

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03748

研究課題名(和文) 自然・獲得免疫系を繋ぐ肺胞マクロファージの機序解明による同種・異種肺移植成績向上

研究課題名(英文) To improve the outcome of allogeneic and xenogeneic lung transplantation by elucidating the mechanisms of alveolar macrophages that link the innate and acquired immune systems.

研究代表者

佐原 寿史 (SAHARA, Hisashi)

鹿児島大学・総合科学域共同学系・准教授

研究者番号：90452333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：肺は外界と直面する臓器であるという特異性を持つため、自然免疫系の亢進と獲得免疫系の活性化の双方に重要な役割を果たす肺胞マクロファージを始めとするマクロファージの動態解析は、移植肺の拒絶制御や免疫寛容誘導、更には異種肺移植成績の向上につながりうる。本研究での虚血再灌流障害や肺移植モデルを用いたマクロファージの動態解析からは、肺胞マクロファージのみを主体とする新規治療開発には至らなかったものの、拒絶抑制標的としてのヘムオキシゲナーゼ-1の可能性、さらに異種移植におけるマクロファージの制御をはかる遺伝子改変および骨髄移植の併用によって、異種肺移植の成績向上が得られることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺移植の効果は広く認知されるが、ドナー不足は極めて深刻である。また移植後の永続的な複数の免疫抑制剤服用による副作用の惹起や慢性期の移植臓器機能不全のため、肺移植の長期予後は必ずしも改善していない。これらの問題を解決するため、ブタ臓器を用いる異種移植の実現や免疫寛容誘導は、移植医療の更なる発展に際し必須の課題である。しかし免疫性の強い肺では免疫寛容の誘導は困難とされ、また異種肺移植の成績は他の臓器よりも極めて悪いのが現状であった。今回の研究を通じて得られた、肺移植の成績向上、さらには異種肺移植の成績改善におけるマクロファージの重要性という点は、移植医療の課題克服に直結する高い社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：Because of the uniqueness of the lung as an organ facing the outside, the analysis of the dynamics of macrophages including alveolar macrophages, which play important roles in both the enhancement of the innate immune system and the activation of the acquired immune system, may lead to the control of lung rejection, the induction of immune tolerance, and the improvement of the outcome of pulmonary xenotransplantation. Although the analysis of macrophage dynamics using ischemia-reperfusion injury and lung transplantation models in this study did not lead to the development of new therapies focused exclusively on alveolar macrophages, the potential of heme oxygenase-1 as a target for rejection inhibition, as well as the potential of genetic modification to regulate macrophages in xenografts and bone marrow transplantation in xenotransplantation, may improve the outcome of pulmonary xeno transplantation.

研究分野：移植・再生医療

キーワード：移植・再生 虚血再灌流障害 異種移植 肺移植 ミニブタ マクロファージ 肺胞マクロファージ 骨髄移植

1. 研究開始当初の背景

(1) 重篤な臓器不全に対する肺移植の効果は広く認知されるが、ドナー不足は極めて深刻である。また移植後の永続的な複数の免疫抑制剤服用による副作用の惹起、更に免疫抑制剤長期服用にも関わらず生ずる慢性期の移植臓器機能不全のため、肺移植の長期予後は必ずしも改善していない。これらの問題を解決するために、異種(遺伝子改変医用ブタ)臓器を用いた異種移植を含め、ドナー適応拡大によるドナー不足の解消、永続的な免疫抑制剤を必要としない免疫寛容誘導戦略の確立は、移植医療の更なる発展に際し必須の課題である。

