

令和 6 年 4 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08877

研究課題名（和文）自然免疫とサブタイプに着目した慢性移植肺機能不全のメカニズム解明

研究課題名（英文）Mechanism of Chronic Lung Allograft Dysfunction Focusing on innate immunity and Subtypes

研究代表者

渡邊 龍秋（Watanabe, Tatsuaki）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70636034

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では肺移植術後の慢性期の主たる死因であり、通常の免疫抑制療法では制御困難な慢性移植肺機能不全のメカニズムの解明である。研究は肺移植術時の虚血再灌流障害と肺移植後の慢性気道炎症という2つの臨床肺移植に則したシナリオをマウス肺移植に適応した慢性移植肺機能不全モデルを用いて行った。虚血再灌流障害モデルではB細胞、慢性気道炎症では免疫系の細胞や気道上皮の障害が寄与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植肺機能不全には様々なメカニズムが寄与していると考えられ、そのメカニズムの一端が本研究で明らかになったと考えられる。実際肺移植後には望ましい肺機能に最初から到達できない症例や、長年肺機能が安定していたものの、急性移植肺機能不全をきっかけに肺機能が戻らずCLADに至る症例を経験する。本研究ではこのような臨床経過をたどる症例のメカニズムの検討に用いることができる動物実験モデルが得られたこと、および治療介入のターゲットとなり得るメカニズムが示唆された。今後の治療の発展に寄与できる成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed to elucidate the mechanism of chronic lung allograft dysfunction, which is a major cause of death in the chronic phase after lung transplantation and is difficult to control with conventional immunosuppressant. The study used a mouse model of chronic lung allograft dysfunction with two clinically relevant scenarios: ischemia-reperfusion injury at the time of lung transplantation and chronic airway inflammation after lung transplantation. The ischemia-reperfusion injury model was thought to be associated with B cells, while the chronic airway inflammation model was thought to be associated with immune system cells and airway epithelial damage.

研究分野：肺移植

キーワード：移植 呼吸器外科 移植肺機能不全 B細胞 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

肺移植は、他に治療法のない終末期呼吸不全患者を救命できるのみならず身体機能も回復させ社会復帰を可能とする治療法である。欧米の肺移植を中心した国際登録ではすでに累計 7 万例以上の肺および心肺移植が行われてきている。本邦でも脳死および生体ドナーからの提供により累計 750 例以上の肺移植が行われている。しかし、肺移植医療には 2 つの大きな課題がある。その一つは慢性的なドナー不足、もう一つは慢性移植肺機能不全(Chronic Lung Allograft Dysfunction; CLAD)のため他臓器と比べ不良な長期予後である。ドナー数が日本より遥かに多い欧米諸国においてさえ移植に相応しい肺ドナー不足のため肺移植待機中の死亡は 20%ほどである。本邦では 2010 年に臓器移植法が改正され脳死ドナーは増加傾向にはあるが、未だに本邦でのドナー不足は顕著であり、移植待機中の患者死亡が問題である。さらに、本邦では移植可能な臓器が不足しているため、60 歳以上の高齢呼吸不全患者は肺移植登録の機会すら得られずに亡くなっている。限られた数の脳死ドナーでより多くの肺移植を行う手段としてマージナルドナー(高齢ドナー、肺炎、軽度の急性肺障害等を認めるドナーなど)の活用が考えられるが、移植肺機能不全(Primary graft dysfunction; PGD)による急性期死亡と CLAD 発症のリスクがある。

CLAD を発症すると進行性の呼吸不全をきたし、最終的に患者は死亡するか、再肺移植が必要となる。CLAD は病理学的にも臨床的にも多彩な像を示し、少なくとも 2 種類のサブタイプがある。一つは臨床的に閉塞性肺障害を認める Bronchiolitis obliterans syndrome であり、病理学的には末梢細気管支の閉塞性変化(Obliterative bronchiolitis; OB)が見られる。もう一つは臨床的には拘束性肺障害を認める Restrictive allograft syndrome であり、病理学的には pleuroparenchymal fibroelastosis (PPFE)を認める。実際には CLAD はこの 2 つのサブタイプに限らず、臨床的、病理学的にオーバーラップを認める。T 細胞をターゲットとした免疫抑制療法は急性拒絶反応を制御することはできるが CLAD による進行性の線維化を進抑制することはできない。

CLAD が多彩な病理学的・臨床的像を示し、T 細胞をターゲットとした免疫抑制で制御できない理由として、肺移植後に様々な外的刺激が肺の局所で過剰な自然免疫反応、同種免疫反応を惹起していることが提唱されている。例えば、肺移植時の虚血再灌流障害やドナー肺炎などを背景として発症する PGD が移植肺の長期機能障害をきたすことが知られている。さらに肺は他の臓器と異なり、気道を介して外界に開かれているため肺移植術後にも種々の外的刺激に暴露され続ける。例えば、誤嚥、大気汚染、気道の菌叢の異常が CLAD 発症のリスクとして知られている。一方で、このような外的な要因による肺障害では健常人では急速な肺機能低下認めず、通常は修復される。つまり、肺移植術後には PGD や気道を介した自然免疫刺激により従来の免疫抑制療法では制御困難な反応が起きているため、気道・肺実質が正常に再生されず肺の線維化をきたすと考えられる。

申請者は C57BL/10 マウス(B10)と C57BL/6 マウス(B6)を用いる肺移植モデルを用いて、異なる自然免疫刺激が異なるサブタイプの CLAD の組織所見を示す実験系を確立し、一つは虚血再灌流障害-CLAD モデルで組織学的には OB と PPFE を認め、Restrictive allograft syndrome に類似する。今までの解析ではケモカインの一つの CXCL12 と B 細胞の関与が示唆された。もう一つは慢性気道炎症-CLAD モデルで組織学的には OB を主体とし PPFE はほとんど認めず、Bronchiolitis obliterans syndrome に類似する。このモデルでは IL-17A/IL-17RA 軸の関与が示唆された。比較的早期の検体(移植後 3-10 日)を使用して RNA シークエンス(RNAseq)とメタボローム解析を行い CLAD のサブタイプの発症に特徴的な遺伝子の網羅的解析とパスウェイ解析を行う。さらに、得られた結果に基づいて抗体等を利用して治療介入し、CLAD に対して個別化医療の提供を目標とする。

2. 研究の目的

【目的 1】本研究の第 1 の目的は、CLAD のサブタイプをそれぞれ解析することにより、共通および特徴的な分子学的メカニズムを明らかにすることである。本研究は申請者がすでに確立している 2 つのマウス CLAD モデルを用いる。

【目的 2】第 2 の目的は目的 1 で明らかになったメカニズムに介入し、CLAD を予防・治療できるか検討することにある。現時点では申請者が明らかにした 1)虚血再灌流障害-CLAD モデルでは CXCL-12/CXCR4 軸をターゲットとした治療(薬剤としては CXCR4 阻害薬; プレリキサホル等)、2)慢性気道炎症-CLAD モデルでは IL-17A/IL17-RA 軸をターゲットとした治療(IL-17RA 抗体; プロダルマブ等)が候補である。目的 1 の結果からより強いシグナルのパスウェイや、各 CLAD モデルに共通のメカニズムを同定できた場合には、それに対する阻害薬を用いる。

3. 研究の方法

(1)動物実験モデル: B10 マウスをドナー、B6 マウスをレシピエントとして用いる。ドナーマウスを麻酔後、気管内挿管、人工呼吸器管理としヘパリンを投与する。胸骨正中切開を行い肺動脈より肺保存液(Perfadex®) 2ml を投与し血液を除去する。レシピエントマウスは麻酔後、気管内挿管、人工呼吸器管理とし、左片肺移植術を行う。実験モデルとしては以下の 2 つ。

i) 虚血再灌流障害-CLAD モデルのコントロールは肺は最小の冷保存時間(30 分)、実験群は 6 時間の冷保存と 60 分間の温阻血後に移植を行う。

ii) 慢性気道炎症-CLAD モデルでは最小冷保存時間で移植を行う。移植後 3 日目から 21 日目まで週 2 回経気道的に LPS を投与する。コントロールマウスには PBS を経気道投与する。

(2)解析(図 3)

i) 虚血再灌流障害-CLAD モデルでは移植術後 3, 7, 28 日に検体を採取する。ii)慢性気道炎症-CLAD モデルでは移植術後 5, 14, 28 日に検体を採取する。一群 n=6 で実験を行う。移植肺は分割してそれぞれ、RNA, Flow cytometry, 組織学的評価に用いる。縦隔リンパ節、脾臓を Flow cytometry に用いる。免疫学的、組織学的解析は継時的に行う。RNAseq は高価な解析であるため、本研究では移植後 5-14 日目までの移植後早期で線維化が完成していない段階での検体を解析する。同じくメタボローム解析も移植後早期の検体を用いて行う。

【実験 2】

実験 1 で得られた結果に基づき、主たる反応経路を阻害する薬剤、抗体を投与する。免疫学的プロファイルの変化、CLAD 病変形成の抑制が認められるか検討を行う。現時点では虚血再灌流障害-CLAD モデルでは CXCR4 阻害薬である プレリキサホル、慢性気道炎症-CLAD モデルでは IL-17RA 抗体; プロダグルマブを候補として想定しているが、実験 1 の解析結果により適切な薬剤に変更する。動物実験としては実験 1 と同じ処置を行い、解析は移植後 28 日目に行う。治療介入群、コントロール群それぞれ一群 n=12 で検討する。

4 . 研究成果

1) F1 マウスモデルの確立

当初の目的の 2 つの自然免疫刺激に応じて異なるサブタイプに加え、2 系統のマウスを掛け合わせて作成した F1 マウスを用いた肺移植後肺線維化モデルを作成した。自然免疫刺激なしで肺線維化をきたすため、自然免疫の影響と、自然免疫なしでの移植肺に線維化をきたすメカニズムとの比較検討のため重要なモデルと考えられたためである。本モデルについても確立でき、解析を行っている。

2) IL-17A/IL-17RA に関する研究

これまでの研究で関与が示唆されていた IL-17A/IL-17RA について気道炎症-CLAD モデルについて、その詳細を解析し発表した(Donor IL-17 receptor A regulates LPS-potentiated acute and chronic murine lung allograft rejection. JCI Insight. 2023 Nov 8;8(21):e158002.)。

3) RNAseq による解析

虚血再灌流障害モデルでは B 細胞と肺のリモデリング、慢性気道炎症モデルでは気道上皮の障害や過剰な免疫反応が病態形成に影響を与えていることが示唆された。現在得られている成果を用いて国際共同研究へ発展させるように、海外研究協力者と研究計画を立案している。

4) 薬剤を用いた治療介入

本研究期間中では検討を行えなかった。これまでの知見をもとに新たに研究計画を立案し研究資金を得たのちに実行する予定である。

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 Watanabe Tatsuaki, Lam Christina, Oliver Jillian, Oishi Hisashi, Teskey Grace, Beber Samuel, Boonstra Kristen, Mauricio Uma?a Juan, Buhari Hifza, Joe Betty, Guan Zehong, Horie Miho, Keshavjee Shaf, Martinu Tereza, Juvet Stephen C.	4. 巻 16
2. 論文標題 Donor Batf3 inhibits murine lung allograft rejection and airway fibrosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 104 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mucimm.2023.02.004	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 Watanabe Tatsuaki, Juvet Stephen C., Boonstra Kristen, Guan Zehong, Joe Betty, Teskey Grace, Keshavjee Shaf, Martinu Tereza	4. 巻 69
2. 論文標題 Recipient bone marrow-derived IL-17 receptor A-positive cells drive allograft fibrosis in a mouse intrapulmonary tracheal transplantation model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transplant Immunology	6. 最初と最後の頁 101467 ~ 101467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.trim.2021.101467	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 Watanabe Tatsuaki, Juvet Stephen C., Berra Gregory, Havlin Jan, Zhong Wenshan, Boonstra Kristen, Daigneault Tina, Horie Miho, Konoeda Chihiro, Teskey Grace, Guan Zehong, Hwang David M., Liu Mingyao, Keshavjee Shaf, Martinu Tereza	4. 巻 8
2. 論文標題 Donor IL-17 receptor A regulates LPS-potentiated acute and chronic murine lung allograft rejection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e158002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.158002	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 1. 渡邊龍秋, 宇井雅博, 小野寺賢, 渡辺有為, 野津田泰嗣, 鈴木隆哉, 平間崇, 大石久, 新井川弘道, 野田雅史, 秋場美紀, 岡田克典.
2. 発表標題 当施設で移植後10年生存を得られるレシピエントの特徴
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 4. 渡邊龍秋, 宇井雅博, 小野寺賢, 渡辺有為, 野津田泰嗣, 鈴木隆哉, 平間崇, 大石久, 新井川弘道, 野田雅史, 秋場美紀, 岡田克典.
2. 発表標題 本邦の肺移植医療の実際
3. 学会等名 第47回日本外科系連合学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 1. Watanabe T, Guan Z, Horie M, Joe B, Juan MU, Buhari H, Hwang D, Kolls JK, Liu M, Keshavjee S, Juvet S, Martinu T.
2. 発表標題 IL-17 receptor on donor cells regulates acute and chronic lung allograft rejection potentiated by repeated endotoxin inhalation.
3. 学会等名 The 40th Annual meeting and scientific sessions of the International Society for Heart and Lung Transplantation (国際学会)
4. 発表年 2021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	野津田 泰嗣 (Notsuda Hirotsugu) (00636037)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	渡辺 有為 (Watanabe Yui) (20724199)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	大河内 眞也 (Ohkouchi Shinya) (40375035)	東北大学・事業支援機構・准教授 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	大石 久 (Oishi Hisashi) (60451580)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	平間 崇 (Hirama Takashi) (80510338)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	矢吹 皓 (Yabuki Hiroshi) (80848276)	東北大学・大学病院・医員 (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)	

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