

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293286

研究課題名(和文) 肺移植後肺内リンパ組織新生に伴う局所抗体産生が重症型慢性拒絶RASに及ぼす影響

研究課題名(英文) The impact of locally produced anti-donor specific antibody in de novo intrapulmonary lymphoid tissue on RAS, the sever form of chronic rejection after lung transplantation

研究代表者

佐藤 雅昭 (Sato, Masaaki)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00623109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,000,000円

研究成果の概要(和文)：Restrictive allograft syndrome (RAS)は研究代表者(佐藤)らが2010年に提唱した予後不良な肺移植後慢性拒絶だが、その発症機序について「外界に暴露された臓器である肺は移植後様々な刺激によってリンパ組織化する」との仮説に基づき研究を進めた。ラット肺移植を行い作成したRASモデルでは、肺内リンパ組織新生に伴う肺内局所での抗ドナー抗体産生を証明した。またRASの病態には上記の液性拒絶が重要であり、逆に従来型の気道中心の慢性拒絶に気道の感染等の炎症が重要であることを示した。さらにマウス気管移植モデルを用い、気道中心の炎症が直接線維芽細胞を活性化させる機序を見出した。

研究成果の概要(英文)：Among chronic rejection after lung transplantation, the severe form, restrictive allograft syndrome (RAS) was proposed by the principle investigator (Sato M) in 2010. Regarding the mechanisms, we hypothesized that the lung exposed to multiple external stimuli through ambient air becomes a lymphoid organ. In a RAS model using orthotopic rat lung transplantation, we demonstrated intra-pulmonary formation of lymphoid tissue formation associated with local production of anti-donor-specific antibodies. Such antibody-mediated process was found to be important in RAS, whereas in the conventional form of chronic rejection in which the airway is mainly affected, an airway-centered inflammatory process such as chronic infection was found to be important. We further utilized an orthotopic mouse tracheal transplant model and then demonstrated that airway-centered inflammation not only induces rejection but also directly activates fibroblasts by signaling through a toll-like receptor.

研究分野：呼吸器外科

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

1. 研究開始当初の背景

肺移植は終末期呼吸不全に対して確立された治療法である。しかし肺移植の5年生存率は50-70%にとどまり、その最大の原因が慢性拒絶である。肺移植後の慢性拒絶は最近まで、Bronchiolitis obliterans syndrome (BOS)と呼ばれる症候群と認識されてきた。BOSは気道を中心とした慢性炎症、線維化(閉塞性細気管支炎: obliterative bronchiolitis)を主体とする状態である。

研究代表者(佐藤)らは2010年トロント大学から、新たなタイプの慢性拒絶として restrictive allograft syndrome (RAS)の概念を提唱した。RASは胸膜や末梢肺を中心に炎症・線維化を来す。RASは慢性拒絶全体の1/3から1/4を占め、生存率が著しく低いことがわかり、大きな注目を集めるに至った。

本研究開始時点ではBOSとRASの違いがなぜ生じるのかといった根本的な疑問は未解決のままであり、特に予後不良な表現型であるRASのメカニズムの解明と、有効な予防・治療法の研究開発が急務であった。

2. 研究の目的

肺移植後慢性拒絶の機序として、肺内リンパ組織新生を介した局所での抗ドナー抗体産生が重要な役割を果たし、リンパ流に沿った慢性炎症の分布の違いがBOSとRASという表現型の違いを生む、という仮説を検証することであった。

3. 研究の方法

ラット肺移植モデルを主に使用して、肺移植後慢性拒絶の機序、とくにBOSとRASという2つの表現型の違いが生まれる理由を、局所での抗ドナー抗体産生、慢性炎症に重要な役割を果たす肺内リンパ組織新生の観点から検証した。また、気道中心に炎症を生じた場合にはBOS型の慢性拒絶となる可能性を見出したため、その機序をさらに追及すべく、マウス同所気管移植モデルを使用し、とくに自然免疫で重要な役割を果たす toll-like

receptor (TLR)4機能不全マウスを用いることで機序の解明を試みた。

4. 研究成果

(1) ラット同所肺移植を使用したRASモデル確立

ラット同所肺移植をMHCフルミスマッチの組み合わせで実施した場合は、極めて強力な急性拒絶反応によりグラフトは1-2週間で荒廃することが知られているため、われわれは段階的に免疫抑制剤シクロスポリンの投与量を変化させることで、急性拒絶の程度を弱め、慢性拒絶の病態を再現することを試みた。とくにここでの疑問は、拒絶に関連することが想定されているBOSとRASが、まったく異なる病態なのか、BOSの中で拒絶の程度が強いものがRASになるのかを検証することだった。

結果は、免疫抑制を弱くかけた場合はRAS様の組織像を移植後98日目に呈したが、その程度を強め拒絶の程度を弱めた場合でも、純粋に気道中心の慢性拒絶がおこることはなく、程度の弱いRAS、すなわち、軽度な末梢肺と気道の線維化を生ずるのみだった(図1)。BOSとRASは基本的に異なる病態であることが推定された。

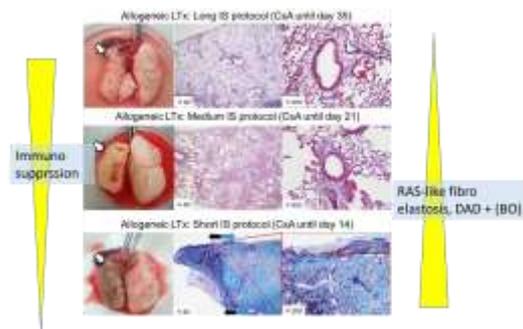


図1. 免疫抑制の程度(期間)を下げると、移植肺は程度の強いRAS様の病理像を呈するが、BOS様の病理像は呈さない。

(2) RASモデルにおける肺内リンパ組織新生と局所抗体産生

上記の RAS モデルにおいて、移植後 98 日目に採取した肺組織を 4 日間培養した上澄みからは、ドナーの MHC class I に特異的な抗ドナー特異抗体が検出された。この抗体の検出には、非特異的な結合を排除するため、ドナーまたはレシピエント由来のリンパ球と培養上清を反応させるだけでなく、マウス線維芽細胞にドナー (Bronwn-Norway rat) 型 MHC class I またはレシピエント (Lewis rat) 型 MHC class I をプラスミドを用いて強制発現させて反応性を検討した。

特筆すべきことに、肺内産生抗ドナーが 98 日目に検出されたのとは対照的に、レシピエント血清内には抗ドナー抗体が検出されなかった (図 2)。これまで、肺移植後に一旦血液中に出現した抗ドナー抗体が経過の中で消失したり、経過を通じて抗体が検出されない例が経験されているが、肺内局所の抗体産生は、血液検査のみでは検出できない抗体関連拒絶と慢性拒絶を説明しうるかもしれない。

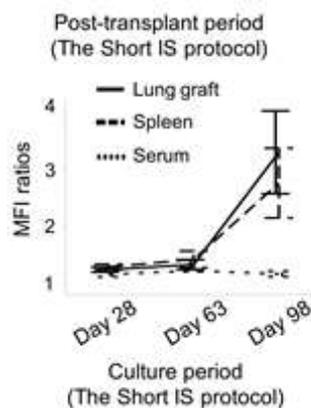


図 2 フローサイトメーターで検出した血清中の抗ドナー抗体と脾臓、グラフト肺を 4 日間培養 ex vivo 培養した上清中の抗ドナー抗体

(3) 気道中心の炎症機序 BOS 型慢性拒絶

先に述べたように、BOS と RAS では基本的な病態が異なることが推測され、RAS は肺の広範なコンパートメントをターゲットとすることが考えられた。そこで逆に BOS については、何らかの理由で気道中心の炎症と線維

化が引き起こされる可能性を考えた。実際、慢性的な気道感染 (例: 緑膿菌による) や、胃食道逆流が BOS のリスクを高めることが知られている。

この仮説を検証するため、われわれは上記のラット肺移植モデルに比較的強い免疫抑制をかけて、そのままであれば慢性拒絶の組織像を呈さない状態を作り出し、これにグラム陰性桿菌の成分であるリポポリサッカライド (LPS) を経気道的に反復投与する実験を行った。その結果予想通り、気道を中心とした線維化と炎症を呈し、生理学的にも BOS によく似た閉塞性障害を呈することが分かった (図 3)。

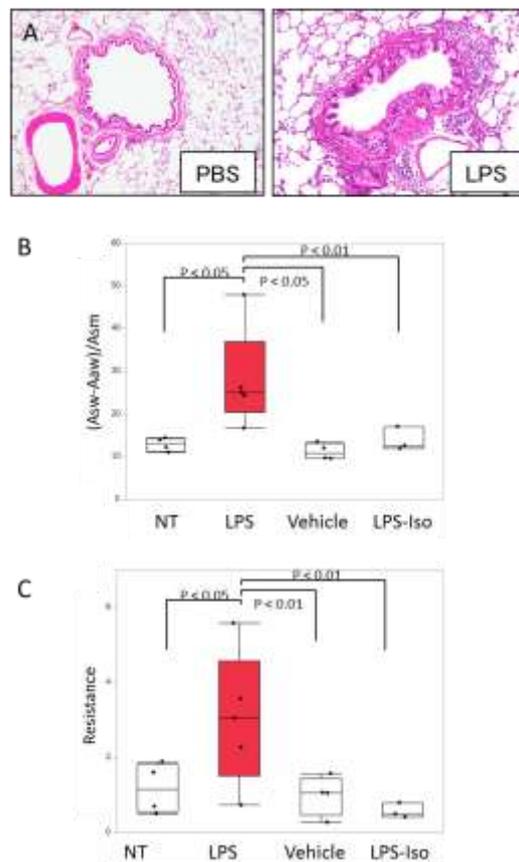


図 3 A. 気道内に PBS を投与したアログラフトと LPS を投与したアログラフト。後者に気道中心の炎症と線維化がみられる。B. 気道閉塞を病理組織像を基に定量したもの。アログラフトの LPS 気道投与群で有意に閉塞率が高い。C. フレキシベントを用いて気道抵抗

を測定したもの。同様にアログraftの LPS 気道投与群で有意に気道抵抗が高い。

(4) 自然免疫の活性化による直接的な線維芽細胞活性化の機序

上記のように BOS の発症には気道中心の炎症プロセスが必要であると考えられたため、そうした抗原非特異的な免疫反応（自然免疫）の重要な担い手である toll-like receptor (TLR)、とくに LPS のレセプターとして知られている TLR4 に着目することにした。

TLR4 機能不全マウスを使用して気道の炎症と線維化を検証するため、動物モデルを同位気管移植モデルとし、中程度の免疫抑制をかけた。このモデルでは移植グラフト自体が中枢気道であり、常在菌が存在する部位であることから LPS の投与は行わなかった。

興味深いことに、TLR4 機能不全マウスでは移植後 21 日目の時点では、活性型の線維芽細胞である myofibroblast がほとんど見られず、多くの myofibroblast がグラフトに侵入している wild-type とは対照的な結果だった（図 4）。免疫反応の違いとしての説明も可能だが、浸潤している CD3+T cell の数には違いはなく、mixed lymphocyte reaction でもリンパ球のドナー抗原への反応性に違いは見られなかった。

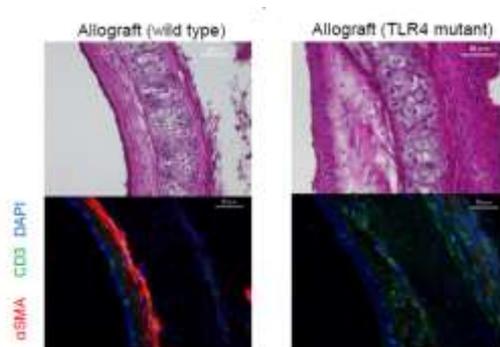


図 4 TLR4 機能不全マウスでは、気管移植後有意に myofibroblast の低下がみられた。

そこで、TLR4 を介したシグナルが、一般に言われている樹状細胞などの抗原提示細胞を活性化させて拒絶反応を惹起する以外に、線維芽細胞が発現している TLR4 を介して直接線維化のスイッチが ON になる機序があるのではないかと新たな仮説をたてた。これを検証するため我々は、wild-type、TLR4 機能不全マウスのそれぞれから、肺線維芽細胞を一次培養し、LPS による刺激を加えることで活性化に変化があるかを調べた。興味深いことに、LPS の線維芽細胞への直接効果は、従来線維芽細胞の活性化に重要とされていたサイトカイン TGF-beta1 と相加的であった（図 5）。拒絶反応を介して TGF-beta1 が放出され線維芽細胞が活性化される機序と、LPS などのリガンドが直接 TLR4 を介して線維芽細胞を活性化させる機序の両方が関与している可能性が考えられた。

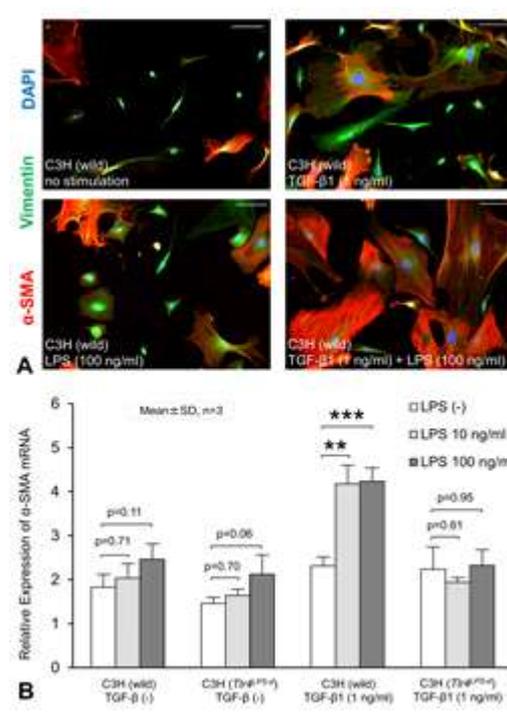


図 5 wild-type および TLR4 機能不全マウスでの肺線維芽細胞における LPS および TGF-beta1 の反応性。LPS と TGF1 が相加的に、また LPS は TLR4 を介して、線維芽細胞の活性化を促すと考えられた。

TLR4 のリガンドには、LPS に限らず、自己組織の損傷などで放出される HMGB1 などの、いわゆる danger associated molecular patterns (DAMPs) が知られており、移植肺が外界に通じていることで生じる様々な刺激が、拒絶反応と相加的に直接気道の線維化を促進しうる可能性が見出された。

今後は、BOS および RAS の病態をさらに探求するとともに、発症の予防、早期発見と治療に向けた研究を進めていく。

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 2 件) 他 2 件投稿中、1 件投稿準備中

1. Miyamoto E, Motoyama H, Sato M, Aoyama A, Menju T, Shikuma K, Sowa T, Yoshizawa A, Saito M, Takahagi A, Tanaka S, Takahashi M, Ohata K, Kondo T, Hijiya K, Chen-Yoshikawa TF, Date H. Association of Local Intrapulmonary Production of Antibodies Specific to Donor Major Histocompatibility Complex Class I With the Progression of Chronic Rejection of Lung Allografts. *Transplantation*. 2017;101(5):e156-e165.

2. Verleden SE, Todd JL, Sato M, et al. Impact of CLAD Phenotype on Survival After Lung Retransplantation: A Multicenter Study. *Am J Transplant*. 2015;15(8):2223-30.

[学会発表] (計 8 件)

1. Sato M. Antibodies and B Cells in Pathogenesis of CLAD. The 37th annual meeting of the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT); 2017 年 4 月 6 日: San-Diego.
2. Takahagi A, Sato M, Chen-Yoshikawa, Yoshizawa A, Ohata K, Saito M, Okabe R, Gochi F, Yamagishi H, Hamaji M, Motoyama H, Hijiya K, Aoyama A, Date H. Airway-centered inflammation induced by LPS instillation leads to BOS-like phenotype of CLAD in rat lung transplantation. The 37th annual meeting of the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT); 2017 年 4 月 6 日: San-Diego.
3. 川島光明、佐藤雅昭、村川知弘、安樂真樹、此枝千尋、中尾啓太、唐崎隆弘、村山智紀、桑野秀規、長山和弘、似鳥純一、中島淳。気道アログラフト線維化にお

ける toll-like receptor 4 の役割. 第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会; 2016 年 9 月 29 日: 岡山.

4. Sato M. Putting stories together: why post-lung-transplant CLAD takes two forms – BOS and RAS. 第 33 回日本呼吸器外科学会・肺移植パネルディスカッション. 2016 年 5 月 12 日: 京都.
5. Sato M. CLAD Endotypes: diagnosis, radiology, and pathology. Pre-meeting Symposium, The 36th annual meeting of the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT); 2016 年 4 月 27 日: Washington DC.
6. Miyaoto E, Sato M, Motoyama E, Aoyama A, Menju T, Shikuma K, Sowa T, Saito M, Takahagi A, Tanaka S, Takahashi M, Ohata K, Kondo T, Hijiya K, Chen-Yoshikawa TF, Sato T, Sonobe M, Date H. Intrapulmonary Local Production of Antibodies Specific to Donor Major Histocompatibility Complex Class I in Association with the Progression of Chronic Rejection in Lung Allografts. The 36th annual meeting of the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT); 2016 年 4 月 28 日: Washington DC.
7. Miyamoto E, Sato M, Motoyama E, Aoyama A, Menju T, Shikuma K, Sowa T, Saito M, Takahagi A, Tanaka S, Takahashi M, Ohata K, Kondo T, Hijiya K, Chen-Yoshikawa TF, Sato T, Sonobe M, Date H. Insufficient Post-Transplant Immunosuppression Induces Restrictive Allograft Syndrome-Like Fibrosis in the Pleura and Lung Parenchyma After Lung Transplantation. The 36th annual meeting of the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT); 2016 年 4 月 28 日: Washington DC.
8. 佐藤雅昭. 外科医の発想で迫る肺移植後慢性拒絶: 拘束型慢性移植肺障害 (RAS) の発見と肺内リンパ組織新生. 第 32 回日本呼吸器外科学会・学会賞受賞講演; 2015 年 5 月 15 日: 香川.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 雅昭 (SATO, Masaaki)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 00623109

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者

宮本 英 (MIYAMOTO, Ei)

高萩 亮宏 (TAKAHAGI, Akihiro)

川島 光明 (KAWASHIMA, Mitsuaki)