

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790901

研究課題名（和文）同種造血幹細胞移植後閉塞性細気管支炎に対するイマチニブの効果

研究課題名（英文）Effect of imatinib in bronchiolitis obliterans syndrome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

研究代表者

早稲田 優子 (WASEDA YUKO)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：80536037

研究成果の概要（和文）：マウス肺移植モデルに対して c-kit ノックアウトマウスを使用したところ、ドナーの c-kit をノックアウトした場合、有意に BO が抑制された。このことより、肺移植後の最大の合併症である BO をドナーの c-kit を抑制することにより減少することが出来る可能性が示唆された。

よって、イマチニブ投与により BO を減少することが出来る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the mouse lung transplantation model, BO was significantly controlled when we used the c-kit knockout model as donor. We had the possibility to be able to reduce BO, which is the biggest complications after the lung transplantation, by controlling c-kit of the donor.

Therefore, We thought about the possibility that we could decrease BO with imatinib.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：細胞移植学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：閉塞性細気管支炎

1. 研究開始当初の背景

近年急性白血病を始めとする血液悪性疾患の治療として同種造血幹細胞移植（SCT）は有効な治療として確立されている。ただし、SCTを行った症例の5%前後は合併症として閉塞性細気管支炎（BO）を生じる（Afessa B et. al. Bone Marrow Transplant. 28: 425-434, 2001, Holland HK et. al. Blood 72: 21-627, 1988）。

BOは慢性移植片対宿主病（cGVHD）との関連が報告されており（Yousem SA. Hum Pathol 26: 668-675, 1995, Schwarzer AP et. al. Transplantation 54: 1002-1008, 1992）、内科的治療としてはcGVHDに準じてステロイド療法、免疫抑制療法など、またBOに対してアジスロマイシン療法（Susan G et. al. Am J Respir Crit Care Med 168: 121-125, 2003）やスピリーバによる気道拡張療法

(Barisione G et. al. 19: Chest Epub ahead of print, 2010) が有効であるとの報告もあるが、実際の臨床ではこれらの治療を行っても通常は1年以内に急速に増悪する。

唯一の治療法としては生体肺移植や脳死肺移植があげられ、国内でもB0に対する肺移植成功例が報告されるようになった (Date H et. al. J Thorac Cardiovasc Surg 128: 933-940, 2004)。ただし、肺移植に対する問題点としては、悪性疾患が肺移植時点で寛解となっていること (再発の見込みがほとんどないこと)、生体肺移植に関しては左右別々のレシピエントから肺の下葉を移植するため、2親等以内のレシピエントが2人いること、さらにドナー、レシピエントの年齢制限があること、脳死肺移植に関してはドナー登録から肺移植までに数年要するため、たいてい待機中に呼吸不全増悪し、肺移植ができなくなることなどより、ほとんどの症例は肺移植ができずに死の転帰をとげることとなる。

2003年から2009年の間、金沢大学附属病院呼吸器内科にてSCT後に発症したB0症例 (病理組織にて確定診断) を3例経験した。うち2例 (どちらも原疾患は急性リンパ性白血病) はB0を発症してから月単位の進行をし、そのうち1例は人工呼吸器管理となった上で、生体肺移植を行い、もう1例は急速にB0が進行したため、生体肺移植を予定していたところ、準備段階で原疾患の再発が判明しB0があるため原疾患の治療も行えず死亡した。それに比して残りの1例は原疾患が慢性骨髄性白血病 (CML) であり、SCT後にB0が発症、同時期に原疾患も再発しCMLのBcr-ablに対して効果があるチロシンキナーゼ阻害薬、イマチニブの投与が開始となっている。本患者はB0の進行が他の2例と比して明らかに遅く、年単位でわずかに進行しているのみであった。また、イマチニブの副作用に対して1カ月ほど

