

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390334

研究課題名(和文)肺移植後の拒絶反応抑制の治療方法の開発 - IL-6増幅回路の遮断を用いた治療戦略 -

研究課題名(英文)Development of novel method to control chronic rejection after lung transplantation using suppression of IL-6 amplifier

研究代表者

奥村 明之進 (Okumura, Meinoshin)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40252647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円、(間接経費) 4,050,000円

研究成果の概要(和文)：肺移植は進行性で不可逆的な慢性呼吸不全に対して臓器置換型の根治的治療法として確立されているが、肺は他の臓器に比して拒絶反応が起こりやすく他の臓器の移植に比べて長期生存率は低い。したがって拒絶反応の抑制が、肺移植の長期成績の向上には極めて重要である。

我々はこれまでに、IL6によって誘導されるTh17細胞がB0の発症に関与していることを明らかにしてきた。本研究では、IL-6 amplifierの増幅回路とEGF、CCL2の発現を介してB0が発症することを動物実験と肺移植後のB0病変の生検検体を用いて明らかにした。本研究結果は、肺移植後の慢性拒絶反応を抑制する新たな治療戦略の構築につながる。

研究成果の概要(英文)：Lung transplantation has been established as the curative treatment for chronic progressive severe respiratory failure. Rejection of the graft is, however, most common in lung transplantation and graft survival is the poorest among all the organ transplantations. Therefore, suppression of rejection is essential to improve the long-term outcome of lung transplantation. We showed that Th17 cells induced by IL-6 play an important role in bronchiolitis obliterans (BO) which is supposed to be the result of chronic rejection after lung transplantation.

In the present study, we further clarified that IL-6 amplifier, EGF, and CCL2 BO are involved in initiation of BO in the animal model as well as the clinical specimens. These results are supposed to lead to innovation of the novel method to suppress chronic rejection after lung transplantation.

研究分野：外科

科研費の分科・細目：呼吸器外科

キーワード：肺移植 拒絶反応 免疫抑制 IL-6 amplifier EGF

1. 研究開始当初の背景

肺移植は、進行的で不可逆的な慢性呼吸不全に対して臓器置換型の根治的治療法として確立されており、本邦においても脳死ドナーあるいは生体ドナーからの肺移植は年間に合計で 40 例程度行われている。しかしながら、肺は他の臓器に比して拒絶反応が起こりやすく、国際心肺移植学会の集計では 5 年生存率は 50%程度であり、他の臓器の移植に比べて長期生存率は低い。拒絶反応の抑制が、肺移植の長期成績の向上には極めて重要である。

肺移植後の慢性拒絶反応は閉塞性細気管支炎(BO)という形態で発症することが知られているが、その発生メカニズムは未だ不明なところが多い。我々はマウスの肺移植動物実験により Th17 細胞が BO の発症に関与していることを明らかにしてきた。近年の基礎免疫学研究の進歩により、Th17 細胞の分化には IL-6 が関与していることが明らかにされている。炎症部位では、繊維芽細胞が分泌する IL-6 により Th17 細胞が誘導されると、その Th17 細胞がさらに IL-6 を産生し、Th17 細胞の分化が一層促進されるという IL-6 増幅回路の存在が明らかにされている。さらに、IL-6 receptor のシグナル伝達には JAK2/STAT3 が介在すること、Th17 細胞の分化は $I\kappa B$ とも関与していることが既に明らかにされている。また、1 型コラーゲンを発現する上皮細胞の IL-6 amplifier における関与も認められている。

我々は今回、以上の基礎免疫学の最新知見を持って、肺移植の臨床の現状の問題の解決を目指すこととした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウスの小動物モデルによる気管移植の実験的研究と臨床の肺移植の診療において得られる検体を用いて、BO の発現における Th17 の誘導のメカニズムの詳細を解明することである。そして、肺移植後の慢性拒絶の克服のための新しい治療方法の開発につながることを最終の目標とする。

3. 研究の方法

①動物実験による基礎研究

マウス気管移植モデルを用いて以下の研究を行う。マウスは C57BL/6 と C3H/He の 2 系統を使って、気管移植の Allo 気管移植の系を用いた。

また、IL-6-deficient マウス、human gp130 variant (S710L)を有する F759 マウス、Type I collagen-Cre マウス、STAT3flox/flox マウス、gp130flox/flox マウス、IKK-gflox/flox マウス、STAT1 欠損マウスなどの遺伝子操作マウスも用いた。これらの遺伝子操作マウスは C57BL/6 マウスとの交配を重ねて C57BL/6 の遺伝的背景にした。

