

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08898

研究課題名(和文)肺移植後慢性拒絶におけるマクロファージの役割解明とFROUNT阻害による機能制御

研究課題名(英文)The role of macrophages in chronic rejection after lung transplantation and regulation of macrophage activities by FROUNT inhibition

研究代表者

佐藤 雅昭 (Sato, Masaaki)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：00623109

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)：抗アルコール薬であるDisulfiram (DSF) は、抗炎症作用があり、マクロファージの走化性活性を制御する機能があり、肺移植後の急性拒絶反応の抑制における DSF の有効性を研究した。ラットを用い軽微な組織適合性抗原不一致肺移植を施しDSFを7日間皮下投与したところ、対照群と比べ気管支周囲における急性拒絶反応の程度、CD68⁺、CD3⁺細胞の浸潤が軽減しCCL2 およびIL-6 mRNA の発現が低下した。DSFは、末梢気管支周囲のマクロファージ浸潤を軽減し、炎症誘発性サイトカインの発現を抑制することにより、肺移植後の急性拒絶反応を軽減する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗アルコール薬として使われているDisulfiram (DSF)はその安全性が確立している。その抗炎症作用が肺移植においても、マクロファージの組織浸潤を制御することで急性拒絶を抑制する可能性が示唆された。肺移植後の予後を左右する拒絶反応の制御において、従来の免疫抑制療法に追加する形で効果が期待できる安全かつ安価な新規介入方法として期待される。

研究成果の概要(英文)：Macrophages contribute to post-transplant lung rejection. Disulfiram (DSF), an anti-alcoholic drug, has an anti-inflammatory effect and regulates macrophage chemotactic activity. We investigated DSF efficacy in suppressing acute rejection post-lung transplantation. A rat lung transplant model with minor histocompatibility antigen-mismatch was used. DSF (0.75 mg/h) monotherapy or co-solvent only as control was subcutaneously administered for 7 days (n = 10/group) without other immunosuppression. Grades of bronchial acute rejection, infiltration of immune cells positive for CD68 and CD3 were reduced in the DSF group. The gene expression of chemokine ligand 2 and interleukin-6 were significantly lower in the DSF group. DSF can alleviate acute rejection post-lung transplantation by reducing macrophage accumulation around peripheral bronchi and suppressing pro-inflammatory cytokine expression.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺移植 急性拒絶 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

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。しかし肺移植後の長期生存率は他の固形臓器移植と比べ満足できるものではなく(5年生存率:6-70%),長期生存の最大の阻害要因は、慢性拒絶とよばれる移植後遠隔期の移植片機能不全である。研究代表である佐藤は肺移植後慢性拒絶には、従来言われていた閉塞性換気障害を来す気道中心の病態: bronchiolitis obliterans syndrome(BOS)だけでなく、末梢肺にも病変が及び拘束性障害を呈する予後不良な restrictive allograft syndrome (RAS)が存在することを提唱し(Sato M, et al. J Heart Lung Transplant 2011),当該分野の進歩に大きく貢献してきた。興味深いことに骨髄移植後の慢性肺GVHDにも、典型的なBOSとともにRAS様の病態があることが近年明らかとなっている。これまで我々はBOSおよびRASのラット肺移植モデルを確立し、これらのサブタイプの病態解明に尽力してきた(Takahagi A, et al. Transplantation 2020; Miyamoto E, et al. Transplantation 2017)。すなわち,RASでは複数の組織コンパートメントにおよぶ免疫反応(代表的なものは激しい拒絶反応)が主体であり,BOSでは、外界に曝された臓器である肺に特徴的な経気道的な刺激(代表的なものは経気道感染,誤嚥,大気汚染など)による気道中心の免疫反応が重要な役割を果たすと考えてきた(Sato M. AnnTransMed 2020)。これらの知見は臨床的には、免疫抑制剤のアドヒアランスの強化や危険因子の回避など,BOSとRASの予防に貢献し得ると考える。