(2) しかし自然免疫系、あるいは獲得免疫系相互の働きによって強い拒絶反応を惹起しうる肺移植において、免疫寛容の誘導は困難とされてきた(Jiang X. *J Clin Invest* 2014)。またドナーとなるブタの遺伝子改変技術の進歩によって、異所性心臓移植で900日以上、腎臓移植で6か月以上の長期生着が得られているなか、異種肺移植の生着期間は後述の自験例のように最長10日留まっていた(Sahara H. *Curr Opin Organ Transplant* 2017, Watanabe H, Sahara H. *Xenotransplantation* 2018)。これらの点は「外界と直面する肺には豊富な免疫担当細胞が存在し、自然免疫系の亢進と獲得免疫系の活性化により拒絶反応が増強され、血管内皮や肺胞上皮を始め多数の細胞から複雑に構成される肺胞の障害は容易に機能不全に直結する」という肺の免疫・解剖学的特異性を念頭に、免疫寛容誘導あるいは異種移植研究を推進する必要があることを意味する。

(3) 我々はこれまでに、血管内皮保護や抗炎症効果を示す一酸化炭素(Carbon monoxide: CO)に注目した継続的なミニブタ同種肺移植実験から、「ドナーに対する一過性のCO吸入が、長期的な拒絶反応抑制効果を導くこと」を明らかにした(Sahara H. *JTCVS* 2010, Sahara H. *Transplantation* 2010)。同時に短期のCO吸入によって「ドナー肺で長期的に拒絶制御や免疫寛容誘導性を果たしうる対象」の同定が課題として浮かび上がってきた。一方で申請者は、COに着目した同種移植実験を、異種間超急性拒絶反応の標的抗原であるGal抗原を発現しないように遺伝子がノックアウトされた、1,3-galactosyltransferase gene-knockout (GalTKO)ブタを用いたブタ・霊長類間異種肺移植実験に展開した結果、CO吸入によって移植肺でのマクロファージ浸潤の軽減が、炎症性サイトカイン産生抑制や組織学的拒絶の軽減効果を導くことを明らかにした(Sahara H. *Xenotransplantation* 2018)。さらに、「異種移植肺への早期のマクロファージ浸潤は、ブタCD47と霊長類間SIRP不適合に起因するマクロファージの異常機能亢進が原因となる」という着想のもと、ヒトCD47遺伝子を導入したGalTKOブタの肺をヒヒに移植した結果、ブタ肺胞組織でヒトCD47発現を認める症例では、異種移植肺の生着が延長することが明らかとなった(Watanabe H, Sahara H. *Xenotransplantation* 2018)。これらの結果をもとに、申請者は、外界と直面する肺の特異性にに基づき、肺に豊富に存在する免疫担当細胞であり、かつ自然免疫系の亢進と獲得免疫系の活性化の双方に重要な役割を果たすマクロファージ、特にドナー由来肺胞マクロファージの役割を解明することが移植肺の拒絶制御、更には免疫寛容誘導や異種肺移植成績の向上につながるのではないかと「問い」至った。

2. 研究の目的

近年、臓器特異的な組織なマクロファージがどのように維持されるのか、その機構の存在が徐々に解明されてきた(Davies LC. *Nat Immunol* 2013)。臨床検体を用いた検討から、移植後長期を経た移植肺に存在する肺胞マクロファージの大多数が、自己増殖したドナー由来のものであり、急性期のみならず、慢性期においてもドナー由来の肺胞マクロファージが拒絶反応に重要であることを示唆する報告がなされている(Eguíluz-Gracia I. *Thorax* 2016, Nayak DK. *Am J Transplant* 2016)。マクロファージは環境により炎症促進に働くM1型や、炎症抑制と組織修復に働くM2型に変化しうることから、「長期にわたり維持されるドナー由来の肺胞マクロファージがレシピエント内でドナー臓器の免疫原性変化(拒絶から免疫動誘誘導)に直接関与するのではないかと」という着想に至った。しかし移植肺の肺胞マクロファージについては、臨床検体を用いたretrospectiveな検討や、小動物での短期評価に関する報告が殆どである。臨床知見に基づく仮説から機序を探索するには、臨床症例のみでは遺伝背景である主要組織適合性抗原(Major histocompatibility complex: MHC)が異なること、限定される症例数と検体採取のため明確な解析は困難であることを踏まえ、臨床医療への応用を前提とする前臨床実験として、MHC確立ミニブタを用いた同種および異種肺移植実験によって、1)肺胞マクロファージの移植肺内での動態を明らかにし、虚血再灌流障害から拒絶反応発症・抑制における肺胞マクロファージの役割を解明する、2)肺胞マクロファージに着目することによって、免疫寛容誘導を含めた新たな同種移植拒絶戦略が確立しうるかという点の評価を行ったうえで、3)肺胞マクロファージが異種肺移植生着延長のための新たな標的因子となるかを本実験の最終目的として、種々の実験を立案した。

