

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390386

研究課題名（和文）：肺移植免疫寛容の導入を目指す前臨床研究

研究課題名（英文）：Preclinical study for tolerance induction in lung transplantation

研究代表者

庄司 剛 (SHOJI TSUYOSHI)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第1研究部・研究員

研究者番号：80402840

研究成果の概要（和文）：

肺移植前臨床研究モデルとしてのミニブタを用いた実験において、急性拒絶モデルで、術前に採取したレシピエントリンパ球からCD4⁺CD25⁺ Cells を分離、これをドナーアロ抗原で刺激してCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Regulatory T Cells を作成培養、肺移植術後10日目にレシピエントに経静脈的注入することで、移植肺グラフトの生存期間が延長を示した。

研究成果の概要（英文）：

In the study of lung allograft using miniature swine as preclinical model, an adoptive transfer of *ex vivo* donor alloantigen-stimulated CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs combined with low dose tacrolimus ameliorates rejection of immunogenic lung transplantation and prolonged lung allograft survival in clinically relevant miniature swine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

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

1. 研究開始当初の背景

臨床肺移植は従来の治療に反応しない重症慢性進行性肺疾患の治療法として確立しており、現在世界中で年間1500例以上の肺移植が実施され、本邦でも1998年の生体肺葉移植実施以来、症例数を重ねてきた。しかし、手術手技・免疫抑制剤・術後管理技術の進歩した現在においても、肺移植後の5年生存率は約50%と、肝・腎・心など他の臓器に比べ不良である。肺移植後慢性拒絶病変は術後遠隔期（術後1年以上）の死因の第1位をしめており（Trulock EP. *J Heart Lung Transplant.* 26(8):782-95, 2007）、術後成績の向上には慢性拒絶病変の克服が必須条件であるが、その成因や病態制御のメカニズムは未だ解明されていない。また、肺移植臨床においては拒絶予防のため免疫抑制剤の一生涯の投与を必要とし、その副作用として発生する感染症・悪性腫瘍などの合併症は、術後生存率を低下させる大きな要因の一つとなっている。これらの現状を克服するため、半永久的な免疫抑制療法を不要とする長期移植臓器の生着、すなわち「免疫寛容」の確立は、肺移植においての術後成績を向上する上で大きな課題であり肺移植臨床の発展に大きく寄与する。免疫寛容研究は制御性T細胞の免疫寛容への関与が示されて以来、小動物モデルにおいて寛容が誘導されるなど国内外でその研究成果は著しいが、臨床に直結する前臨床研究である大動物実験での知見は特に本邦では極めて少ない。さらに肺移植領域での免疫寛容研究は、他臓器に比して大きく立ち遅れており、研究推進が急務である。さらに、最近、移植後慢性拒絶病変の発生には、レシピエントリンパ球による間接認識（ドナー抗原情報をレシピエント抗原提示細胞経由でレシピエントリンパ球が認識する）が重要な役割を果たしているという基礎実験結果が報告され、その重要性が

注目されているにもかかわらず、間接認識経路と肺移植後拒絶病変との関連性を検討した動物実験はきわめて少ない。また、臨床現場において、肺移植後拒絶反応の診断は、肺という臓器の特性上、生検による病理組織診断の施行が非常に困難である。拒絶病変の確定診断のためには気管支鏡下に肺生検を行い、病理組織診断を行うべきであるが、生検そのものによる出血・感染等のリスクが他臓器に比べきわめて高く、実際にはX線診断・呼吸機能検査・臨床症状等を総合的に判断して拒絶の診断を行っているのが現状である。腎移植、肝移植においては、採血データ（クレアチニンや肝逸脱酵素など）が拒絶診断に有用であるばかりか、生検も比較的容易に施行可能であるが、肺移植では拒絶病変の信頼のおける非侵襲的パラメーターがなく、拒絶病変の早期パラメーターとなりうる検出法の確立が急務である。

2. 研究の目的

- (1) 肺移植後拒絶病変を克服する免疫寛容状態の導入
- (2) 拒絶病変における間接認識経路の関与と免疫寛容への応用
- (3) 拒絶病変の非侵襲的早期パラメーターの確立