イマチニブを中止したが、中止後呼吸機能検査が増悪し、B0の急速な進行が考えられた。そののち第二世代チロシンキナーゼ阻害薬であるダサチニブを投与したところ呼吸機能の改善を認めた。このことから、B0の進行を阻止するものとして、チロシンキナーゼ阻害薬の関与が考えられた。文献的検索では、cGVHDに対してイマチニブが効果があったというものが散見される (Olivieri A et. al. Blood 114: 709-718, 2009, Margo L et. al. Bone Marrow Transplantation 42: 757-760, 2008)。

また、B0患者の気道の閉塞部位である細気管支周囲にbcr-abl以外にイマチニブが作用するとされるc-kitが存在することが報告されている (Neil E. Fuehrer, Arch Pathol Lab Med. 133: 1420-1425, 2009)。また、マウスB0モデル作成に関する報告もあり (Angela Panoskaltzis-Mortari, Am J Respir Crit Care Med. 176: 713-723, 2007)、当科にて経験した3例の肺の組織のうち閉塞している細気管支にc-kitが存在し、動物実験モデルとしてマウスB0モデルにイマチニブを投与した際にはB0発症の割合が低下するという仮説を立てた。

2. 研究の目的

研究期間内に当院にて経験した3例の肺の病理標本に免疫染色を行い、細気管支にc-kitが存在することを確認した上で、動物実験モデルとしてマウスB0モデルにイマチニブを投与した際にB0発症の割合が低下することを証明する。

3. 研究の方法

実験①ヒトSCT後B0標本の細気管支領域におけるc-kitの存在

(1) 対象

2003年から2009年の間、金沢大学附属病院血液内科および関連施設においてSCTが施行され、合併症としてB0が発症し金沢大学附属病院呼吸器内科紹介となり、外科的肺生検により病理学的にB0と確定診断された3例（慢性骨髄性白血病1例、急性リンパ性白血病2例）。

（2）方法

ホルマリン処理された肺組織よりパラフィンブロックを作成し、未染標本を作製する。

対象として当院にて手術を施行された自然気胸患者の肺組織を使用（3例）。

外注業者に委託し、CD117（c-kit）の免疫染色を施行。

細気管支のc-kitの染色割合をカウントする。

実験②マウスB0モデルにおけるイマチニブの効果の検討

（1）B0モデル作成

8～10週齢のC57BL/6マウスをレシピエントとし、8～12週齢のC57BL/6マウスをドナーとする。Angelaらの方法により（Angela Panoskaltsis-Mortari, Am J Respir Crit Care Med. 176: 713-723, 2007）B0モデルを作成

ドナーマウス骨髄は抗Thy1.2モノクローナル抗体にてT細胞を枯渇させる。

レシピエントマウスは移植3日前、2日前にcyclophosphamide 120mg/kg/日を腹腔内投与し、前日に全身放射線照射（0.39Gy/分、合計7.5Gy）を施行する。