3. 研究の方法

(1) 移植肺における肺胞マクロファージの長期動態評価および術後虚血再灌流障害や拒絶反応進行/抑制に果たす役割の解明

MHC 確立クラウン系ミニブタを用いた肺実験モデルを用いて、肺胞マクロファージを主体とするマクロファージの長期動態を経時的に評価し、その役割の解明をはかる。

術後虚血再灌流障害を評価するモデルとして、クラウン系ミニブタを用い、左肺動静脈と主気管支を遮断（気管支は切開し肺は虚脱）し 120 分温虚血を誘導後、再灌流するモデルを用いる。また拒絶反応の進行や抑制を評価するモデルとして、クラウン系 C1 をドナーとし、C2 をレシピエントとする肺移植を行い（MHC が完全不適合である組み合わせ）、術後経時的な評価を行う。免疫抑制療法は 12 日間の持続タクロリムス投与を用いる。

肺機能評価として、左肺静脈採血で虚血肺の酸素化を評価する（再灌流 2 時間、2 日後）。移植後の肺障害（虚血再灌流障害、拒絶反応の進行など）については、経時的胸部 X 線や肺生検検体を H&E、Masson Trichrome、Elastica-Masson、TUNEL 染色等で評価する。また炎症性サイトカイン（IL-1 /IL-6/TNF- /HMGB1）や抗炎症サイトカイン（IL-10/TGF- ） 酸化ストレス（MDA assay）などを評価する。さらに生検で得られた組織をもとに、CD3/CD4/CD8 細胞などの細胞浸潤、マクロファージ（CD68/あるいは制御性 M2 型マクロファージとして CD163 を染色）などの解析を行う。

(2) 肺胞マクロファージの気道内投与による拒絶反応制御・免疫寛容誘導の可能性評価

肺胞マクロファージを標的とする治療の有効性が示唆される結果が得られた場合は、MHC 不適合移植の際に、ドナー肺へレシピエントの肺胞マクロファージを経気道的に投与することで虚血再灌流障害や拒絶進行を抑制しうるかを評価する。術前にドナー肺に存在する肺胞マクロファージを Clodronate Liposome を経気道内に投与して除去した後、レシピエントの肺胞マクロファージを移植の際に摘出する左肺から回収し、これを経気道的にグラフト肺に投与することによって、その効果を評価する。

(3) 異種肺移植における肺胞マクロファージの役割解明と異種肺移植成績向上への挑戦

遺伝子改変ブタにより、ブタとヒトとの生理学的・免疫学的不適合が是正されるが、これのみでは異種肺移植の長期生着は得られず、自然免疫をも含めた異種間免疫制御として、マクロファージに着目した自然・獲得免疫系の制御が異種移植成績向上につながるかを評価する。ブタ・霊長類間で持続的キメラ形成を可能とする、独自開発の骨内骨髄移植（Intra-Bone Bone Marrow Transplantation 法: IBBMTx）を用い、IBBMTx 後にマクロファージにキメラが誘導され、成績向上につながるかを評価し、異種肺移植成績向上の新たな治療標的因子となるかを明らかにする。具体的には肺移植術前 60 日前に、肺移植ドナーと同じ MHC 型であり、ヒト CD47 遺伝子が導入され、また異種移植の投球性拒絶反応の標的である異種抗原 Gal 抗原をノックアウトしたブタ（hCD47/GalTKO ブタ）を犠牲死させ全椎体から骨髄を採取し、肺移植レシピエントの脛骨粗面に骨髄内注射により移植する。骨髄移植後は経時的な骨髄生検によるキメラ評価を行い、このドナー肺をレシピエント霊長類に対し左肺移植を行う。肺移植術前には抗胸腺細胞グロブリンによる T 細胞除去と、リツキシマブ Rituximab による B 細胞除去等を行い、タクロリムス、ミコフェノール酸モフェチル、抗 CD40 抗体を主体とする免疫抑制療法を用い、前項と同様に移植肺の評価や病理学的解析を実施する。

