

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10253

研究課題名(和文) 肺移植における抗体性拒絶の早期診断法と低用量IL-2を用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文) Early diagnosis and novel treatment with low-dose IL-2 of humoral rejection in lung transplantation.

研究代表者

青山 晃博 (Aoyama, Akihiro)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：60379047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究目的1：当科で施行した肺移植は平成27年27例、28年26例、29年24例で30年3月で193例(146例が生存中)となった。抗ドナー抗体が検出されたのは20例であった。研究期間中に閉塞性細気管支炎は9例で剖検が1例、再肺移植による摘出1例で、他はいずれも肺生検は施行不可能であった。

研究目的2：気管移植よりもより臨床肺移植に近いラット同所肺移植モデルのモデルを作成した。ラットアロ肺移植を行い、シクロスポリンを14日と35日投与する群を作成、短期投与群では、肺組織上清中に抗ドナー抗体を検出し組織学的には閉塞性細気管支炎を認めた。ラット肺移植モデルでも局所での抗体産生されることが示された。

研究成果の概要(英文)：Study 1: 193 lung transplantations (LuTx) was performed and 146 patients were alive s of March 2018. Anti-donor antibody was detected in peripheral blood in 20 cases. During the study period, nine patients developed obstructive bronchiolitis, and except one autopsy and one retransplantation, pulmonary biopsy was impossible due to poor status of the patients.

Study 2: Rat orthotopic LuTx model was established, which is closer to clinical lung transplant than tracheal transplantation. Using this model, administration of 14-day cyclosporine resulted in anti-donor antibody in lung tissue and histologically obstructive bronchiolitis. It was confirmed that antibody production in lung allograft was produced in rat lung transplantation model.

研究分野：移植免疫

キーワード：肺移植 抗体 慢性拒絶反応 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

肺移植後の成績は経年的に向上しているが、これは周術期管理や急性拒絶反応制御の向上による所が大きく、慢性拒絶反応による移植肺機能不全のために慢性期の死亡率は向上していない。慢性拒絶反応は病理学的に、閉塞性細気管支炎 (bronchiolitis obliterans, BO) を呈するが、この原因として虚血再灌流障害や感染以外に、MHC 分子に対する抗体の関与が示唆されている (Palmer, Transplantation. 2002;74:799, Fukami, J Immunol. 2009; 182: 309)。BO の診断は、肺組織が、肝・腎・心と異なり経皮生検で得られず、経気管支生検での採取は時に困難である。当科で抗体性拒絶反応により移植肺機能が廃絶し、再肺移植を要した症例 (Chen, Transpl Int.2014;27:e8) では、摘出肺で C4d 染色陽性、BO を認めた。この症例では血清中の de novo の抗ドナー抗体 (donor-specific antigen, DSA) は治療により消失したが、再肺移植を余儀なくされ、血清中の DSA の追跡だけでは病勢の判断が困難であった。

2. 研究の目的

肺移植後慢性期の死亡原因は慢性拒絶反応が最多で、この中には移植後新規に産生される抗ドナー抗体の関与があると考えられている。本研究の目的は、肺移植分野における液性拒絶の早期診断、治療を検証、確立することである。

3. 研究の方法

経気管支肺生検組織の培養上清中の抗ドナー抗体検出による抗体性拒絶反応の早期検出に関する研究

臨床肺移植症例で肺機能低下、CT 画像にて浸潤影を認めた症例に対して、気管支鏡検査を施行し鉗子肺生検を行い病理検査で BO の評価を行い、他の検体を 4 日間培養を行ない、培養上清中の DSA の

有無を評価する。評価方法はドナーリンパ球を、培養上清と incubation 後、抗ヒト IgG 抗体で incubate し、フローサイトメリーにて評価する。同日に採取したレシピエント血清中の DSA も合わせて評価する。患者は術後半年、1年、以後1年毎に精密肺機能検査、CT 検査、HLA 抗体検査をルーチンで行なっており、これらのデータの推移との相関も検討して行く。

ラットの Treg を増加させる IL-2 至適量を決定する。

申請者 (青山晃博) は霊長類モデルで、recombinant IL-2 を 1×10^6 IU/m²BSA/day 皮下投与し、末梢血中 Treg の割合、絶対数が増加することを示した (Aoyama, Am J Transplant. 2012;12:2532)。ラットに rat recombinant IL-2 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 IU/m²BSA/day を連日皮下投与し、7 日、14 日目に犠牲死させ、末梢血、脾臓での Treg を CD4, CD25, FoxP3 染色しフローサイトメリーで評価する。

抗ドナー抗体産生ラット肺内気管移植モデルにおける低用量 IL-2 による制御性 T 細胞増加と抗体産生抑制

研究分担者の佐藤雅昭は肺内気管移植 OB モデルを用いて、気道拒絶に伴い肺内リンパ組織を培養し、抗ドナー特異抗体が局所で産生されることを見出した。このモデルを用いて、気管移植後約 2 週間、低用量 IL-2 を投与し、移植後 14 日、28 日、84 日で犠牲死させ、末梢血中、脾臓・肺組織の 5 日間培養上清中の DSA をフローサイトメリーで評価する。また気管を含む切片にて、閉塞の評価、弾性線維、C4d 染色を行なう。

