

## 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24日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791251

研究課題名（和文） 肺移植後の虚血再還流障害による移植肺生着阻害に関する研究

研究課題名（英文） Ischemia reperfusion injury induced abrogation of lung transplant acceptance

研究代表者

杉本 誠一郎（SUGIMOTO SEICHIRO）

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：40570148

研究成果の概要（和文）：肺移植は終末期肺疾患の唯一の治療法であるが、肺移植後の5年生存率は他の臓器移植より低く約50%に過ぎない。肺移植後の虚血再還流障害は移植肺の生存期間を悪化するとされているが、虚血再還流障害による移植肺生着への影響やその機序についてはあまり明らかにされていない。本研究では同所性マウス左肺移植モデルを用いて、肺移植後の虚血再灌流障害が移植肺生着阻害に与える影響やその機序について検討した。

研究成果の概要（英文）：Lung transplantation has become the treatment of end-stage lung disease. However, outcomes after lung transplantation remain worse than those after transplantation of other solid organs. Ischemia reperfusion injury is considered to be linked to the limitation to long term survival after lung transplantation. We examined the mechanism that ischemia reperfusion injury induces the abrogation of lung transplant acceptance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：外科学一般

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：肺移植、虚血再灌流障害、急性拒絶反応、免疫寛容

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 肺移植と虚血再灌流障害

肺移植は終末期肺疾患の唯一の治療法であるが、一般的に肺移植後の5年生存率は他の臓器移植より低く約50%に過ぎない。肺移植後急性期の主な死因は原発性移植肺機能不全であり、虚血再灌流障害がその主因である。肺移植後の虚血再灌流障害の発症率は高率で、

肺移植後の長期生存を妨げる慢性拒絶反応の発症にも関連する。2009年10月現在、日本では我々、岡山大学による1998年の生体肺移植の成功以来145例の肺移植が行われ、約半数の68例（生体肺移植：53例、脳死肺移植：15例）が岡山大学で行われた。岡山大学での肺移植後5年生存率は80.8%と良好だが、生体肺移植（86.4%）に比べ脳死肺移植（57.2%）の方が

悪い傾向にある。肺移植では虚血時間の延長が移植肺の生存期間を悪化するとされ、脳死肺移植の臓器搬送による虚血時間の延長、つまり虚血再灌流障害の程度が生体肺移植との生存率の差の一因と推測される。しかし虚血再灌流障害による移植肺生着への影響やその機序については解明されていない。申請者はこれまで肺移植後の虚血再灌流障害の機序について研究を行い、新しい薬剤の有効性を報告してきた (Sugimoto S, Lin X, Lai J, Okazaki M, Das NA, Li W, Krupnick AS, Chen R, Jeong SS, Patterson GA, Kreisel D, Gelman AE. Apyrase treatment prevents ischemia-reperfusion injury in rat lung isografts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 138:752-9, 2009. )。

#### (2) 肺移植における自然免疫と獲得免疫の関連性

肺は皮膚や小腸のように常に外界や共生細菌に暴露するため、抗原性が強く免疫寛容が導入されにくい。他の臓器移植では虚血再灌流障害のような自然免疫のシグナルが寛容破綻の原因になり、虚血再灌流障害が獲得免疫反応である拒絶反応に寄与する可能性も報告された。またエンドキシンの低反応性と関連するToll様受容体4の多様性は、肺移植後の患者では急性拒絶反応の発症率の低下と関連する。肺移植後の患者では虚血再灌流障害などによる自然免疫反応の活性化により拒絶反応が発症する可能性がある。

#### (3) 移植における制御性T細胞とエフェクターT細胞

自己抗原に対する免疫反応は、免疫応答を起こすエフェクターT細胞と抑制性の制御性T細胞のバランスによって制御されるが、Th1やTh17のようなエフェクターT細胞や制御性T

細胞の発達は、獲得免疫と自然免疫の両方のシグナルによって制御される。他臓器移植の研究ではCD4+Foxp3+ 制御性T細胞を介して免疫寛容が導入され、寛容導入された異種移植片内にはCD4+CD25+ 制御性T細胞が蓄積する。非制御性のCD4+CD25-Foxp3- T細胞から制御性のCD4+CD25+Foxp3+ T細胞への変化に関わるのがTGF- $\beta$ で、IL-6はTGF- $\beta$ によるFoxp3の誘導を阻害し、制御性T細胞の産生抑制やTh17分化に関わる。

