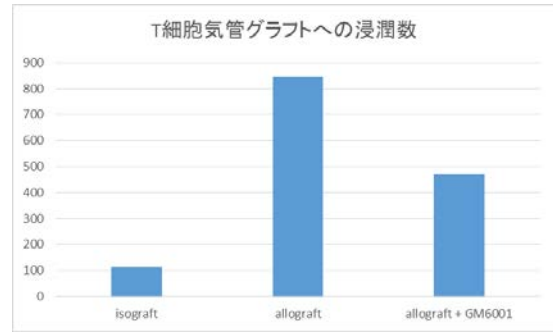
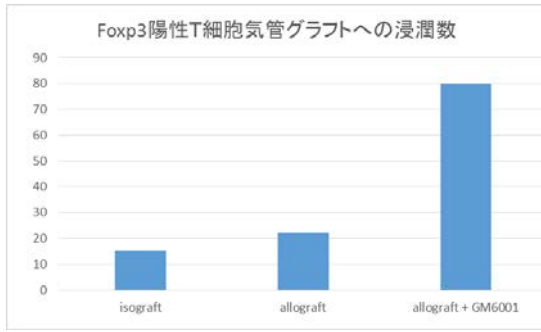


## II. マウス気管移植での組織の検討

MMP 阻害薬投与群において移植気管閉塞率は Allograft+GM6001 投与群と Allograft 群ではそれぞれ 18% と 65%であった。GM6001 投与により閉塞が改善された。

また Allograft+GM6001 投与群と Allograft 群での CD3 陽性細胞の免疫染色ではそれぞれ 845, 472 であり有意差は認めなかった。しかし Foxp3 陽性 T 細胞の数においては Allograft+GM6001 群において allograft 群よりも増加していた。このことより GM6001 により Foxp3 陽性 T 細胞が誘導され、移植気管の閉塞を軽減したことが示唆された。





III MMP ノックアウトマウスを用いた気管移植モデルの拒絶反応の検討.

MMP-9 ノックアウトマウスを用いて気管移植モデルでの拒絶反応は、移植気管閉塞率ではコントロールのマウスでの allograft と統計学的有意差を認めなかった。しかし T 細胞の浸潤の数において MMP-9 ノックアウトマウスで増加を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shigenobu T, Ohtsuka T, Shimoda M	4. 巻 53
2. 論文標題 The prevention of tracheal graft occlusion using pioglitazone: A mouse tracheal transplant model study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transplant Immunology	6. 最初と最後の頁 21-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.trim.2018.12.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大塚 崇
2. 発表標題 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) - アゴニストによるマウス気管移植での拒絶反応抑制
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Ohtsuka
2. 発表標題 Pioglitazone Induces Infiltrations of Regulatory T Cells in the Tracheal Graft and Attenuates Allograft Rejection
3. 学会等名 International society for heart and lung transplantation (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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	下田 将之  (Shimoda Masayuki)  (70383734)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授    (32612)	