

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462134

研究課題名(和文)人工酸素運搬体によるMMP/ADAMの発現制御により肺移植術後拒絶反応を抑制する

研究課題名(英文) Ameliorating bronchiolitis oblietrans after transplantation using hemoglobin vesicles by controlling ADAM/MMP expressions.

研究代表者

大塚 崇 (Ohtsuka, Takashi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：40306717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺移植後の拒絶反応であるbronchiolitis obliterans (BO)は移植後5年以内に50%程度の患者に認められる病態であるが、病態は明らかになっておらず、また有効な治療法も現状では無い。マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)がBOに関与している可能性がありマウスの気管移植モデルを用いて検討した。MMP阻害薬により制御性T細胞の増加と拒絶反応の抑制が認められた。

研究成果の概要(英文)：Acute rejection after lung transplantation is the main risk factor for the development of bronchiolitis obliterans (BO). We investigated inhibitor of Matrix metalloproteinases (MMPs) could ameliorate acute rejection in mouse trachea transplantation model. MMP inhibitor was given to the transplanted mice. The acute rejection of tracheal transplant was decreased in the allograft treated with MMP inhibitor. Regulatory T-cell infiltration and IL-10 mRNA expression increased in the allograft treated with MMP inhibitor. MMP inhibitor could be the treatment option for BO after lung transplantation.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺移植 拒絶反応 メタロプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

肺移植は重症呼吸不全疾患に対する唯一の根本的治療である。しかし近年の免疫抑制剤の進歩にも拘わらず拒絶反応はいまだに移植レシピエントの主要な死因である。末梢の気管支が次第に閉塞する Bronchiolitis obliterans Syndrome(BOS) は5年以上生存した肺移植後のレシピエントの内50から60%の確率で発症する病態である。現在このBOSに対する治療法は確立しておらず、ブレイクスルーが求められている。BOSの原因として虚血再環流障害、低酸素状態、Matrix metalloproteinases (MMP)のバランスの欠如が報告されている (Jiang, JCI 2011、Sato, Am J Pathol 2011)。BOSでは細胞外マトリックス (ECM) の分解、変性が強く関与しているがそのメカニズムは多くが不明なままである。肺移植後の拒絶反応に伴う線維化、炎症でのMMPとADAMの役割は現在までに検討されていない。

一方肺移植の研究分野ではまだ人工酸素運搬体と移植免疫の研究は行われていないが、近年開発された人工酸素運搬体の投与により、拒絶反応の抑制が腎移植の動物実験モデルでは報告されている (Thuillier, Am J Pathol 2011)。上記の論文では人工酸素運搬体を臓器保存液と併用することで短期、長期の合併症を減少させた。人工酸素運搬体による拒絶反応軽減のメカニズムは解明されていないが、臓器保存液中の虚血保存臓器の酸素化、アデノシン三リン酸 (ATP) の組織内での保持により保存臓器内のエネルギー消費のバランスをとり、虚血再灌流障害を減少させると考えられている。しかし肺移植を含む臓器移植後拒絶反応で重要な役割を担うT細胞への人工酸素運搬体の影響などは現在まで検討されていない。

2. 研究の目的

我々は①MMP-9、MMP-13などのメタロプロテアーゼを抑制することによりT細胞の組織への浸潤を抑え、気管移植後の拒絶反応を抑えるという仮説と②移植後の拒絶反応においてADAM28が高発現していることを示し(予備実験で確認済み)、ADAM28の制御により拒絶反応を抑制することができるという仮説を検討する。さらに③人工酸素運搬体投与によりグラフトの組織酸素濃度を増加させることによりMMP、ADAMの発現を制御し拒絶反応を抑制するという仮説を検討する。

3. 研究の方法

I.

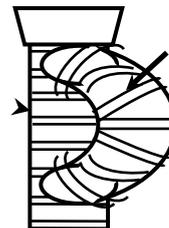
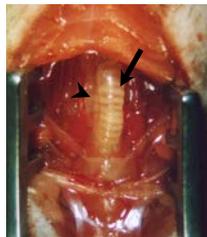
マウス気管移植モデルにおいてMMP阻害薬を用いた場合の炎症性サイトカインの発現の検討。

II.

