

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08777

研究課題名(和文) Type 1 regulatory T細胞による肺移植後の新規免疫抑制療法

研究課題名(英文) A novel immunosuppressive therapy by Type 1 regulatory T cells after lung transplantation

研究代表者

大石 久 (Hisashi, Oishi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60451580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、制御性T細胞のサブセットの1つであるType 1 regulatory T(Tr1)細胞を利用した慢性移植肺機能不全(Chronic lung allograft dysfunction: CLAD)に対する細胞治療の可能性を研究した。CTLA4-Ig製剤はTr1細胞誘導効果があることから、CTLA4-Ig製剤をCLADの動物モデルとして確立しているマウス肺内気管移植モデルにて投与した。移植された気管内の線維性閉塞を有意に抑制することが明らかとなり、CLADの抑制効果が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は肺移植後の慢性期予後に重大な影響を及ぼす慢性移植肺機能不全(Chronic lung allograft dysfunction: CLAD)の治療や予防として、CTLA4-Ig製剤が有効である可能性を示した。現在の医療では、CLADに対する確立した治療法はなく、本研究成果は肺移植医療に大きなインパクトを与えると考える。さらに、CTLA4-Ig製剤はすでに慢性関節リウマチに対しては、国内で承認されている薬剤であり、CLADの治療法としても、臨床応用に非常に近い状態にあるといえる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the potential of a therapy for chronic lung allograft dysfunction (CLAD) using Type 1 regulatory T (Tr1) cells, which is one of a subset of regulatory T cells. We examined the effect of CTLA4-Ig in a mouse intrapulmonary tracheal transplant model, which is an established animal model of CLAD. CTLA4-Ig was reported to induce Tr1 cells. It was clarified that the fibrous occlusion in the transplanted trachea was significantly suppressed, and the effect of inhibiting CLAD by CTLA4-Ig was shown.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺移植 慢性移植肺機能不全 Type 1 regulatory T 細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺移植後の5年生存率は54%であり、他の臓器移植に比較し、予後は不良である。その主な原因のひとつは、肺移植後慢性期(術後1年目以降)の死因のトップである慢性拒絶反応である。その病態は、拒絶反応に伴う炎症とそれに引き続く線維化であり、近年は慢性移植肺機能不全(Chronic lung allograft dysfunction: CLAD)と呼ばれる。有効な治療法は確立しておらず、年間多くの肺移植レシピエントがCLADにより死亡したり、再移植を要したりしている。拒絶反応がその病態のベースとなっていると考えられているが、肺はリンパ組織が豊富な臓器であるために拒絶反応の制御が他臓器に比較して難しく、事実、肺移植レシピエントは他の臓器移植レシピエントに比べ、高用量の免疫抑制剤を要し、さらにこの免疫抑制療法の強化により、腎障害、糖尿病、高コレステロール血症、骨髄抑制、骨粗鬆症といった合併症を起こす可能性が高まる。これらの問題を克服し、肺移植後の予後を改善するためには、より毒性の少ない、新たな拒絶反応制御法を用いた、CLADに対する新たな治療戦略を開発することが急務である。制御性T細胞は臓器移植後の免疫寛容において重要な役割を果たすといわれている。そのサブセットの1つであるType 1 regulatory T(Tr1)細胞は、アンチインフラマトリー(抗炎症)サイトカインであるIL-10を高濃度に産生することから、近年は臓器移植において注目されつつある。しかし、Tr1細胞の臓器移植における詳細な役割や、Tr1細胞の投与や誘導が拒絶反応の抑制につながるのか、など明らかになっていないことが多い。

### 2. 研究の目的

Tr1細胞による細胞治療やレシピエント体内でのTr1細胞の誘導を、臓器移植後の新規免疫抑制療法として開発することが可能であるかどうかを検討することを研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) Tr1細胞の分離方法の確立

Nature Medicine (Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. 2013)に報告された染色方法を応用し、自動磁気細胞分離装置またはフローサイトメトリーのセルソーティングの技術により、マウスの脾臓から、Tr1細胞の分離を行った。

#### (2) マウス肺内気管移植モデルにおけるTr1細胞の投与効果の検討

マウス肺内気管移植モデルを用いて、Tr1細胞の投与の効果を検討する予定であった。しかし、上記において、細胞治療に十分な細胞数のTr1細胞を得られないことが判明したため、下記の実験に進めることとなった。

#### (3) マウス肺内気管移植モデルにおけるTr1細胞誘導効果の検討

マウス肺内気管移植モデルは肺移植後のCLADのモデルとして確立しており、移植した気管支内腔の線維化をきたし、その病理像はヒト肺移植後のCLADに類似する。(Matsuda Y, et al. Spleen Tyrosine Kinase Modulates Fibrous Airway Obliteration and Associated Lymphoid Neogenesis After Transplantation. Am J Transplant. 2015.)この実験では、Tr1細胞の誘導が、CLADに何らかの影響を及ぼすかどうかを検討することとした。

