

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08778

研究課題名(和文) 肺移植後急性・慢性拒絶反応を抑制するIL-2複合体の臨床応用に向けた研究

研究課題名(英文) Induction of persistent lung transplant tolerance by IL-2 complex-stimulated regulatory T cells: a study for the clinical application

研究代表者

山田 義人 (Yamada, Yoshito)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：80375691

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)：CD25受容体に親和性を持たせたIL-2抗体(JES6-1)とIL-2の複合体で制御性T細胞(Treg)を誘導できる。これを用いて、MHC完全ミスマッチ間マウス肺移植のアログラフト生着が90日以上に渡って維持された。ジフテリアトキシンによるTreg失活マウスで同様の実験を行うと、IL-2cx投与にも関わらずグラフトは短期で拒絶された。また、各組織のTregをFACSで測定するとTregが誘導されていることが示された。以上より、Treg誘導によりマウス肺移植後拒絶反応を長期に抑制した。また、アログラフト内でのFoxp3+ Tregを含む三次リンパ構造が重要な役割を果たすことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺移植は末期呼吸器疾患に対する治療手段の一つである。1998年の本邦初症例以来、症例数は増加しており、一般呼吸器外科診療の一つとなった。一方で、肺移植術後慢性期の術後成績は長年停滞傾向となっている。本研究ではIL-2複合体によりマウス肺移植実験で長期に渡ってグラフト保護効果を示した。本法を用いた免疫制御法で、臨床肺移植で課題となっている慢性期免疫抑制治療戦略を改善できると考える。

研究成果の概要(英文)：Using targeted interleukin-2 (IL-2) pre-treatment in fully immunocompetent mice, we here achieved acceptance of fully mismatched lung allografts that remained functional for >90 days. These tolerogenic effects were controlled by graft-homing forkhead box p3 (Foxp3)+ regulatory T (Treg) cells. Thus, although circulating Treg cell counts rapidly returned to baseline following IL-2 pre-treatment, Foxp3+ Treg cells persisted in peribronchial areas of the grafted lung, forming bronchus-associated lymphoid tissues (BALT). Foxp3-transgenic mice with inducible deletion of Foxp3+ cells were unable to form organized BALT containing Foxp3+ Treg cells, as evidenced using microscopy-based calculation of ordered distribution, and these mice acutely rejected their lung allografts. Collectively, we report a high-intensity and biased IL-2 pre-conditioning able to induce Foxp3-controlled BALT to facilitate acceptance of vascularized and ventilated lung allografts without the need of immunosuppression.

研究分野：移植免疫

キーワード：肺移植術後拒絶反応 IL-2複合体 制御性T細胞 三次リンパ構造 慢性期肺移植片機能不全

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最終治療手段の一つである。一方で、長年の移植医療に対する研究にもかかわらず、慢性期における生存曲線はこの20年間でほぼ変わっていない。長期予後不良の最大の要因は慢性期移植肺機能不全(CLAD)である。また、術後5年以内に50%のレシピエントが経験する急性拒絶反応(ACR)は、CLADを引き起こす要因の一つである。ACRおよびCLADは、長期予後を改善するために克服すべき最大の課題となっている。

現在臨床で用いられている免疫抑制剤(サイクロスポリン、ステロイド等)は、主に免疫応答を抑制する作用の薬剤がほとんどだが、免疫制御系を賦活させる方法は未だ実用化に至っていない。既存の治療法では拒絶を抑えるには不十分な現状においては、新たなアプローチが求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス肺移植モデルで示された、IL-2cxを用いた免疫抑制効果を臨床応試験の段階に移行するための、準備を整えることである。