4. 研究成果

(1) 肺虚血再灌流障害の際のマクロファージの動態評価

虚血再灌流障害の際に、肺胞マクロファージを含めたマクロファージがどのような動態を示すかという点を明らかにするため、獲得免疫系の関与が乏しく、自然免疫系の関与を主として評価する実験系を用いて評価を行った。クラウン系ミニブタを用いて、90 分間の温虚血により惹起される虚血再灌流障害モデルを用い、再灌流 2 時間、2 日後、7、14、28 日後に、経時的な画像解析および開胸肺生検を実施し障害の病態を評価し、あわせて病理標本におけるマクロファージ、特に肺胞マクロファージがどのように変化するかについて評価を行った。このモデルで肺の虚血再灌流障害は、術後 2 日をピークに、7 日から 14 日で収束を迎えることが示されたが、この障害の程度と、肺内の浸潤マクロファージの数には、概ね相関関係が得られた。また表面マーカー染色によって、M1 型や M2 型のマクロファージのサブタイプの評価、あるいは肺胞内のマクロファージの解析を実施したところ、今回の障害モデルでは、多くが M1 型のマクロファージを示した。肺胞内のマクロファージも多くは M1 型であったものの、移植モデルを想定した際に、このマクロファージがドナー由来（肺に特異的な組織常在性のマクロファージ）であるのか、あるいはレシピエント由来（骨髄等に由来する循環マクロファージ）であるのかという点の評価は、今回の虚血再灌流障害モデルからは困難であり、移植モデルによる展開が期待される結果となった。

(2) 肺移植モデルにおけるマクロファージの動態評価

本研究の着眼点となった、ドナー肺で長期的に拒絶制御や免疫寛容誘導性を果たしうる対象としてどのような構成成分が重要であるかを同定するため、これまで MHC 確立クラウン系ミニブタを用いた MHC 不適合間肺移植モデルを用いて、特に肺胞マクロファージを含めたマクロファージの動態評価を主体として、免疫染色を主体とする詳細な病理学的解析を行った。この結果、拒絶反応が制御された症例においては、早期からドナー肺内でのマクロファージの浸潤が軽度であったものの、CD68 (M1 型マクロファージ) / CD163 (M2 型マクロファージ) 陽性マクロファージの比率をもとにサブタイプの同定を行ったところ、今回の検討では拒絶反応制御と M2 型マクロファージの割合増加という点に関して相関関係は認めず、これは肺胞内のマクロファージを中心に評価を行っても同様の結果であった。一方、ドナー肺でのヘムオキシゲナーゼ-1 (Hemoxygenase-1: HO-1) の発現増強と、拒絶反応の抑制には相関関係を認めた。HO-1 がどの細胞に発現することが重要であるかについては更に検討が必要であるものの、ドナー肺に HO-1 を発現しうる治療法の開発を示唆する所見が得られた。なお当初は肺胞マクロファージの気道内投与による免疫寛容誘導性の評価を検討していたものの、これらの結果のように、肺虚血再灌流障害や肺移植モデルの進展における肺胞マクロファージのみを標的とする十分な根拠が得られなかったことから、肺胞マクロファージの気道投与実験は実施せず、本研究で最も挑戦的な課題である異種肺移植の拒絶抑制におけるマクロファージの役割解明に焦点をあてた、次項の検討課題を中心とし評価を行った。

