

令和 2 年 4 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16410

研究課題名(和文)肺移植における抗体関連拒絶反応の病態解明と補体活性化抑制による新規治療法の検討

研究課題名(英文)Anti-complement component C5 prevent antibody-mediated rejection after lung transplantation in murine orthotopic model.

研究代表者

椎名 裕樹 (Shiina, Yuki)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30782304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は肺移植後の抗体関連拒絶反応(Antibody-mediated rejection; AMR)マウスモデルの確立と、補体抗体であるAnti-C5抗体による治療効果の検証を目標としている。まず我々は異なる主要組織適合遺伝子複合体を有するマウス間での同所性左肺移植を行い、術後7日目にAMRの所見(グラフト肺拒絶所見・C4d沈着・血清中ドナー特異的抗体)を認めること、さらに皮膚移植を先行して行うことでAMRが増強され移植2日目から上記所見を認めることを示した。続いてanti-C5抗体が上記マウスにおいてAMR所見を抑制することを示し、anti-C5抗体によるAMR抑制効果を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究において、マウスモデルにおいてanti-C5抗体がAMRを抑制する可能性が示唆された。腎移植など他臓器の移植においては、anti-C5抗体は複数の臨床試験が行われるなどAMRに対する治療効果が期待されている。一方で肺移植後AMRに対するanti-C5抗体の効果を検証した報告は少なく、今回の研究は有効な治療選択肢の乏しい肺移植後AMRに対する新規治療法としてのanti-C5抗体の有用性を示す点で学術的意義のあるものと考えられる。今後、さらなる基礎実験・臨床試験の実施が望ましい。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish the mice model of antibody-mediated rejection (AMR) after lung transplant and verify the efficacy of anti-C5 to AMR after lung transplant. First, we performed lung transplants using BALB/c (major histocompatibility complex; MHC H2d) as a donor and C57BL/6 (MHC H2b) as a recipient. The recipient showed clinical features of AMR, and pre-sensitization by skin transplant enhanced AMR. Continuously, other mice underwent skin and lung transplants and treated with anti-C5 or with isotype IgG control. The mice treated with anti-C5 showed significantly lower acute rejection scores compared to the mice with isotype control. Among this model, Anti-C5 suppressed the AMR findings. Anti-C5 therapy may be effective for AMR in lung transplants.

研究分野：肺移植

キーワード：肺移植 拒絶反応 抗体関連拒絶 補体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

難治性肺疾患において肺移植は唯一の有効な治療法であるが、その5年生存率は約60-70%といまだ改善の余地がある。肺移植における重要課題の一つは拒絶反応の制御である。拒絶反応のうち、T細胞が中心となる細胞性拒絶の抑制はシクロスポリンなどにより良好な成績を収めているが、B細胞が関与する液性拒絶(Antibody-mediated rejection: AMR)は機序が不明な点も多く、有効な予防法や治療法が確立されていない。AMRは急性拒絶反応に関与し高い死亡率を有することに加え、グラフト肺の慢性拒絶反応にも関与すると報告されており、拒絶反応の克服においてAMRの抑制は不可避の課題である。AMRは補体活性化と密接に関連を有しており、腎移植においてはAMRに対して、補体経路を抑制するanti-C5抗体であるEculizumabを投与する臨床試験が実施中である。しかし肺移植においてはAMRや補体活性の知見は乏しい。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、肺移植におけるAMRの詳細な機序の解明および液性拒絶の有効な予防手段の探索・研究である。異なる主要組織適合遺伝子複合体(Major histocompatibility complex: MHC)を有するマウス間での同所性肺移植による液性拒絶モデルを作成した後、AMR予防手段の候補としてanti-C5抗体を投与し、AMRと補体活性化との相関を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 皮膚移植によるドナー特異的抗体の感作

Allograft マウスモデルとして、ドナーにBALB/c(MHC H2d)、レシピエントにC57BL/6(MHC H2b)を用いて実験を行った。ドナー背部から皮膚1cmを採取し、皮下組織を除去した後、レシピエントの背部に移植し、経時的に血中のドナー特異的抗体(Donor specific antibody: DSA)を測定した。DSA測定には蛍光標識抗体とフローサイトメトリーを用いた。

