

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591612

研究課題名（和文） V 型コラーゲンによる制御性 T 細胞の誘導と免疫抑制剤併用による免疫抑制療法の確立

研究課題名（英文） Establishment of Immunosuppressive Therapy by Regulatory T cells Induced Type V Collagen with Immunosuppressive Medication

研究代表者

吉田 成利 (YOSHIDA SHIGETOSHI)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90334200

研究成果の概要（和文）：MHC 完全ミスマッチラット肺移植において経口 V 型コラーゲン [col(V)]+低用量サイクロスポリン（CsA）投与で拒絶反応が抑制された。レシピエント T 細胞のアロ抗原誘導性 IFN- $\gamma$  と IL-17A の産生抑制、IL-10 産生促進、傍気管血管周囲領域に調節性 T 細胞が誘導されていた。低用量 CsA を介する免疫抑制作用は col(V)により増強され、col(V) 経口投与が臨床肺移植に応用できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Oral administration of type V collagen [col(V)] plus low-dose cyclosporine (CsA) was abrogates rejection of fully MHC incompatible rat lung allograft. Col(V) plus CsA was down-regulated alloantigen-induced production of IFN-gamma and IL-17A and associated with alloantigen-induced expression of IL-10 in recipient T cells. These data demonstrate that col(V) enhances low-dose CsA-mediated immune suppression, and suggest a role for oral col(V) in immune modulation in lung transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：呼吸器外科学、移植・再生医療、外科、免疫学、細胞・組織

### 1. 研究開始当初の背景

肺移植の急性拒絶反応時にはcol(V)に特異的なanti-col(V) lymphocytesが虚血再灌流傷害 (IRI) にて暴露された気管支周囲・血管周囲のcol(V)に集簇することにより拒絶反応を促進すること、これら特異的T細胞を抑制するTregsがcol(V)の経口投与により誘導され、免疫寛容状態に至り拒絶反応を抑制することをこれまでに解明してきた。

近年、自己免疫疾患の発症の抑制に重要な役割を果たすと考えられる制御性T細胞 (Tregs) が注目され、移植免疫寛容の導入、維持において重要であることが明らかになってきている。Tregsの導入には様々な方法がなされているが、col(V)による経口寛容は生体に与える影響がないという特性があり、近い将来臨床応用できることが期待される。しかしながら、50種類以上の細胞から構成されている肺は他臓器より移植後の拒絶反応が強いことが明らかにされており、免疫抑制剤の投与量も他の臓器移植と比較して多めに設定されている。このような免疫抑制剤による非特異的免疫抑制の環境下で、外界に接する臓器である移植肺は他の臓器移植に比して感染症に罹患する危険にさらされ、また免疫抑制剤そのものによる副作用も大きな弊害となっている。肺移植患者に対して免疫抑制剤を投与しなくても免疫が抑制され拒絶が起らない状態、即ち免疫寛容を誘導・成立させることがサイクロスポリン (CsA) を主とする免疫抑制剤使用の中止あるいは減量に結びつくものと考えられる。その結果、肺移植患者に対して QOL の向上のみならず予後を改善することが期待できると考えられる。

### 2. 研究の目的

これまでの研究で用いたラット肺移植モデルは F344[RT1<sup>l</sup>] → WKY[RT1<sup>h</sup>] の近交系モデルであり、ヒトの肺移植経過に類似したものとして用いた incomplete MHC mismatch model であった。しかし、complete MHC mismatch のラット肺移植モデルを用いた col(V) の経口投与による Tregs の誘導・増殖、および誘導された Tregs と免疫抑制剤との併用療法についての研究報告例はない。本研究では、col(V) により誘導された Tregs の免疫寛容機序の解明に基き、Tregs の活性化および増殖の誘導、CsA を主とする免疫抑制剤との併用療法の臨床への応用の可能性を目的と

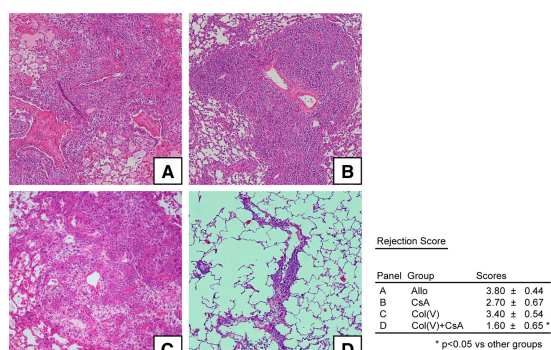
した。

### 3. 研究の方法

BN から WKY への左肺移植モデルを作成し、次の4群に分けて検討を行った。

①Col(V)群: Col(V)を術前経口投与 (10 $\mu$ g $\times$ 8回) を施行、②CsA 群: 低用量 CsA を術後投与 (5mg/kg $\times$ 3回) を施行、③Col(V)+CsA 群: Col(V)経口投与 (術前 10 $\mu$ g $\times$ 8回) と低用量 CsA 投与 (5mg/kg $\times$ 3回) を施行、④Allo 群: 追加療法を施行しない。

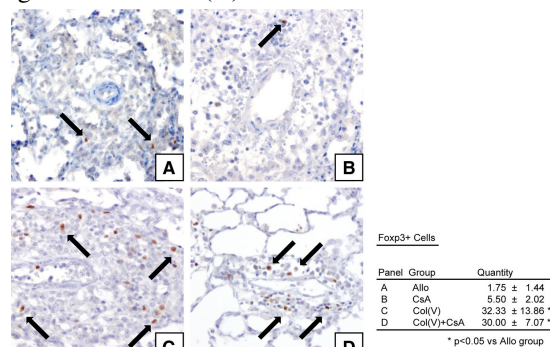
肺移植後7日目に犠牲死させ、病理学的評価を施行。縦隔リンパ節 (MLNs)・脾臓より T細胞を分離し、また気管支肺胞洗浄液 (BALF) より肺胞マクロファージ (AM) を



分離し、リンパ球混合培養反応 (MLR) を施行した。ELISPOT 法、ELISA 法にてサイトカイン産生能を評価し、BALF のマクロファージ遊走能を解析した。

### 4. 研究成果

急性拒絶反応の病理スコア (拒絶反応 grade) では Col(V)+CsA 群が他群と比べ有意



に低い値を示した (上図: 発表論文⑤, Figure 1 引用)。Foxp3 による免疫組織化学染色においては Col(V)+CsA 群で気管支・血管周囲に FoxP3+ Tregs 陽性細胞が認められた (下図: 発表論文⑤, Figure 3 引用) が、FACS では

MLNs・脾臓 T 細胞中の Foxp3 発現は顕著ではなかった。

サイトカイン分析においては、Col(V)+CsA 群で IFN- $\gamma$  が抑制され、IL-10 の産生が促進された。各々の実験群由来の AM と naïve WKY の T 細胞を用いた MLR では、Col(V)+CsA 群で IL-10 の顕著な産生が見られた。また BALF によるマクロファージ遊走能、BALF 中 MCP-1 の産生は Col(V)+CsA 群で抑制された。Col(V)と低用量 CsA の複合投与は肺移植の急性拒絶反応に対して強い免疫抑制効果を与えた。その機序としては Col(V)の経口寛容により誘導された IL-10 の産生が重要であると考えられた。

これらの結果より、臨床肺移植においても術前の Col(V)投与による CsA の減量効果が期待できると示唆された。

#### 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 5 件)

- ① Yamada Y, Sekine Y, Yoshida S, Yasufuku K, Petrache I, Benson HL, Brand DD, Yoshino I, Wilkes DS. Type V collagen-induced oral tolerance plus low dose cyclosporine prevents rejection of MHC class I and II incompatible lung allografts. *Journal of Immunology*, 査読有, Vol 183, 2009, 237-245.
- ② Iwata T, Chiyo M, Yoshida S, Smith GN Jr., Mickler EA, Presson R Jr., Fisher AJ, Brand DD, Cummings OW, Wilkes DS. Lung transplant ischemia reperfusion injury: Metalloprotease inhibition down-regulates exposure of type V collagen, growth-related oncogene-induced neutrophil chemotaxis, and tumor necrosis factor-[alpha] expression. *Transplantation*, 査読有, Vol 85, 2008, 417-426.
- ③ Chiyo M, Iwata T, Webb TJ, Vasko MR, Thompson EL, Heidler KM, Cummings OW, Yoshida S, Fujisawa T, Brand DD, Wilkes DS. Silencing S1P1 receptors regulates collagen-V reactive lymphocyte-mediated immunobiology in the transplanted lung. *American Journal of Transplantation*, 査読有, Vol 8, 2008, 537-546.
- ④ Burlingham WJ, Love RB, Jankowska-Gan E, Haynes LD, Xu Q, Bobadilla JL, Meyer KC, Haynes MS, Braun RK, Greenspan DS, Gopalakrishnan B, Cai J, Brand DD, Yoshida S, Cummings OW, Wilkes DS. IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants. *Journal of Clinical Investigation*, 査読有,

Vol 117, 2007, 3498-3506.

- ⑤ Yoshida S, Iwata T, Chiyo M, Smith GN, Foresman B, Mickler E, Heidler KM, Cummings OW, Fujisawa T, Brand DD, Baker A, Wilkes DS. Metalloproteinase inhibition has differential effects on alloimmunity, autoimmunity, and histopathology in the transplanted lung. *Transplantation*, 査読有, Vol 83, 2007, 799-808.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 山田義人、他. V 型コラーゲンの経口投与による急性拒絶反応抑制—IL-10 及び調節性 T 細胞からの検討—. 2010.1.30, 第 26 回日本肺および心肺移植研究会, 大阪
- ② 山田義人、他. V 型コラーゲン+低用量サイクロスポリンによる MHC 完全マッチ間ラット肺移植の急性拒絶反応に対する抑制効果. 2009.10.13, 第 62 回日本胸部外科学会的学術集会, 横浜.
- ③ 山田義人、他. V 型コラーゲンによる免疫寛容と低用量サイクロスポリンによる肺移植拒絶反応に対する抑制効果. 2009.9.17, 第 45 回日本移植学会総会, 東京.
- ④ Yamada Y, et al. Oral type V collagen enhanced low dose cyclosporine-induced immunosuppression in lung transplantation. *American Thoracic Society* 2009.5.17, San Diego.
- ⑤ 岩田剛和、他. Primary graft dysfunction における V 型コラーゲン液性免疫の関与. 第 44 回日本移植学会総会. 2008.9.21, 大阪.
- ⑥ 大場太郎、他. ラット肺切除モデルにおける代償性肺再生機序に関する研究. 第 108 回日本外科学会総会. 2008.5.15, 長崎.
- ⑦ 鈴木秀海、他. ラット肺移植モデルにおける液性免疫—C4d—による拒絶反応の評価. 第 1163 回千葉医学会. 2008.1.12, 千葉.
- ⑧ 吉田成利、他. ラット肺移植モデルにおける抗 ICAM-1 抗体の効果. 第 1163 回千葉医学会. 2008.1.12, 千葉.
- ⑨ 鈴木秀海、他. ラット肺移植モデルにおける拒絶反応と C4d 沈着との関連性. 第 24 回日本肺および心肺移植研究会. 2008.1.26, 福岡.
- ⑩ 岩田剛和、他. 肺虚血再還流傷害による V 型コラーゲンの表出と Chemically Modified Tetracycline (COL-3)による抑制効果について. 第 43 回日本移植学会総会. 2007.10.24, 仙台
- ⑪ 千代雅子、他. Silencing sphingosine-1-phosphate receptor-1 on type V collagen-reactive lymphocytes prevents rejection

pathology in lung transplantation. 第43回  
日本移植学会総会. 2007.10.24, 仙台

⑫ 吉田成利、他. ラットMHC完全ミスマッチモデルにおけるV型コラーゲン経口投与および少量サイクロスポリン投与による免疫抑制効果. 第43回日本移植学会総会. 2007.10.24, 仙台

⑬ Yamada Y, et al. The Immunosuppressive effect of type V collagen and low dose administration of cyclosporine in rat lung transplantation. American Thoracic Society 2007.5.21, San Francisco

[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

吉田 成利 (YOSHIDA SHIGETOSHI)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 90334200

### (2) 研究分担者

吉野 一郎 (YOSHINO ICHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 40281547

### (3) 研究分担者

和田 啓伸 (WADA HIRONOBU)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 90514604

### (4) 連携研究者

関根 康雄 (SEKINE YASUO)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 70312957

### (5) 連携研究者

安福 和弘 (YASUFUKU KAZUHIRO)

Division of Thoracic surgery, Toronto General

Hospital, University Health Network, Toronto,

Canada, Assistant Professor

研究者番号: 60372356

### (6) 連携研究者

鈴木 秀海 (SUZUKI HIDEMI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号: 6042226