しかし一旦慢性拒絶のプロセスが進み始めた場合には,BOS・RASともにその進行を食い止めるのは非常に困難である。すなわちBOSとRASに共通するメカニズムである慢性炎症から組織の線維化に至る過程のコントロールがカギになる。この common final pathway における key player として我々が着目するのが、組織局所での炎症と創傷治癒に重要な役割を果たすといわれているマクロファージである。実際、慢性拒絶に冒された移植肺組織には多数のマクロファージが浸潤しており、われわれのラット肺移植モデルでも再現されている(図1)。しかしこのマクロファージのBOS,RASの病態における役割の詳細はあまり検討されていない。拒絶反応等で惹起され遷延する慢性炎症とこれに伴う組織損傷には恐らく自己免疫疾患と類似したマクロファージの古典的(M1)活性化が関与していると思われる。一方,IL-10やIL-13などにより誘導される選択的(M2)活性化は宿主の免疫応答を抑制し,創傷治癒とならんで組織リモデリングを促進する。近年M2マクロファージについてはM2a,M2bなどさらに細分化され,様々な疾病への関与が明らかとなってきているが肺移植後の慢性拒絶においても大量に存在するマクロファージが,どのように活性化し,どのような役割を担うか非常に興味深く,また治療ターゲットとしても魅力的である。

研究分担者である東京理科大学の寺島は,ケモカイン受容体CCR2,CCR5に会合してマクロファージの遊走シグナル伝達機構を調節し,その遊走と活性化を担う重要な分子であるFROUNTを同定し(Terashima Y, et al. Nature Immunol 2005; 図2)CCR2とCCR5に共通してその細胞内領域に結合し,ケモカイン刺激依存的なPI3KおよびG蛋白であるRacの活性化を促進的に調節することを見出した(Toda E, Terashima Y, et al. J Immunol. 2009)。さらに131,200種類の低分子化合物ライブラリーからのスクリーニングで抗酒癩剤として保険適応とされているdisulfiramが有効なFROUNT阻害薬であることを見出し(Terashima Y, et al. Nature Communications 2020),本研究においてもマクロファージの遊走・活性化阻害薬として用いることが可能となっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は,肺移植後に生じる拒絶の過程で線維化にも重要な役割を果たす可能性があるマクロファージの役割を,肺移植後拒絶モデルを用いて解析検討し,マクロファージの遊走阻害による新たな治療方法の可能性を探索することである。

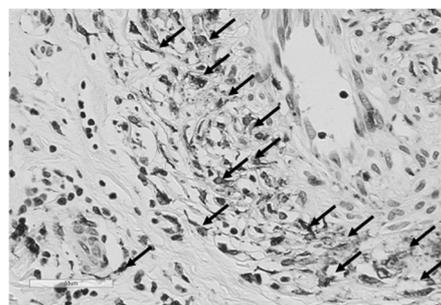


図1 ラット肺移植モデル(RASモデル)において観察された,線維化病巣での多数のマクロファージ浸潤。矢印:CD68(ED1)染色陽性細胞の一部を示した。

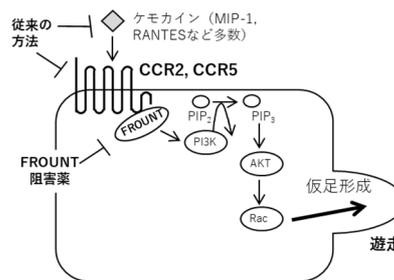


図2 FROUNTが介在するCCR2,CCR5下流のシグナル伝達経路。従来の抗体等を用いたケモカイン抑制では克服できないケモカインの冗長性・重複性を,その下流のシグナルを抑制することで克服できる可能性がある。

3. 研究の方法

動物モデル

この研究は、研究番号 H20-204 (2021 年 1 月 19 日発行) の下で東京大学実験動物倫理委員会によって承認され、すべての手順を東京大学の施設内動物管理使用委員会ガイドラインに準拠し行った。特定の病原体を含まない同系交配雄ラットを日本 SLC, Inc. (日本、浜松市) から購入した。すべてのラット (年齢: 12 ~ 13 週、体重: 280 ~ 300 g) は、動物研究プロトコールに従って適切なケアを受けた。動物実験は、ガイドラインに従って、Lewis ラット (LEW; RT1^l) および Fisher344 ラット (F344; RT1^{lv1}) を使用して実施した。同種異系同所性左肺移植は、以前に報告されたように修正カフ技術を使用して実施した。マイナー組織適合性 (MiHC) 抗原不一致移植手順では、F344 ラットをドナーとして使用し、LEW ラットをレシピエントとして使用した。