#### (2) 同所性肺移植マウスモデルにおけるAMR所見と、皮膚移植前感作が与える影響の検討

(1)と同様のallograft マウスモデルにおいて、同所性左肺移植を行った。左肺移植においては20G/22G/26Gのエラスター針を使用し作成したカフによるテクニックを用いた。皮膚移植にて前感作を行った後に肺移植を行った群(st+)と肺移植のみ行った群(st-)を作成し、各群において肺移植後2日目(st+群/st-群)または7日目(st+群/st-群)に犠牲死とした群を作成した。免疫抑制剤は使用しなかった。解析として、病理評価(拒絶スコア、免疫染色によるC4d沈着評価を含む)および血清中のDSAを評価した。Controlにはisograft マウスモデル(ドナー・レシピエント:C57BL/6)を作成し、肺移植後2日目または7日目に犠牲死とした(is2/is7)。

#### (3) 皮膚移植前感作後、同所性肺移植マウスモデルに対するanti-C5のAMR抑制効果の検討

(2)と同様に、皮膚移植後に肺移植を行ったマウスに対してanti-C5投与群(40mg/kg)(C5+群)とisotype controlを投与した群(C5-群)を作成し、肺移植後2日目に犠牲死とし病理評価(拒絶スコア、C4d沈着含む)およびDSAを評価した。また、anti-C5に加えてメチルプレドニゾロンとシクロスポリンを投与した群(C5+is群)とメチルプレドニゾロン(1.6mg/kg)とシクロスポリン(10mg/kg)のみを投与した群(C5-is群)も作成し、同様の解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1)

皮膚移植後7日目に犠牲死としたマウスでは血清中DSAは認めなかったが、皮膚移植後14日目から血清中のDSA-IgG・DSA-IgMがともに検出された。DSA-IgGは皮膚移植後70日目でも認められた。移植された皮膚グラフトに対する感作反応と考えられた(図1)。得られたこの結果をもとに、(2)において皮膚移植を行うタイミングを肺移植の14日前と設定した。

#### (2)

肺移植に先行して皮膚移植を行わなかった群の解析では、st2-群ではグラフト肺の拒絶所見、血管内皮へのC4d沈着、血清中DSAはい

ずれも認めなかった。一方でst7-群はグラフト肺の病理所見にて血管周囲へのリンパ球浸潤を認め、拒絶スコアの上昇がみられた(図2、図3)。免疫染色では血管内皮へのC4d沈着を認め、

