

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462173

研究課題名(和文) 移植肺拒絶における自然免疫の役割の解明：マウス肺移植モデルによる試み

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of transplanted rejected airways with special reference to innate immunity

研究代表者

村川 知弘 (Murakawa, Tomohiro)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：50359626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫系受容体の一つである toll-like receptor 4 (TLR4) の機能が欠損したマウスをレシピエントとした場合、移植気道の線維化が軽減されるという結果が得られた。このことは、移植気道に対する免疫応答と組織リモデリングプロセスが獲得免疫系のみによって引き起こされるのではなく、TLR4 のシグナル伝達によって修飾されていることを意味する。将来的には、既存の免疫抑制剤に加え TLR4 阻害剤を使用することで移植片の線維化を抑制できるのではないか、という新たな治療方法の可能性を示唆する研究成果である。

研究成果の概要(英文)：We confirmed that allograft airway fibrosis was reduced in toll-like receptor 4 (TLR4) mutant recipient mouse. This result suggests that not only acquired immunity but also innate immunity including TLR4 signal transduction control allo-immune response and tissue remodeling. In future perspective, using TLR4 inhibitor may be an innovative therapeutic option to reduce allograft airway fibrosis that cannot be inhibited by already established immune-suppressants.

研究分野：胸部外科学

キーワード：肺移植 閉塞性細気管支炎 自然免疫

### 1. 研究開始当初の背景

終末期肺病変に対する唯一の救命方法は肺移植である。肺機能を長期に渡り補助しうる補助人工臓器が不在のためこの状況は暫く継続するものと考えられる。しかしながら肺移植の長期予後は他の固形臓器移植に比べて著しく悪く、5年生存率で約50%となっている。その原因の一つとして慢性移植肺機能不全 Chronic lung allograft dysfunction (CLAD) が挙げられる。CLAD は更に Bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) と restrictive allograft syndrome (RAS) に分けられ、その予後が両者で異なることが知られている。しかし、BOS と RAS のどちらも発症機序の詳細は不明であり、内科的に治療することは不可能なため、進行した場合の根本的な治療は現状としては再肺移植しかない。また CLAD の発症は今日における既存の免疫抑制剤によって予防することができないため、未知の様々な刺激が関与しているものと想像されるが、その一つとして、自然免疫系に属する toll-like receptor (TLR) の関与が疑われる。TLR は哺乳動物の細胞膜に存在しており、病原体成分を認識し、感染防御の第一線を担っている。肺は外界の刺激に絶えず曝されるという特殊な環境に存在する臓器であり、当然のことながら気道には常在細菌叢も存在する。このため、病原体成分や大気汚染物質などが移植肺に慢性的な炎症を起こし、CLAD の発症に関与している可能性が想定される。CLAD の発症がこのような仮説で説明されるかどうかを検討するために、モデル動物を用いた検証を以下の通り行った。

### 2. 研究の目的

本研究では、移植気道において TLR が果たす役割を動物実験で検討する。特に CLAD の病態の一つである気道の線維化にどのような影響を与えるのかを調べる。

### 3. 研究の方法

現在のところ CLAD を完全に再現するマウスモデルは報告されていないが、病態の一つは気道の線維化であると考えられるため、これを高頻度で引き起こすマウス同所性気管移植モデルで仮説の検証を行うこととした。同所性気管移植モデルは移植片が気道に連続しているため、外部の環境や気道の常在細菌叢に曝露されるという特徴を備えており、今回の仮説を検証するには適したモデルであると考えられる。

主要組織適合抗原 (MHC) major mismatch pair である Balb/c (H-2d) C3H/HeN (H-2k) の組み合わせでマウス同所性気管移植を行い、術後 21 日目でグラフトの評価を行った。

TLR4 が果たす役割を検討するため、TLR4 の mutant mouse である C3H/HeJ (H-2k) を用いた。C3H/HeJ は C3H/HeN と MHC は同一であるが、TLR4 の細胞内ドメインに変異があり機能が欠損している。

病理組織学的な検討は、H&E 染色と免疫染色を用いて行った。免疫染色は、smooth muscle actin (SMA)、CD3 の染色を行った。

SMA は筋線維芽細胞に発現し、ヒト肺移植後の線維化病変においても高発現していることが知られている。CD3 染色は T リンパ球に発現し、獲得免疫系の活動を推し量るために用いた。各組織標本は、単核球浸潤の有無、気管上皮の形態、気管上皮下の線維化などを元に病理学的スコアリングを行った。免疫染色については、SMA 染色はコンピュータ解析で染色陽性面積を数値化し、CD3 染色は手作業で細胞数をカウントした。

### 4. 研究成果

Balb/c C3H/HeN の組み合わせで、気管上皮下の著明な線維化が観察され、移植気道における線維化を検討するに妥当なモデルだと確認された。

C3H/HeJ マウスをレシピエントに用いた気管移植においても、C3H/HeN マウスをレシピエントに用いたのと同様に気管上皮下の線維化は引き起こされた。従って、MHC major mismatch の組み合わせでは、たとえ TLR4 の変異があってもそれだけではグラフトの線維化は避けられないことが示された (Fig. 1)。

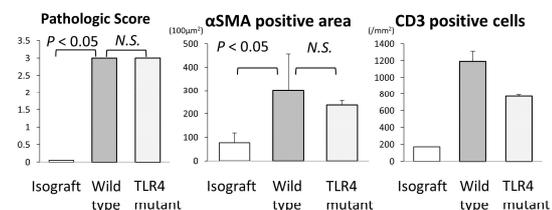
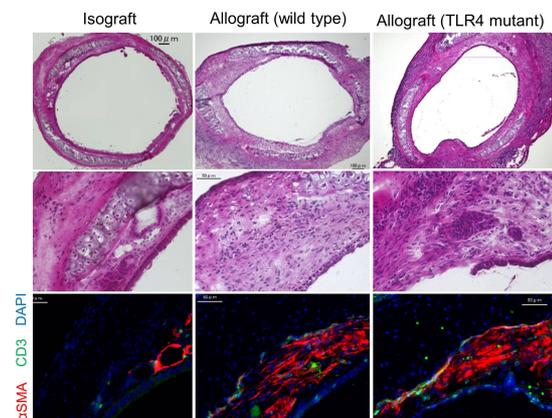


Fig. 1 Pathological findings 21 days after orthotopic tracheal transplantation. Allograft (wild): Balb/c → C3H/HeN, Allograft (TLR4 mutant): Balb/c → C3H/HeJ (TLR4 mutant), Isograft: Balb/c → Balb/c. Data are expressed as mean ± SD; Isograft: n=4, allograft: n=3.

免疫抑制剤を併用した場合 (cyclosporin A を 25mg/kg/day 皮下注射、手術当日から術後 10 日目まで) では、C3H/HeJ マウスをレシピエントとした群で、病理学的スコアリングで傷害の程度が有意に軽く ( $p < 0.05$ )、SMA 染色陽性面積が有意に小さかった ( $p < 0.05$ )。CD3 陽性 T 細胞の数は有意な差が認められなかった (Fig. 2)。

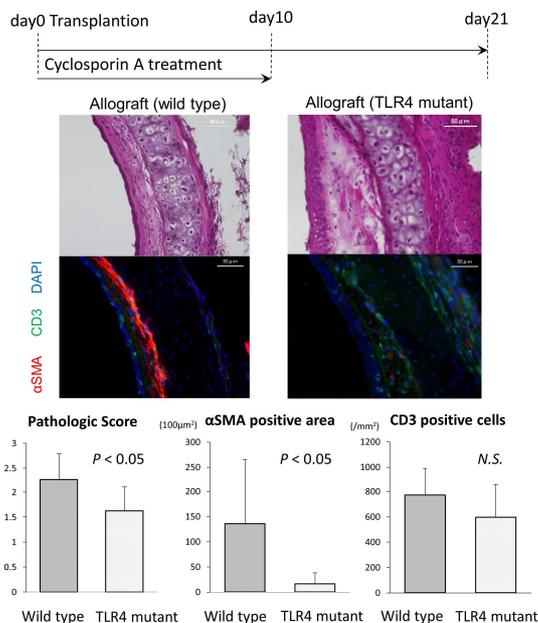


Fig. 2 Pathological findings 21 days after orthotopic tracheal transplantation with cyclosporin A (25 mg/kg/day, s.c. day0-10). Allograft (wild type): Balb/c → C3H/HeN, Allograft (TLR4 mutant): Balb/c → C3H/HeJ (TLR4 mutant). Data are expressed as mean ± SD; n=9.

これらの結果から、TLR4 のシグナルは移植片の拒絶と線維化において補助的な役割を果たしていると思われ、TLR4 の変異があるだけではグラフトの線維化は避けられなかった。しかし、獲得免疫系がある程度抑えられた条件では、TLR4 のシグナルの有無（例えば慢性的な感染の有無）が、移植片の線維化の進行に重要な影響を及ぼす可能性が示唆された。

## 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）

### 〔雑誌論文〕(計7件)

Tomohiro Murakawa, Chihiro Konoeda, Takuya Ito, Yuta Inoue, Atsushi Sano, Kazuhiro Nagayama, Jun Nakajima. The ground glass opacity component can be eliminated from the T-factor assessment of lung adenocarcinoma. *European journal of cardio-thoracic surgery*. 2013;43(5):925-932.

doi: 10.1093/ejcts/ezs467. 査読有  
Junji Ichinose, Tomohiro Murakawa, Haruaki Hino, Chihiro Konoeda, Yuta Inoue, Kentaro Kitano, Kazuhiro Nagayama, Jun-ichi Nitadori, Masaki Anraku, Jun Nakajima. Prognostic impact of the current Japanese nodal classification on outcomes in resected non-small cell lung cancer. *Chest*. 2014; 146(3):644-9. doi: 10.1378/chest.14-0159. 査読有

Tomohiro Murakawa, Takahiro Karasaki, Kentaro Kitano, Kazuhiro Nagayama, Jun-ichi Nitadori, Masaki Anraku, Jun Nakajima. Invasive thymoma

disseminated into the pleural cavity: mid-term results of surgical resection. *European journal of cardio-thoracic surgery*. 2015; 47(3):567-72.

doi:10.1093/ejcts/ezu210. 査読有  
Tomohiro Murakawa, Junji Ichinose, Haruaki Hino, Kentaro Kitano, Chihiro Konoeda, Jun Nakajima. Long-term outcomes of open and video-assisted thoracoscopic lung lobectomy for the treatment of early stage non-small cell lung cancer are similar: a propensity-matched study. *World journal of surgery*. 2015;39(5):1084-91. doi: 10.1007/s00268-014-2918-z. 査読有

Chihiro Konoeda, Jun Nakajima and Tomohiro Murakawa. Fibroblasts of recipient origin contribute to airway fibrosis in murine tracheal transplantations. *Transplant international*. 2015 ;28(6):761-3. doi: 10.1111/tri.12525. 査読有

Mitsuaki Kawashima, Tomohiro Murakawa, Tomohiro Shinozaki, Junji Ichinose, Haruaki Hino, Chihiro Konoeda, Takehiro Tsuchiya, Tomonori Murayama, Kazuhiro Nagayama, Jun-ichi Nitadori, Masaki Anraku and Jun Nakajima. Significance of the Glasgow Prognostic Score as a prognostic indicator for lung cancer surgery. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*. 2015 ;21(5):637-43. doi: 10.1093/icvts/ivv223. 査読有

Junji Ichinose, Kazuhiro Nagayama, Haruaki Hino, Jun-ichi Nitadori, Masaki Anraku, Tomohiro Murakawa, Jun Nakajima. Results of surgical treatment for secondary spontaneous pneumothorax according to underlying diseases. *European journal of cardio-thoracic surgery*. 2016 ;49(4):1132-6. doi: 10.1093/ejcts/ezv256. 査読有

### 〔学会発表〕(計5件)

村山智紀, 急性グラフト不全モデルの作成:ラットによるヒストン肺障害モデル. 第30回日本肺および心肺移植研究会. 2014年1月25日, 芝蘭会館(京都府・京都市)

村山智紀, 肺移植後 primary graft dysfunction モデルに用いるヒストン障害ドナー肺の作成. 第50回日本移植学会総会. 2014年9月12日, 京王プラザホテル(東京都・新宿区)

村山智紀, ラット肺移植におけるグラフト肺の急性期機能評価の工夫. 第31

回日本肺および心肺移植研究会. 2015年  
1月31日, 山上会館(東京都・文京区)  
村山智紀, Circulating Histone-Induced  
Lung Injury: A novel model of damaged  
lungs from brain-dead donors. The  
International Society for Heart and  
Lung Transplantation 35th Annual  
Meeting and Scientific Sessions. 2015  
年4月16日. ニース(フランス)  
川島光明, Role of the Glasgow  
Prognostic Score (GPS) as a prognostic  
indicator for lung cancer surgery.  
23rd European Conference on General  
Thoracic Surgery. 2015年6月2日. リ  
スボン(ポルトガル)

村山 智紀(MURAYAMA TOMONORI)  
東京大学・医学部附属病院  
川島 光明(KAWASHIMA MITSUAKI)  
東京大学・医学部附属病院

〔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 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  
<http://cts.m.u-tokyo.ac.jp/thoracic-surgery>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村川 知弘(MURAKAWA TOMOHIRO)  
東京大学・医学部附属病院・登録研究員  
研究者番号: 50359626

### (2) 研究分担者

中島 淳(NAKAJIMA JUN)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号: 90188954  
長山 和弘(KAZUHIRO NAGAYAMA)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 00647935

### (3) 研究協力者