15×10⁶のT細胞を処理した同種骨髄と1×10⁶の脾細胞をレシピエント尾静脈より移植する。

投与開始から60日後にマウスを屠殺し、マウスから肺を取り出す。

ホルマリン処理を行い、パラフィンブロック作成し、未染標本を作製。

H-E染色を行い、B0発症の割合を評価する。

（2）マウスB0モデルにおけるイマチニブの効果

上記報告よりSCTしたマウスの中でB0が発症するのは40%程度と考えられるため、

1. SCT+アラビアゴム群
2. SCT+イマチニブ群
3. ノーマル+イマチニブ群
4. ノーマル+アラビアゴム群

の4群を40匹ずつ計160匹作製する。チロシンキナーゼ阻害薬であるイマチニブ100mg/kgをアラビアゴムにより作成したゲルに懸濁し、毎日経口投与する。

投与開始から60日後にマウスを屠殺し、マウスから肺を取り出し、かつ心臓穿刺にて採血を行う。

ホルマリン処理を行い、パラフィンブロック作成し、未染標本を作製。H-E染色、CD117（c-kit）の免疫染色を行う。

一部は-80℃の冷蔵庫で保存。

H-E染色においてB0発症の割合を評価する。

CD117（c-kit）免疫染色においてCD-117陽性細胞の割合を評価する。

線維化の指標としてSchrierらの方法に従い、肺組織のヒドロキシプロリン測定を行う

（Schirier et. al. Am Rev Respir Dis 127: 614-617, 1983）。

(3) マウスB0モデルにおける
炎症性サイトカイン動
態への影響

両モデルにおけるCCL2 (MCP-1)、CXCL1(KC)、CXCL2(MIP-2)、IFN- γ 、TNF- α 、VEGF、IL-10、IL-5、IL-6、IL-13、IL-12p70、IL-17をLuminex社のマルチプレックスアッセイにて測定、PDGF-AB、CXCL10(IP-10)、TGF- β はR&D社のELISAキットにて測定。

(4) 総括

1. B0モデルにおけるc-kit発現の確認
2. イマチニブ投与によるB0の割合の変化を検討
3. イマチニブ投与によるc-kit発現量の変化の検討
4. サイトカインから見た炎症と線維化の変化の検討
5. B0モデルに対するイマチニブ投与の有用性の検討

4. 研究成果

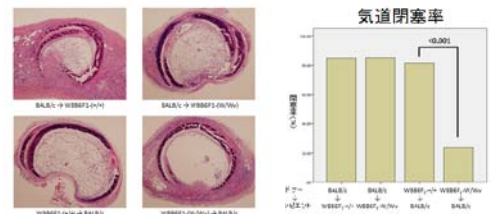
実験①ヒトSCT後B0標本の細気管支領域におけるc-kitの存在

当院にて経験した同種造血幹細胞移植後の組織にて証明された閉塞性細気管支炎 3 例 (CML 1 例、ALL 2 例) の肺組織においてCD117(c-kit)の免疫染色を行ったところ、いずれの症例も気管支細気管支周囲にもc-kit陽性細胞が存在することを確認した。ただし、コントロールに使用した、気胸患者に関しても同様にc-kit陽性細胞が存在することが分かった。

実験②マウスB0モデルにおけるイ

マチニブの効果の検討

当初はマウスの同種造血幹細胞移植を行い、B0を作成す



る予定であった。しかしこのB0モデルは、同種造血幹細胞移植の手技が煩雑であること、B0発症が少ないことから、モデルとして用いることは難しいと判断した。現在B0モデルとしては、異種マウス気管移植モデル (Heterotopic tracheal transplantation: HTT) が最も多用されている (Am J Pathol 1993;142:1945-1951、Am J Transplant. 2009;9(9):1981-1987)。過去の文献をもとに、我々はHTTによるB0モデルの作成 (ドナーBALB/c レシピエントB57BL/6) に成功した。Isograft群ではday14に一旦上皮は欠損するものの、day28にはほぼ元通り上皮は再生するが、Allograft群ではday3よりほぼ全て上皮が欠損し、それ以降はday28までそのまま欠損していることが分かった (p<0.05)。また、気道閉塞率に関しては、どちらの群もday14までは軽度閉塞を認めるが、day28においては、Allograft群の気道閉塞率が100%であり、有意差を持って気道が閉塞することが示された (P<0.05)。

我々は、B0にc-Kitが関与しており、さらにレシピエント側のc-Kitが気道閉塞に関与すると仮説を立て、c-kitノックアウトマウス (WBB6F1-W/Wv) を用いてB0モデルを作成した (下記参照)。

結果は、c-kitノックアウトマウスの気管をドナーとして移植した組み合わせで、有意に気道閉塞が抑制された (下記参照)。結果は当初の仮説と異なり、レシピエント側のc-Kitは気道閉塞には影響せず、ドナー側にc-Kitノックアウトマウスの気管を用いた場

合に気道閉塞が抑制された。以上より、B0に c-Kit が関与していること、および移植気管側の c-Kit が B0 形成に関与していることが示唆された。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早稲田 優子 (WASEDA YUKO)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：80536037

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし