

平成 26 年 4 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791461

研究課題名(和文) 肺移植後の虚血再灌流障害と移植肺生着阻害における制御機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of ischemia reperfusion injury and abrogation of lung allograft acceptance after lung transplantation

研究代表者

杉本 誠一郎 (Sugimoto, Seiichiro)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：40570148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：肺移植後の5年生存率は他の臓器移植より低く約50%に過ぎない。虚血再灌流障害や急性・慢性拒絶反応による移植肺の生着阻害がその主な原因であるが、近年、自然免疫である虚血再灌流障害と、獲得免疫である移植肺生着阻害の関係が報告されている。本研究ではマウス温虚血再灌流障害モデルやマウス同所性左肺移植モデルを用いて、肺移植後の虚血再灌流障害やそれによる移植肺生着阻害における新たな機序を解明する研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Outcomes after lung transplantation remain significantly worse than those after transplantation of other solid organs. Ischemia reperfusion injury is the leading cause for early morbidity and mortality after lung transplantation and has also been shown to be a risk factor for chronic lung rejection demonstrating its long-term effect on allografts. In this study, we examined the mechanism of ischemia reperfusion injury and abrogation of lung allograft acceptance after lung transplantation.

研究分野：呼吸器外科

科研費の分科・細目：胸部外科学

キーワード：肺移植 虚血再灌流障害 急性拒絶反応 免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺移植と虚血再灌流障害

肺移植は終末期肺疾患の唯一の治療法であり、日本では我々、岡山大学による1998年の生体肺移植の成功以来、2010年末までに187例の肺移植が施行され、岡山大学では88例(生体肺移植：60例、脳死肺移植：28例)の肺移植が施行された(2011年10月現在)。岡山大学での肺移植後5年生存率は世界平均よりも良好(約80%)であるが、世界平均では約50%に過ぎず、他の臓器移植より予後は悪い。

(Kreisel D, et al. JACS 2011)。肺移植後急性期の主な死因は原発性移植肺機能不全であり、虚血再灌流障害がその主因である。肺移植後の虚血再灌流障害の発症率は高率で、急性拒絶反応の発症頻度を増加させ、肺移植後の長期生存を妨げる慢性拒絶反応の発症にも関連する。肺移植では虚血時間の延長が移植肺の生存期間を悪化させるため(Meyers BF, et al. JACS 2005)、申請者はこれまで肺移植後の虚血再灌流障害の機序解明や、虚血再灌流障害の急性拒絶反応への影響について研究を行ってきた(Huang HJ, Sugimoto S, et al. Transplantation 2011, Sugimoto S, et al. JACS 2009 他)。

(2) 肺移植における自然免疫と獲得免疫の関連性

肺は、心臓や肝臓・腎臓とは異なり、皮膚や小腸と同様に常に外界と接しており、細菌や真菌・ウイルスなどに暴露するため、抗原性が強く免疫寛容が導入されにくい。他の臓器移植では、虚血再灌流障害のような自然免疫のシグナルが、導入された免疫寛容の破綻の原因になり、虚血再灌流障害が獲得免疫反応である拒絶反応に寄与する可能性が報告された。また脳死肺移植後の患者では、エンドキシンの低反応性と関連するToll様受容体

4の多様性が、急性拒絶反応の発症率の低下と関連しており(Palmer SM, et al. Am J Respir Crit Care Med. 2003)、肺移植後の患者では虚血再灌流障害等により自然免疫反応が活性化することで拒絶反応が発症する可能性がある。

(3) 同所性マウス左肺移植モデルと免疫寛容

腎・肝移植では約30年前、心移植では約15年前からマウス移植モデルが確立されていたが、肺移植の研究では生理学的なマウス肺移植モデルが存在しなかったため、他の臓器移植の研究に比べ後塵を拝していた。これを解決するため世界初の同所性マウス左肺移植モデルが2007年にアメリカ・ワシントン大学で開発された(Okazaki M, et al. Am J Transplant. 2007)。マウス肺移植では同系のC57B6L/6(B6) B6で移植した肺は組織学的に正常だが、異系のBalb/c B6で移植した肺は術後7日目でヒト肺移植後と同様の急性拒絶反応を認めた。免疫抑制剤として、抗原提示細胞とT細胞の共刺激を阻害しT細胞の活性化を抑制するMR1とCTLA4-Igを用いると、マウス肺移植後の急性拒絶反応は抑制され、免疫寛容が導入された(二重共刺激阻害Double Costimulatory Blockade : DCB)。

(4) 虚血時間の延長による免疫寛容の破綻

ヒト肺移植では虚血時間の延長が移植肺の生存期間を悪化するため、マウス肺移植での冷虚血時間を通常1時間から18時間に延長し、冷虚血時間と急性拒絶反応の関係を検討した。Balb/cドナー肺を18時間冷虚血時間後にB6レシピエントに移植しDCBで免疫抑制したところ、1時間冷虚血時間の場合と違い移植後7日目に高度の急性拒絶反応を認めた。DCBで免疫抑制された移植肺浸潤CD8+ T細胞の細胞内染色では1時間冷虚血時間よりも18時間

冷虚血時間後でIFN- γ レベルが著明に高値であった。また移植後6・24時間における移植肺内のIL-6のmRNAレベルは、1時間冷虚血時間より18時間冷虚血時間の方が高値であった。IL-6は制御性T細胞とエフェクターT細胞のバランスを制御する際に重要で、寛容原性から抗原性へと変化する際の鍵となる可能性がある。更に移植後24時間での気道内、移植肺内、末梢血中の顆粒球数も虚血時間の延長により有意に増加しており、顆粒球形成のシグナルとなる血中G-CSF値も移植後6・24時間で有意に増加していた。

(5) MAPK/ERK経路

サイトカインシグナルのような細胞外からの刺激を細胞核へ伝える経路の1つがMAPK/ERK経路である。G-CSFはMAPK/ERK経路を活性化することが知られている。

(6) JAK/STAT経路

サイトカインシグナルはJAK/STAT系などのシグナル伝達経路を利用して細胞内に伝達され、Suppressor of cytokine signaling(SOCS)ファミリー等により、負にフィードバック制御される。SOCSファミリーはサイトカイン依存性に遺伝子発現が誘導される蛋白質群であり、特にSOCS3は前述のIL-6やG-CSFを負に制御することが知られている(Croker BA, et al. *Immunity* 2004)。

これまで我々はIRIや移植肺生着阻害においてG-CSFによる緊急顆粒球形成が促進因子として重要であることを示してきた(Kreisel D, Sugimoto S, et al. *Blood* 2011. Kreisel D, Sugimoto S, et al. *J Clin Invest.* 2011)。本研究では顆粒球やG-CSFの増加に関わるシグナル伝達経路であるMAPK/ERK経路とJAK/STAT経路に着目し、これらの経路が虚血再灌流障害や虚血再灌流障害に伴う移植肺生

着阻害において果たす役割を明らかにし、新しい機序を解明する。

2. 研究の目的

本研究ではマウス温虚血再灌流障害モデルや同所性マウス左肺移植モデルを用いて、虚血再灌流障害におけるMAPK/ERK経路やJAK/STAT経路の役割を解明し、虚血再灌流障害によって免疫寛容が破綻し移植肺が生着阻害される際のMAPK/ERK経路やJAK/STAT経路の役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) MAPK/ERK 経路に関する検討

MAPK/ERK 経路を負の制御因子であるSPRED2に着目し、SPRED2 ノックアウトマウス(SPRED2KO)を用いて検証する。またERK1/2活性阻害剤であるU0216の投与を行う。SPRED2KOは、マウス肺移植が可能な24gの大きさへの成長が困難なため、温虚血再灌流障害モデルであるマウス左肺門クランプモデルを使用する。正中開胸後に左肺門をクランプし、30分後にクランプを解除することで温虚血再灌流障害を惹起し、60分後に動脈血液ガス分析を行い、犠牲死させ左肺を摘出し、ホルマリン固定標本を作成しH&E染色や免疫染色で虚血再灌流障害の程度を評価する。またフローサイトメトリー法で、マクロファージや樹状細胞、単球、好中球等の抗原提示細胞の分析のため、肺組織をCD11b、CD11c、Gr-1、等の抗体で評価する。MAPKs (ERK, JNK, p38) 活性化の評価をウエスタンブロット法で評価する。コントロールであるB6群と、SPRED2KO群、SPRED2KO群にU0126を投与した群で比較する。

(2) JAK/STAT 経路に関する検討

SOCS3がCD4陽性Tリンパ球に特異的に欠損するノックアウトマウス(CD4CreSOCS3KO)

