

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01581

研究課題名(和文) 肺移植後の慢性拒絶に対する核医学的非侵襲モニタリング法の確立と早期治療法の創成

研究課題名(英文) Establishment of noninvasive nuclear monitoring for chronic rejection after lung transplantation and development of early therapy

研究代表者

佐藤 雅昭 (SATO, MASAOKI)

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) 17,150,000円

研究成果の概要(和文)：我々はラット肺移植モデルを用いて肺移植後の慢性拒絶の機序の解明と核医学的非侵襲モニタリング法の創成に取り組んだ。同モデルは、肺移植後最大の問題である慢性拒絶であるBOSとRASの病態の理解のために有用であり、今回の研究結果は、BOSは経気道的な刺激(感染、誤嚥、大気汚染など)が自然免疫の惹起を介して気道を中心とした拒絶反応と線維化を引き起こす一方、RASは不十分な免疫抑制などにより、移植肺内の様々なコンパートメントに拒絶反応と線維化を生じる肺移植後慢性拒絶のプロトタイプである、との仮説を支持する。FDG-PETを肺移植患者に用いることは、早期の拒絶反応や線維化を探知する有用な方法となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果は、肺移植におけるもっとも重要な予後規定因子となっている慢性拒絶の二つのサブタイプ、BOSとRASのメカニズムに迫るものだった。これに基づき、さらなる検査方法や治療方法の開発に期待がかかる。とくに検査としては、非侵襲的な拒絶モニタリングとしての方法として、FDG-PETが有用である可能性が示唆された。今後は臨床研究として、実際の肺移植患者にこの方法を用いた検討が待たれる。

研究成果の概要(英文)：We tried to elucidate the underlying mechanisms of chronic rejection after lung transplantation and to develop a novel non-invasive strategy using nuclear medicine to monitor the process. We found that a rat lung transplant model is useful to study the mechanisms of the subtypes chronic rejection, BOS and RAS. BOS can be caused by trans-airway stimulation such as infection, aspiration, and air pollution, which provokes innate immunity and results in airway-centered inflammation and fibrosis. Conversely, in RAS, multiple anatomical compartments of the lung are broadly affected for example by rejection due to insufficient immunosuppression. We also found that FDG-PET can detect early rejection in this model. Uptake of FDG was significantly correlated with acute rejection grades as well as the degree of tissue fibrosis of allografts. PET-CT could be a novel tool to detect early rejection and infection in lung transplant recipients.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺移植 急性拒絶 慢性拒絶 BOS RAS

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) 肺移植における最大の問題：慢性拒絶

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、他の臓器移植と比べ著しく低い。その最大の原因が慢性拒絶である。慢性拒絶は移植後5年までに肺移植患者の約50%に認められ、呼吸不全の進行、生命予後の悪化が見られる。

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(図1左)。

2) 予後不良な肺移植後慢性拒絶 RAS の発見

従来のBOSに加え、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(Sato M, JHLT 2011: 図1右)。RASは胸膜や末梢肺を中心に炎症・線維化を来し、拘束性障害を示す。RASは慢性拒絶全体の1/3から1/4を占め、BOSと比べると発症後の生存率が著しく低い(発症後の生存中値: 約1年 vs. 2.5年)。この結果はその後、世界中の主な肺移植センターで再現され大きな注目を集めるに至った。

3) BOS と RAS のメカニズムの研究

私たちはRASの提唱以降、なぜ肺移植後の慢性拒絶がBOSとRASの形をとり得るのかに着目研究を進めてきた。臨床研究はトロント大学との共同で以下の知見を得た。

①RASは末梢肺の炎症、diffuse alveolar damageを前駆病変とする(Sato M, et al. JHLT 2012)

②RASは増悪と寛解を繰り返し階段状に進行する(Sato M, et al. JHLT 2013)

③RASは気管支鏡で採取された肺胞洗浄液内に、末梢肺の炎症を反映する炎症サイトカイン(Saito T, Sato M, et al. AJT 2013)やalarmin分子(Saito T, Sato M, et al. AJT 2014)を発現する

一方、京都大と東京大で基礎研究を行い下記の知見を得た。

①ラット肺移植モデルで免疫抑制を段階的に変化させ、免疫抑制が不十分な場合はRAS様の組織変化(胸膜末梢肺を中心とする線維化)を呈する。

②マウス同所気管移植モデルで、気道線維芽細胞がToll-like receptor (TLR) 4を発現し、LPS刺激で活性化・線維化を増悪させる(Kawashima M, Transplant Proc. 2018)。

4) FDG-PET/CTによる炎症モニタリングと早期治療の可能性

BOSとRASの有効な治療手段はまだない。治療抵抗性の理由として、不可逆的な線維化が進行した状態でしか治療を開始できないタイミングの問題が考えられる。

分担研究者(高橋)らは、炎症細胞や活性化した線維芽細胞にFDGが高度に取り込まれることを報告した(Matsui T, et al. JNM 2009)。

また、急性肺障害モデルを用いたFDG-PET研究では炎症モニタリングと機能予後予測に役立つことが報告されている(V. Zambelli et al. Int Care Med 2012)。従って、本研究のラット肺移植モデルにおいても、FDG-PET/CTは炎症・線維化過程のモニタリングを可能にすると考えられる。尚18F-FDGはすでに保険診療として多くの患者に安全に使用され、炎症病巣の描出も可能であるため(Takahashi M, et al. ANM 2006)本研究の成果は速やかな臨床導入が可能と考えられる。

2. 研究の目的

これまで確立したラット肺移植モデルを洗練し、肺移植後の慢性拒絶であるBOSとRASは、それぞれ異なる部位の慢性炎症・リンパ組織化・抗ドナー抗体産生の結果であるとの仮説に基づき、①BOSが気道中心の炎症によることを示す。②移植肺の炎症を非侵襲的にモニタリングする方法として、FDG-PETを用いて経時的に同一個体をモニタリングし、病理像との対比を行う。

3. 研究の方法

1) ラット肺移植モデル

これまで確立した方法をさらに手技的に洗練し、ラット肺移植急性拒絶、慢性拒絶モデルを作成した。具体的にはLewis ratをレシピエントとし、ドナーにLewisラット(isograft)またはBrown-Norwayラット(allograft)を用いた。

2) ラット気道LPS投与実験

肺移植後のレシピエントラットにLPSを反復投与することでinnate immunityを活性化させ、

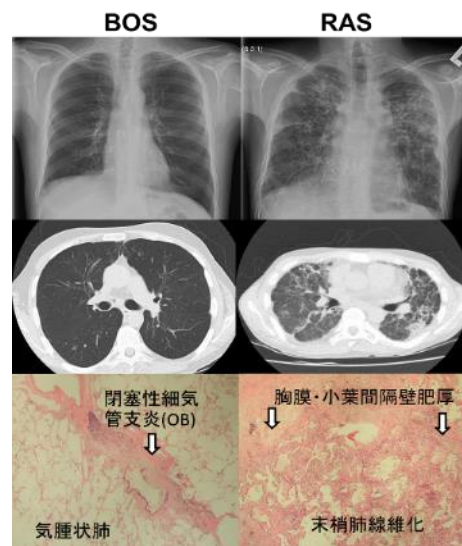


図1 肺移植後のBOS(左)と、申請者らが確立したRAS(右)の胸部X線、CT、病理像。

これが気道中心の BOS 様病変をつくるかどうかを検討した。

3) FDG-PET 実験

ラット肺移植後に cyclosporine の投与、および FDG-PET 撮影を行った。東京大学アイソトープセンターにて、レシピエントラットの尾静脈から 18F-fluorodeoxyglucose を投与、positron emission tomography (PET) で撮像を行った。また病理像、免疫組織染色像との比較を行った。

4. 研究成果

1) ラット肺移植モデルの改良

これまでのラット肺移植モデルの再現性を高め、手技を簡素化するための工夫を大学院生の田 (Tian) が中心となり実施、下記の論文として発表した。具体的には肺移植に用いるカフの形状、開胸助間、脈管吻合の際に “Pendulum mode” と呼んでいる装置を開発し使用する、脈管吻合の際の切込みの形状を工夫する (図 2) などいくつかの改良を加え、一件の手術時間が平均 48 分に短縮、これにより、1 日に最大 8 件のラット肺移植を実施することが可能となった。