4. 研究成果

当科で施行した肺移植の症例数は平成 27 年 27 例、28 年は 26 例、29 年は 24 例で 30 年 3 月の時点で、累計 193 例 (146

例が生存中)となった。これまで一時的もしくは長期抗ドナー抗体が検出されたのは20例で、長期検出されている症例は予後不良の傾向にあった。研究期間中に閉塞性細気管支炎は9例で発症し剖検が1例、再肺移植による摘出1例で、他はいずれも患者の状態が不良のため肺生検は施行不可能であった。

臨床肺移植より免疫学的に近いラット同所肺移植モデルでの閉塞性細気管支炎モデルの作成を行ってきた。ラットアロ同所性片肺移植を行い、シクロスポリンを14日と35日投与する群を作成、肺組織、脾臓の培養上清中の抗体と移植肺の組織学的検討を行った。短期投与群では、上清中に抗ドナー抗体を検出し組織学的に閉塞性細気管支炎を認めた。ラット肺移植モデルでも局所での抗体産生されることが示された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計8件)

Aoyama A, Chen F, Minakata K, Yamazaki K, Yamada T, Sato M, **Date H**. Sparing native upper lobes in living-donor lobar lung transplantation: Five cases from a single center. *Am J Transplant* 15(12):3202-7, 2015

Sato M, Yamada T, Menju T, Aoyama A, Sato T, Chen F, Sonobe M, Omasa M, **Date H**. Virtual-assisted lung mapping: outcome of 100 consecutive cases in a single institute. *Eur J Cardiovasc Surg* 24(4):e131-9, 2015

Chen F, Miyamoto E, Takemoto M, Minakata K, Yamada T, Sato M, Aoyama A, **Date H**. Right and left inverted lobar lung transplantation. *Am J Transplant* 15(6):1716-21, 2015

Tanaka S, Chen-Yoshikawa TF, Kajiwara M, Menju T, Ohata K, Takahashi M, Kondo T, Hijiya K, Motoyama H, Aoyama A, Masuda S, **Date H**. Protective effects of Imatinib on ischemia/reperfusion injury in rat lung. *Ann Thorac Surg* 102(5):1717-1724, 2016

Tanaka S, Chen-Yoshikawa TF, Miyamoto E, Takahashi M, Ohata K, Kondo T, Hijiya K, Motoyama H, Aoyama A, **Date H**. Vascular endothelial-cadherin expression after reperfusion correlates with lung injury in rat lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 101(6):2161-7, 2016

Hijiya K, Chen-Yoshikawa TF, Kondo T, Motoyama H, Ohsumi A, Nakajima D, Sakamoto J, Ohata K, Takahashi M, Tanaka S, Miyamoto E, Aoyama A, **Date H**. Bronchodilator inhalation during ex vivo lung perfusion improves posttransplant graft function after warm ischemia. *Ann Thorac Surg* 103(2):447-53, 2017

Ohata K, Chen-Yoshikawa TF, Menju T, Miyamoto E, Tanaka S, Takahashi M, Motoyama H, Hijiya K, Aoyama A, **Date H**. Protective effect of inhaled Rho-kinase inhibitor on lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 103(2):476-83, 2017

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. 査読有 2017 May;101(5):e156-e165. doi: 10.1097/TP.0000000000001665.

[学会発表] (計 2 件)

合地史明、陳 豊史、上田聡司、栢分秀直、徳野純子、岡部 亮、山岸弘哉、高萩亮宏、齋藤正男、近藤 健、中島大輔、濱路政嗣、本山秀樹、青山晃博、伊達洋至。生体肺移植におけるグラフト毎のドナー特異的抗体の検討。日本肺および心肺移植研究会。福岡。2018/2/3

A. Takahagi, M. Sato, T. Chen-Yoshikawa, A. Yoshizawa, K. Ohata, M. Saito, R. Okabe, F. Gochi, H. Yamagishi, M. Hamaji, H. Motoyama, K. Hijiya, A. Aoyama, H. Date. Airway-Centered Inflammation Induced by Lipopolysaccharide Leads to BOS-Like Phenotype of CLAD in Rat Lung Transplantation; International Society for Heart & Lung Transplantation. San Diego, USA. 2017/4/15

[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]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青山晃博(AOYAMA AKIHIRO)
(京都大学・医学研究科・講師)
研究者番号: 60379047

(2) 研究分担者

伊達洋至(DATE HIROSHI)
(京都大学・医学研究科・教授)
研究者番号: 60252962

陳 豊史(CHEN FENGSHI)
(京都大学・医学研究科・講師)
研究者番号: 00442334

佐藤雅昭(SATO MASA AKI)
(東京大学・医学研究科・助教)
研究者番号: 00623109

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

Tatsuo Kawai (ハーバード大学医学部、教授)