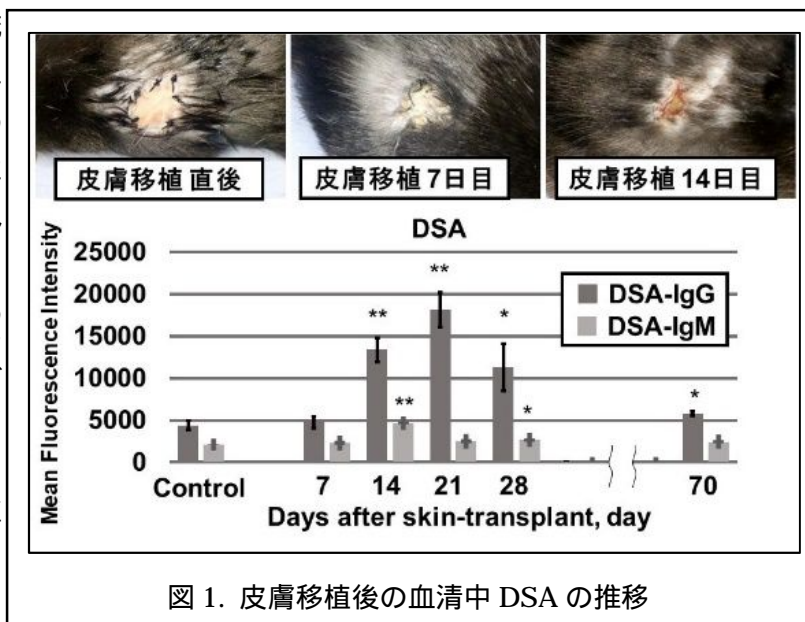


図1. 皮膚移植後の血清中 DSA の推移

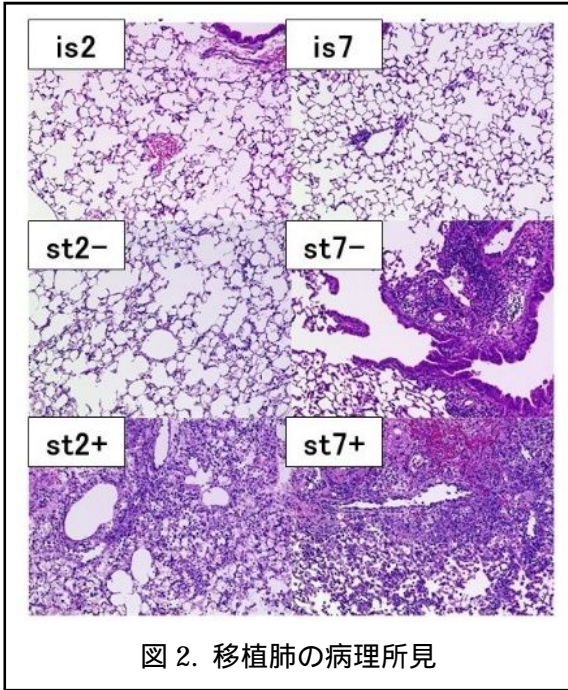


図 2. 移植肺の病理所見

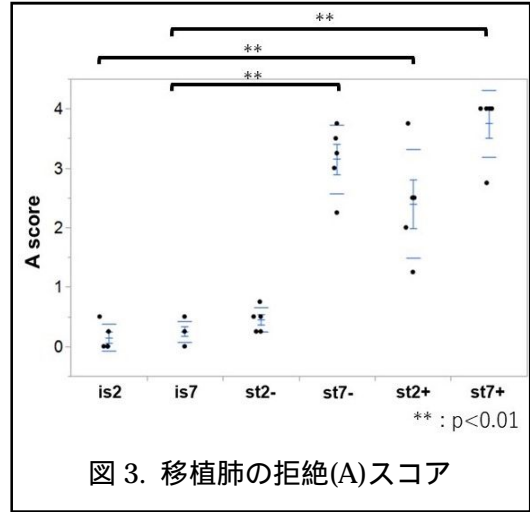


図 3. 移植肺の拒絶(A)スコア

さらに血清中 DSA を認めた。以上より、st7-群では AMR の診断基準を満たしていた。肺移植に先行して皮膚移植を行った群では、st2+群/st7+群ともに拒絶スコアの有意な上昇を伴うグラフト肺の拒絶所見を認め、加えて血管内皮への C4d 沈着、血清中 DSA をいずれも

認めており、AMR の診断基準を満たしていた。どちらも肺移植後 2 日目である st2+群と st2-群を比較すると、上記のとおり AMR を示唆する所見に差異を認めており、皮膚移植による前感作によって AMR 所見が増強されたと考えられた。

(3)

Anti-C5 を投与した C5+群および C5+is 群は、非投与群である C5-群と比較して、急性拒絶スコアが有意に低値であった(図 5、図 6)。メチルプレドニゾロンおよびシクロスポリンのみを投与した C5-is 群は C5-群と比較して有意な差を認めなかった。C4d の沈着および DSA に有意差はなかった。Anti-C5 の投与により、既存の治療法であるステロイドおよびシクロスポリンによる治療では抑制しきれなかった AMR が抑制されたと考えた。

(今後の展望)

皮膚移植にて AMR を増強したマウスモデルにおいて anti-C5 は AMR の抑制に有用であったことから、Anti-C5 は実臨床においても肺移植後 AMR の抑制に有効である可能性が示唆された。今後、得られた検体に対しサイトカイン測定などの各種解析を追加する予定である。