と、SOCS3 がリンパ球に過剰発現している SOCS3 トランスジェニックマウス (SOCS3Tg) を用いて検証する。温虚血再灌流障害の実験では、MAPK/ERK 経路と同様にマウス左肺門クランプモデルを使用して行う。同所性マウス左肺移植モデルでは、1 時間冷虚血時間で B6 CD4CreSOCS3KO や B6 SOCS3Tg を施行し、移植後 24 時間で動脈血液ガス分析を行い、レシピエントを犠牲死させ移植肺を摘出し、ホルマリン固定標本を作成し H&E 染色や免疫染色で虚血再灌流障害の程度を評価する。またフローサイトメトリー法で、移植肺中の細胞を Thy1.2、CD4、CD8 抗体で染色し、エフェクター T 細胞 (Th1、Th2、Th17 細胞) を IFN- γ や IL-17 等の抗体で評価し、CD4 陽性制御性 T 細胞を Foxp3、CD25 等の抗体で評価する。マクロファージや樹状細胞、単球、好中球等の抗原提示細胞の分析のため、肺組織を CD11b、CD11c、Gr-1、等の抗体で評価する。また凍結肺組織から炎症性サイトカイン (IL-6、G-CSF、IFN- γ 等) を ELISA 法、RT-PCR 法で測定する。

移植肺生着阻害に関する実験ではドナーとして Balb/c を用い、DCB による免疫抑制を行う。移植後 7 日目に同様の検討を行う。

4. 研究成果

(1) MAPK/ERK 経路

マウス左肺門クランプモデルによる動脈血液ガス分析を用いた肺機能の評価では、コントロールの B6 群に比べ、SPRED2KO では優位に PaO₂ が低下していたが、SPRED2KO に ERK1/2 活性阻害剤である U0216 を投与した群では、PaO₂ は良好であり、コントロール群と同レベルであった。

組織学的に肺障害は SPRED2KO 群で高度であり、好中球浸潤や出血、浮腫を認めたが、SPRED2KO に U0216 を投与した群では、肺障害

はコントロールと同程度で軽微であった。

組織学的に計測した好中球数も SPRED2KO 群では他の 2 群に比べ、有意に高値であった。

また、フローサイトメトリー法でも肺内の好中球浸潤はコントロール群や U0216 投与群に比べ、SPRED2KO 群で有意に高値であった。

ウエスタンブロット法では、SPRED2KO 群で ERK 活性化が有意に高値であった。

以上より、MAPK/ERK 経路の活性化により好中球浸潤を促進し、虚血再灌流障害を引き起こしていることが示された。

(2) JAK/STAT 経路

マウス左肺門クランプモデルによる動脈血液ガス分析を用いた肺機能の評価では、SOCS3 トランスジェニックマウス群はコントロール群と差がなかったが、SOCS3 ノックアウトマウス群ではコントロール群より PaO₂ が低下しており、虚血再灌流障害が高度であった。また、組織学的に SOCS3 ノックアウトマウス群では他の群よりも肺障害が高度になっていたが、フローサイトメトリーでは SOCS3 ノックアウトマウス群と他の群で、肺内の好中球集積にはあまり差がなかった。今回の SOCS3 のノックアウトやトランスジェニックはリンパ球で選択的に行われているが、リンパ球が虚血再灌流障害でより重要な役割を果たすのは移植後 24 ~ 72 時間であり、そのタイミングで犠牲死させる同所性左肺移植モデルを用いた研究を引き続き施行している。

これらの結果は、肺移植後の虚血再灌流障害において炎症性シグナルを活性化する経路が重要な役割を果たしていることを示しており、移植肺生着阻害への影響を引き続き解明していく必要がある。これらの研究は、急性拒絶反応を抑制する新たな方法の発見や慢性拒絶反応の制御への糸口となり、肺移植後の予後改善に寄与する結果となる。

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 4 件)

Sugimoto S、他、Release of ATP by injured pulmonary cells triggers Th17 dependent lung allograft rejection、The International Society for Heart and Lung Transplantation 32th Annual Meeting and Scientific Sessions、2012年4月18日、プラハ(チェコ)

Okada M、Yamane M、Sugimoto S、他、MAPK/ERK pathway activation leads to ischemia-reperfusion-induced lung injury. The 24th International Congress of The Transplantation Society、2012年7月19日、ベルリン(ドイツ)

杉本誠一郎、他、肺細胞傷害後に放出される細胞外 ATP による肺移植後の Th17 依存性拒絶反応、第 65 回日本胸部外科学会定期学術集会、2012年10月18日、福岡

Okada M、Yamane M、Sugimoto S、他、MAPK/ERK pathway activation leads to severe ischemia-reperfusion-induced lung injury. The International Society for Heart and Lung Transplantation 33th Annual Meeting and Scientific Sessions. 2013年4月27日、モントリオール(カナダ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉本 誠一郎 (SUGIMOTO SEIICHIRO)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：40570148

(2)研究分担者

(3)連携研究者