

令和 5 年 4 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03769

研究課題名（和文）自然免疫の活性化が誘因となる移植肺機能不全の抑制

研究課題名（英文）Attenuation of lung graft dysfunction induced by the inappropriate activation of innate immunity

研究代表者

田中 里奈（Tanaka, Satona）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80847517

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 8,400,000円

研究成果の概要（和文）：過度の炎症を収束に導く抗炎症性脂質メディエーター（Specialized pro-resolving mediators; SPMs）が近年同定され注目されている。肺移植後早期の移植肺機能不全の代表である虚血再灌流肺障害の発症と収束の過程におけるSPMsの動態を明らかにし、SPMsであるAT-RvD1とAT-LXA4の投与がラット肺門クランプモデルによる虚血再灌流肺障害を軽減させ、その作用はFPR2受容体を介するものである可能性を明らかにした。さらに、移植後急性期の炎症を引き起こすイベントが移植肺の長期経過に与える影響を検討するのに適したマウス肺移植長期生存モデルと、臨床研究基盤を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

手術技術、周術期管理、免疫抑制剤の発展により、心臓や肝臓など固形臓器移植は80%以上の5年生存率が達成されているが、肺移植においては、国際学会のレジストリーで報告される5年生存率はいまだ50%程度で、長期予後は不良である。本研究では、虚血再灌流肺障害における抗炎症性脂質メディエーターの動態と介入効果を示し、それらが移植肺の機能に与える影響を検討する実験モデルと臨床研究基盤を確立した。肺移植患者の予後改善のため、さらなる研究発展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on specialized pro-resolving mediators, which have been reported to resolve inflammation in various disease model. Dynamics of SPMs in the initiation and resolution process of pulmonary ischemia-reperfusion injury was investigated and reported. AT-RvD1 and AT-LXA4 attenuated pulmonary ischemia-reperfusion injury in rat hilar clamp model. This effect of AT-RvD1 and AT-LXA4 was considered as a process mediated by FPR2 receptor. Moreover, mouse model of orthotopic lung transplantation was established to investigate an impact of pro-inflammatory or anti-inflammatory event early after transplantation on long-term graft function. We also conducted retrospective clinical study to evaluate whether inflammatory events early after transplantation affect long-term patient outcome.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺移植 虚血再灌流肺障害 抗炎症性脂質メディエーター 自然免疫 拒絶反応

## 1. 研究開始当初の背景

手術技術、周術期管理、免疫抑制剤の発展により、心臓や肝臓など固形臓器移植は 80%以上の 5 年生存率が達成されているが、肺移植においては、いまだ 50%程度の 5 年生存率である。その原因は、術後早期の移植肺機能不全、感染症、慢性拒絶などである。長期的に最も問題になるのは慢性拒絶が主因の慢性期移植肺機能不全(Chronic lung allograft dysfunction; CLAD)であり、CLAD のリスク因子として、肺移植後早期に発症する移植肺機能不全の代表である虚血再灌流障害や、気道感染の持続、急性細胞性拒絶反応の発症などが知られている。

虚血再灌流障害や気道感染による自然免疫の活性化による「過度の炎症」は、アロ免疫応答を惹起し、移植肺の機能廃絶につながると考えられる。虚血再灌流障害などによる術後早期の“過度の炎症”を適切にコントロールすることができれば、肺移植後患者の予後改善に貢献できると考えられる。近年、Arachidonic Acid(AA)、Eicosapentaenoic Acid (EPA)、Docosahexaenoic Acid (DHA)から、抗炎症性脂質メディエーター(Specialized pro-resolving mediators; SPMs)が生成されることが報告され、これらのメディエーターは、ホストの免疫能に影響を与えず、かつ、過度の炎症による臓器障害を抑制すると報告されている[Serhan CN. Nature. 2014, Arita M. J Biochem. 2012]。したがって、肺移植においても、移植後早期に発症し過度な炎症を伴う虚血再灌流肺障害は、SPMs の投与により軽減する可能性が考えられた。

申請者らは、2019 年度・科研費・研究活動スタート支援により、ラットの左肺門を一定時間遮断し温虚血状態とした後に、遮断を解除して再灌流を行い、虚血再灌流肺障害を生じさせるラット左肺門クランプモデルにおいて、障害肺において SPMs の受容体の 1 つである FPR2 が障害肺における炎症細胞に発現していること、FPR2 に作用する SPMs である Aspirin-triggered (AT) resolvin D1(AT-RvD1)と AT-lipoxinA4(AT-LXA4)を投与すると、虚血再灌流肺障害の軽減効果があることを確認した。

本研究では、この知見をさらに発展させ、肺移植において、SPMs が「過度の炎症」が誘因となる移植肺機能不全を抑制しうるかを、小動物実験モデルと質量分析による脂質メディエーターの解析を通じて検討する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、SPMs が肺移植において「過度の炎症」が誘因となる移植肺機能不全を軽減させ、肺移植後の管理に応用が可能かを明らかにすることであり、本研究期間での目標を、  
虚血再灌流肺障害の発症と収束の過程における SPMs の動態を明らかにする  
SPMs が虚血再灌流障害を軽減させるメカニズムを解明する  
移植後早期の過度な炎症など急性期のイベントが移植肺の長期経過に与える影響を検討する動物モデルと臨床研究基盤を確立することとした。

## 3. 研究の方法

虚血再灌流肺障害の発症と収束の過程における SPMs の動態を明らかにする

SPMs である AT-RvD1 と AT-LXA4 の虚血再灌流肺障害を軽減させる効果を確認した、ラット肺門クランプモデルを引き続き用いた。ラットの左肺門を一定時間遮断し温虚血状態とした後に、遮断を解除して再灌流を行い、虚血再灌流肺障害を生じさせるモデルである。このモデルにおいて、複数の再灌流時間を設定し、気道内圧、コンプライアンス、血液ガス、Wet-to-dry ratio(W/D)、障害肺における炎症性サイトカインなどを測定、虚血再灌流障害の発症から収束に至る時間的経過を検討した。さらに、これらの設定した再灌流時間において肺組織を採取、質量分析(Lipid Mediator Lipidomics)による網羅的な脂質メディエーターの測定を行った。

SPM が虚血再灌流障害を軽減させるメカニズムを解明する

ラット左肺門クランプモデルにおいて、障害軽減効果を確認した AT-RvD1 と AT-LXA4 の投与と同時にその受容体として知られる FPR2 受容体の拮抗薬を投与し、気道内圧、コンプライアンス、血液ガス、W/Dなどを測定した。

移植後早期の過度な炎症など急性期のイベントが移植肺の長期経過に与える影響を検討す

## る動物モデルと臨床研究基盤を確立する

マウスの心肺ブロックを採取し、一定時間の冷虚血後、左肺を顕微鏡的吻合手技をもちいて同所性に移植し、かつ、そのレシピエントマウスを長期に生存させるマウス肺移植モデルの実験条件の最適化を行った。また、移植肺の長期経過に影響を与える因子の解析のため、本学の臨床肺移植データを用いた臨床研究を行った。また、臨床肺移植における肺移植後のSPM動態解析のため、肺移植後の臨床サンプル採取と保存を開始した。

### 4. 研究成果

#### 虚血再灌流肺障害の発症と収束の過程におけるSPMsの動態を明らかにする

ラット左肺門クランプモデルによる温虚血再灌流肺障害において、3時間、6時間、12時間、24時間、72時間、7日の再灌流時間を設定し、気道内圧、コンプライアンス、血液ガス、W/D、炎症性サイトカインなどを測定した。再灌流後3時間から12時間にかけて肺障害は悪化し、7日目には、気道内圧やコンプライアンスなどの呼吸機能はまだ十分に改善はないものの、酸素化、肺水腫の指標であるW/Dは、naïve肺と同様にまで改善していた。

また、虚血再灌流肺障害で上昇が報告されている炎症性サイトカインであるIL-1とIL-6も同様の経時的変化を示した(図1)。これらの結果から、肺障害が悪化傾向にある時間帯に内因性に産生されるSPMsのレベルを検討するため、再灌流後1時間、3時間、12時間、7日で肺組織を採取し、Lipid Mediator Lipidomicsにより脂質メディエーターの網羅的解析を行った。特に注目したSPMsの動態に関しては、ほとんどのSPMsが再灌流障害発症後の障害肺では、naïve肺と比べて肺内のSPMsが低下したままで、障害(炎症)が収束する7日後でもnaïve肺と同じレベルまで戻ったSPMsはなかった(図2)。

図1 虚血再灌流肺障害の時間経過における酸素化と炎症性サイトカインの関連

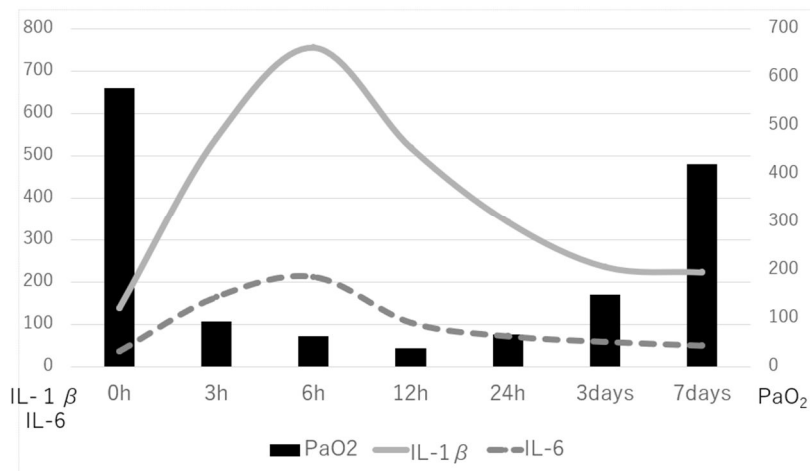
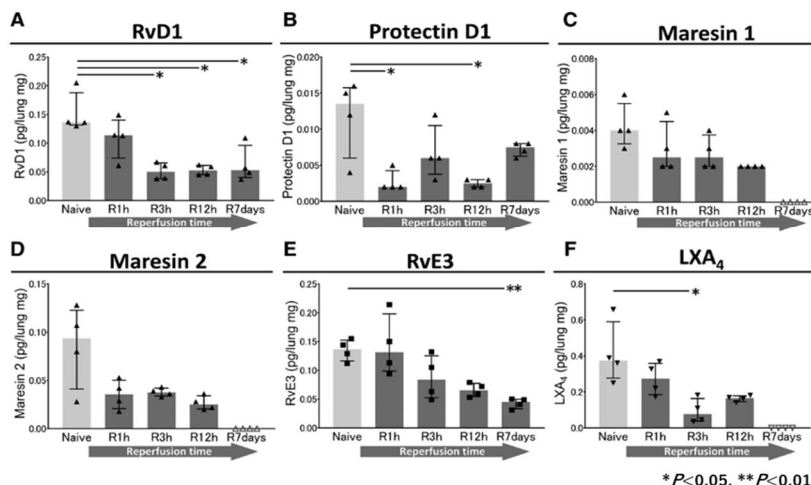


図2 虚血再灌流肺障害の時間経過におけるSPMsの動態



これまで、虚血再灌流肺障害モデルでの障害の発症から収束過程におけるSPMsの動態の報告

はなく、本研究で初めて明らかになったが、他疾患モデルでの報告からたてた、「虚血再灌流肺障害においても、SPMs は肺障害の過程で増加し、障害を収束に導く」という仮説からは少し異なった結果であった。しかしながら、内的な SPMs の増加がみられない虚血再灌流肺障害においては、SPMs の補充を行う意義は大きいことが推測される結果と考えられた。

### SPMs が虚血再灌流障害を軽減させるメカニズムを解明する

申請者らは、90 分の虚血と 180 分の再灌流を行うラット左肺門クランプモデルにおいて、AT-RvD1 と AT-LXA4 を投与すると、障害軽減効果があることを確認した(図 3)。本研究期間では、AT-RvD1 と AT-LXA4 の投与前に FPR2 受容体拮抗薬 WRW4 を投与すると、AT-RvD1 と AT-LXA4 の保護効果はみられず、AT-RvD1 と AT-LXA4 の効果はそれぞれの受容体を介する可能性が高いことを確認した(図 4)。

図3 ラット肺門クランプモデルにおけるAT-RvD1 AT-LXA4の保護効果

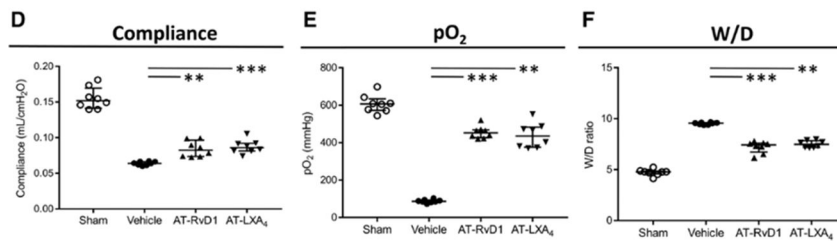
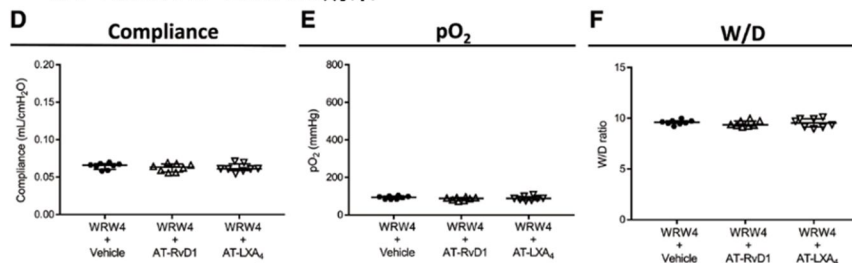


図4 ラット肺門クランプモデルにおけるFPR2受容体拮抗薬存在下でのAT-RvD1 AT-LXA4の効果



WRW4: FPR2受容体拮抗薬

移植後早期の過度な炎症など急性期のイベントが移植肺の長期経過に与える影響を検討する動物モデルと臨床研究基盤を確立する

虚血再灌流肺障害をはじめとする急性期の過度な炎症が、移植後長期経過に影響するか、SPMs の投与の影響を確認するためには、移植肺の組織学的検討と分子生物学的検討の双方が可能な、マウス肺移植モデルの確立が必要であった。そこで、BALB/c マウスの心肺ブロックを採取しレシピエント B6 マウスに移植(臨床肺移植と同様である MHC full mismatch 移植)、長期間生存させるモデルの確立を目指した。

マウス肺移植モデルは技術的難易度が高く、虚血再灌流肺障害について再現性をもって検討できるモデルの確立には至らなかったが、BALB/c B6 の肺移植後に、臨床肺移植でも用いられる免疫抑制剤であるシクロスポリン(CyA)とステロイド(mPSL)を低用量投与すると、移植後 15 日には血管気管支周囲にリンパ球浸潤が目立つ急性細胞性拒絶の組織像が確認でき、移植後 30 日には細胞性拒絶とともに血管気管支周囲や胸膜に高度な線維化が確認できた。

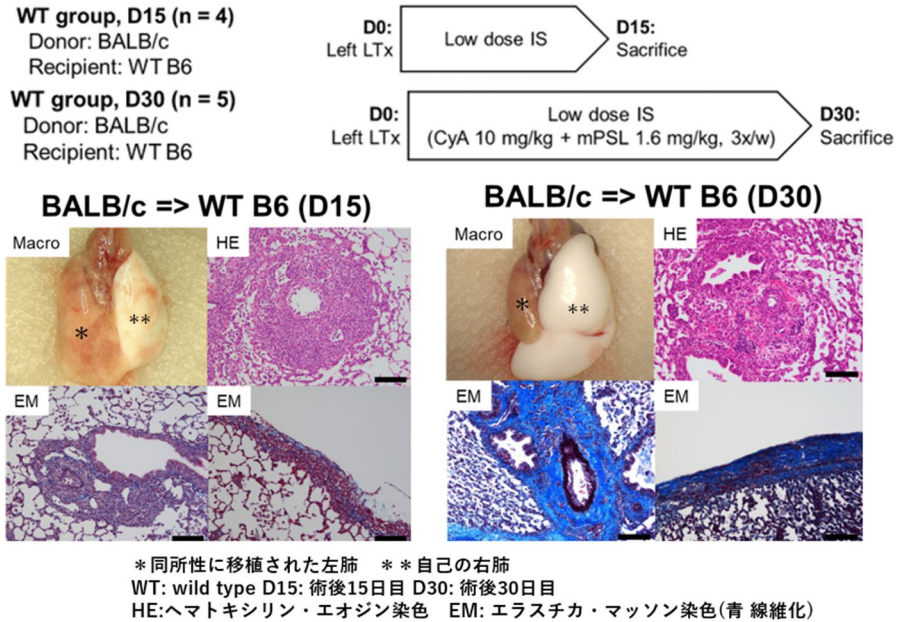
これは、Restrictive allograft syndrome とよばれる CLAD の 1 つのタイプと似た組織像であり、マウス肺移植モデルにおいて、低用量の免疫抑制により RAS type CLAD に似た細胞性拒絶と線維化を発症するモデルが確立できた(図 5)。今後、本モデルにおいて、細胞性拒絶から線維化に至るメカニズムや、アロ免疫応答と炎症性・抗炎症性脂質メディエーターの関連を検する予定である。

また、上記 に述べたように、ラット肺門クランプモデルでは、虚血再灌流肺障害の発症と収束過程において、内因性の SPMs の増加がみられないことを確認した。この所見の臨床的な validation を行うために、肺移植後急性期(移植前、移植後 1 日、7 日など)の臨床検体(血漿)の prospective な採取保存を開始した。臨床血漿検体を用いて Lipid Mediator Lipidomics を行うことにより、臨床肺移植後の炎症性・抗炎症性脂質メディエーターの動態を検討する。COVID-19 感染蔓延下で臨床肺移植の症例数が減少した時期があり、本研究期間中に結果の解析まで至らなかったが、現在は順調に検体採取ができています。これらの既報はなく、初めての解析と報告

になる。

肺移植後急性期のイベントが、移植後長期経過に影響するかを臨床研究で検討するため、本学の臨床肺移植症例において、これらを検討するデータベースの基盤を作成した。移植後早期の虚血再灌流障害、気道感染症、急性拒絶反応などのイベントが長期経過に与える検討が進んでいる。

図5 低用量の免疫抑制により細胞性拒絶から線維化に至るマウス肺移植モデルの確立



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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka S, Kayawake H, Yamada Y, Yutaka Y, Ohsumi A, Nakajima D, Hamaji M, Menju T, Yamamoto M, Nagao M, Date H	4. 巻 54
2. 論文標題 Outcome After Lung Transplantation From a Donor With Bacterial Pneumonia Under the Japanese Donor Evaluation System	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transplant Proc	6. 最初と最後の頁 782-788
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2021.12.045	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 Tanaka S, Nakajima D, Sakamoto R, Oguma T, Kawaguchi A, Ohsumi A, Ohata K, Ueda S, Yamagishi H, Kayawake H, Yutaka Y, Yamada Y, Hamaji M, Hamada S, Tanizawa K, Handa T, Suga T, Baba S, Hiramatsu H, Ikeda T, Date H	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Outcome and growth of lobar graft after pediatric living-donor lobar lung transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Heart Lung Transplant	6. 最初と最後の頁 Epub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.healun.2022.12.010	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 Oda H, Tanaka S, Shinohara M, Morimura Y, Yokoyama Y, Kayawake H, Yamada Y, Yutaka Y, Ohsumi A, Nakajima D, Hamaji M, Menju T, Date H	4. 巻 106
2. 論文標題 Specialized Proresolving Lipid Mediators Agonistic to Formyl Peptide Receptor Type 2 Attenuate Ischemia-reperfusion Injury in Rat Lung	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 1159-1169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/TP.0000000000003987	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12件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Tanaka S, Nakajima D, Kayawake H, Yamada Y, Yutaka Y, Ohsumi A, Hamaji M, Date H
2. 発表標題 Long-Term Outcome and the Radiological Evaluation of Lung Growth After Living-Donor Lobar Lung Transplantation in Pediatric Patients
3. 学会等名 42nd The International Society for Heart and Lung Transplantation Annual Meeting and Scientific Sessions（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中里奈、山田義人、豊洋次郎、大角明宏、中島大輔、濱路政嗣、毛受暁史、伊達洋至
2. 発表標題 小児生体肺移植後における成人肺葉グラフトの変化
3. 学会等名 第75回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中里奈、峯浦一貴、郷田康文、山田義人、大角明宏、中島大輔、伊達洋至、Daniel Kreisel
2. 発表標題 肺移植後拒絶反応の克服と免疫寛容誘導の可能性
3. 学会等名 第58回日本移植学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Oda H, Tanaka S, Shinohara M, Morimura Y, Yokoyama Y, Kayawake H, Yamada Y, Ohsumi A, Nakajima D, Date H
2. 発表標題 Dynamic Changes and Roles of Specialized Pro-resolving Lipid Mediators in the Initiation and Resolution Process of Lung Ischemia-Reperfusion Injury in Rats
3. 学会等名 American Transplant Congress 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mineura K, Tanaka S, Kayawake H, Yamada Y, Yutaka Y, Nakajima D, Ohsumi A, Hamaji M, Menju T, Date H
2. 発表標題 Fibrosis of Chronic Lung Allograft Dysfunction After Orthotopic Lung Transplantation is Prevented in the Absence of Secondary Lymphoid Organs in a Mouse Model
3. 学会等名 42nd The International Society for Heart and Lung Transplantation Annual Meeting and Scientific Sessions（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Morimura Y, Tanaka S, Kayawake H, Yamada Y, Yutaka Y, Ohsumi A, Nakajima D, Hamaji M, Date H
2. 発表標題 Use of basiliximab in patients who required dose reduction or discontinuation of calcineurin inhibitors early after lung transplantation
3. 学会等名 42nd The International Society for Heart and Lung Transplantation Annual Meeting and Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森村祐樹、田中里奈、松原慧、田中真、狩野孝、山田義人、豊洋次郎、大角明宏、中島大輔、濱路政嗣、新谷康、杉本誠一郎、豊岡伸一、伊達洋至
2. 発表標題 小児肺移植の適応疾患と長期予後：多施設共同後ろ向き研究
3. 学会等名 第58回日本移植学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satona Tanaka, Daisuke Nakajima, Akihiro Ohsumi, Shiro Baba, Itaru Kato, Hidefumi Hiramatsu, Hiroshi Date
2. 発表標題 Post-transplant lymphoproliferative disorder after living-donor lung transplantation in pediatric patients
3. 学会等名 International Symposium of Pediatric Heart and Lung Transplantation (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中里奈、栢分秀直、中島大輔、合地史明、山梨恵次、藤本 遼、山田義人、豊 洋次郎、大角明宏、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と抗体関連拒絶に対する治療
3. 学会等名 第57回日本移植学会総会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 尾田博美、田中里奈、横山雄平、池田政樹、徳野純子、上田聡司、栢分秀直、豊洋次郎、山田義人、大角明宏、濱路政嗣、中島大輔、伊達洋至
2. 発表標題 肺の虚血再灌流障害に対するALX/FPR2を介したResolvin D1およびLipoxin A4の効果
3. 学会等名 第56回 日本移植学会総会
4. 発表年 2020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	伊達 洋至  (Date Hiroshi)  (60252962)	京都大学・医学研究科・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
---------	---------