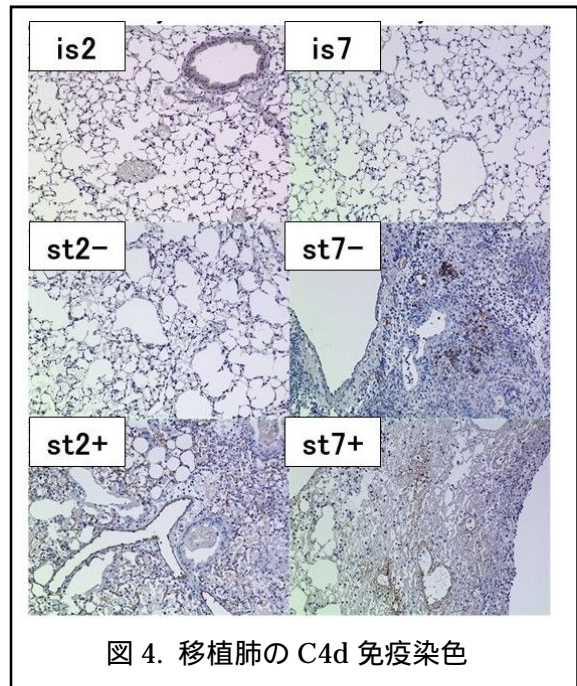


図 4. 移植肺の C4d 免疫染色

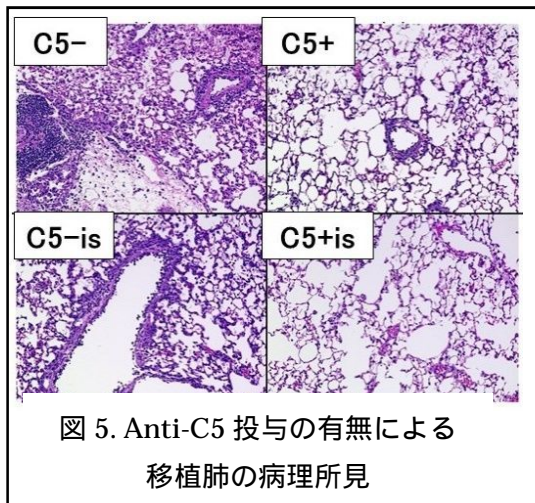


図 5. Anti-C5 投与の有無による移植肺の病理所見

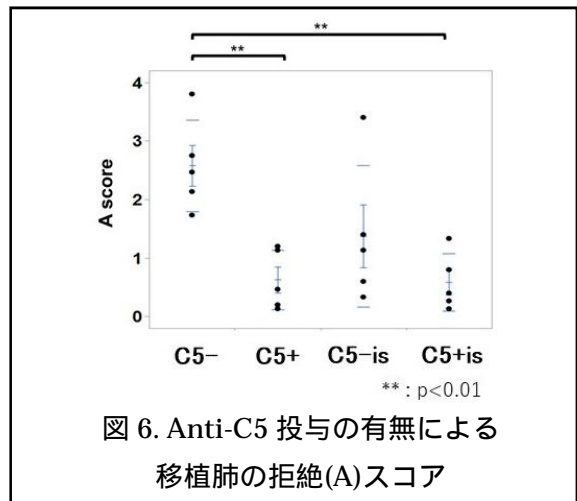


図 6. Anti-C5 投与の有無による移植肺の拒絶(A)スコア

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名	Yuki Shiina, Hidemi Suzuki, Takahiro Yamanaka, Jotaro Yusa, Jun Naito, Takahiro Ochi, Taisuke Kaiho, Kota Ohashi, Yuki Sata, Atsushi Hata, Takahide Toyoda, Takayoshi Yamamoto, Junichi Morimoto, Yuichi Sakairi, Hironobu Wada, Takahiro Nakajima, Ichiro Yoshino
2. 発表標題	Development of novel murine antibody mediated rejection model after orthotopic lung transplant.
3. 学会等名	The International Society for Heart and Lung Transplantation 2019 Annual Meeting and Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	椎名裕樹, 鈴木秀海, 山中崇寛, 由佐城太郎, 内藤潤, 越智敬大, 伊藤祐輝, 海竇大輔, 大橋康太, 佐田諭己, 畑 敦, 豊田行英, 山本高義, 森本淳一, 坂入祐一, 和田啓伸, 中島崇裕, 吉野一郎
2. 発表標題	肺移植後抗体関連型拒絶反応に対するAnti-C5抗体の予防効果
3. 学会等名	第36回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	椎名裕樹, 鈴木秀海, 山中崇寛, 由佐城太郎, 内藤潤, 越智敬大, 海竇大輔, 大橋康太, 佐田諭己, 畑 敦, 豊田行英, 山本高義, 森本淳一, 坂入祐一, 和田啓伸, 中島崇裕, 吉野一郎
2. 発表標題	移植肺に対する抗体関連型拒絶反応の機序解明に向けてのマウスモデルの確立
3. 学会等名	第119回日本外科学会定期学術集会
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
研究協力者	鈴木 秀海  (Suzuki Hidemi)	千葉大学医学部医学研究院・呼吸器病態外科学	

## 6. 研究組織 (つづき)

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	畑 敦  (Hata Atsushi)	千葉大学医学部医学研究院・呼吸器病態外科学	
研究協力者	海竇 大輔  (Kaiho Taisuke)	千葉大学医学部医学研究院・呼吸器病態外科学	
研究協力者	本橋 新一郎  (Motohashi Shinichiro)	千葉大学医学部医学研究院・免疫細胞医学	
研究協力者	吉野 一郎  (Yoshino Ichiro)	千葉大学医学部医学研究院・呼吸器病態外科学	