DSF 溶液の調製

DSF (田辺三菱製薬、大阪、日本) を 50% ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン (HBC) (東京化成工業、東京、日本) に最終濃度 37.5 mg/mL になるまで攪拌しながら溶解し、4℃ で保存した。ALZET 浸透圧ポンプ (モデル 2ML1, DURECT, Cupertino, CA) を用い、10 μL/h の速度で 7 日間連続的に溶液を投与することとし、埋め込み直前に 1 個あたり 2 mL の DSF 溶液または 50% HBC を充填した。ポンプにはラベルを貼らず、術者は各ポンプの内容を知らずポンプの埋め込みを行った。

治療プロトコール

皮膚切開を行う前に、再灌流障害および感染予防として、メチルプレドニゾロンナトリウム (1 匹あたり 10 mg, SHIONOGI, 大阪、日本) およびセファゾリンナトリウム (1 匹あたり 10 mg, ニプロメディカル、大阪、日本) をレシピエントに皮下または腹膜に全身麻酔下に投与した。レシピエントには移植後の免疫抑制剤は投与しなかった。再灌流後、50% HBC (対照群、n = 10) または DSF 溶液 (DSF 群、n = 10) でプライミングした 2 つの浸透圧ポンプを各レシピエントの皮膚の下に埋め込み移植後 7 日目にレシピエントを安楽死させた。DSF 群のラットには、屠殺されるまで 1 日あたり 18 mg の DSF が投与されたが、これはヒトでは約 600 mg / 日に相当する。研究期間中、すべてのラットには水を自由に摂取させた。レシピエントの給餌量は 7 日間 200 g とし、体重は毎日測定した。

統計解析

連続変数は中央値および四分位範囲として表示し、体重 % は正規分布のため平均 ± 標準偏差として表示した。マンホイットニーの U 検定またはスチューデントの t 検定をそれぞれ使用して値を比較した。分析は、R ソフトウェア (ver 4.2.1; R Foundation for Statistical Computing, ウィーン、オーストリア) を使用した。DEG の特定には、Benjamini-Hochberg 法が使用した。両側検定で p < 0.05 または Q < 0.05 を有意な差とした。

4. 研究成果

体重の変化

ベースライン値に対する治療後のラットの体重の割合 (% 体重) を図 3A に示す。両グループとも 2 日間体重減少が見られ、その後は徐々に回復した。POD 7 における体重 % は、対照グループでは 95.2% ± 4.7%、DSF グループでは 99.1% ± 3.6% だった (p = 0.052; 図 3A)。

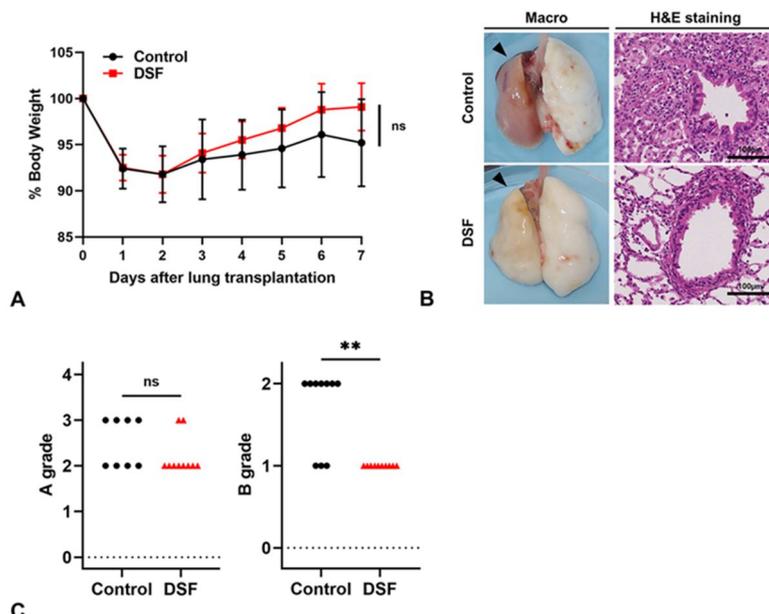


図 3 DSF の身体的および組織病理学的影響。(A) 体重%。毎日の体重を測定し、手術直後の体重のパーセントで表示す。(B) 肉眼所見 (黒矢印は同種移植片を示す) および顕微鏡画像 (H&E 染色、高倍率視野、倍率 × 400)。スケールバー: 100 μm。(C) 急性肺拒絶反応の A/B グレード。スコアは、国際心臓肺移植学会の基準に従った。対照群の 2 例は AX (評価不能) のため除外された。ns、有意差なし。 ** p < 0.01。