(3) 異種肺移植におけるマクロファージの役割解明と拒絶反応抑制への関与

マクロファージの制御により肺移植の成績向上をはかる実験として、ブタ CD47 と霊長類間 SIRP 不適合に起因する、霊長類マクロファージの異常機能亢進を制御する目的で、ヒト CD47 をブタに遺伝子導入 (+GalT-KO、補体活性制御因子導入) した動物を用い、骨髄移植による免疫寛容誘導戦略を併用することにより、異種肺移植の成績延長を試みる実験を実施した。骨髄移植の方法としては、従来の方法よりも高いキメラ形成率が得られる独自開発の骨内骨髄移植法 (intra-bone bone marrow transplantation: IBBM 法) を用いた。この結果、ヒト CD47 を導入したブタ由来の骨髄を移植した全ての個体は、従来の結果では 21 日でキメラが消失するのとは異なり、30 日以上にわたりマクロキメリズムを維持し (2 匹は 8 週間以上キメリズムを維持) することが明らかになり、またキメラ維持とヒトの抗ブタ抗体レベルが経時的に低下し、抗ブタ細胞に対し無反応性が生じた。骨髄移植ドナーにマッチしたブタの肺を骨髄移植約 1 か月後に移植ところ、2 週間まで生存期間が延長した。一方 hCD47 陰性のブタ肺の移植では生存期間は最大 4 日以内にとどまった。このように、マクロファージを制御することにより、異種肺移植の成績向上が得られることが明らかとなったが、依然としてその成績は他の移植より大きく劣ることから、グラフト内の免疫応答を司る新たな病変進展/制御/治療標的因子の探索は必須であると考えている。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Watanabe H, Ariyoshi Y, Pomposelli T, Takeuchi K, Ekanayake-Alper DK, Boyd LK, Arn SJ, Hawley RJ, Sahara H, Shimizu A, Ayares D, Lorber MI, Sykes M, Sachs DH, Yamada K	4. 巻 27
2. 論文標題 Intra-bone bone marrow transplantation from hCD47 transgenic pigs to baboons prolongs chimerism to >60 days and promotes increased porcine lung transplant survival.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Xenotransplantation	6. 最初と最後の頁 e12552
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/xen.12552	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

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐原寿史, 岩永健裕, 市成ゆりか, 関島光裕, 竹内和博, 清水 章
2. 発表標題 シンポジウム「実用化を目指した移植・再生医療研究」「ブタを用いた移植研究の現状と課題」
3. 学会等名 第8回日本先進医工学ブタ研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐原寿史
2. 発表標題 異種移植医療の最前線
3. 学会等名 第8回日本医療研究開発機構レギュラトリーサイエンス公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐原寿史, 関島光裕, 岩永健裕, 市成ゆりか, 清水章
2. 発表標題 パネルディスカッション 2 「肺移植における予後改善に向けての取組」「異種肺移植の成績向上を目指した前臨床実験の展望」
3. 学会等名 第38回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐原寿史, 関島光裕, 岩永健裕, 市成ゆりか, 渡邊洋之助, 清水章
2. 発表標題 分野別シンポジウム9「肺移植におけるドナー不足にどう取組むか」「ドナー臓器不足克服のための異種肺移植研究の現状と課題」
3. 学会等名 第57回日本移植学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐原寿史
2. 発表標題 前臨床異種肺移植研究の現状と課題
3. 学会等名 第22回日本異種移植研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>鹿児島大学先端科学研究推進センター/生命科学動物実験ユニット/大動物研究推進部門のホームページ http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~xenotx/index.html</p>

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	清水 章 (Shimizu Akira) (00256942)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	

6. 研究組織（つづき）

	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	関島 光裕 (Sekijima Mitsuhiro) (20568589)	鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研究センター・特任助教 (17701)	
研究分担者	山田 和彦 (Yamada Kazuhiko) (40241103)	鹿児島大学・総合科学域総合研究学系・教授 (17701)	削除：2019年9月17日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関