3. 研究の方法

- (1) 短期間大量免疫抑制剤使用によるMHCフルミスマッチ肺移植免疫寛容導入を目指す。
- (2) その実験過程にて、免疫抑制剤の投与量・投与期間の調整をする上で得られる、術後拒絶病変を来たしたレシピエント内で起こるドナー抗原認識（直接・間接認識）の役割と、拒絶病変の相関を検討し、短期間大量免疫抑制剤使用とは別の方法での免疫寛容導入に応用する。

(3) 術前・術後において、新たな生理学的肺機能検査法である強制オシレーション法 (forced oscillation technique: FOT) での呼吸機能測定をIOS (Impulse Oscillation System) を使用して行い急性・慢性拒絶病変の病理像・X線所見と、in vitro assay データの経時的変化との相関を解析し、IOS の、肺移植後拒絶病変の早期非侵襲的パラメーターとしての可能性を検討する。

4. 研究成果

肺移植前臨床研究モデルとしてのミニブタを用いた肺移植実験において、急性拒絶モデル (左肺移植・術後タクロリムス7日間の短期間投与) で、術前に採取したレシピエントリンパ球からCD4⁺CD25⁺ Cells を分離、これをドナー抗原で刺激してCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Regulatory T Cells を作成培養、肺移植術後10日目にレシピエントに経静脈的注入することで、移植肺グラフトの生存期間が延長するか検討した。その結果、ドナー抗原で刺激されたレシピエントCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Regulatory T Cells 注入 (Adoptive Transfer: AT) 群のグラフト生存期間は51±13日で、非注入群の15±1日に比べ、肺グラフトの生存期間を有意に延長することが示され、AT群でのグラフト内FoxP3発現が有意に増加していた。さらに、100日以上長期生存を示したAT群レシピエントのグラフト肺はほとんどリンパ球浸潤のない病理組織像であり、急性拒絶モデルにて得られた上記結果は、本研究の目的であるミニブタ肺移植における免疫寛容の導入に非常に重要な知見であり、本手法を今後慢性拒絶モデルに用いることで、免疫寛容が導入できるか検討するために重要な結果と考えられる。上記結果を下記のごとく国内外の学会で発表し、結果をさらに解析して論文投稿準備中であ

る。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 庄司 剛、阪井宏彰、板東徹、伊達洋至ら 11 名. 肺移植における移植免疫研究～大動物実験から臨床応用へ～. 第 46 回日本移植学会総会. 2010 年 10 月 22 日 京都市.
- ② Koshiha T, Date Hら 11 名. Adoptive Transfer of Ex Vivo Donor Alloantigen-Stimulated CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Regulatory T Cells Ameliorates Rejection of Lung Transplantation between Fully Mismatched Miniature Swine. American Transplant Congress (米国移植学会). 2010 年 5 月 1 日、米国カリフォルニア州サンディエゴ.
- ③ Satoda N, Shoji T, Bando T, Date H ほか 10 名. Adoptive transfer of ex vivo donor alloantigen-stimulated CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells ameliorates rejection of Lung Transplantation between Fully Mismatched Miniature Swine. European Society for Organ Transplantation (欧州臓器移植学会) 2009. 2009 年 8 月 31 日、フランス、パリ.
- ④ Shoji Tら 11 名. Adoptive Transfer of Ex Vivo Donor Alloantigen-Stimulated CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Regulatory T Cells Ameliorates Rejection of Lung Transplantation between Fully Mismatched Miniature Swine. American Transplant Congress (米国移植学会), Late Breaking Oral Session. 2009 年 6 月 3 日、米国マサチューセッツ州ボストン.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庄司 剛 (SHOJI TSUYOSHI)
公益財団法人田附興風会・医学研究所
第1 研究部・研究員
研究者番号：80402840

(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

板東 徹 (BANDO TORU)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：20293945

阪井 宏彰 (SAKAI HIROAKI)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：50362489