組織学的所見

POD 7 では、DSF で治療したラットの同種移植肺は対照よりも肉眼的に白く、軽度の拒絶反応を示した(図 3B)。血管周囲リンパ球浸潤 ($p = 0.321$; 図 3C) は有意な違いを示さなかったが、リンパ性細気管支炎 ($p = 0.0031$; 図 3C) DSF グループでは対照グループよりも有意に軽度だった。血管周囲/細気管支周囲領域では、DSF 処理後に CD68 + 細胞と CD3 + 細胞の浸潤が有意に阻害された(それぞれ $p = 0.0001$ および $p = 0.0029$; 図 4A)。肺泡領域では、浸潤している CD68 +、CD3 +、および CD79a+ 細胞の割合は、DSF 投与後も減少しなかった(図 4B)。

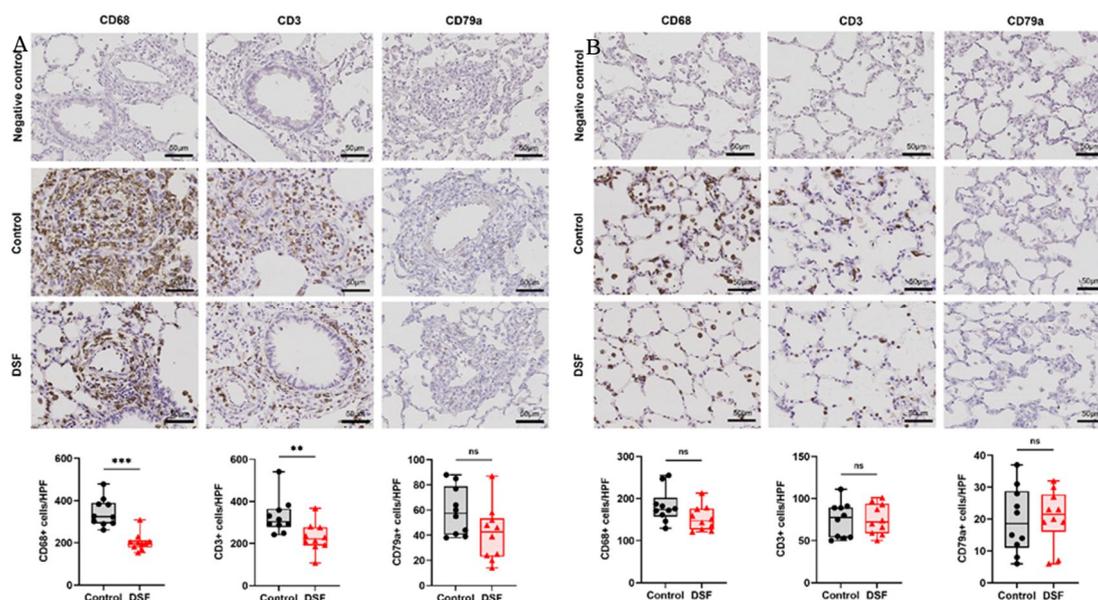


図 4 免疫組織化学的染色。プロットは、ネガティブコントロール、コントロール、およびジスルフィラム (DSF) グループの高倍率視野 (HPF; 倍率、 $\times 400$) あたりの CD68、CD3、および CD79a 陽性細胞の数を示す。(A)血管周囲/細気管支周囲領域。(B)肺泡領域。箱ひげ図は、中央値と四分位範囲を最小値と最大値で表す。ns、有意差なし。 ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。

DEG 解析

対照群と DSF 群の間の DEG 解析では、カットオフ基準 ($|\log 2$ 倍変化) > 1.0 、および $Q < 0.05$) に一致する 258 個の遺伝子が RNA-Seq 解析から同定された。DEG の発現ヒートマップは、DSF 投与後に 134 個の遺伝子が発現抑制されていることを示した(図 5A)。その中で、マクロファージおよび急性肺拒絶反応に関連する遺伝子の発現は、対照群と比較して DSF 群で発現抑制されていた(図 5B)。CD86 および CD163 の発現は、対照群と比較して DSF グループで有意に発現抑制されていた(それぞれ $Q = 0.002$ および $Q = 0.014$)。IL-6 の発現は、対照群と比較して DSF グループで有意に発現抑制され ($Q = 0.037$)、これらの所見は RT-qPCR の結果と一致していた($p = 0.047$)。図 5C)。さらに CCL2 の発現は、コントロールグループよりも DSF グループの方が低かったが ($Q = 0.100$)、RT-qPCR 分析では、発現にわずかな差しか示されなかった($p = 0.874$; 図 5C)。カットオフ値を 1.5 倍高い発現 ($|\log 2$ 倍変化) > 0.6) にあげると、DSF グループで IL-10 発現の発現増加が観察されたが、グループ間の有意差はなかった($Q = 0.654$)。