3. 研究の方法

マウス肺移植モデルのプロトコール

IL-2cxはBoyman教授の研究室で作成されたものを冷凍空輸し、冷凍庫で保存する。レシピエントマウス(C57BL/6)に対し、術前にヒトIL-2cx(5 μ g/day)を3日間腹腔内投与する。最終投与日の翌々日に、MHC完全ミスマッチのマウス(BALB/c)をドナーとしたマウス同所性左片肺移植をカフテクニック法で行う。IL-2cxの代わりにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を投与したマウスを対照群とする。手術日から犠牲死日まで、身体所見、異常行動の有無等を観察する。術後15日、30日、60日、90日で犠牲死させ、肺及び血漿とともに、縦郭リンパ節、脾臓を採取する。

呼吸生理学的評価・画像評価

人工呼吸器管理の上で、レシピエント固有の右肺の循環・換気を結紮により停止する。その上で、移植された左肺のコンプライアンス、血液ガスを測定する。

組織学的評価

レシピエントの両肺は病理組織検査を行い、HE染色とTrichrome染色を行い、国際心肺移植学会の基準に基づき、拒絶反応の点数化および閉塞性細気管支炎の診断を行う。

リンパ球動態の解析、サイトカイン分析

採取されたリンパ節、両肺、脾臓は、フローサイトメトリーによるリンパ球動態解析を行う。

4. 研究成果

(1) IL-2/JES6-1cxによるマウス左肺移植術後拒絶抑制効果

MHC完全ミスマッチ間でのマウス左肺移植を施行したところ、PBSが投与された対照群は移植後5日目で組織学的に急性拒絶所見が確認されたが、IL-2cx投与群では急性拒絶反応所見が抑制されていた。また、同様の傾向は術後15日、30日、60日、90日と長期に渡って効果が持続した。国際心肺移植学会(ISHLT)による拒絶スコアでは、全ての評価日においてIL-2cx群で優位に低い値となった。

グラフト肺の機能性を調べるために、肺コンプライアンスと血液ガスを術後5日目、15日目に測定した。両評価日ともIL-2cx群は優位に良好の肺コンプライアンスとPaO₂を示した。

(2) IL-2cxで誘導されたFoxp3+制御性T細胞がアログラフト保護に寄与する

上記で確認されたアログラフトの保護効果において、Foxp3+制御性T細胞が関与しているかどうかを確認した。そこで本実験ではFoxp3DTRトランスジェニックマウスを使用した。このマウスにおいてはジフテリア毒素によりFoxp3陽性細胞が失活する。同マウスで左肺移植を施行したところ、IL-2cx投与により上記同様拒絶反応は抑制されたが、ジフテリア毒素投与で制御性T細胞を失活させた群では、IL-2cx投与に関わらず拒絶所見が確認された。以上よりFoxp3陽性制御性T細胞がグラフト保護効果の機序と考えられた。

(3) 制御性T細胞はアログラフト保護とドレナージリンパ節、全身に分布する

制御性T細胞の発現と推移を、グラフト肺(左)、自己肺(右)、血液、脾臓、縦隔LNで検証した。IL-2cx群においては術後5日目をピークに制御性T細胞が誘導されたが、15日目から減弱し、30日以降は対照群と同等となった。

(4) アログラフト内Foxp3+制御性T細胞による気管支関連リンパ組織(BALT)の構築

慢性期における制御性T細胞数が減弱している中、制御性T細胞の分布を検証した。術後5日目においては、制御性T細胞の分布はIL-2cx群においても対照群においても均一に分布して

いた。5日目以降では、IL-2cx 群では制御性 T 細胞は血管・気管支周囲へ集簇するようになったが、対照群では引き続きランダムに散布していた。この傾向を評価するため、Foxp3+T 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞等の細胞に加えて、Smooth muscle actin (α -SMA)の免疫染色像を作成した。すると術後 15 日以降では、IL-2cx 群では Foxp3+T 細胞が α -SMA 陽性気管支周囲に集簇していたが、対照群ではやはりランダムに散布していた。この傾向は B 細胞、T 細胞でも同様であった。次に、cumulative distribution function (CDF)を用い、数理モデルで評価した所、IL-2cx 群において、気管支周囲の Foxp3+細胞、CD4+細胞、CD8+細胞、B220+細胞、CD11c+ ミエロイド細胞の集簇が示された。これら細胞の集簇は、二次リンパ器官、BALT を示唆するものである。さらには、PNAd+ 細胞の検出は高内皮性細静脈も示された。これより三次リンパ器官の構築が示唆された。

(5) Foxp3+T 細胞はアログラフト内 BALT の誘導において重要である

Foxp3+ CD4+ 制御性 T 細胞こそが、BALT 構築に関与していることを確認すべく、Foxp3DTR トランスジェニックマウスで実験を行った。ジフテリアトキシンにより Foxp3+ CD4+ 制御性 T 細胞欠失モデルでのアログラフトでは BALT 構築は見られなかった。

(6) 結語

CD25 受容体に親和性を持たせた IL-2 複合体を用いて制御性 T 細胞(Treg)を誘導させることで、MHC 完全ミスマッチ間マウス肺移植のアログラフト生着が 90 日以上に渡って維持された。この機序は、Foxp3+ 制御性 T 細胞の誘導によるものである。また、グラフト肺内に構築された、Foxp3+ 制御性 T 細胞、CD4+T 細胞、CD8+ T 細胞、B 細胞、CD11c+ ミエロイド細胞による三次リンパ構造がグラフト保護に関与すると考えられた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yamada Yoshito, Brustle Karina, Jungraithmayr Wolfgang	4. 巻 233
2. 論文標題 T Helper Cell Subsets in Experimental Lung Allograft Rejection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Research	6. 最初と最後の頁 74 ~ 81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jss.2018.07.073	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 該当する

1. 著者名 Kenkel David, Yamada Yoshito, Weiger Markus, Wurnig Moritz C., Jungraithmayr Wolfgang, Boss Andreas	4. 巻 2
2. 論文標題 Magnetisation transfer as a biomarker for chronic airway fibrosis in a mouse lung transplantation model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Radiology Experimental	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41747-017-0032-3	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 該当する

1. 著者名 Yamada Yoshito, Langner Tim, Inci Ilhan, Benden Christian, Schuurmans Mace, Weder Walter, Jungraithmayr Wolfgang	4. 巻 26
2. 論文標題 Impact of human leukocyte antigen mismatch on lung transplant outcome†	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 859 ~ 864
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/icvts/ivx412	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 該当する

〔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 山田義人、海竇大輔、椎名裕樹、畑敦、坂入祐一、田村創、藤原大樹、和田啓伸、中島崇裕、鈴木秀海、千代雅子、Walter Weder、Onur Boyman、Wolfgang Jungraithmayr、吉野一郎
2. 発表標題 IL-2複合体によるマウス肺移植後免疫寛容の誘導における制御性T細胞の役割
3. 学会等名 第35回日本呼吸器外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田義人、Wolfgang Jungrathmayr、吉野一郎
2. 発表標題 肺移植後拒絶の克服 臨床応用への「死の谷」を超えるため
3. 学会等名 第35回日本呼吸器外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshito Yamada, Daniela Impellizzeri, Jae-Hwi Jang, Tony Nguyen, Ufuk Karakus, Ilhan Inci, Ichiro Yoshino, Christian Benden, Walter Weder, Wolfgang Jungrathmayr, Onur Boyman
2. 発表標題 Regulatory T cells on persistent tolerance stimulated by IL-2 complex in mouse lung transplant
3. 学会等名 The 38th Annual Meeting & Scientific Sessions of the international society for heart and lung transplantation (国際学会)
4. 発表年 2018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	吉野 一郎 (Yoshino Ichiro) (40281547)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	本橋 新一郎 (Motohashi Shinichiro) (60345022)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	鈴木 秀海 (Suzuki Hidemi) (60422226)	千葉大学・医学部附属病院・講師 (12501)	

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