移植された気管グラフトの顕微鏡的形態、免疫組織染色、ELISA によるタンパク定量により、BO の病態と発症機序を探索した。

②ヒトの肺移植の BO 病変の生検組織による検討

肺移植後には定期的な気管支鏡下肺生検が必要であり、また慢性拒絶が疑われた場合も生検による診断が必要である。今回、BO 病変の生検検体が得られたので、その組織を用いて免疫組織染色により、実験的研究の知見が臨床検体においても再現されるかどうかを検証した。方法は免疫組織染色で、ヒトの肺移植後の生検組織における各腫のタンパクの発現を評価した。

4. 研究成果

B6 マウス由来の気管グラフトを C3H/He マウスに移植した場合の組織像を図 1 に示す。コントロールと比し、明らかに STAT3 と $NF\kappa B$ のリン酸化が認められ、IL-6 の発現が認められる。

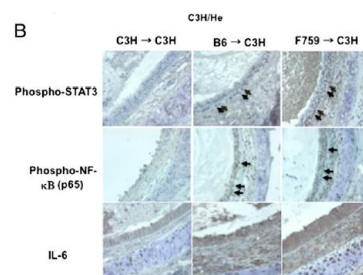


図 1

B6 マウス由来の気管グラフトを C3H/He マウスに移植した後、IL-6 の発現が day 3 以降、著明に上昇し、少なくとも day14 まで遷延していることが示された。(図 2)

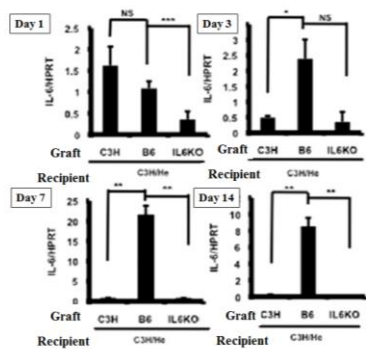


図 2

各種の遺伝子操作を受けたマウス由来の気管グラフトを C3H/He マウスに移植した後の気管グラフトの病理学的評価を行った。図 3 に示す如く、グラフトの IL6 シグナルが欠損しているグラフトと I 型コラーゲン産生上皮細胞に障害のあるグラフトでは BO の形成が軽減された。

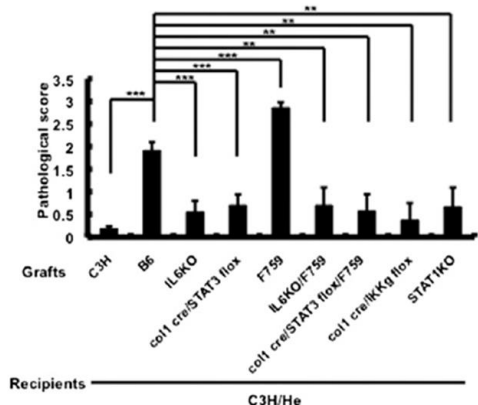


図 3

逆に、C3H/He マウス由来の気管グラフトを各種の B6 マウスに移植した場合のグラフトの組織像の評価を図 4 に示す。レシピエント側の IL6 のシグナルの欠損がグラフトの BO の発症に影響を与えないことが示された。

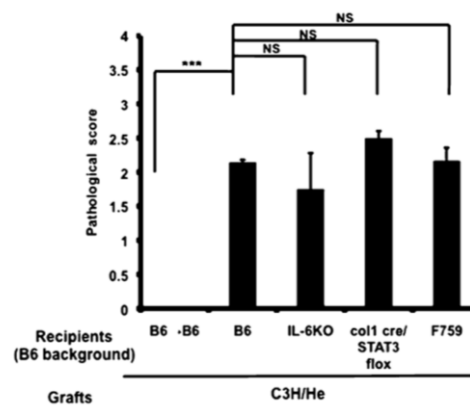


図 4

B6 マウス由来の気管グラフトを C3H/He マウスに移植した後のグラフトの上皮細胞増殖因子 EGF の発現を検討した。図 5 に示されたごとく、day 3 以降、著明に上昇し、少なくとも day14 まで遷延していることが示された。IL6 が欠損するグラフトでは EGF の発現は誘導されなかった。