Tian D, Sato M, et al. A rat lung transplantation model: modifications of the cuff technique. 2020 Ann Transl Med (in press)



図 2 ラット肺移植モデル改良: 気管支、肺動脈、肺静脈の吻合に必要な切込みの形状を、従来の一直線または T 型から肺動脈は L 型、肺静脈と気管支は V 型にすることで脈管が裂けるのを防いだ。

2) ラット気道 LPS 投与実験

i) Allograft を移植した肺移植後のラットに免疫抑制剤 cyclosporine (CsA) を投与し拒絶が起こりにくい状態としたうえで、術後 35 日目から気道内に PBS または LPS を投与した (図 3)。一部のラットは isograft を移植し LPS を投与した。結果、LPS を投与した Allograft にのみ、気道を中心とした炎症と線維化を生じた (図 4)。またこのグループは他のグループに比べ、病理組織診断では国際心肺移植学会の定義に基づく拒絶反応 grade A (末梢肺) および B (気管支) が有意に他のグループより高い結果となった。Alloantigen-independent な刺激により拒絶反応が惹起され、免疫抑制を乗り越えて気道を中心とする炎症と線維化を生じる BOS の病態が再現された。

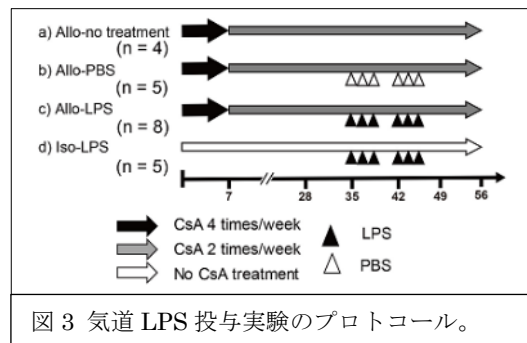


図 3 気道 LPS 投与実験のプロトコール。

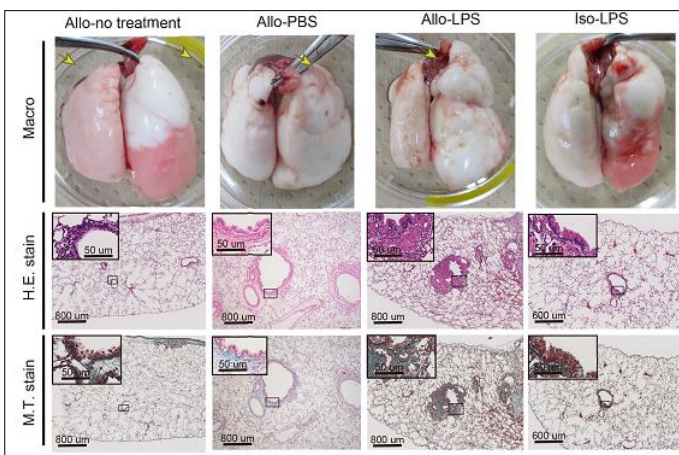
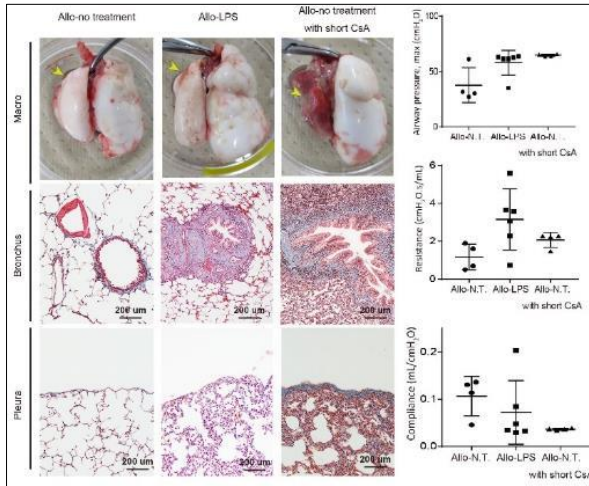


図 4 気道 LPS 投与実験によるラット肺移植 BOS モデルの確立: Allograft に免疫抑制を行い、LPS を投与した場合のみ、人間の肺移植後にみられる BOS に類似した気道中心の炎症と線維化を確認した。Isograft や免疫抑制剤のみ投与した Allograft、免疫抑制を行い PBS を気道投与した Allograft ではそのような変化を生じなかった。M. T. = Masson Trichrome。

ii) RAS モデルとの比較

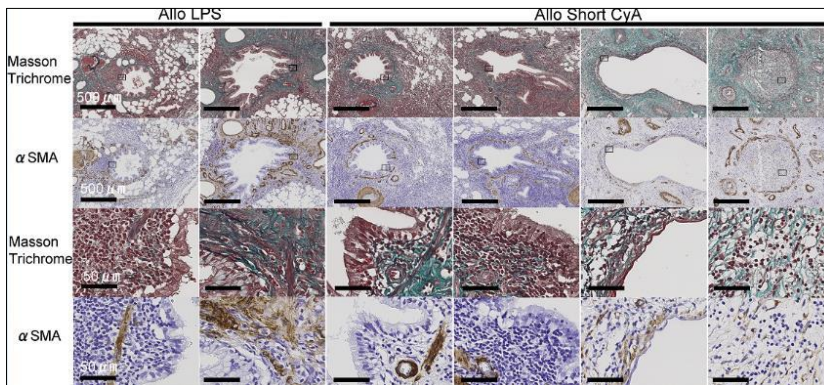
さらに、この BOS モデルと、我々が既に確立した、不十分な免疫抑制によって生じる RAS モデル (Miyamoto et al. Transplant 2017) を比較した。BOS モデルでは、気道を中心とした線維化を来しているのに対して、RAS モデルでは、胸膜や肺実質といった複数のコンパートメントに病変を生じた (図 5 左)。また、呼吸機能検査では、BOS モデルで気道抵抗が高いのに対し RAS モデルはコンプライアンスが低く、BOS と RAS の臨床像に合致した結果が得られた。CD3 (T cell), CD68 (マクロファージ), α -smooth muscle actin (SMA) 染色では、それぞれ病変部に合致して細胞浸潤と線維化が見られた (図 6)。これらの成果は下記の論文で発表した。

Takahagi A, Sato M, et al. LPS-induced airway-centered inflammation leading to BOS-like airway remodeling distinct from RAS-like fibrosis in rat lung transplantation. Transplantation. 2020 [epub ahead of print]



←図 5 Allograft 移植後、免疫抑制剤のみを投与した群 (Allo-no treatment (NT))、LPS を気道投与した BOS モデル群 (Allo-LPS)、短期間の免疫抑制のみを施した群 (Allo-no treatment with short CsA) の病理組織、呼吸機能検査の比較。