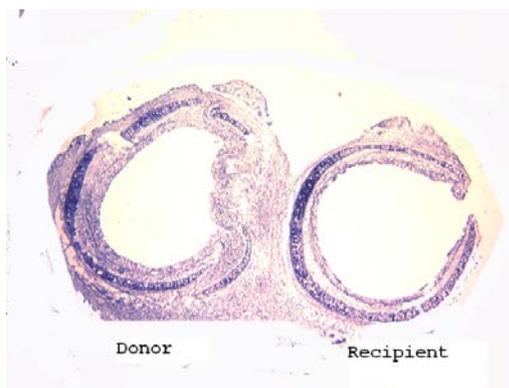
マウス気管移植モデルでのMMP阻害

薬 (GM6001)による拒絶反応を組織で検討する。

III. MMPノックアウトマウスを用いた気管移植モデルの拒絶反応の検討。



マウス気管同所移植モデル

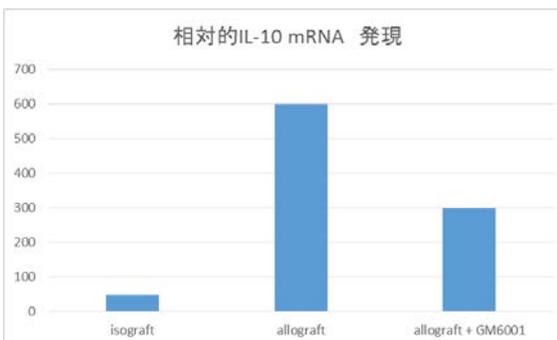
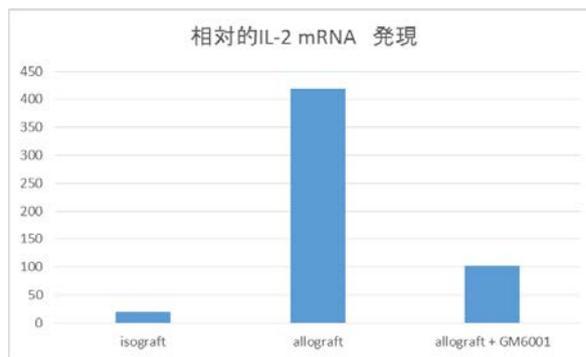


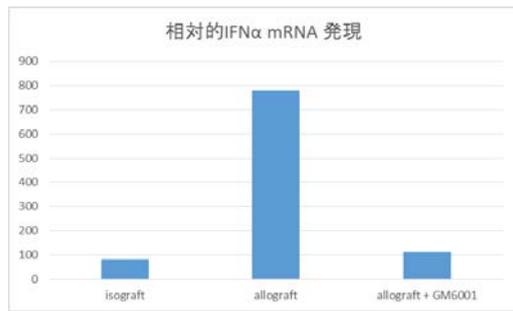
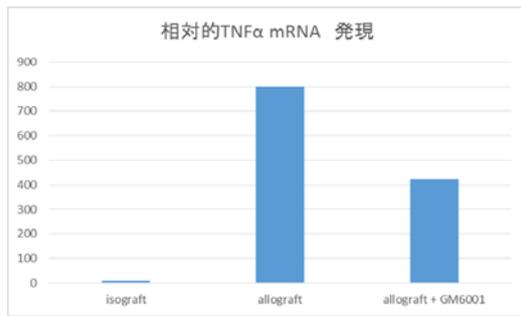
気管同所移植モデルの組織 HE 染色

4. 研究成果

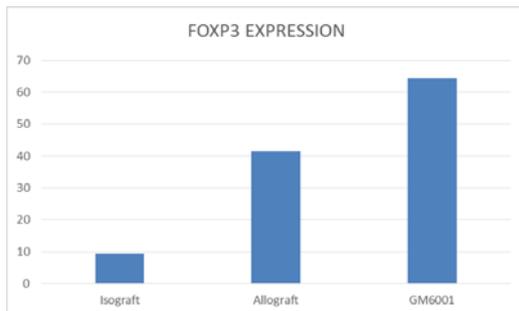
I. マウス気管移植

MMP阻害薬であるGM6001をレシピエントに投与した。Allograft+GM6001投与群ではAllograft+PBS投与群に比べてIL-2、IL-10、TNF α 、IFN γ のmRNAが低下していた。





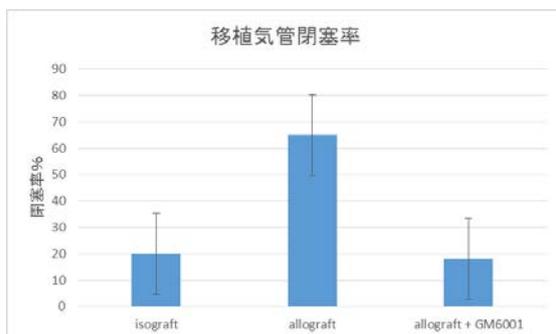
また、Foxp3 mRNA では、Allograft (=無投与群) と Allograft+GM6001 (=MMP 阻害薬投与群) において発現が有意に高く見られた。



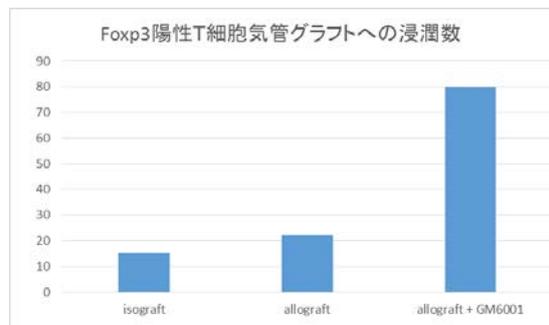
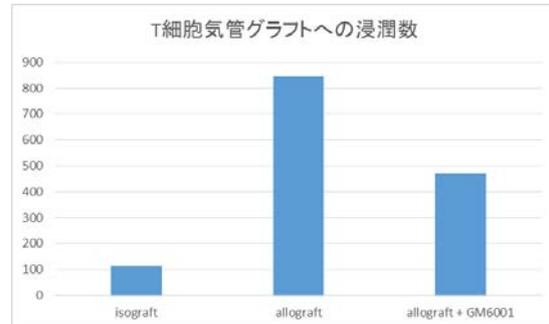
以上より炎症性サイトカインを GM6001 が抑制していると考えられた。また移植グラフトの拒絶反応も抑制していた。Foxp3 mRNA が増加していたことから制御性T細胞の関与の可能性が考えら絵 RT あ。

II. マウス気管移植での組織の検討

MMP 阻害薬投与群において移植気管閉塞率は Allograft+GM6001 投与群と Allograft 群ではそれぞれ 18%と 65%であった。GM6001 投与により閉塞が改善された。



また Allograft+GM6001 投与群と Allograft 群での CD3 陽性細胞の免疫染色ではそれぞれ 845, 472 であり有意差は認めなかった。しかし Foxp3 陽性 T 細胞の数においては Allograft+GM6001 群においてallograft 群よりも増加していた。このことより GM6001 により Foxp3 陽性T細胞が誘導され、移植気管の閉塞を軽減したことが示唆された。



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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

重信敬夫, 大塚 崇, 下田将之
Pioglitazone 投与による気管移植動物モデルの拒絶反応抑制, **FoxP3** 陽性細胞の集積
 2015年4月16日 名古屋国際会議場 名古屋市 第115回日本外科学会定期学術集会

〔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 0 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

大塚 崇 (OHTSUKA, Takashi)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：40306717

(2) 研究分担者

下田 将之 (SHIMODA, Masayuki)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：70383734

安樂 真樹 (ANRAKU, Masaki)
東京大学・呼吸器外科・講師
研究者番号：70598557

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()