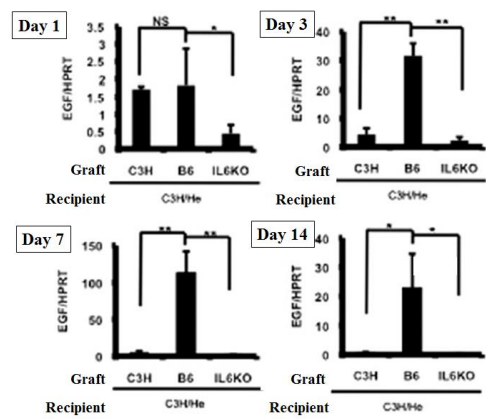


図 5

また、図 6 に示すように、B6 マウス由来の気管グラフトを C3H/He マウスに移植した後、グラフト内には EGF の受容体である ERB-B1 の発現上昇も確認された。

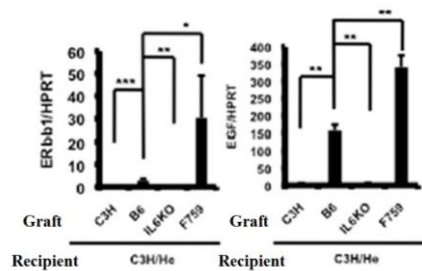


図 6

B6 マウス由来の気管グラフトを C3H/He マウスに移植した後のグラフト内の CD44+CD4+ T 細胞の存在を図 7 に示す。IL-6 のシグナルが障害されている系では、CD44+CD4+ T 細胞の蓄積が少なかった。

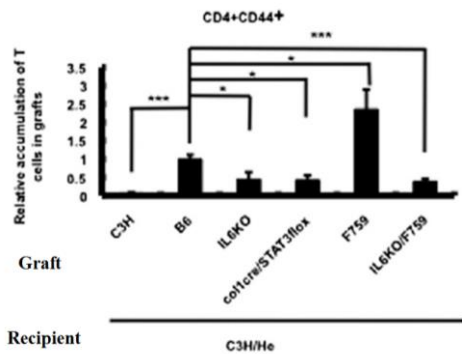


図 7

さらに各種の中和抗体を投与した場合、抗 CD4 抗体が BO の発症を阻害することが示された。(図 8)

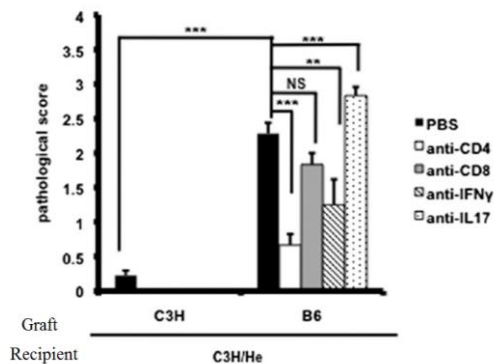


図 8

次に B6 マウス由来の気管グラフトを C3H/He マウスに移植した後のグラフト内の CCL2 の発現を検討したところ、図 9 に示すように、allo 移植では CCL2 の発現が著明の上昇していたが、IL-6 の機能がないと CCL2 の発現も誘導されなかった。

