

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月31日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16603

研究課題名(和文) マウス肺移植モデルを用いた慢性拒絶、線維化機構の分子学的病態解明

研究課題名(英文) Genetic Profiling in murine orthotopic lung transplantation model of chronic lung allograft dysfunction

研究代表者

畑 敦 (HATA, ATSUSHI)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30750806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺移植は慢性進行性肺疾患患者に対する治療方法として確立したが、慢性拒絶反応(OB)のため、その長期予後は不良である。我々はマウスのOBモデル作成に成功し、このモデルを用いて、遺伝子発現網羅的解析を行い、新規治療法、診断法の開発を試みた。その結果、自然免疫に加え、獲得免疫として抗原提示、抗体産生に関するプロセスの上昇を認め、さらに複数の発現上昇遺伝子を認めた。それらの遺伝子をさらにリンパ節や脾臓でも検討すると、リンパ節で肺と共通して発現上昇を認める遺伝子を同定し、リンパ節からもOBの診断が可能である事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺やリンパ節で共通して発現亢進しているパスウェイ、遺伝子を同定した事は、侵襲的かつ診断率の低い肺生検の代替手段として、EBUS-TBNAなどを用いたリンパ節生検が診断法に有用である可能性を示している。また今回のモデルは実臨床でもまれに行われるマイナー抗原不適合モデルを使用しており、このモデルで、B細胞を含む獲得免疫、また自然免疫まで様々な免疫のパスウェイの上昇を確認した事は、通常懸念される主要組織適合遺伝子複合体不適合と同様にマイナー抗原不適合もこれらの免疫反応を惹起する事を示した世界初の実験であった。

研究成果の概要(英文)： This study evaluated gene expression in a murine orthotopic lung transplantation model using microarray analysis. Three groups (OB, non-OB, and sham controls) were confirmed pathologically and analyzed. Gene expression changes in the lung grafts were determined by microarray and immunohistochemical staining, and genes were verified by quantitative PCR in the lungs, mediastinal lymph nodes (LNs), and spleens.

As for OB lung, significant upregulation was observed for genes related to innate and adaptive immunity. Positive labeling for MHC class II antigen was also observed in inflammatory cells and the bronchial epithelium of OB mice accompanied with B cells in the de novo lymphoid tissue. We found increased some gene mRNA expression in the OB lung grafts, and also increased in the OB LNs. This study showed antibody-mediated and innate immune reactions are involved in OB after lung transplantation, and genetic examination of related genes could be used for early detection of OB.

研究分野：肺移植

キーワード：慢性移植肺機能不全 閉塞性気管支炎 抗体関連拒絶 遺伝子発現網羅的解析 マウス同所性肺移植

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺移植は末期呼吸器疾患に対する唯一の根治的な治療法として国内外で広く行われており、その数も増加傾向である。しかし肺移植は国際的には5年生存率約50%と他の臓器移植と比較するとかなり劣っているのが現状である。長期予後不良の最大の要因は臨床的には閉塞性汎細気管支炎症候群(BOS)や拘束型慢性移植肺障害(RAS)に区分される慢性移植肺機能不全(CLAD)であり、その病態解明および治療法の確立が課題である。CLAD、特にBOSの発症に関しては、①終末細気管支における免疫および自己免疫の関与による局所の反応、②終末細気管支における上皮のリモデリング、血流、間質およびリンパ組織の変化③線維化が提唱されている。我々はインディアナ大学免疫生物センターと共同研究を行い、近年ラットの肺移植手技(カフテクニック)を応用し、独自にマウスの同所性肺移植モデルを開発し、さらにドナーおよびレシピエント間のマイナー抗原の不一致を利用して、臨床のCLADをよく模倣したマウスの慢性拒絶反応(慢性閉塞性細気管支炎(OB))モデル作成に成功した。本研究ではこのモデルを基本にOBの病態のさらなる解明に結びつく移植実験を計画した。

