

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19558

研究課題名（和文）マウス肺移植・慢性期移植肺機能不全モデルの開発と免疫応答機構の解明

研究課題名（英文）Development of mouse model of chronic lung allograft dysfunction to evaluate immune regulation

研究代表者

田中 里奈（Tanaka, Satona）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80847517

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：BALB/cマウスの左肺をB6マウスに同所性に移植し、術後に低用量の免疫抑制（ステロイド・シクロスポリン間欠的投与）を行うことで、移植後15日で急性細胞性拒絶反応が、30日でリンパ球浸潤とともに血管気管支周囲や胸膜に線維化が生じ、臨床肺移植における拘束性の慢性期移植肺機能不全のモデルとなると考えられた。レシピエントマウスに二次リンパ組織欠損マウスを用いることにより、二次リンパ組織での免疫応答が、細胞性拒絶から線維化への進行に重要な役割を果たすことが明らかとなった。さらに、本モデルでは移植後15日時点からの気管支肺胞洗浄液中sICAM-1の上昇が特徴的であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺移植臨床で経験する線維化主体の慢性期移植肺機能不全(RAS: restrictive allograft dysfunction)を反映するマウス肺移植モデルを開発し、細胞性拒絶から線維化への進行メカニズムの一端を明らかにした。さらに、慢性期移植肺機能不全発症を予測するマーカーの候補を同定した。本研究成果は、肺移植後の長期予後改善を妨げ、いまだ有効な治療がない慢性期移植肺機能不全に対する発症予測と新たな治療ターゲットの開発に貢献している。

研究成果の概要（英文）：We developed a murine model of chronic lung allograft dysfunction (CLAD) and transplanted left lungs from BALB/c donors into B6 recipients that were treated with intermittent cyclosporine and methylprednisolone postoperatively. In this model, the lung allograft developed acute cellular rejection on day 15 which, by day 30 after transplantation, progressed to severe pleural and peribronchovascular fibrosis with lymphocyte infiltration. This model reflects restrictive type of CLAD. Using secondary lymphoid organ - deficient mice as recipients, we found that secondary lymphoid organs were necessary for progression from acute cellular rejection to allograft fibrosis. sICAM-1 elevation in bronchoalveolar lavage fluid was characteristics in this model. We uncovered a critical role for recipient secondary lymphoid organs in the development of CLAD and identified a possible predictive marker for CLAD.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺移植 慢性期移植肺機能不全 細胞性拒絶 線維化 二次リンパ組織

1. 研究開始当初の背景

肺移植は末期呼吸不全患者に対する唯一の救命手段だが、移植後の5年生存率は大規模レジストリーの報告では55%から60%程度であり、80%前後の生存率が見込まれる他の臓器移植と比べ、明らかに予後不良である[Chambers DC, et al. J Heart Lung Transplant 2018]。周術期の成績は、臓器保存や術式、患者管理の工夫により改善しているが、長期予後の改善を妨げる最も大きな要因は、「慢性期移植肺機能不全(chronic lung allograft dysfunction: CLAD)」で、その病態はいわゆる「慢性拒絶」である[Verleden GM, et al. J Heart Lung Transplant 2019]。従来、CLADは病理組織学的には細気管支の閉塞・狭窄を特徴とする閉塞性肺障害が主(bronchiolitis obliterans syndrome: BOS)と考えられてきたが、近年は、胸膜や肺に線維化を生じ拘束性肺障害の形をとるより予後不良なタイプ(restrictive allograft syndrome: RAS)があることが報告された[Sato M, et al. J Heart Lung Transplant 2011]。

現在の肺移植後の免疫抑制療法の標準は、ステロイド(prednisolone: PSL)・タクロリムスやシクロスポリンA(CyA)といったカルシニューリン阻害剤(calcineurin inhibitor: CNI)・ミコフェノール酸モフェチル(Mycophenolate mofetil: MMF)などの代謝拮抗薬の3剤併用療法を基本としている。これは他臓器のプロトコルを参照にしているものであり、肺移植後は他臓器よりも強力に免疫抑制が行われているが、移植後5年以内に約50%がCLADと考えられる状態になるのが現状である[Sato M. Gen Thorac Cardiovasc Surg 2013]。いったんCLADと診断されると、診断治療を兼ねた試験的な免疫抑制の増量や、マクロライド系抗生物質の少量持続投与、モンテルカストの投与が選択肢としてあるが、どれも根本的な治療ではなく、再度、呼吸機能が低下し呼吸不全に至った場合にはリスクの高い再肺移植しか救命手段がなくなってしまう。したがって、従来のPSL・CNI・MMF 3剤併用免疫抑制に代わる、効果的にCLADを抑制する新たな治療法の確立が必要である。

