

平成 22 年 6 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20790375  
 研究課題名 (和文) 肺移植後慢性拒絶反応における気道上皮のアポトーシスに関する研究  
 研究課題名 (英文) Research of the Airway Apoptosis after Lung Transplant Rejection  
 研究代表者  
 岡崎 幹生 (OKAZAKI MIKIO)  
 国立病院機構四国がんセンター レジデント  
 研究者番号：50467750

研究成果の概要 (和文)：肺移植後の慢性拒絶反応である閉塞性細気管支炎 (BO) は肺移植後の長期生存率が他の臓器移植より低い要因であるが、BO に関してはいまだに不明な部分が多い。今までは異所性気管移植モデルが BO の研究に多く用いられてきたが、気管内腔に空気は通過せず、臨床肺移植とかけ離れており、BO のモデルとしては不完全であった。今回、申請者が開発した同所性マウス肺移植モデルを用いて、拒絶反応における気道上皮とアポトーシスの関係について研究した。

研究成果の概要 (英文)：Long-term outcomes after transplantation of the lung are worse than those after transplantation of other solid organs. The main limitation to the long-term success of this procedure remains bronchiolitis obliterans (BO), which is thought to be a manifestation of chronic allograft rejection. The murine heterotopic tracheal transplantation model has been widely used for studies investigating pathogenesis of BO. This model differs from clinical lung transplantation because it employs proximal airway that lacks airflow and is not vascularized. We developed a novel model of orthotopic mouse lung transplantation and studied the airway apoptosis during the lung transplant rejection by using this model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：肺移植、急性拒絶反応、慢性拒絶反応、閉塞性細気管支炎、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

(1)肺移植後の長期生存率は他の臓器移植より低い、その大きな要因は肺移植後の慢性

拒絶反応である閉塞性細気管支炎 (Bronchiolitis obliterans : BO) の発症である。近年、新たな免疫抑制剤が開発されるな

ど、臓器移植後の免疫抑制療法が進歩してきたにもかかわらず、いまだにBOの発症を抑制することができていないのが現状である。その大きな要因として、今までBOに対する多くの研究がなされてきたにもかかわらず、その機序はまだ不明な部分が多いことが挙げられる。今までのBOに関するin vivoの研究では、ドナーの気管をレシピエントの背部に移植する異所性気管移植モデルが多く用いられてきた。しかし、気管はBOの好発部位である細気管支と部位が異なること、また血流が不足していること、気道内に空気が通っていないことなどから、臨床肺移植とはかけ離れた不完全なモデルと認識されることもあり、そのモデルの使用には賛否両論があるのが事実である。

(2) 肝移植や腎移植では約30年前から、心移植では約15年前からマウスの移植モデルが確立されているのに対して、肺ではマウスの移植モデルは存在しなかった。肺移植の研究は他の臓器移植より遅れをとっているといっても過言ではなく、その要因のひとつはマウスの同所性肺移植モデルがなかったためであると言える。そこで、申請者は、マウスの同所性肺移植モデルを作成することが肺移植の研究、とくにBOの研究の進歩には必要不可欠であると考え、このモデルを作成することを試み、初めてこのモデルの作製に成功した。この同所性マウス肺移植モデルは臨床肺移植に即しており、ドナーマウスの肺を摘出した後、肺動脈・肺静脈・気管支をそれぞれカフ法でレシピエントに吻合することによって左肺を同所性に移植する。移植後は閉胸し、急性および慢性実験モデルとして使用できる。

(3) マウスを用いた同所性肺移植では、C57BL/6からC57BL/6への同系移植から28日後において移植肺は正常な組織像を呈していた。Balb/cからC57BL/6に異系移植した肺は移植から7日後には血管周囲にリンパ球が浸潤し、急性拒絶反応を呈していた。また、異系移植から28日後には移植肺は全く換気されておらず、壊死状であった。しかし、気道上皮下への単核球浸潤はわずかで、気道上皮もよく保たれていた。また、気道内に分泌物を認めるものの、BOのような気道上皮下の線維化による内腔の閉塞は存在しなかった。気道上皮が比較的良好に保たれていたのは、拒絶反応に対する気道上皮の抗アポトーシス作用によるものである可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

同所性マウス肺移植モデルにおいて、異系移植後の移植肺の気道上皮がよく保たれてい

たのは、拒絶反応に対する気道上皮の抗アポトーシス作用によるものである可能性が示唆された。また、気道上皮のアポトーシスがBOの発症に関与している可能性も示唆され、BOと気道上皮のアポトーシスの関係を明らかにする必要があると考えられた。本研究では同所性マウス肺移植モデルを用いて、気道上皮のアポトーシスと拒絶反応の関係を明らかにすることを目的とした。

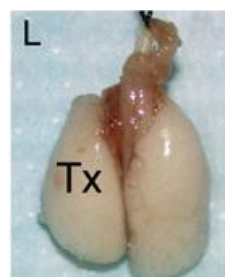
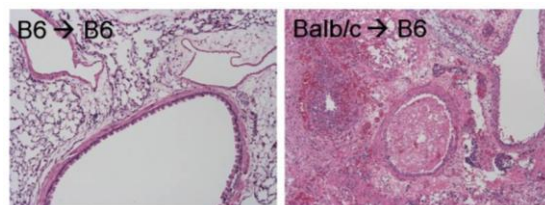
## 3. 研究の方法

(1) いずれの実験にも同所性マウス(25-30g)左片肺移植モデルを使用した。C57BL/6からC57BL/6への同系移植と、Balb/cからC57BL/6への異系移植の同所性肺移植を行い、移植から7日目、28日目に移植肺を摘出し、病理組織学的に(Hematoxylin-Eosin染色、免疫染色)検討した。

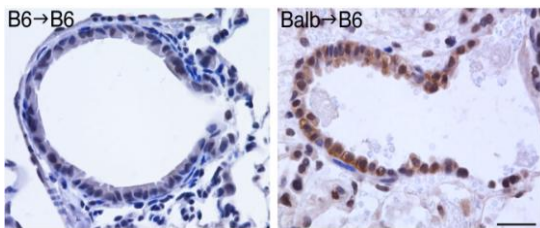
(2) Balb/cの肺をC57BL/6に同所性異系肺移植を施行し、移植後に移植肺を摘出し、病理組織学的検討およびフローサイトメトリー法による移植肺内のリンパ球の分析を施行した。次にBalb/cの肺をC57BL/6に同所性異系肺移植を施行し、周術期にレシピエントにCTLA4IgとMR1を投与することによって、それぞれCD28/B7とCD40/CD40Lの共刺激経路を阻害し、同様に移植肺を分析した。さらに、Balb/cからBel-2トランスジェニックマウス(C57BL/6)に同所性異系肺移植を施行し、同様に周術期にCTLA4IgとMR1を投与し、病理組織およびフローサイトメトリー法で移植肺を分析した。

## 4. 研究成果

(1) C57BL/6からC57BL/6への同系肺移植から28日後において、移植肺は正常な外観を呈しており(下図・左)、また病理組織学的にも正常な組織像を呈していた。Balb/cからC57BL/6へ移植した移植肺では、移植から7日後には血管周囲にリンパ球が浸潤し、著明な急性拒絶反応を呈していた。移植から28日後には移植肺は全く換気されず(下図・右)、



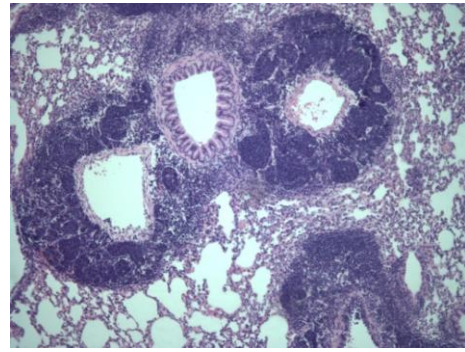
壊死状となっていた。また、病理組織学的にも広範に壊死状であった。しかし、血管周囲と比較して、気道上皮下への単核球浸潤はわずかで、気道上皮もよく保たれていた。また、気道内には分泌物を多く認めるものの、B0のような気道上皮下の線維化による内腔の閉塞は存在しなかった。つまり、Balb/c から C57BL/6 へ移植した移植肺では強い急性拒絶反応が存在したにもかかわらず、気道上皮は移植から 28 日後でもよく保たれていた。気道上皮とアポトーシスの関係を検証するために、移植肺において、抗アポトーシス蛋白である Bcl-2 の発現を免疫染色で分析した。拒絶反応のなかった C57BL/6 から C57BL/6 への移植肺では気道上皮に Bcl-2 はほとんど発現していなかった（下図、左）。それに対して、Balb/c から C57BL/6 への異系移植肺ではほとんどの気道上皮細胞に Bcl-2 が強く発現していた（下図、右）。Balb/c から C57BL/6



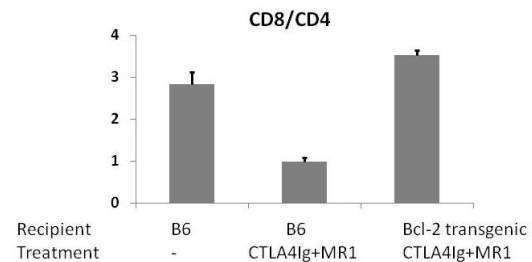
への移植肺において、強い急性拒絶反応があったにもかかわらず、気道上皮がよく保たれていたのは、拒絶反応に対する気道上皮の抗アポトーシス作用によるものである可能性が強いことが示唆された。

(2) Balb/c から C57BL/6 へ同所性異系肺移植を施行し、移植から 7 日後に移植肺を分析したところ、病理組織学的には血管周囲および気道周囲にリンパ球が浸潤し、強い拒絶反応を呈していた。さらに、移植肺内のリンパ球数をフローサイトメトリー法で分析したところ、CD8 陽性 T 細胞/CD4 陽性 T 細胞 (CD8/CD4) の比は  $3.0 \pm 0.3$  で CD8 陽性 T 細胞の割合が大きかった。次に、Balb/c から C57BL/6 へ同所性異系肺移植を施行し、周術期に CTLA4Ig (250  $\mu$ g, day0) と MR1 (200  $\mu$ g, day2) を投与することによって、それぞれ CD28/B7 と CD40/CD40L の共刺激経路を阻害し、拒絶反応が抑制されるか検討した。移植から 7 日後の移植肺は、病理組織学的にはわずかな炎症が存在するのみで、拒絶反応は強く抑制されていた。移植肺内の CD8/CD4 比は  $1.0 \pm 0.1$  と有意に低い値で ( $p < 0.01$ )、CD8 陽性 T 細胞と CD4 陽性 T 細胞の割合は同等であった。次に、Balb/c をドナーとし、Bcl-2 トランスジェニックマウス (C57BL/6) をレシピエントとし、左片肺移植を施行し、周術期に同様に CTLA4Ig (250  $\mu$ g, day0) と MR1 (200  $\mu$ g, day2) を投与した。移植から 7 日目に移植肺を分析したところ、血管周囲へ強いリンパ球

浸潤を認め、病理組織学的に移植肺は強く拒絶されていた（下図）。Bcl-2 を高発現したレ



シピエントにおいて、CTLA4Ig と MR1 による免疫抑制効果は阻害されていたと考えられた。また、CD8/CD4 比も  $3.0 \pm 0.2$  に上昇しており、CD8 陽性 T 細胞の割合が増加していた。これらの結果から Bcl-2 が CD8 陽性 T 細胞のアポトーシスを抑制し、拒絶反応が抑制されなかったことがもっとも考えられた。また、移植肺内の CD8/CD4 比は拒絶反応と強く相関しており、肺移植後の拒絶反応および免疫寛容に CD8 陽性 T 細胞が強く関与していると示唆された（下図）。



レシピエントに Bcl-2 トランスジェニックマウスを用い、CTLA4Ig と MR1 を投与した群では、予想以上に強い拒絶反応が血管周囲および気道周囲にみられた。しかし、TUNEL 染色で病理組織学的に分析したところ、気道上皮細胞自体のアポトーシスに大きな変化はみられなかった。

(3) 次に Bcl-2 ノックアウトマウスの使用も考慮したが、移植に適する大きさへの成長が困難だった。今後は、アポトーシス誘導遺伝子をドナーまたはレシピエントに導入することによって気道上皮細胞のアポトーシスと拒絶反応の関係をさらに明らかにする研究を続ける必要があると考えられた。また、今回この新しいマウス肺移植モデルを用いたが、B0 を発症させるには至らなかった。今後はさらに研究を重ね、まず B0 モデルを確立させ、B0 の研究の発展に貢献する必要があると思われる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

M. Okazaki, S. Sugimoto, J. Lai, C. G. Kornfeld, R. S. Hotchkiss, S. B. Richardson, W. Li, F. H. Kreisel, H. J. Huang, G. A. Patterson, A. S. Krupnick, A. E. Gelman, and D. Kreisel. Costimulatory blockade-mediated lung allograft acceptance is abrogated by overexpression of Bcl-2 in the recipient. Transplant Proc. 2009 Jan-Feb; 41(1): 385-7.

[学会発表] (計 1 件)

Mikio Okazaki

Costimulatory blockade-mediated lung allograft acceptance is abrogated by overexpression of Bcl-2 in the recipient. XXII International Congress of the Transplantation Society  
2008年8月12日、オーストラリア・シドニー

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡崎 幹生 (OKAZAKI MIKIO)

国立病院機構四国がんセンター レジデント

研究者番号：50467750

### (2) 研究協力者

山根 正修 (YAMANE MASAOMI)

岡山大学 腫瘍・胸部外科 助教

研究者番号：20432643

Daniel Kreisel (KREISEL DANIEL)

ワシントン大学 助教

吉田 修 (YOSHIDA OSAMU)

岡山大学 腫瘍・胸部外科 研究生

山本 澄治 (YAMAMOTO SUMIHARU)

岡山大学 腫瘍・胸部外科 研究生

川上 哲生 (KAWAKAMI TETSUO)

岡山大学 腫瘍・胸部外科 技官