2. 研究の目的

上記OBモデルを用いて、遺伝子発現網羅的解析、免疫染色による分子生物学的、病理学的検証を行い、OBの新規診断法、治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス同所性肺移植手技とサンプル採取、解析

C57BL/10 マウスの肺をドナー肺として、マイナー抗原不一致であるC57BL/6 マウスをレシピエントとして、吻合にはカフテクニックを用いて同所性左片肺移植を行った。移植後21日目にレシピエントを犠牲死させ、肺及び血清とともに、左縦隔リンパ節と脾臓、血清を採取した。コントロールとして、sham群に対しては開胸のみを施行した。

(2) 病理学的検証

術後21日目の移植肺をHematoxylin/Eosin染色、Masson-Trichrome染色により検証し、移植群をOB群と非OB(non-OB)群に分類した。

(3) マイクロアレイによる遺伝子発現網羅的解析

犠牲死させたマウスにおいてOB群(3例)、非OB群(3例)からそれぞれ別々に採取した肺からmRNAを抽出し、さらにsham群(3例)を用いてAgilent社のマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、OBで特異的に上昇・低下を認める遺伝子群を抽出し、機能解析としてGO(Gene Ontology)解析を行った。

(4) Real-time PCRによる検証

同定された遺伝子に対して、個体数を追加し、各群5例以上を用いてReal-time PCR(polymerase chain reaction)法により検証した。また縦隔リンパ節、脾臓に関しても肺と同様にmRNAを抽出し、Real-time PCR法により検証した。

(5) 免疫染色

OBにて遺伝子発現上昇を認めたパスウェイの中から重要と思われるT・B細胞、C4d、MHC classII分子を免疫染色にて形態学的評価を行った。

(6) ELISAによるIgG3解析

OBにて発現亢進を認めたIgGのサブクラスであるIgG3に対してはELISA解析を行った。個体数は各群5例以上を用いて検証した。

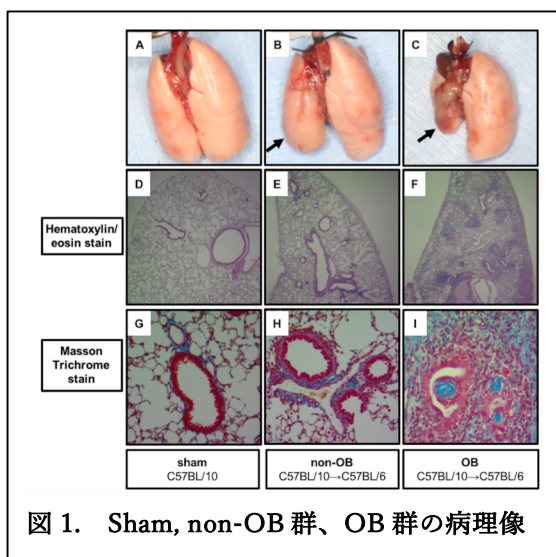


図1. Sham, non-OB群、OB群の病理像

4. 研究成果

(1) 病理学的評価

当モデルにおいて移植後21日目に約50%の確率でOBを発症する事を確認した(図1)。また免疫染色標本ではB細胞(CD45R陽性細胞)がT細胞とともに末梢気管支周囲に浸潤し、リンパ組織新生を生じている事を確認した(図2)。MHC classII分子は気管支上皮に高発現し、抗体関連拒絶のマーカーであるC4dはマクロファージと思われる細胞質に陽性であった。

(2) マイクロアレイによる遺伝子発現解析

sham群と比較し、OB群では1343個の遺伝子において有意に発現上昇を認め、GO解析ではToll like receptor等のinnate immunity(自然免疫)やB細胞、MHC classIIによる抗原提示を含めたadaptive immunity(獲得免疫)のパスウェイが含まれている。

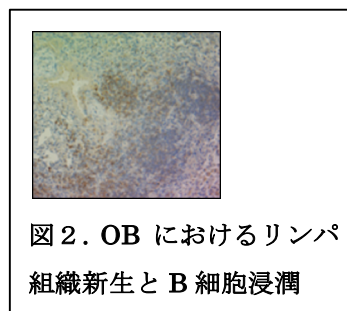


図2. OBにおけるリンパ組織新生とB細胞浸潤

た (図 3)。またそれらのパスウェイを構成する遺伝子群における階層的クラスタリングでも OB 群においてクラスター形成を認めた (図 4)。一方、OB 群で発現低下を認めたものを検証すると、繊毛運動に関与するパスウェイを有意に認めた。

(3) リアルタイム PCR における検証

G0 解析で重要なパスウェイと考えられたものの中から遺伝子を抽出し、リアルタイム PCR による検証を行ったところ、特定の Toll-like receptor やケモカインなどが肺のみならず、リンパ節でも共通して発現亢進を認めた。対照的に脾臓における解析ではこれらの遺伝子において 3 群間で差を認めなかった。

(4) ELISA における IgG3 解析

抗体関連拒絶と密接な IgG3 の発現上昇が OB 群にて確認されたため、血清における IgG3 を ELISA にて検証したところ、有意に上昇を認めた (図 5)。

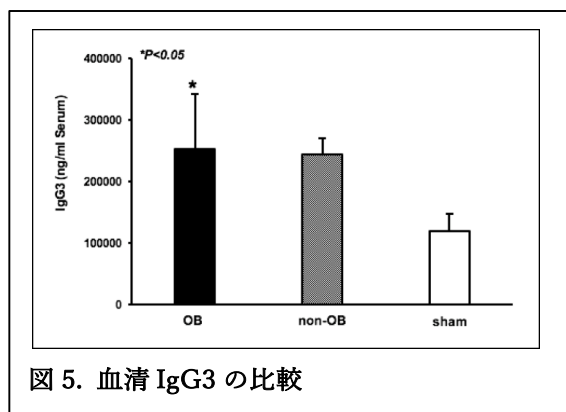


図 5. 血清 IgG3 の比較

(今後の展望)

肺やリンパ節で共通して発現亢進しているパスウェイ、遺伝子を同定した事は、侵襲的かつ診断率の低い肺生検の代替手段として、EBUS-TBNA などを用いたリンパ節生検が診断法に有用である可能性を示している。また今回のモデルは実臨床でもまれに行われるマイナー抗原不適合を使用しており、このモデルで、B 細胞を含む獲得免疫から自然免疫まで様々な免疫のパスウェイの上昇を確認した事は、通常懸念される MHC 不適合と同様にマイナー抗原不適合もこれらのさまざまな免疫反応を惹起する事を示した世界初の実験であった。IgG3 などの抗体関連拒絶も慢性拒絶に影響している可能性が示唆され、今後これらに対する治療法の検証にも当モデルが利用可能である事が示唆された。今回予想していた線維化のマーカーの発現上昇は認められず、当初予定していたピルフェニドンの効果検証は行わなかったが、今後は抗体関連拒絶に対する治療薬の検証を考えている。さらに今回のマーカー遺伝子をさらに詳細に検証するため、経時的変化や Western blot 等を用いたタンパク質解析を検討している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)
[学会発表] (計 3 件)

- (1) [Hata A](#), Suzuki H, Oeda H, Nishii K, Kaiho T, Ohashi K, Shiina Y, Sata Y, Toyoda T, Sakairi Y, Tamura H, Fujiwara T, Wada H, Nakajima T, Yamada Y, Chiyo M, Yoshino I. Gene Expression Profiling in murine orthotopic lung transplantation model of chronic lung allograft dysfunction (CLAD). ISHLT 38th Annual Meeting and Scientific Sessions. 2018.
- (2) 畑 敦、鈴木秀海、椎名裕樹、坂入祐一、田村 創、藤原大樹、和田啓伸、中島崇裕、千代

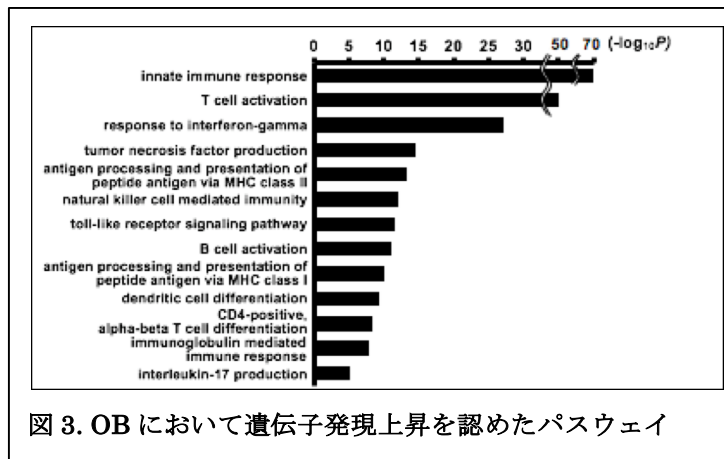


図 3. OB において遺伝子発現上昇を認めたパスウェイ

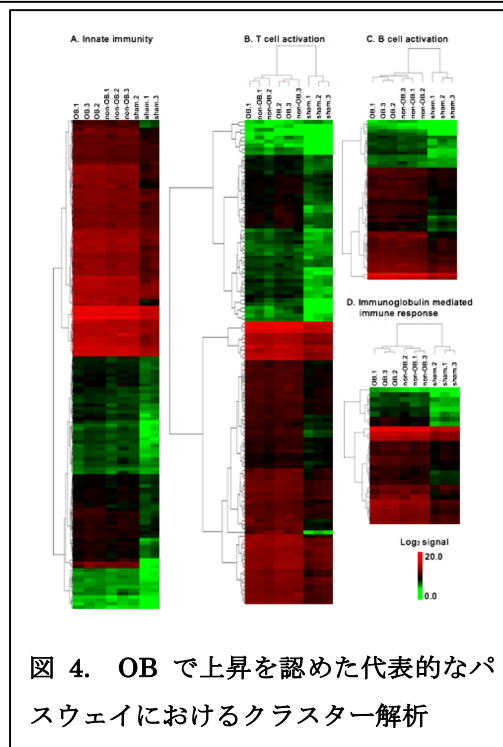


図 4. OB で上昇を認めた代表的なパスウェイにおけるクラスタ解析

- 雅子、吉野一郎 肺移植成績向上のための研究基盤の確立に向けて—マウスモデルによる肺移植後慢性拒絶の病態解明と克服—、第 70 回日本胸部外科学会定期学術集会、2017 年
- (3) 畑 敦、鈴木秀海、椎名裕樹、坂入祐一、田村創、藤原大樹、和田啓伸、中島崇裕、千代雅子、吉野一郎・肺移植後慢性拒絶反応の病態解明：肺移植成績向上のための基礎的取り組み、第 53 回日本移植学会総会、2017 年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：鈴木秀海

ローマ字氏名：Hidemi Suzuki

千葉大学大学院医学研究院 呼吸器病態外科学

研究協力者氏名：中島崇裕

ローマ字氏名：Takahiro Nakajima

千葉大学大学院医学研究院 呼吸器病態外科学

研究協力者氏名：和田啓伸

ローマ字氏名：Hironobu Wada

千葉大学大学院医学研究院 呼吸器病態外科学

研究協力者氏名：岩田剛和

ローマ字氏名：Takekazu Iwata

千葉大学大学院医学研究院 呼吸器病態外科学

研究協力者氏名：本橋新一郎

ローマ字氏名：Shinichiro Motohashi

千葉大学大学院医学研究院 免疫細胞医学

研究協力者氏名：金田篤志

ローマ字氏名：Atsushi Kaneda

千葉大学大学院医学研究院 分子腫瘍学

研究協力者氏名：吉野一郎

ローマ字氏名：Ichiro Yoshino

千葉大学大学院医学研究院 呼吸器病態外科学