↓図 6 LPS 気道投与による BOS モデルと、短期間 CsA 投与による RAS モデルの免疫染色による比較。



3) FDG-PET による肺移植後拒絶反応のモニタリング

ラット肺移植後の拒絶反応をモニタリングするため、様々なパターンでの免疫抑制を施し、FDG-PET を撮像した。プロトコールを図 7 に示す。

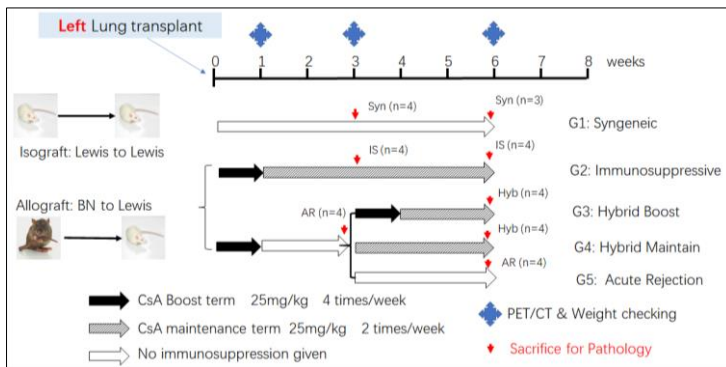


図 7 肺移植後のラットに免疫抑制を施し、FDG-PET を撮像したプロトコール

移植後 3 週間目に撮像した FDG-PET では、免疫抑制剤を移植後初期にしか投与していない acute rejection (AR) 群で、isograft を移植した syngenic 群より有意に高い FDG 取り込みを移植肺に認めた。この時点での病理組織では、acute rejection 群で、典型的な早期の急性拒絶像が見られた。肺移植後 3 週間から 6 週間までに、様々なプロトコールの免疫抑制を追加した。この結果、病理組織像では、免疫抑制継

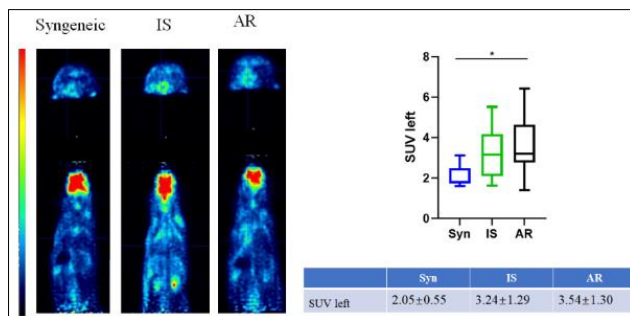


図 8 肺移植後 3 週間の FDG-PET 像と SUV max

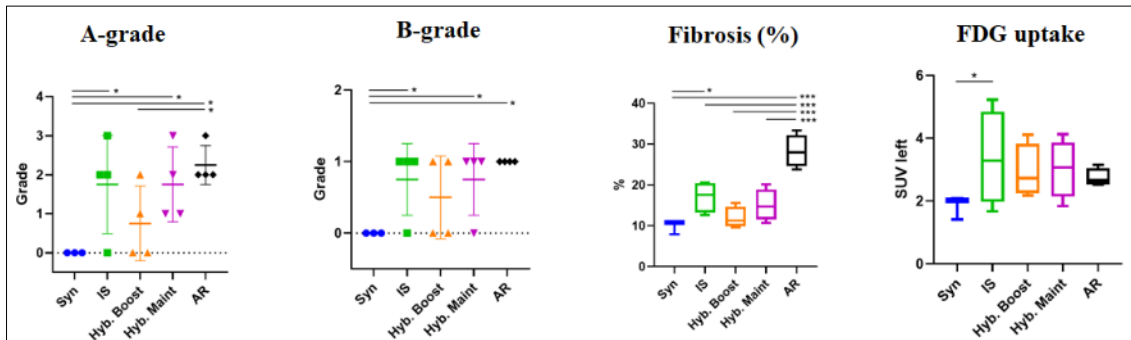


図9 肺移植後6週目の国際心肺移植学会拒絶 A grade, B grade と、肺全体の線維化の割合。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

統群 (IS)、一時免疫抑制中断後の再開群 (Hybrid maintenance)、中断後ブースト群 (Hybrid boost) で、国際心肺移植学会の定める拒絶反応 grade A, B それぞれで個体差を認めたが syngenic 群より高い値を認める一方、線維化の割合では acute rejection (AR) 群 (実験2で示した RAS モデルと同じプロトコール) より低かった。FDG-PET の SUVmax は、AR group で線維化の進行に伴い、むしろ低下傾向となった。

各グループ内の個体差を考慮し、実験全体で FDG uptake と国際心肺移植学会拒絶 A, B grade と、肺線維化の割合の相関を検討したところ、いずれも強い相関関係が得られた (図10)。

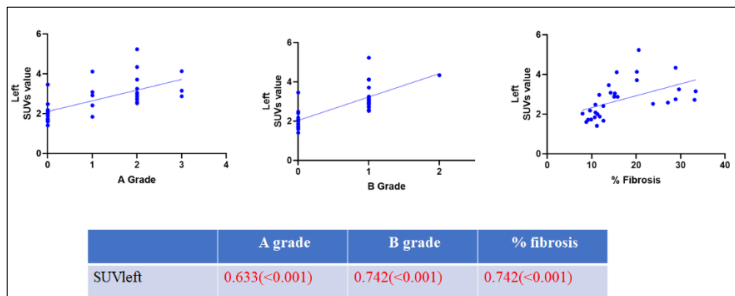


図10 国際心肺移植学会拒絶 A grade, B grade と、肺全体の線維化の割合と FDG-PET で得られた移植肺グラフトの SUVmax の相関関係。

今回の研究では、ラット肺移植モデルを用いて、肺移植後最大の問題である慢性拒絶およびその subtype である BOS と RAS の病態の理解、およびその病勢把握のための FDG-PET の有用性の検討を試みた。BOS モデル、RAS モデルの確立は肺移植後慢性拒絶のメカニズム理解のために重要な役割を果たすと考えられ、実際今回の研究で確立した BOS モデルは、経気道的な刺激 (感染、誤嚥、大気汚染など) が自然免疫の惹起を介して気道を中心とした拒絶反応と線維化を引き起こすとの仮説を支持する。これはまた、免疫抑制が不十分な場合に移植肺全体に病変が出現する RAS モデルと比較することで、肺移植後の慢性拒絶のプロトタイプは RAS であるとの仮説を支持する。これらの仮説は、下記の論文において発表した。

Sato M. Bronchiolitis obliterans syndrome and restrictive allograft syndrome after lung transplantation: why are there two distinct forms of chronic lung allograft dysfunction? *Ann Transl Med* 2020 (in press)

FDG-PET を用いた研究は、PET 機器の施設内での運用開始が大幅に遅れた関係で、慢性拒絶モデルの検証は十分にできなかったが、移植肺に生じる拒絶反応と線維化を反映した FDG 取り込みを生ずることが示された。この成果は現在投稿準備中である。

ラット肺移植モデルは、肺移植後最大の問題である慢性拒絶およびその subtype である BOS と RAS の病態の理解のために有用であり、今回の研究結果は、BOS は経気道的な刺激 (感染、誤嚥、大気汚染など) が自然免疫の惹起を介して気道を中心とした拒絶反応と線維化を引き起こす一方、RAS は不十分な免疫抑制などにより、移植肺内の様々なコンパートメントに拒絶反応と線維化を生じる肺移植後慢性拒絶のプロトタイプである、との仮説を支持する。FDG-PET を肺移植患者に用いることは、早期の拒絶反応や線維化を探知する有用な方法となりうる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawashima M, Sato M, Murakawa T, Anraku M, Konoeda C, Hosoi A, Kakimi K, Nakajima J	4. 巻 50
2. 論文標題 Role of Toll-like Receptor 4 Expressed by Fibroblasts in Allograft Fibrosis in Mouse Orthotopic Tracheal Transplantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transplantation proceedings	6. 最初と最後の頁 3863-3872
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2018.06.023.	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 Glanville Allan R, Verleden Geert M., Todd Jamie L., Benden Christian, Calabrese Fiorella, Gottlieb Jens, Hachem Ramsey R, Levine Deborah, Meloni Federica, Palmer Scott M., Roman Antonio, Sato Masaaki, Singer Lianne G, Tokman Sofya, Verleden Stijn E, von der Th?sen Jan, Vos Robin, Snell Gregory	4. 巻 38
2. 論文標題 Chronic Lung Allograft Dysfunction: Definition and Update of Restrictive Allograft Syndrome (RAS) A Consensus Report from the Pulmonary Council of the ISHLT	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Heart and Lung Transplantation	6. 最初と最後の頁 483-492
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.healun.2019.03.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 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.	4. 巻 101
2. 論文標題 Association of Local Intrapulmonary Production of Antibodies Specific to Donor Major Histocompatibility Complex Class I With the Progression of Chronic Rejection of Lung Allografts.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 e156-e165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/TP.0000000000001665.	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 Saito T, Liu M, Binnie M, Martinu T, Sato M, Keshavjee S.	4. 巻 epub ahead of print
2. 論文標題 Upregulation of alveolar neutrophil enzymes and long pentraxin-3 in human chronic lung allograft dysfunction subtypes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Thorac Cardiovasc Surg	6. 最初と最後の頁 epub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtcvs.2018.02.039	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 Takahagi A, Sato M, Chen-Yoshikawa TF, Miyamoto E, Saito M, Gochi F, Hamaji M, Yoshizawa A, Terasaki Y, Urushiyama H, Aoyama A, Sonobe M, Date H.	4. 巻 epub ahead of print
2. 論文標題 LPS-induced airway-centered inflammation leading to BOS-like airway remodeling distinct from RAS-like fibrosis in rat lung transplantation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 epub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TP.0000000000003097	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16件 (うち招待講演 14件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 佐藤雅昭
2. 発表標題 肺移植 (肺機能から見た治療適応、移植後のフォロー)
3. 学会等名 第58回臨床呼吸機能講習会 応用コース (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaaki Sato
2. 発表標題 Teamwork; easier said than done! Challenge in building the lung transplant team across multiple modalities in a big hospital
3. 学会等名 Linkou Changgeng Hospital lecture (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaaki Sato
2. 発表標題 Chronic Lung Allograft Dysfunction after Lung Transplantation
3. 学会等名 Transplantation Science Symposium Asian Regional meeting 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaaki Sato
2. 発表標題 Teamwork; easier said than done! Challenge in building the lung transplant team across multiple modalities in a big hospital
3. 学会等名 中山外科論壇興大師有約（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaaki Sato
2. 発表標題 CLAD overview and focused update on management
3. 学会等名 Yonsei Lung Transplant Academy 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤雅昭
2. 発表標題 移植後長期観察の問題点 新たな時代を迎えた肺移植～現状と課題～
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaaki Sato
2. 発表標題 Restrictive Allograft Syndrome: Definition and Diagnosis
3. 学会等名 The 39th ISHTL annual meeting and scientific session（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤雅昭
2. 発表標題 Antibodies and B cells in the pathogenesis of CLAD. SYMPOSIUM 11: Not CAVing to CLADtastrophe: Emerging Mechanisms of Chronic Heart and Lung Allograft Disease
3. 学会等名 International Society for Heart and Lung Transplantation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤雅昭
2. 発表標題 骨髄移植後肺合併症：肺移植という選択 合同企画「症例から学ぶ注目されているびまん性肺疾患、病態」
3. 学会等名 日本呼吸器学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤雅昭
2. 発表標題 肺移植後CLADの病態における抗HLA抗体の役割
3. 学会等名 HLA研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤雅昭
2. 発表標題 肺移植における核医学検査の応用と可能性
3. 学会等名 呼吸器核医学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤雅昭
2. 発表標題 肺移植のABC - 実地医家に知っていただきたいこと
3. 学会等名 横浜内科学会 第147回呼吸器疾患の知識をふやす会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高秋亮宏
2. 発表標題 Airway-centered inflammation induced by LPS instillation leads to BOS-like phenotype of CLAD in rat lung transplantation
3. 学会等名 International Society for Heart and Lung Transplantation (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川島光明
2. 発表標題 Toll-like Receptor 4 Signaling Affects Myofibroblasts Expression in Mice Tracheal Allograft
3. 学会等名 International Society for Heart and Lung Transplantation (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤雅昭
2. 発表標題 日本の肺移植の現状と未来 内科の先生方に知っていただきたいことー
3. 学会等名 第68回 臨床呼吸器カンファレンス (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤雅昭
2. 発表標題 CLAD、BOS、RASの新たな定義 国際心臓移植学会(ISHLT) pulmonary council, CLAD working groupからの報告
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019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	高橋 美和子 (Takahashi Miwako) (00529183)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 計測・線量評価部・主幹研究員(任非) (82502)	
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	中島 淳 (Nakajima Jun) (90188954)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	
研究分担者	本山 秀樹 (Motoyama Hideki) (20762264)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	青山 晃博 (Aoyama Akihiro) (60379047)	京都大学・医学(系)研究科(研究院)・その他 (14301)	