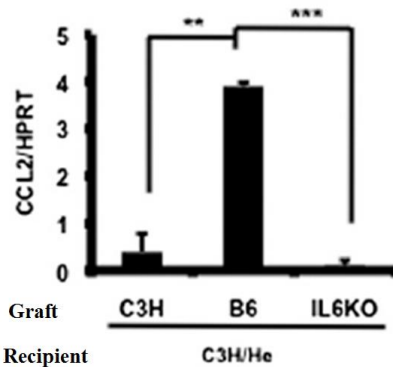


図 9

そして図 10 に示されるように、BO の発症は抗 CCL2 抗体投与のより軽減された。

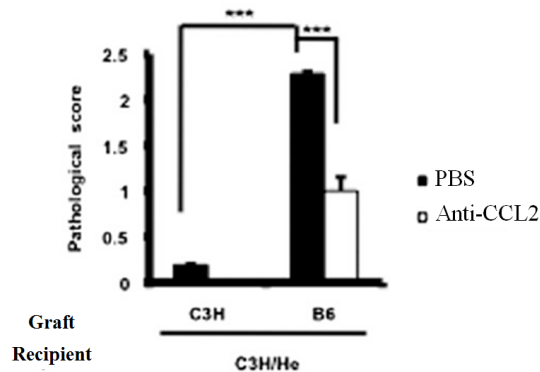


図 10

臨床検体の評価を図 11 から図 18 に示す。

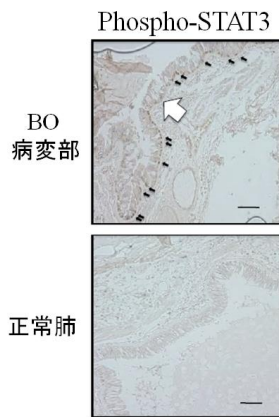


図 11

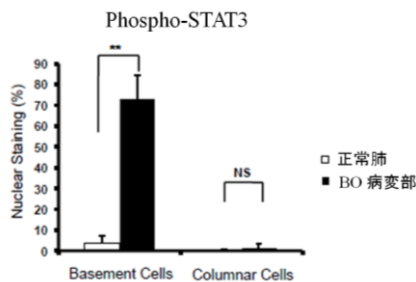


図 12

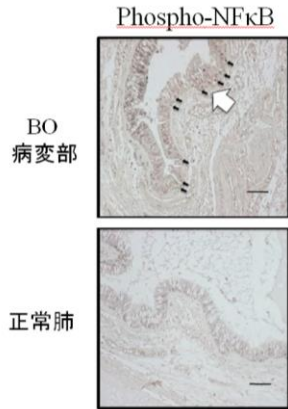


図 1 3

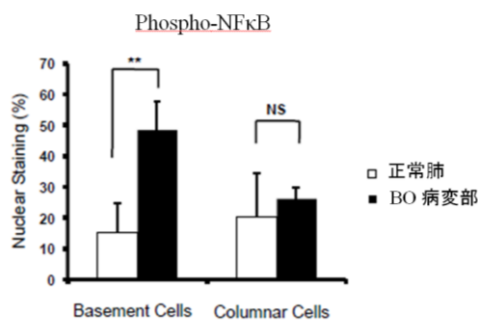


図 1 4

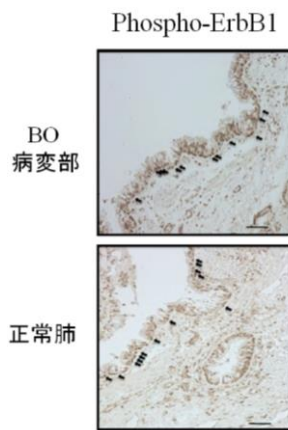


図 1 5

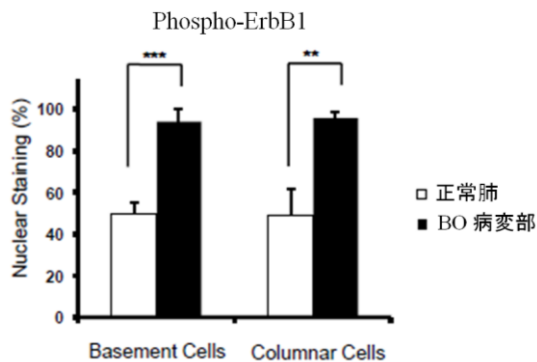


図 1 6

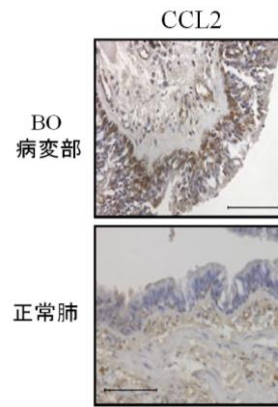


図 1 7

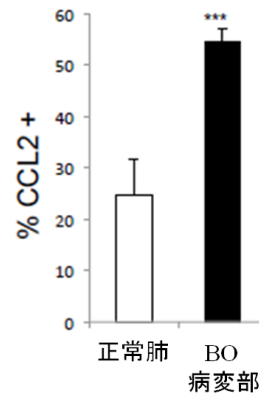


図 1 8

BO の発症部位では、SYAT3 のリン酸化、NFκB のリン酸化、ERB-B1 のリン酸化、CCL2 の発現が認められ、マウスの気管移モデルの結果と矛盾しなかった。

以上の結果から、IL-6 amplifier の経路が移植後の肺組織でも惹起され、BO の発症につながることを示唆された。(図 19)

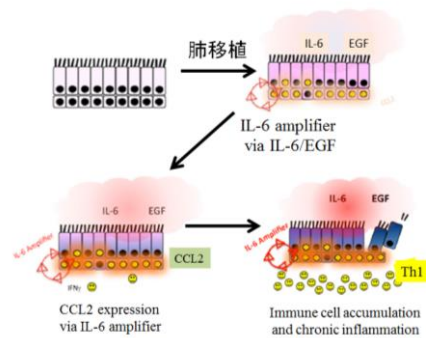


図 1 9

IL-6 のシグナルの抑制は BO の発症を阻害すると考えられ、現在、臨床応用への研究を進めている。IL-6 receptor に対するモノクローナル抗体は、マウス型・ヒト型と

もに確立されており、現在、マウス型の抗体を用いてマウス移植モデルでの効果の検討を行っており、移植後のグラフトの形態、病理像、リンパ球浸潤の程度、Th17 細胞の分布、STAT3 のリン酸化の有無の評価を施行している。また、亜鉛は STAT3 の立体構造を変化させ、IL-6 のシグナルを阻害することが知られており、亜鉛の経口投与が BO の発症を抑制するかどうかを検証している。

さらに、B6 マウス由来の気管グラフトを C3H/He マウスに移植するモデルにおいて、EGFR の細胞内ドメインのチロシンキナーゼ(EGFR-TKI)を阻害する gefitinib (イレッサ) を投与したところ、BO の抑制が確認された。今後、EGFR-TKI の阻害薬も BO の抑制剤として有効である可能性が示された。

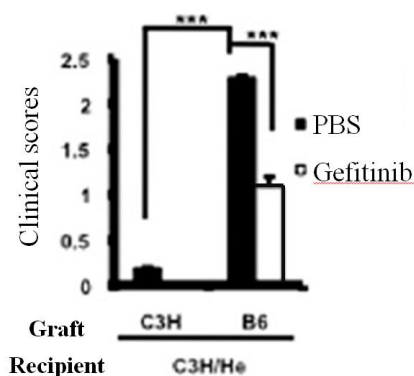


図 2 0

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 5 件)

①Lee J, Nakagiri T, Oto T, Harada M, Morii E, Shintani Y, Inoue M, Iwakura Y, Miyoshi S, Okumura M, Hirano T, Murakami M, IL-6 amplifier NF- κ B-triggered positive feedback for IL-6 signaling in grafts is involved in allogeneic rejection responses, Journal of Immunology, 査読有, 189, 2012, 1928-1936

②Lee J, Nakagiri T, kamimura D, Harada M, Oto T, Susaki Y, Shintani Y, Inoue M, Miyoshi S, Morii E, Hirano T, Murakami M, Okumura M, IL-6 amplifier activation in epithelial regions of bronchi after allogeneic lung transplantation.

International Immunology, 査読有, 25, 2013, 319-332

③奥村明之進、澤芳樹、心肺移植の適応・術式・成績、移植、査読無、48 巻、2013、192-200

[学会発表] (計 9 件)

① Okumura M, Current status of lung transplantation in Japan, Congress of the Asian Society of Transplantation, 2013/9/5 ~2013/9/7, Kyoto

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 明之進 (OKUMURA Meinoshin)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 40252647

(2) 研究分担者

南 正人 (MINAMI Masato)

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 10240847

井上 匡美 (INOUE Masayoshi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 10379232

澤端 章好 (SAWABATA Noriyoshi)

大阪大学・医学系研究科・招聘教授

研究者番号: 50403184

新谷 康 (SHINTANI Yasushi)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号: 90572983

中桐 伴行 (NAKAGIRI Tomoyuki)

大阪大学・医学系研究科・招聘教員

研究者番号: 70528710

(3) 連携研究者

()

研究者番号: