

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02893

研究課題名(和文) 肺移植後の慢性拒絶撲滅を目指す、自然免疫を温存した選択的免疫抑制療法の創出

研究課題名(英文) Development of selective immunosuppressive therapy preserving natural immunity for treating chronic rejection after lung transplantation

研究代表者

芳川 豊史 (Yoshikawa, Toyofumi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00452334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺移植の長期予後を阻む最大の原因は、「慢性拒絶」が主体の、慢性期移植肺機能不全(CLAD)であるが、その病態は未だ不明で有効な治療法もない。肺は、外界と直接通じる臓器のため、免疫力が元来強く拒絶を起こしやすいが、感染症を併発する可能性も高い。よって、肺移植では、感染に対する免疫力を低下させない「選択的な免疫抑制」が重要である。そこで、「感染免疫を低下させない免疫抑制剤」として、免疫抑制剤としては新規のメカニズムを有する、MEK阻害剤に着眼し、小動物肺移植モデルを用いて、MEK阻害剤(Trametinib)が、肺の慢性拒絶を軽減することを多角的に証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界だけでなく本邦においても、肺移植は年々増加しており、慢性呼吸不全に対する最後の砦としての医療として確立した。しかしながら長期予後は満足が行くものではない。現在、肺移植において最も克服すべき課題は、慢性期死亡の最大の原因である、「慢性拒絶」が主体の慢性期移植肺機能不全(CLAD)である。今回、我々は、感染に対する免疫力を低下させない「選択的な免疫抑制」に着眼し、免疫抑制剤としては新規のメカニズムを有する、MEK阻害剤(Trametinib)が、肺の慢性拒絶を軽減することを世界で初めて証明した。本研究の学術的意義は大きく、今後、臨床応用を含めた展開が期待され、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：The greatest cause to prevent long-term survival after lung transplantation is chronic allograft dysfunction (CLAD), which is mainly due to chronic rejection. The etiology of CLAD remains unknown and there is no proper therapy for progressive CLAD. Since lungs communicate with the outer world, immunity in lungs is developed, while lungs are susceptible to infection. Thus, in lung transplantation, it is crucial to develop a selective immune suppression which does not decrease immunity against infection. Herein, we focused on a MEK inhibitor (trametinib), which has a new mechanism for immunosuppression, as an immunosuppressant which does not decrease immunity against infection. We performed several studies to prove that a MEK inhibitor alleviated chronic rejection in a rat lung transplantation model.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺移植 慢性拒絶 免疫抑制自然免疫

1. 研究開始当初の背景

肺移植は、末期呼吸不全に対する最終手段としての医療として確立し、1年生存率は85%を越えるようになった。しかしながら、長期予後は厳しく、5年生存率は未だ50%程度であり、長期予後は未だ満足のいく数字とは言えない。長期予後を阻む主因は、慢性移植肺機能不全(Chronic lung allograft dysfunction: CLAD)と近年呼称される、いわゆる「慢性拒絶」である。CLADの病因や病態がほとんど解明されておらず、現に、CLADの動物モデル作成や同モデルを用いた研究など、ほとんど報告されていない。

したがって、現状を打破するために、CLADの小動物モデルを確立し、CLADの病態に迫る研究を行うことが喫緊の課題と考え、研究代表者らのチームは、これまでに、CLADの小動物モデルを確立する試み [1] や、移植肺におけるドナー特異的抗体産生 [2] など、臨床と基礎の両面から検討してきた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの成果を踏まえ、より臨床の状況に近いCLADの小動物モデルを作成することを第一の目的とする。

また、肺は外界と直接通じるため、病原性微生物に暴露される機会が多い。そのことは高い感染症のリスクを孕む一方、多数の免疫担当細胞を保有するため、移植片拒絶を生じやすい素地をも意味する。したがって肺移植では、感染免疫は温存しつつ、しかし慢性拒絶は抑制する、「選択的免疫抑制」が重要となる。そこで、造血幹細胞移植領域で抗腫瘍免疫や感染免疫を温存しつつ、移植片対宿主病だけを選択的に抑制するという概念を提唱した共同研究者とともに、今回、MEK阻害剤を「感染免疫を低下させない免疫抑制剤」として肺移植で使用することを考案した。したがって、自然免疫を低下させないMEK阻害剤を用いた、肺移植における新規免疫抑制法を開発する、ことを本研究の第二の目的とする。

3. 研究の方法

本研究の最終目標は、CLADの解明と肺移植における新規免疫抑制法を開発することである。研究期間内には、以下の二つの課題に取り組む。

(1) ラットCLADモデルの確立とCLADの病態解明

LewisラットとBrown Norwayラットを用いた同所性片肺移植を行い、LPSによる気道刺激を追加する。LPS投与の頻度、回数、免疫抑制剤の投与量を調整し、ヒトのCLADを模倣したモデルを作成する。さらに、CLADの病態解明を目指す。

(2) CLADモデルにおけるMEK阻害剤投与による治療

CLADモデルを用いて、MEK阻害剤のCLADの進展を抑える効果を多角的に検討する。

cyclosporine A の投与のタイミングなどで、ラット左片肺移植モデルとして、Major histocompatibility complex (MHC)ミスマッチと Minor histocompatibility complex (MiHC)ミスマッチの2種類を作成できたが、主にMHCミスマッチモデルを用いて実験を行った。なお、MEK阻害剤として、trametinibを使用した。

4. 研究成果

(1) ラット CLAD モデルの確立と CLAD の病態の解明

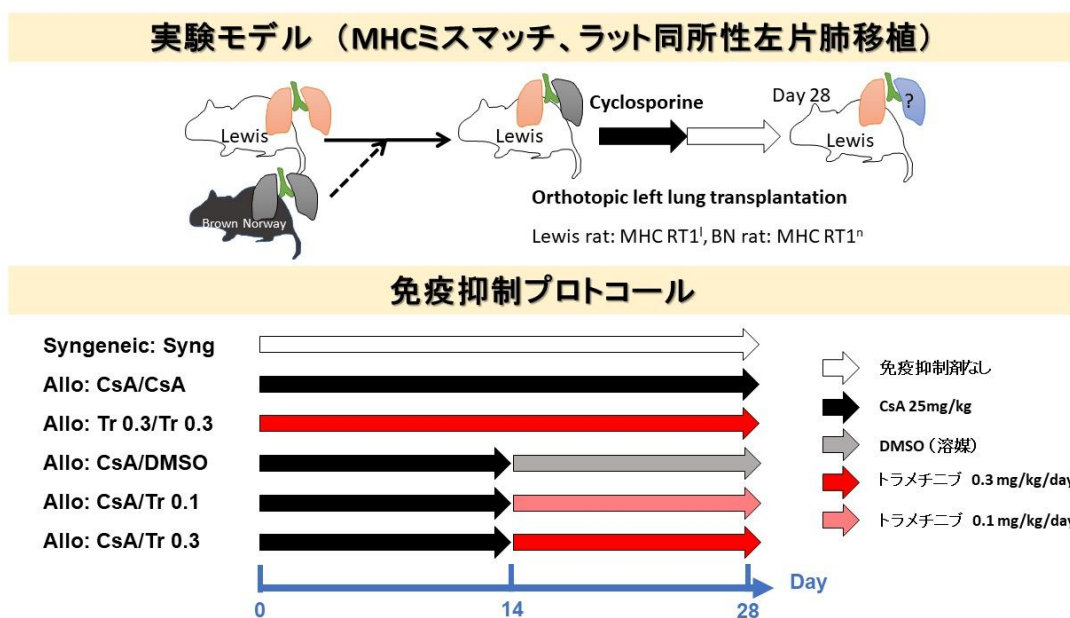
Lewis ラットと Brown Norway ラットを用いた同所性片肺移植が安定して行い得ることをまず確認しモデルの確立を行った。

その後、LPS による気道刺激を追加し、LPS 投与の頻度、回数、免疫抑制剤の投与量の最適化を行い、ヒトの CLAD を模倣したモデルを作成することに成功した。本 CLAD モデルでは、いわゆる RAS ではなく、BOS タイプの CLAD モデルとなることが確認された。

本成果は、Transplantation という本分野でのトップジャーナルである英文誌に採択された [3]。

(2) CLAD モデルにおける MEK 阻害剤投与による治療

MHC ミスマッチモデルでは、移植後に cyclosporine A (CsA)と MEK 阻害剤 trametinib(Tra)、溶媒である DMSO を単剤で 28 日間投与する群 (CsA/CsA、Tra/Tra、DMSO/DMSO) に加え、CsA を Day14 まで投与した後に CsA から Tra または DMSO に変更して Day28 まで投与する群 (CsA/Tra、CsA/DMSO) を置いた。28 日目のグラフト肺の所見を群間で比較した。MiHC ミスマッチモデルでは、CsA、Tra、DMSO の単剤投与を行い 14 日目に評価を行った (図 1)。



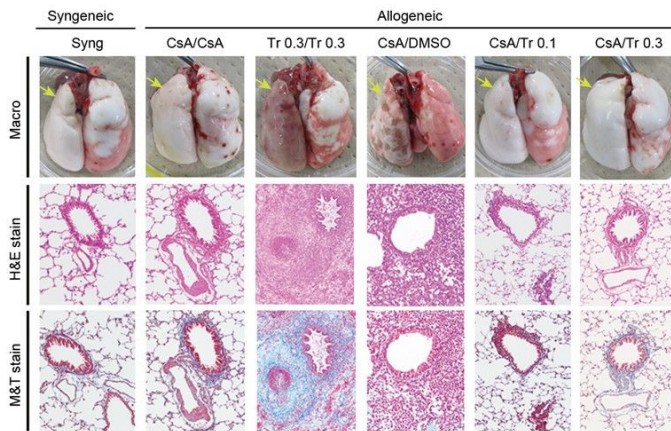
(図 1)

MHC ミスマッチ移植の DMSO/DMSO 群でみられた高度線維化と炎症細胞浸潤は Tra/Tra 群では抑制されなかったが、Day 14 で CsA から Tra に切り換えた CsA/Tra 群では CsA/DMSO 群に比して炎症

細胞浸潤が軽減し肺機能は温存された(図2)

trametinibは、CsA 2週投与後に起こる拒絶反応を抑制する

肺移植後28日目の肉眼所見、病理所見



急性拒絶 grading*

A grade 急性拒絶反応	
0	血管周囲の単核球浸潤、出血、壊死がみられない
1	血管周囲の炎症細胞浸潤が散在性に少数確認
2	弱拡大でも確認できる炎症細胞浸潤
3	血管周囲に強い単核球浸潤、好中球も混在する。
4	血管周囲に強い単核球浸潤、好中球も混在する。 血管周囲の炎症細胞は減少。硝子膜形成。出血。梗塞。
B grade 気管支の炎症	
0	細気管支の炎症が認められない
1R	細気管支の粘膜下層に軽度の単核球浸潤あり。
2R	気管支の粘膜下層内に強い炎症相浸潤あり。

* Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection
Susan Stewart, et al. *J Heart Lung Transplant* 2007 Dec;26(12):1229-42. doi: 10.1016/j.healun.2007.10.017.

(図2)

CsA/Tra 群ではグラフト内の CD4⁺CD62L⁺ T 細胞の比率が高く、末梢血と脾臓の CD3⁺CD45RA⁺ B 細胞比率が低かったことから、trametinib の投与で T/B 細胞の機能分化が抑制されたと考えられた。Day 28 におけるレシピエントの胸腺機能を CD4⁺8⁺および CD4⁺8⁺T 細胞と TCRab 鎖発現、AIRE 抗原陽性細胞の比率で評価したところ、CsA/Tra 群では CsA/CsA 群に比して T 細胞の分化が温存された。移植後 14 日目にはグラフト肺におけるドナー B 細胞がほぼ枯渇していたことをふまえると、MEK 阻害剤が遅発性拒絶に有効性を示したことは、グラフト肺内の抗原提示細胞がドナーからレシピエントに置き換わることと関連する可能性が考えられた。

一般に、移植後の急性拒絶にはドナー抗原提示細胞による抗原提示が重要で、direct presentation と呼ばれる。一方遅発性拒絶にはレシピエント由来抗原提示細胞が重要で、indirect presentation と呼ばれる。また MiHC ミスマッチ移植では indirect 経路が重要とされるが、今回 MiHC ミスマッチモデルで Tra の単独投与が炎症細胞浸潤を軽減した。これらの結果は、MEK 阻害剤が indirect 経路を抑制する可能性を示唆している。

肺移植後の拒絶反応が発生した場合、T 細胞内では MAPK 経路を用いたシグナル伝達が活性化されるが、Trametinib がこのシグナルを阻害することにより拒絶反応を減弱させたと考えられる。さらに、T 細胞、B 細胞共に機能的分化を抑制すること、既存薬である CsA 比較して胸腺の T 細胞分化、成熟を抑制しないこと、抗原認識において Indirect 経路が trametinib の効果と関連がある可能性を報告し、肺移植後のグラフト機能不全に対する有効な治療法の一つとなる可能性を示した。

結論として、MEK 阻害剤である trametinib は、肺移植後の拒絶反応に起因する炎症細胞浸潤を軽減しつつグラフト機能と胸腺機能を温存すると考えられる。なお、本成果は、*Am J Respir Cell Mol Biol* という呼吸器の基礎研究ではトップジャーナルに数えられる英文誌に採択された [4]。

文献

1) Miyamoto E, Motoyama H, Sato M, Aoyama A, Menju T, Shikuma K, Sowa T, Yoshizawa A, Saito M, Takahagi A, Tanaka S, Takahashi M, Ohata K, Kondo T, Hijiya K, Chen-Yoshikawa TF, Date H.

Association of Local Intrapulmonary Production of Antibodies Specific to Donor Major Histocompatibility Complex Class I with the Progression of Chronic Rejection of Lung Allografts. *Transplantation*. 2017 May;101(5):e156-e165.

2) Chen F, Miyagawa-Hayashino A, Yurugi K, Chibana N, Yamada T, Sato M, Aoyama A, Takakura S, Bando T, Date H. Redo Living-Donor Lobar Lung Transplantation for Bronchiolitis Obliterans Associated with Antibody-Mediated Rejection *Transpl Int*. 2014 Feb;27(2):e8-e12.

3) Takahagi A, Sato M, Chen-Yoshikawa TF, Miyamoto E, Saito M, Gochi F, Hamaji M, Yoshizawa A, Terasaki Y, Urushiyama H, Aoyama A, Sonobe M, Date H. LPS-induced airway-centered inflammation leading to BOS-like airway remodeling distinct from RAS-like fibrosis in rat lung transplantation. *Transplantation*. 2020; 104: 1150-1158.

4) Takahagi A, Shindo T, Chen-Yoshikawa TF, Yoshizawa A, Gochi F, Miyamoto E, Saito M, Tanaka S, Motoyama H, Date H. Trametinib attenuates delayed rejection and preserves thymic function following rat lung transplantation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2019 Sep;61(3):355-366.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahagi A, Shindo T, Chen-Yoshikawa TF, Yoshizawa A, Gochi F, Miyamoto E, Saito M, Tanaka S, Motoyama H, Aoyama A, Takaori-Kondo A, Date H	4. 巻 61
2. 論文標題 Trametinib Attenuates Delayed Rejection and Preserves Thymic Function in Rat Lung Transplantation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Respir Cell Mol Biol	6. 最初と最後の頁 3550366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2018-01880C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Chen-Yoshikawa TF	4. 巻 157
2. 論文標題 Commentary: Promising future solution for unmet needs in lung transplantation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Thorac Cardiovasc Surg	6. 最初と最後の頁 2107-2108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtcvs.2018.12.064. Epub 2018 Dec 27.	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Chen-Yoshikawa TF, Tanaka S, Yamada Y, Yutaka Y, Nakajima D, Ohsumi A, Hamaji M, Menju T, Date H	4. 巻 56
2. 論文標題 Intermediate outcomes of right-to-left inverted living-donor lobar lung transplantation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Cardiothorac Surg	6. 最初と最後の頁 1046-1053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ejcts/ezz244	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 -
1. 著者名 Takahagi A, Shindo T, Chen-Yoshikawa TF, Yoshizawa A, Gochi F, Miyamoto E, Saito M, Tanaka S, Motoyama H, Date H	4. 巻 61
2. 論文標題 Trametinib attenuates delayed rejection and preserves thymic function following rat lung transplantation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Respir Cell Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 355-366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2018-01880C	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10件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Chen-Yoshikawa TF
2. 発表標題 Living lung transplantation
3. 学会等名 7th Shenzhen International Conference on Thoracic Surgery Shenzhen (China) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 陳 豊史、田中里奈、山田義人、豊洋次郎、中島大輔、大角明宏、濱路政嗣、伊達洋至
2. 発表標題 肺移植における悪性疾患
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 陳 豊史、合地史明、大角明宏、田中里奈、山田義人、豊洋次郎、中島大輔、濱路政嗣、伊達洋至
2. 発表標題 肺移植におけるドナー特異的抗体の検討
3. 学会等名 第28回日本組織適合性学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 合地史明、陳 豊史、尾田博美、横山雄平、池田政樹、上田聡司、栢分秀直、徳野純子、山岸弘哉、田中里奈、山田義人、大角明宏、豊洋次郎、中島大輔、濱路政嗣、万木紀美子、菱田理恵、前川平、伊達洋至
2. 発表標題 生体肺移植術後de novo DSAとHLA eplet ミスマッチの検討
3. 学会等名 第28回日本組織適合性学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chen-Yoshikawa TF, Yamada Y, Yutaka Y, Nakajima D, Ohsumi A, Hamaji M, Date H
2. 発表標題 Intermediate outcomes of right-to-left inverted living-donor lobar lung transplantation
3. 学会等名 27th ESTS meeting (European Conference on General Thoracic Surgery) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chen-Yoshikawa TF, Gochi F, Ohsumi A Yamada Y, Yutaka Y, Nakajima D, Hamaji M, Date H
2. 発表標題 Comparison of De Novo Donor-Specific Anti-HLA Antibodies (DSAs) between Living-Donor Lobar Lung Transplantation and Cadaveric Lung Transplantation
3. 学会等名 SHLT 39th Annual Meeting and Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 陳 豊史
2. 発表標題 肺移植における抗HLA 抗体診療の現状
3. 学会等名 第27回日本組織適合性学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 陳 豊史
2. 発表標題 本邦の肺移植における組織適合性検査の現状と課題
3. 学会等名 第54回日本移植学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 陳 豊史
2. 発表標題 肺移植におけるDSAの現状と今後
3. 学会等名 第5回日本移植学会スプリングセミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 合地史明、陳豊史
2. 発表標題 Characteristics of de novo donor-specific anti-HLA antibodies (DSAs) in living-donor lobar and cadaveric lung transplantation.
3. 学会等名 ISHLT 38th Annual Meeting and Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 伊達 洋至、平井 豊博	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 9
3. 書名 最新呼吸器内科・外科学	

〔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	進藤 岳郎 (Shindo Takero) (10646706)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	伊達 洋至 (Date Hiroshi) (60252962)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	祝迫 恵子 (Iwaisako Keiko) (70625300)	同志社大学・生命医科学部・教授 (34310)	
研究分担者	吉澤 明彦 (Yoshizawa Akihiko) (80378645)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関