一方で、免疫学的な見地からは、肺は常に外界と接してリンパ流が豊かな臓器であり、「lymph node with alveoli」とよばれ他の臓器とは異なった特殊な免疫環境を提供していると考えられてきている[Gauthier JM, et al. Ann Am Thorac Soc 2017]。したがって、肺移植でも、肺に特徴的な免疫応答のメカニズムの解明が必要と考えられる。これには免疫応答メカニズムの詳細な検討が可能で、マウス肺移植モデルが適切なプラットフォームを与えると考えられるが、その技術的困難さから、マウスの肺移植ではなく、マウスの気管を皮下や気管に移植するモデルが用いられてきた[Lama VN, et al. JCI Insight 2017]。しかしながら、Washington University in St. Louisのグループにより、マウスの左肺を肺動静脈・気管支を吻合し同所性に左胸腔に移植する方法が確立され、血流含気がある臨床と同じ肺移植モデルであることが2007年に報告された[Okazaki M, et al. Am J Transplant 2007]。それ以降、同グループから、従来は移植におけるアロ免疫応答によって生じる細胞性拒絶には、CD4陽性T細胞やリンパ節などの二次リンパ組織(secondary lymphoid organ: SLO)が必要と考えられてきたが、マウス肺移植モデルを用いた検討により、肺においては、CD4陽性T細胞やSLOがなくとも、肺局所でCD8陽性T細胞が活性化されることで細胞性拒絶が起こりうるということが報告された[Gelman AE, et al. J Immunol 2008, Gelman AE, et al. J Immunol 2009]。また、抗原提示細胞とinteractionしT細胞が活性化するために必要な共刺激シグナルを移植後早期に阻害することにより、Major histocompatibility complex(MHC)が全く異なる組み合わせのマウス肺移植でも、移植肺に免疫寛容が誘導されること、免疫寛容が誘導された移植肺には三次リンパ組織(tertiary lymphoid organ: TLO)がレシピエントマウス由来のシグナルにより誘導され、制御性T細胞として知られるFoxp3陽性細胞が多く集簇して肺局所でその反応を制御していることが報告された[Li W, et al. J Clin Invest 2019, Tanaka S, et al. Am J Transplant 2020]。

肺移植後慢性拒絶において、移植肺内にT細胞・B細胞が集簇するTLOが形成されていることは報告があるが[Sato M, et al. J Immunol 2009]、CD4/CD8陽性T細胞、SLO、TLOが慢性拒絶の進展にどのような影響を及ぼすかについての報告は乏しい。これらを検討し、CLADに対する新たな治療法の確立に貢献するために本研究を立案した。

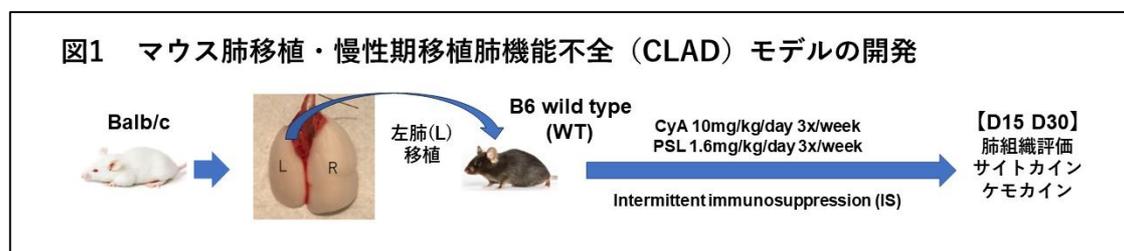
2. 研究の目的

Human leukocyte antigen (HLA)が異なる組み合わせで移植がなされ、術後に免疫抑制剤が投与される臨床肺移植の状況を反映する実験モデルが乏しい現状から、本研究の目的は、臨床状況を反映するマウス肺移植CLADモデルを開発すること、そのモデルを用いた慢性拒絶に至らしめる免疫応答の解明と新たな治療ターゲットの提案を目指すこと、にした。

本研究期間の目標としては、開発したマウス肺移植 CLAD モデルの病理組織学的所見を検討し、慢性拒絶に至った移植肺内に三次リンパ組織(tertiary lymphoid organs: TLO)が形成されているかを調べ、形成されているとすれば、TLO が慢性拒絶の進展に重要であるかどうかを検証し、それを阻害することが治療ターゲットの選択肢になるかを検討することとした(下記に述べるように、開発したマウス肺移植 CLAD モデルの移植肺には TLO が形成されていないと考えられたため、SLO の慢性拒絶への進展への関与を検討することに目標を変更した)。

3. 研究の方法

ドナーマウスの肺を採取し、左右の肺に分割し、左肺の気管支・肺動脈・肺静脈にそれぞれカフを装着し、左肺グラフトを作成する。カフを用いてレシピエントマウスの気管支・肺動脈・肺静脈に吻合することでマウスでの同所性左肺移植が可能になる。Balb/c マウスをドナーマウスとして左肺グラフトを作成し、B6 レシピエントマウスに上記のように同所性に移植する。これは、臨床肺移植と同様、MHC フルミスマッチと考えられる移植である。この B6 レシピエントマウスに術後、低用量の PSL(1.6mg/kg/day 週 3 回)と CyA(10mg/kg/day 週 3 回)を投与(間欠的投与)すると、術後 30 日目(D30)には胸膜と気管支血管周囲はリンパ球浸潤を伴う線維化が観察された(図 1)。これは臨床肺移植における RAS を反映したマウス肺移植 CLAD モデルと考えられた。本モデルを用いて以下を検討した。



レシピエントマウスに B6 wild type(WT)を用いて、D15、D30 の移植肺の Hematoxylin and eosin 染色(HE)、Masson trichrome 染色(MT)を行い、慢性拒絶に特徴的な線維化の進展について評価した。

D30 の移植肺の免疫染色(CD3、CD4、CD8、B220、Lyve-1、PNA_d 等)を行い、浸潤しているリンパ球の構成と、リンパ球浸潤部は TLO の形態をとっているかを評価した。

レシピエントマウスに B6 をバックグラウンドとする SLO 欠損マウスを用いて、同様に左肺移植と PSL と CyA の間欠的投与を行い、慢性拒絶進行における SLO の働きを検証した。

レシピエントマウスに B6 WT を用いて、D15、D30 の肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid: BALF)を採取し、サイトカイン・ケモカインを網羅的に調べ、CLAD 進行を予測するマーカー、治療ターゲットの選択肢を検証した。

