

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791323

研究課題名（和文） 肺移植の拒絶反応抑制のためのサイトカイン受容体に対する  
分子標的療法の開発研究課題名（英文） Development of the molecular target therapy for the cytokine receptor  
for suppression of rejection after the lung transplantation

研究代表者

中桐 伴行 (Tomoyuki Nakagiri)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70528710

研究成果の概要（和文）：

拒絶反応抑制のための分子標的療法の開発を目的として、サイトカイン受容体へのモノクローナル抗体療法の意義を検討した。研究により B0 の発生に循環血中の制御性 T 細胞の割合と、局所の IL-6 の産生および局所の Th17 が関与していることがマウスモデルを用いて示唆された。また IL-6 をブロックすることにより B0 の発生、つまり肺の慢性拒絶を予防できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

IL-6 production increased in local area, but not in peripheral, in allografts of the mouse B0 model, and IL-17 production also locally increased without an alteration in the proportion of peripheral Th17 cells while the level of peripheral Treg decreased. In addition, IL-6 blocking may suppress B0 formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：呼吸器外科学

## 1. 研究開始当初の背景

肺移植後の慢性拒絶は、その長期

予後に大きく関与している。肺移植後の慢性拒絶の病理像は、閉塞性細

気管支炎 (B0) の像を呈するが、その発生機序は不明である。

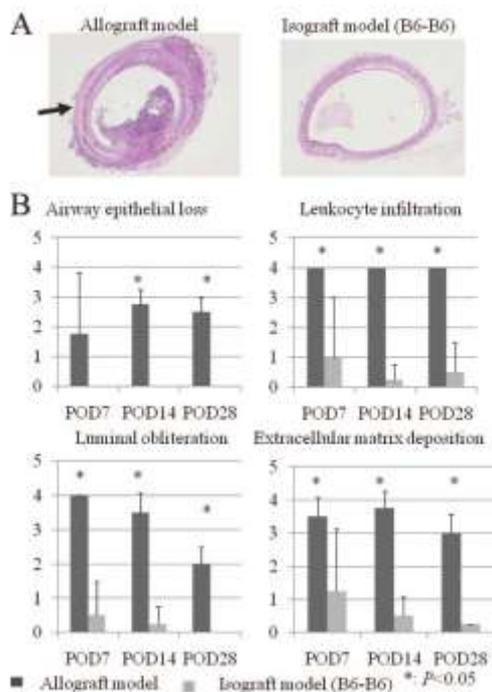
## 2. 研究の目的

拒絶反応抑制のための分子標的療法の開発を目的として、サイトカイン受容体へのモノクローナル抗体療法の意義を検討する。特に抗 CD25 モノクローナル抗体の Treg 分化への関与を検証してその意義を確認するとともに、抗 IL-6 受容体抗体の Th17 分化の抑制の可能性に注目して、肺移植後の拒絶反応抑制のための新たな方法論の開発に取り組む。

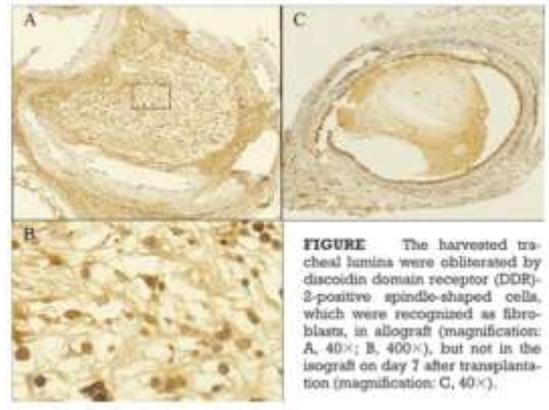
## 3. 研究の方法

B6 マウス由来の気管を C3H マウスの皮下に移植 (B0 の動物モデル) し、リンパ球分画および組織学的評価を行った。

## 4. 研究成果

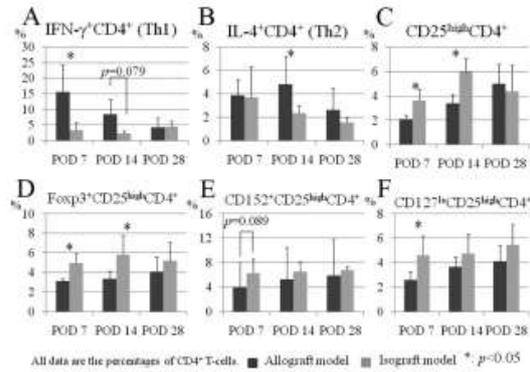


マウスの B0 モデルにおいて、その B0 進行度を点数化し、モデルが有効であることを示した。



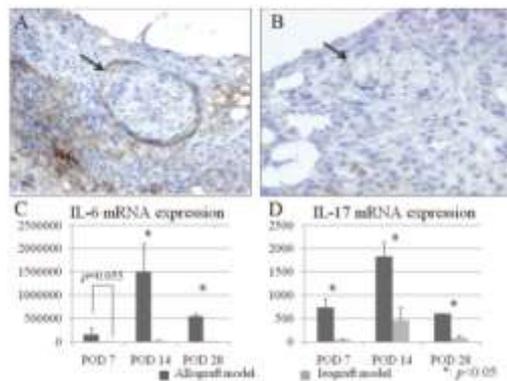
組織学的には閉塞の原因の一つが線維芽細胞の増殖であることが確認された。

末梢血中のヘルパーT細胞中、急性拒絶にてその割合が上昇する Th1 は異系移植群で有意に上昇していた。また、Treg の割合は異系移植群で有意に減少していた。しかし、IL-6 および Th17 の割合は末梢血中では有意差を認めなかった。



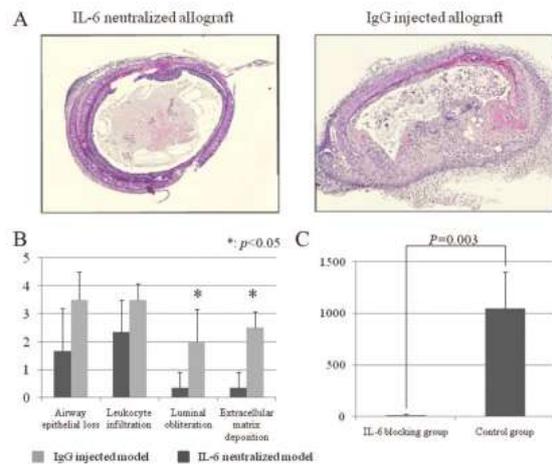
**FIGURE 2.** Flow cytometric analysis of PBL in the mouse BO model. PBL in allografted (n=6) and isografted (n=6) animals were analyzed by flow cytometry using the indicated specific antibodies to the following specific lymphocyte subpopulations. (A) Th1: IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells, (B) Th2: IL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells. Both Th1 and Th2 populations were increased in the allograft model compared with isograft controls for 2 weeks after transplantation. (C) Treg: CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup> T cells, (D) Treg: Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup> T cells, (E) Treg: CD132<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup> T cells, and (F) Treg: CD127<sup>low/-</sup>CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup> T cells. The proportion of Treg in PBL was lower in the allograft model than in the isograft model for 2 weeks after transplantation. All data are calculated as a percentage of CD4<sup>+</sup> T cells.

免疫染色にて移植片中の血管内皮や浸潤リンパ球中に IL-6 を認めた。移植片の IL-6 および IL-17 の mRNA を RT-PCR 法で測定すると、IL-6、IL-17 ともに有意差をもって異系移植群で上昇していた。



**FIGURE 3.** Local analysis of the Th17-related activation. (A, B) Immunohistochemical analysis of IL-6 expression of a vessel in the harvested trachea 2 days after transplantation. IL-6-producing cells were analyzed in (C) alveolar and (D) bronchi (control) by immunohistochemistry (immunofluorescence: 400 $\times$ ). A large number of IL-6-producing lymphocytes and endothelial cells were identified in the allograft (IL, arrow; IL-producing endothelial cells). The positive alveolar IL-6-producing lymphocytes and IL-6-producing endothelial cells (B, arrow; endothelial cells). The mRNA expression of IL-6 and -17 in harvested trachea was measured by quantitative RT-PCR in the indicated steps after transplantation. (C) IL-6: IL-6 mRNA expression level of alveolar (n=4) was significantly higher than that of the isograft (n=4). POD7: 184152.12707 vs. 401.238 units,  $P=0.006$ ; POD14: 1533714.620406 vs. 20880.12818 units,  $P=0.006$ ; POD28: 848128.28818 vs. 1834.032 units,  $P=0.028$ ; data are the mean  $\pm$  SD. Allograft vs. isograft. (D) Significant differences were observed between the IL-17 mRNA expression level of the alveolar (n=4) and that of the isograft (n=4). POD7: 238.7 (184.8 vs. 48.0)  $\pm$  28.3 units,  $P<0.001$ ; POD14: 1808.2 (1345.4 vs. 434.8)  $\pm$  102.2 units,  $P=0.003$ ; POD28: 803.7 (1.7 vs. 38.1)  $\pm$  57.3 units,  $P=0.002$ ; data are the mean  $\pm$  SD. Allograft vs. isograft.

同様の異系移植モデルを作成し、IL-6 を中和抗体にてブロックすると、組織学的にはリンパ球の浸潤を認めるものの内腔の閉鎖を認めず、線維組織の沈着も認めなかった。また局所の IL-17 の mRNA 量は有意に減少しており、浸潤リンパ球は Th17 であることが示唆された。



**FIGURE 4.** Results of neutralized model: histological analysis of the mouse model of BO with IL-6 neutralization and the IgG-injected control. (A) Hematoxylin staining of harvested tracheal grafts on day 14 after orotracheal transplantation. (B) IL-6 neutralized allograft (left) and IgG injected allograft (right). The IgG-injected control allograft showed epithelial loss with luminal obliteration, pronounced leukocyte infiltration, and extracellular matrix deposition on the structure. However, in the IL-6 neutralized allograft, the lumen was preserved with no extracellular matrix deposition, and slight epithelial loss and small amount of leukocyte infiltration was observed. (C) The score of the indicated histologic findings for IL-6 neutralized allograft (n=3) and IgG injected allograft (n=4) were as follows: airway epithelial loss (1.67  $\pm$  0.83 vs. 3.5  $\pm$  1.1,  $P=0.006$ ), leukocyte infiltration (2.33  $\pm$  1.15 vs. 3.8  $\pm$  0.98,  $P=0.107$ ), luminal obliteration (0.33  $\pm$  0.57 vs. 2.1  $\pm$  1.52,  $P=0.002$ ), extracellular matrix deposition (0.66  $\pm$  0.57 vs. 2.2  $\pm$  1.57,  $P=0.003$ ). Data are the mean  $\pm$  SD. The score of IL-6 neutralized allograft vs. that of IgG injected allograft, respectively. (D) The mRNA expression of IL-17 in harvested trachea was measured by quantitative RT-PCR on day 14 after transplantation. (C) The IL-17 mRNA expression level of IL-6 neutralized allograft (n=3) was significantly lower than that of the IgG control group (n=4). IL-6 neutralized allograft: 1346.1  $\pm$  325.7 units,  $P=0.002$ ; data are the mean  $\pm$  SD. IL-6 neutralization group vs. IgG control group (C).

この研究により BO の発生に Th17 が関与していることが示唆され、また IL-6 をブロックすることにより BO の発生、つまり肺の慢性拒絶を予防できる可能性が示唆された。

## 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 3 件)

1. Nakagiri T, Inoue M, Minami M, Shintani Y, Okumura M.: Mini Review Transplantation Immunology: The Basics of Th17 and Interleukin-6 in

Transplantation. Transplant

Proc. 2012 May;44(4):1035-40. 査読有

2. Nakagiri T, Warnecke G, Avsar M, Thissen S, Kruse B, Kühn C, Ziehme P, Knöfel AK, Madrahimov N, Okumura M, Sawa Y, Gottlieb J, Simon AR, Haverich A, Strüber M. (2012): Lung function early after lung transplantation is correlated with the frequency of regulatory T cells. Surg Today. 2012 Feb;42(3):250-8. 査読有
3. Nakagiri T, Inoue M, Morii E, Minami M, Sawabata N, Utsumi T, Kadota Y, Ideguchi K, Tokunaga T, Okumura M. (2010): Local IL-17 production and a decrease in peripheral blood regulatory T cells in an animal model of Bronchiolitis obliterans. Transplantation. 2010 Jun 15;89(11):1312-9. 査読有

[学会発表] (計2件)

1. Nakagiri T. IL-6 and TH17 in Transplantation, Congress of the Asian Society of Transplantation 2011, Seoul, 2011/9/25
2. 中桐伴行, Warnecke G, Haverich A, Stüber M, 井上匡美、南 正人、澤端章好、奥村明之進. 制御性 T 細胞の割合と肺移植後早期の呼吸機能は相関する. 第 26 回肺および心肺移植研究会, 大阪, 2010/4/8

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中桐 伴行 (Tomoyuki Nakagiri)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 70528710

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :