

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791460

研究課題名(和文)肺移植後肺内リンパ組織新生が抗ドナー抗体局所産生により慢性拒絶に果たす役割

研究課題名(英文)Playing an important role in antibody-mediated rejection after lung transplantation.

研究代表者

佐藤 雅昭(SATO, MASAOKI)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00623109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ドナー特異抗体の産生に伴う抗体関連拒絶は肺移植後慢性拒絶の重要なメカニズムである。我々はラット肺内気管移植による肺慢性拒絶モデルを用いて拒絶に伴う肺内リンパ組織新生を証明し、リンパ組織新生を生じた肺組織の培養上清から、ドナー特異抗体の産生を証明した。この現象は異系統ラット間移植でのみ認められ、同系統ラット間移植では認められなかった。血清、脾臓でもドナー特異抗体は産生されたが一時的(週単位)であるのに対し、肺内で産生される抗体は持続的に少なくとも数ヶ月単位で産生された。リンパ組織新生を介した局所の免疫反応・抗体産生(血清検査で検出しえない)が、抗体関連拒絶に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We used an intrapulmonary tracheal transplant model as an animal model of chronic rejection after lung transplantation and demonstrated intrapulmonary lymphoid neogenesis in association with rejection and then demonstrated production of donor-specific antibodies in the supernatant of cultured lung tissue recovered from recipient rat lungs after tracheal transplantation that accompanied lymphoid neogenesis. This phenomenon was observed only after allograft transplantation, not isograft transplantation. We also demonstrated production of donor-specific antibodies in the recipient serum and the spleen but only temporarily (weeks), while production of donor-specific antibodies in the lung persisted at least a few months. Local immune responses mediated by lymphoid neogenesis and consequent antibody production, which cannot be detected in the serum, is suggested to play an important role in antibody-mediated rejection after lung transplantation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：呼吸器外科

キーワード：肺移植 抗ドナー特異抗体 リンパ組織新生 抗体関連拒絶 慢性拒絶

1. 研究開始当初の背景

肺移植は末期の良性肺疾患に対する治療として欧米で確立され、本邦においても症例が増加しつつある。しかし移植後の長期予後は他臓器の移植と比べ劣っており(5年生存率: 50-60% vs. 70-80%) その主な原因は**移植後慢性期の移植片機能不全 (chronic lung allograft dysfunction: CLAD)** である。CLAD はかつては「慢性拒絶」と呼ばれたが、拒絶以外に複数の因子(例えば感染)も関与していることから、現在では CLAD と呼ぶことが一般的となりつつある。CLAD の機序として近年、**抗ドナーHLA 抗体**による液性免疫の関与が明らかになってきた。申請者らのトロント大学での検討では、肺移植後にドナー特異抗体(donor specific antibody: DSA)を新規に検出した患者が移植後2年以内に CLAD を発症する可能性は、そうでない患者に比べて有意に高い(未発表データ)。これは他施設からの複数の研究結果からも支持されている。

申請者はトロント大学での研究で、CLAD におかされた human の移植肺には多数の**リンパ組織新生(lymphoid neogenesis)** が認められることを見出した。リンパ組織新生の結果、移植肺に CD45RO+ memory phenotype の T リンパ球が常在し、慢性的な気道炎症をさらに増悪させるメカニズムが明らかになった。このリンパ組織新生では T リンパ球と並んで B リンパ球の集簇も認められる。続く研究では human では CLAD におかされた移植後肺において、B リンパ球の trafficking に必要なケモカイン、CXCL13 の発現が認められている。この「**移植された肺そのものがリンパ節化する**」メカニズムは、何らかの炎症(拒絶または感染)の遷延と、それに引き続く stromal resident cell の活性化、通常はリンパ組織にのみ認められる各種ケモカインや接着分子の異所性発現が関与している。

2. 研究の目的

肺移植の長期成績に最も大きな影響をもつ慢性期移植片機能不全(Chronic lung allograft dysfunction(CLAD)--慢性拒絶、bronchiolitis obliterans syndrome (BOS)ともよばれる)の機序として、抗ドナーHLA 抗体による液性免疫が注目されている。また申請者はこれまで、肺内でのリンパ組織新生 lymphoid neogenesis と CLAD との関連を human の肺移植で見出した。本研究では、lymphoid neogenesis に伴う B リンパ球の肺内での集簇が局所での抗ドナー抗体産生と組織障害に関与しているとの仮説に基づき、CLAD の動物モデルを用いて、肺内 lymphoid neogenesis での B リンパ球が産生する抗体の作用を *in vitro* および *in vivo* で検討し、また B 細胞集簇に重要なケモカイン過程(CXCL13-CXCR5axis)を阻害することで、臨床応用の可能性を探求することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究の目的は、CLAD 動物モデルを用いて、移植後肺内リンパ新生(lymphoid neogenesis)において集簇する B リンパ球が、ドナーMHC 特異抗体を産生し、移植片の組織障害に寄与するかどうかを検討することである。この研究目的を達成するために申請者は、既に確立されているラット肺内気管移植モデルを用いて、以下の3つの研究方法を用いる。移植後肺内リンパ組織から抽出した B リンパ球を培養し、培養上清のドナー特異抗体の含有、およびそのドナー由来細胞への反応性、障害性を *in vitro* で検査する。上記抗体を含む培養液を、もとの allograft と同じ allograft を移植されたヌードラットに投与し、グラフト障害を来たすかどうかを *in vivo* で検討する。CXCL13 中和抗体、および CXCR5 中和抗体を用いて、肺内リンパ組織新生と

移植片拒絶が阻害されるかどうかを *in vivo* で検討し、本研究結果の臨床応用の可能性を探る。

4. 研究成果

ラット肺内気管移植モデルを用いて、拒絶に伴う肺内リンパ組織新生を証明し、リンパ組織新生を生じた肺組織の培養上清から、ドナー特異抗体の産生を証明した。

まず Brown-Norway rat の気管を Lewis rat の左肺内に移植し、術後 14 日、28 日、84 日でそれぞれ肺内に、T-cell zone, B-cell zone を伴うリンパ組織新生が生じることを組織学的に示した。Lewis rat の気管を Lewis rat に移植した場合は、リンパ組織はわずかに生ずるが日を追って消退した。上記の各タイムポイントで、レシピエントラットの血清、脾臓、肺組織を採取し、脾臓と肺組織は 4 日間培養した。血清および培養上清をそれぞれ Lewis, Brown-Norway rat の脾細胞（リンパ球）と反応させフローサイトメトリーで計測したところ、Brown-Norway から Lewis への allotransplant を行ったレシピエントラットから採取した血清および脾臓・肺組織の上清で特異的に、Brown-Norway 由来のリンパ球に反応が起こることを証明した。さらに血清では移植後 14 日、脾臓培養上清では移植後 28 日に反応のピークが来てその後低下したのに対し、肺組織培養上清では反応性が経時的に上昇した。これらの結果は、肺内におけるリンパ組織新生の結果、ドナー特異抗体の局所産生がおこり、血清でのドナー特異抗体が検出できなくなった後も抗体産生が持続するというわれわれの仮説を支持するものである。

一方、肺組織の培養上清を Brown-Norway rat の気道内に投与する実験では、予想された肺病変はほとんど出現せず、Lewis rat に投与した場合と有意な差を認めなかった。

投与する抗体の経路や量に問題があった可能性がある。

Lewis rat 由来の fibroblast に Brown-Norway rat MHC class I (RT-1An) をプラスミドベクターを用いて発現させ、抗ドナー抗体の特異性をさらに証明する実験では、ベクターの transfection 効率が低く、現在手技の改善、および transfection の対象を NIH3T3 細胞に変更して実験を試みている。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者名 Motoyama H, Sato M, Aoyama A, Sowa T, Shikuma T, Chen F, Hiroshi Date

発表表題 Local production of donor specific antibodies (DSA) by intrapulmonary de novo lymphoid tissue associated with allograft airway rejection
学会名 The 34th International Society for Heart and Lung Transplantation, Annual meeting and Scientific Sessions
発表日時 2014 年 4 月 10 日

発表場所 Manchester Grand Hyatt, San Diego, U.S.A.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

()

研究者番号：

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：