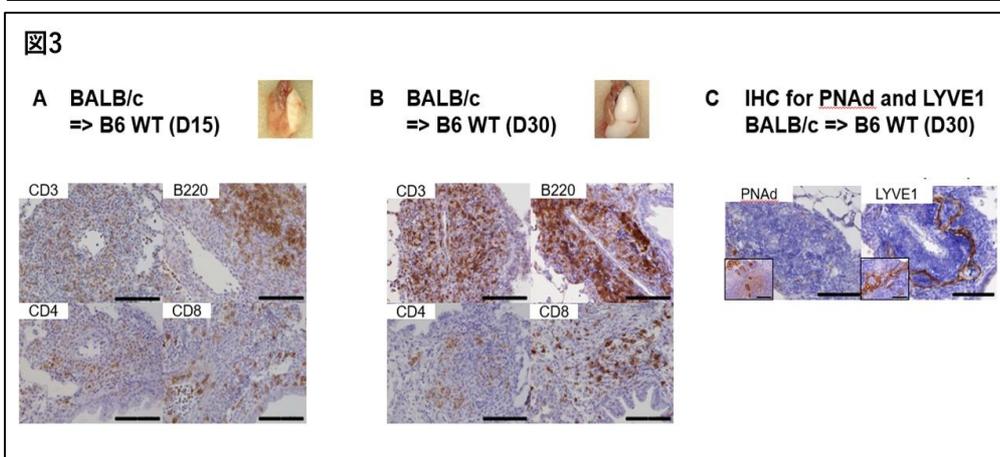
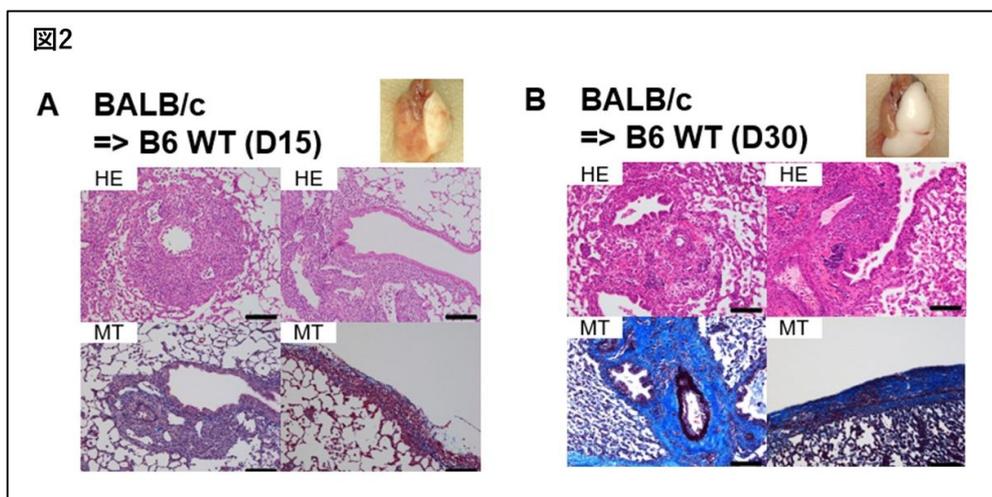
での検証の臨床応用性を検討するため、臨床肺移植後、術後早期の血液検体採取・保存を開始した。

4. 研究成果

図 2A、2B に示すように、D15 では、移植肺はまだ含気を保っていたが、D30 では、胸膜の線維化が進行し移植肺の縮小(拘束性障害)が進行していた。HE 染色と MT 染色により、D15 は血管気管支周囲にリンパ球の浸潤がみられるものの膠原線維の沈着は確認できず、D30 にはリンパ球の浸潤とともに、胸膜や血管気管支周囲に高度に膠原線維が沈着していることが確認された。すなわち、本モデルは、D15 までに細胞性拒絶が起こり、D15 から D30 にかけて線維化が進行することが確認された。