#### (4) 同所性マウス肺移植モデルと免疫寛容

腎・肝移植では約30年前、心移植では約15年前からマウス移植モデルが確立されていたが、肺移植の研究では生理学的なマウス肺移植モデルが存在しなかったため、他臓器移植の研究に比べ遅れをとっていた。これを解決するため世界初の同所性マウス左片肺移植モデルが米国のワシントン大学(セントルイス)で開発された。マウス肺移植では同系のC57B6L/6(B6)→B6移植肺は組織学的に正常だが、異系のBalb/c→B6移植肺は術後7日目でヒト肺移植後と同様の急性拒絶反応を認めた。免疫抑制剤のMR1とCTLA4-Igは抗原提示細胞とT細胞の共刺激を阻害しT細胞の活性化を抑制するが、マウス肺移植後の急性拒絶反応はMR1とCTLA4-Igの2剤投与(二重共刺激阻害)で抑制され、免疫寛容が導入された。この二重共刺激阻害で寛容導入された異系の移植肺では、制御性T細胞であるCD4+Foxp3+ T細胞を認めた。

#### (5) 虚血時間の延長による免疫寛容の破綻

ヒト肺移植では虚血時間の延長が移植肺の生存期間を悪化するため、マウス肺移植モデルでの通常1時間の冷虚血時間を18時間に延長し、冷虚血時間と急性拒絶反応の関係を検討した。Balb/cドナー肺を18時間冷虚血時間

後にB6レシピエントに移植し二重共刺激阻害で免疫抑制を施行したところ、1時間冷虚血時間の場合と違い移植後7日目に高度の急性拒絶反応の所見を認めた。二重共刺激阻害で免疫抑制された移植肺浸潤CD8<sup>+</sup> T細胞の細胞内染色では1時間冷虚血時間よりも18時間冷虚血時間後でIFN- $\gamma$ レベルが著明に高値であった。また1時間冷虚血時間の場合と違い、移植肺浸潤CD4<sup>+</sup> T細胞にFoxp3は発現していなかった。また再灌流後6・24時間における移植肺内のIL-6のmRNAレベルを計測したところ、1時間冷虚血時間より18時間冷虚血時間の方が高値であった。多くの抗原提示細胞の分化に影響を与えるように、IL-6は制御性T細胞とエフェクターT細胞のバランスを制御する際に重要で、寛容原性から抗原性へと変化する際の鍵となる可能性がある。申請者はこれまでマウス肺移植モデルを用いて肺移植後の虚血再灌流障害による単球分化の機序を明らかにし (Sugimoto S, Lin X, Okazaki M, Lai J, Tietjens JR, Huang H, Patterson GA, Krupnick AS, Kreisel D, Gelman AE. **Monocyte Differentiation Is Controlled by MyD88 After Mouse Orthotopic Lung Transplantation**. *Transplant Proc.* 41: 388-390, 2009.)、拒絶反応の機序について共同研究を行ってきたが (Gelman AE, Li W, Richardson SB, Zinselmeyer BH, Lai J, Okazaki M, Kornfeld CG, Kreisel FH, Sugimoto S, Tietjens JR, Dempster J, Patterson GA, Krupnick AS, Miller MJ, Kreisel D. Cutting edge: Acute lung allograft rejection is independent of secondary lymphoid organs. *J Immunol.* 182: 3969-3973, 2009. 他)、本研究では冷虚血時間の延長によるIL-6の増加に着目し、虚血再灌流障害によって免疫寛容が破綻し移植肺の生着が阻害される際のIL-6の役割を検討した。

## 2. 研究の目的

本研究では同所性マウス左片肺移植モデルを用いて、肺移植後の虚血再灌流障害による移植肺生着阻害の機序を解明する。虚血再灌流障害により発生する炎症性シグナルの移植肺生着における役割を明らかにし、炎症性シグナルの抑制による急性拒絶反応の制御を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) IL-6 中和抗体

細胞生存と細胞分化にIL-6が必要なIL-6依存性B9ハイブリドーマ細胞株を使用し、IL-6中和抗体(MP5-20F3)の*in vitro*の効果を検証する。

### (2) IL-6 中和抗体による検討

18時間冷虚血時間でBalb/c $\rightarrow$ B6の肺移植を行い、レシピエント腹腔内にMR1(250  $\mu$ g、移植日)とCTLA4-Ig(200  $\mu$ g、移植後2日目)の2剤を投与(二重共刺激阻害)し免疫抑制療法を行う。IL-6中和抗体100  $\mu$ gを移植前日・当日と移植後1~4日にレシピエントに腹腔内投与する。対照群は同時期にコントロール・イムノグロブリン(IgG)を投与する。移植後7日目にレシピエントを犠牲死させ移植肺を摘出し、ホルマリン固定標本を作成しH&E染色で急性拒絶反応の程度を評価する。またフローサイトメトリー法で、気管支肺胞洗浄液と移植肺中の細胞をThy1.2、CD4、CD8抗体で染色し、エフェクターT細胞(Th1、Th2、Th17細胞)をIFN $\gamma$ やIL-17等の抗体で評価し、CD4<sup>+</sup>制御性T細胞をFoxp3、CD25等の抗体で評価する。移植肺中のマクロファージや樹状細胞の活性化の状態もTNF $\alpha$ 、IL-6等で評価する。気管支肺胞洗浄液と移植肺中の細胞分画(マクロファージ、樹状細胞、単球、好中球、T細胞等)の測定も行う。またELISA

法、RT-PCR 法で移植肺中の炎症性サイトカインを測定する。

### (3) IL-6 ノックアウトマウスでの検討

18 時間冷虚血時間でBalb/c→IL-6 ノックアウトB6 の肺移植を行い、二重共刺激阻害を投与する。移植肺は(2)と同様に評価する。

## 4. 研究成果

まずIL-6中和抗体の生体外での効果を検討するため、IL-6が細胞生存と増殖に必要なセルラインを使用し、IL-6中和抗体が容量依存性にセルラインの増殖を抑制することを確認した。

次に同所性マウス左片肺移植をBalb/cマウスからB6マウスに冷虚血時間1時間で施行し、移植後7日目に急性拒絶反応が発症することを確認した。この急性拒絶反応はMR1とCTLA4-Igの2剤投与（二重共刺激阻害）で抑制され、免疫寛容の導入が可能であった。しかし、Balb/cドナー肺の冷虚血時間を1時間から18時間に延長すると、B6レシピエントに移植後に二重共刺激阻害で免疫抑制を施行しても、移植後7日目に高度の急性拒絶反応の所見を認めた。IL-6中和抗体のマウス生体内での効果を検討するため、移植日前日にドナーBalb/cマウスにIL-6中和抗体を投与し、18時間冷虚血時間でB6レシピエントに移植し二重共刺激阻害による免疫抑制を施行した。レシピエントにもIL-6中和抗体を移植日前日、移植日から術後4日目まで投与した。未治療のマウスに比べ、移植後7日目の急性拒絶反応が軽度であり、フローサイトメトリーでは移植肺内のIFN- $\gamma$ 産生CD8陽性Tリンパ球の割合が著明に低下していた。これらは肺移植後の虚血再灌流障害による移植肺生着阻害においてIL-6が重要な役割を果たしていることを示している。

最後にIL-6ノックアウトマウスを用いた検討を行った。18時間冷虚血時間で異型間のBalb/c→IL-6ノックアウトマウスの肺移植を行い、二重共刺激阻害による免疫抑制療法を施行すると、B6レシピエントに比べ移植後7日目の急性拒絶反応は抑制され、IL-6中和抗体を投与した群と同様であった。

これらの結果は肺移植後の虚血再灌流障害による移植肺生着阻害においてIL-6が重要な役割を果たしていることを示しており、急性拒絶反応の発症を抑制する一つの機序を示していると考えられる。今後、虚血再灌流障害によって増加する炎症性シグナルの制御機構を更に解明していくことが望まれる。

## 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）

〔学会発表〕（計2件）

①杉本誠一郎、Huang HJ、岡崎幹生、脇直久、三好健太郎、大谷真二、原田昌明、山根正修、大藤剛宏、Patterson GA、Kreisel D、Gelman AE、三好新一郎。骨髓細胞I $\kappa$ Bキナーゼ $\beta$ の欠損による肺移植後免疫寛容の導入阻害。第63回日本胸部外科学会定期学術集会（平成22年10月25日、大阪国際会議場）

②杉本誠一郎、岡崎幹生、脇直久、三好健太郎、大谷真二、原田昌明、山根正修、大藤剛宏、Patterson GA、Kreisel D、Gelman AE、三好新一郎。緊急顆粒球形成による移植肺の生着阻害。第46回日本移植学会総会（平成22年10月22日、京都みやこメッセ）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉本 誠一郎 (SUGIMOTO SEIICHIRO)  
岡山大学・岡山大学病院・助教  
研究者番号：40570148

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者