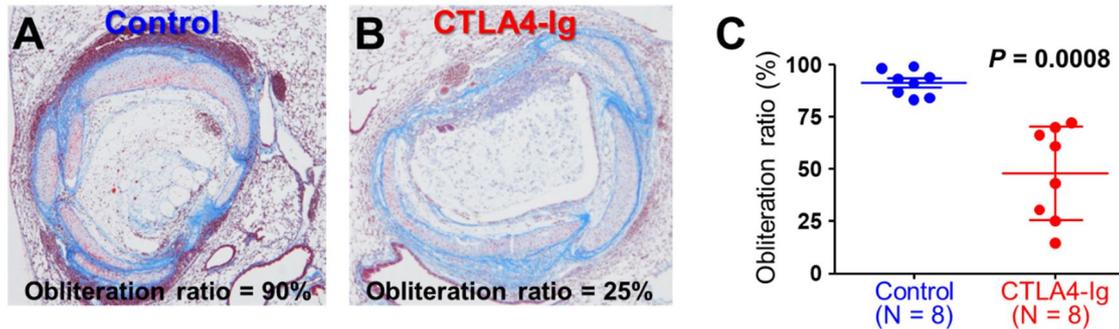
ある臨床研究では、関節リウマチの治療として、国内で承認を得たアバタセプト(CTLA4-Ig製剤)の投与は、その患者の末梢血においてIL-10産生LAG-3陽性細胞を誘導することが報告されている(Nakachi S, et al.: Interleukin-10-producing LAG3+ regulatory T cells are associated with disease activity and abatacept treatment in rheumatoid arthritis. Arthritis Research & Therapy 2017.)。同細胞はその他のさまざまな報告からTr1細胞と考えられている。

マウス肺内気管移植モデルにおいて、移植後当日・7・14・21日目にCTLA4-Ig製剤の投与を行い、28日目にマウスを犠牲死させて分子生物学的・組織学的評価を行った。28日後に犠牲死させ、肺および移植気管を摘出し、以下の3つ項目について、両群で比較検討した。(A)移植気管内腔の閉塞率の検討: Masson-trichrome染色を行い、移植気管内腔の線維化を、その閉塞率を算出することにより、コントロール群とCTLA4-Ig投与群で比較検討する。(B)蛍光免疫染色およびフローサイトメトリーを用いたTr1細胞の検討: 蛍光免疫染色によるTr1細胞の集積の程度や分布を検索した。フローサイトメトリーにより、Tr1細胞数を定量的に観察した。(C)RT-PCRによるサイトカインの発現の検討: 肺内気管移植した肺からmRNAを抽出し、各種サイトカイン・ケモカインの発現を検討した。

### 4. 研究成果

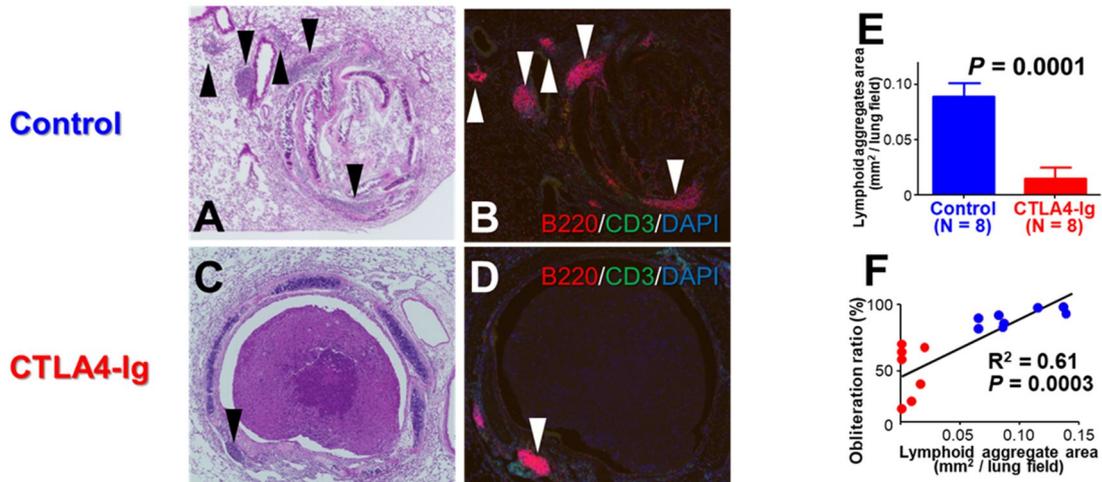
上記の“研究の方法”で述べたとおり、Tr1 細胞を利用した細胞治療として、CLAD モデルのひとつであるマウス肺内気管移植モデルにおける Tr1 細胞の投与効果の検討を行う予定であったが、十分な数の Tr1 細胞を得られなかったため、CTLA4-Ig による Tr1 細胞誘導効果による実験を行うこととなった。