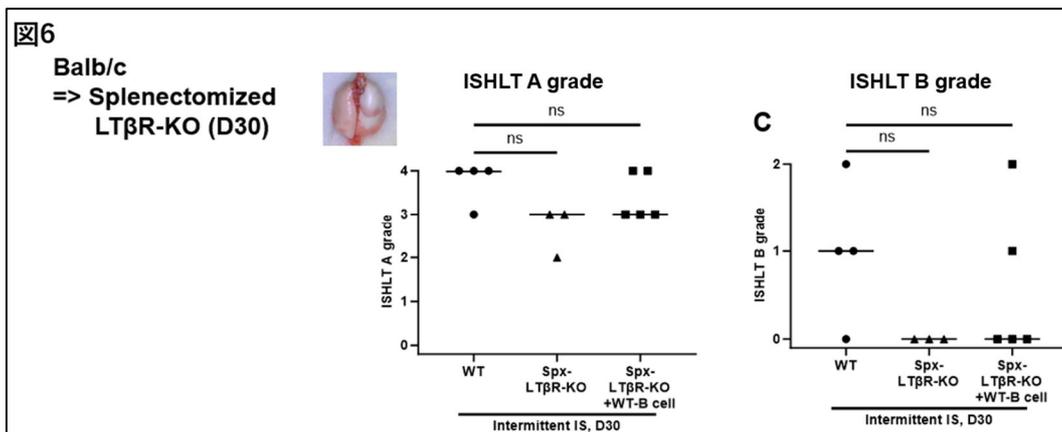
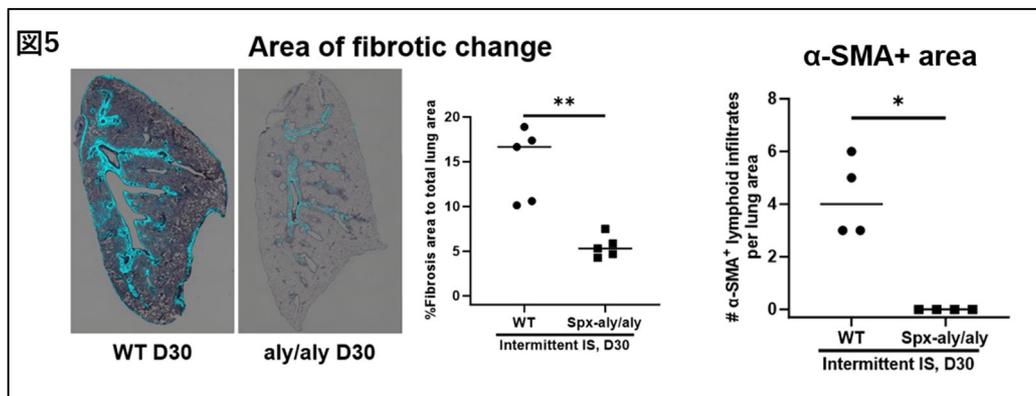
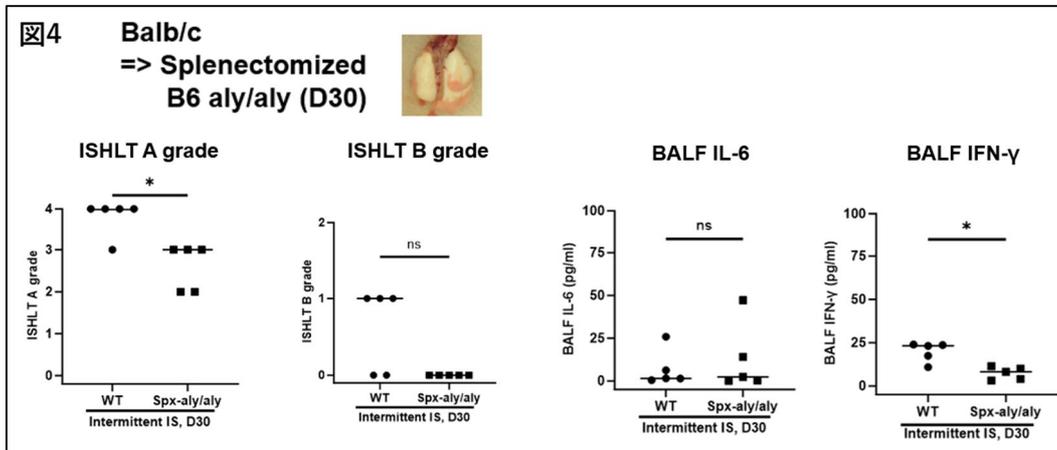
図 3A、3B に示すように、D30 の移植肺におけるリンパ球浸潤部位には CD3 陽性として示される T 細胞、B220 陽性細胞として示される B 細胞がともに浸潤していることが確認された。さらに T 細胞は CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞ともに確認された。これらのリンパ球浸潤部位

が、TLO の構造をとっているかを検討した(図 3C)。これには、TLO に特徴的な high endothelial venule (HEV)を確認するため、PNAd を免疫染色した。リンパ球浸潤部位には Lyve-1 陽性リンパ管は豊富に形成されているものの、PNAd 陽性の HEV の形成は確認できなかった。したがって、本モデルのリンパ球浸潤は TLO の形態はとっていないと考えられた。



本モデルのリンパ球浸潤は TLO の形態をとっていないことから、本モデルの線維化進行における SLO の役割を検討するため、レシピエントマウスに B6 をバックグラウンドとする 2 種類の SLO 欠損マウスを用いた。1 つは、Aly/Aly マウスで、移植時に脾臓を摘出することで、SLO を持たないマウスとなる。脾臓を摘出した Aly/Aly マウス(Spx-aly/aly)に移植し、低用量の PSL、CyA を投与、D30 に犠牲死させ、国際心肺移植学会の基準 ISHLT grade A(血管周囲)、B(気管支周囲)で示される細胞性拒絶の程度、BALF 中の IL-6、IFN- を評価すると、いくつかの項目は WT に比べて Spx-aly/aly で抑制されていたが、変化のないものあり、Spx-aly/aly でも細胞性拒絶は発症していることが明らかになった(図 4)。一方で、MT 染色における膠原繊維の沈着を定量的に評価した線維化の程度や、SMA とアルシアンブルー(AB)染色で評価した線維芽細胞活性化の程度は Spx-aly/aly で有意に抑制されていた(図 5)。ELISA で評価した BAL 中の TGF も Spx-aly/aly で有意に低かった。また、これらの結果はもう 1 つの SLO 欠損マウスである脾臓を摘出した Lymphotoxin ノックアウトマウス(Spx-LT KO)でも同様であることが確認された(図 6)。B 細胞そのものの機能異常ではなく、SLO における応答が線維化進行に重要であることを検討するため、脾臓を摘出した Lymphotoxin ノックアウトマウスに移植後に B6 WT マウスから採取した WT B 細胞を投与した。WT B 細胞投与を行っても、組織学的な所見は有意な変化がなかった(図 6)。

D15 と D30 の BALF を用いてサイトカイン・ケモカインの包括的解析をパネルシートで行った。D15 で上昇しているのは sICAM-1、CXCL13、TIMP-1、CCL5 であったが、D30 で上昇しているのは補体系の他は sICAM-1 のみであった。D15、D30 とともに上昇しているのは sICAM-1 であり、D15 からの高度な上昇が特徴的であった。



臨床肺移植における移植後早期の血液検体採取を開始した。サイトカイン・ケモカイン・脂質メディエーターなどを含め、網羅的に CLAD 発症を予測するマーカーの検証を行うこととした。まず、肺移植後の脂質メディエーターについて質量分析を用いた網羅的解析を行いその動態を解析したが拒絶反応や CLAD との関連は、本研究期間内での検証は十分行うことができなかった。

この他にも移植肺機能の長期経過、特に本研究の主題である慢性拒絶に影響を与える臨床的因子の臨床研究として、京都大学医学部附属病院呼吸器外科での肺移植症例を対象とし、術後の急性拒絶や気道内細菌の検出がその移植肺機能や予後に与える影響や、小児肺移植における移植肺の成長や慢性拒絶発症に着目した研究を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oda Hiromi, Tanaka Satona, Chen-Yoshikawa Toyofumi F., Morimura Yuki, Yamada Yoshito, Yutaka Yojiro, Nakajima Daisuke, Hamaji Masatsugu, Ohsumi Akihiro, Menju Toshi, Nagao Miki, Date Hiroshi	4. 巻 54
2. 論文標題 Impact of perioperative airway pathogens on living-donor lobar lung transplantation outcomes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 266-274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-023-02730-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mineura Katsutaka, Tanaka Satona, Goda Yasufumi, Terada Yuriko, Yoshizawa Akihiko, Umemura Keisuke, Sato Atsuyasu, Yamada Yoshito, Yutaka Yojiro, Ohsumi Akihiro, Nakajima Daisuke, Hamaji Masatsugu, Mennju Toshi, Kreisel Daniel, Date Hiroshi	4. 巻 Online
2. 論文標題 Fibrotic progression from acute cellular rejection is dependent on secondary lymphoid organs in a mouse model of chronic lung allograft dysfunction	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 American Journal of Transplantation	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajt.2024.02.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka Satona, Nakajima Daisuke, Sakamoto Ryo, Oguma Tsuyoshi, Kawaguchi Atsushi, 他I.	4. 巻 42
2. 論文標題 Outcome and growth of lobar graft after pediatric living-donor lobar lung transplantation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Heart and Lung Transplantation	6. 最初と最後の頁 660-668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.healun.2022.12.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuki Morimura, Satona Tanaka, Mamoru Takahashi, Yojiro Yutaka, Akihiro Ohsumi, Daisuke Nakajima, Hiroshi Date
2. 発表標題 The Effect of Resolvin D1, Resolvin E1, and Their Precursors on Lung Ischemia-Reperfusion Injury
3. 学会等名 International Society for Heart and Lung Transplantation, 44th Annual Meeting & Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊達 洋至 (Date Hiroshi) (60252962)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	山田 義人 (Yamada Yoshito) (80375691)	京都大学・医学研究科・特定病院助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Washington University in St. Louis		