マウス肺内気管移植モデルにおける CTLA4-Ig 製剤の投与は、移植気管の線維性閉塞を有意に抑制させた。(移植気管閉塞率; コントロール群 vs. CTLA4-Ig 群 =  $91.18 \pm 2.14\%$  vs.  $47.84 \pm 7.93\%$ ,  $p < 0.001$ )。

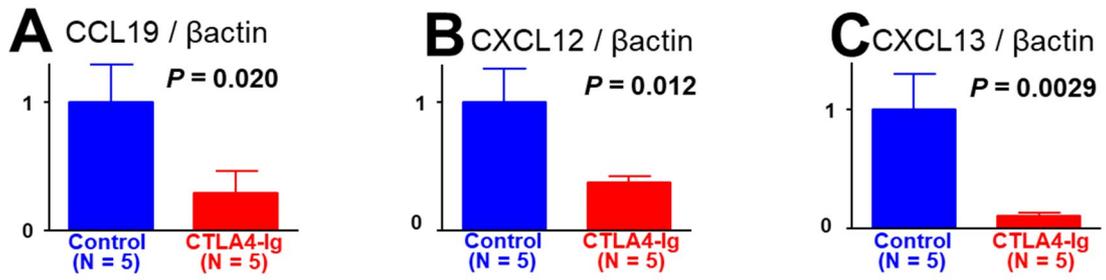


蛍光免疫染色およびフローサイトメトリーを用いて Tr1 細胞の分布を検討した。レシピエント肺・末梢血・縦隔リンパ節にて検討したが、CTLA4-Ig 投与による、Tr1 細胞数の有意な増加は証明できなかった。

我々はメカニズムを解明していく上で、CLAD の病態解明のキーになるとされ、近年注目されている lymphoid neogenesis (LG) に着目した。LG は、リンパ節などの二次リンパ器官に似た構造をもつ三次リンパ器官 (tertiary lymphoid organ, TLO) が形成される現象をさし、ヒト肺移植後の CLAD の肺内には TLO が形成されていること (LG が生じていること) が報告されている。本研究でも、CTLA4-Ig 投与群では気管周囲の TLO の面積が有意に減少していた (下図 A, B, C, D, E)。さらに TLO の面積と気管内の線維性閉塞率の間には有意な正の相関が認められた (下図 F)。



LG 関連のサイトカイン、ケモカイン遺伝子発現の定量 RT-PCR を行った。T 細胞の誘導や遊走に関わる CCL19 が CTLA4-Ig 群で有意に低値であった。B 細胞の誘導や遊走に関わる CXCL12、CXCL13 も CTLA4-Ig 群において有意に低値であった。



CTLA4-Ig 投与は CLAD を予防し、そのメカニズムには LG の抑制が関与していることが明らかとなり、CTLA4-Ig はヒト肺移植後の CLAD の抑制に有効である可能性が示唆された。

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 1件）

1. 著者名 Yamato Suzuki, Hisashi Oishi, Masahiko Kanehira, Yasushi Matsuda, Takashi Hirama, Masafumi Noda, Yoshinori Okada.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Effect of CTLA4-Ig on Obliterative Bronchiolitis in a Mouse Intrapulmonary Tracheal Transplantation Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Thorac Cardiovasc Surg	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木大和, 大石 久, 兼平雅彦, 松田安史, 佐渡 哲, 野田雅史, 桜田 晃, 岡田克典
2. 発表標題 マウス肺内気管移植モデルにおけるCTLA4-Igによる気管の線維性閉塞抑制効果の検討
3. 学会等名 第 35回日本肺および心肺移植研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木大和, 大石 久, 兼平雅彦, 渡辺有為, 野津田泰嗣, 平間 崇, 鈴木隆哉, 松田安史, 佐渡 哲, 野田雅史, 舟橋淳一, 桜田 晃, 岡田克典.
2. 発表標題 肺移植後閉塞性細気管支炎に対するCTLA4-Igの線維性閉塞抑制効果の検討-マウス肺内気管移植モデルを用いて-
3. 学会等名 第35回日本肺および心肺移植研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamato Suzuki, Hisashi Oishi, Masahiko Kanehira, Yasushi Matsuda, Tetsu Sado, Masafumi Noda, Jun-ichi Funahashi, Akira Sakurada, Yoshinori Okada
2. 発表標題 CTLA4-Ig attenuates fibrous airway obliteration in a mouse intrapulmonary tracheal transplantation model
3. 学会等名 The International Society for Heart and Lung Transplantation 38th Annual Meeting and Scientific Sessions (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	松田 安史 (Matsuda Yasushi) (00455833)	藤田医科大学・医学部・准教授  (33916)	
研究分担者	野田 雅史 (Noda Masafumi) (70400356)	東北大学・大学病院・講師  (11301)	
研究分担者	岡田 克典 (Okada Yoshinori) (90323104)	東北大学・加齢医学研究所・教授  (11301)	
研究分担者	兼平 雅彦 (Kanehira Masahiko) (90374941)	山梨大学・大学院総合研究部・准教授  (13501)	

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
---------	---------