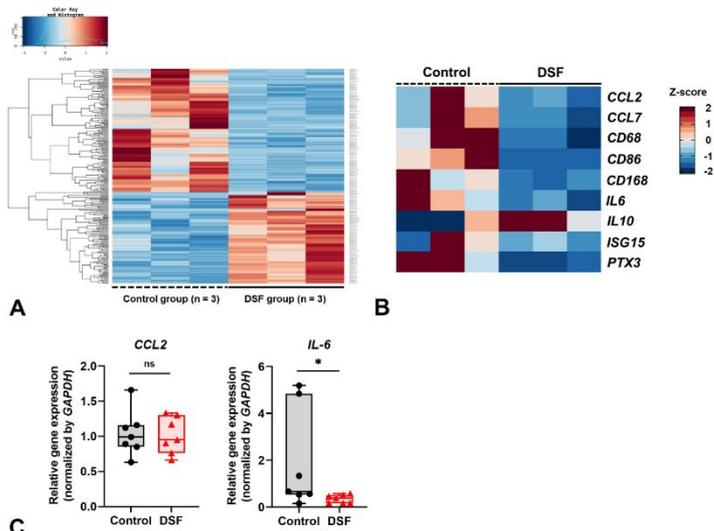


図 5 RNA-Seq および RT-qPCR による遺伝子発現解析。(A)コントロールと DSF グループの間で差次的に発現された遺伝子の Z スコアに基づくヒートマップ ($n = 3$ /グループ)。(B)マクロファージと急性拒絶反応に関連する遺伝子に関して抽出したヒートマップ。(C) RNA-Seq 結果を検証するための RT-qPCR 分析。CCL2 および IL-6 (それぞれ $n = 7$) の発現は、GAPDH の発現で補正した。箱ひげ図は、中央値と四分位範囲を最小値と最大値で表す。ns、有意差なし。 * $p < 0.05$ 。

BALF における TCC と細胞分別

BALF の TCC は、対照群よりも DSF 群の方が著しく低かった ($p = 0.0159$; 図 6A)。DSF グループの細胞プロファイルは、マクロファージの割合が大幅に減少したことを示し ($p = 0.032$; 図 6B)、一方、リンパ球の割合は有意に増加した ($p = 0.024$; 図 6C) 対照群と比較した。グループ間で好中球の割合に差はなかった ($p = 0.143$; 図 6D)。BALF の絶対数に関しては、DSF グループのマクロファージは、対照グループと比較して大幅に減少していた(中央値: 3.8×10^5 vs. 7.3×10^5 細胞/mL, $p=0.008$)。逆に、DSF グループとコントロールグループの間でリンパ球数に有意差はなかった (中央値: 9.9×10^3 対 4.0×10^3 細胞/mL; $p = 0.151$)。

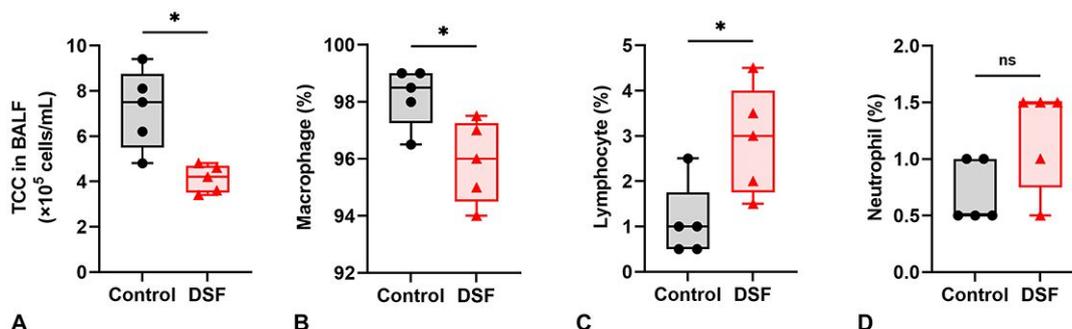


図 6 気管支肺胞洗浄液とその細胞プロファイル。(A)気管支肺胞洗浄液 1ml あたりの総細胞数。(B)マクロファージ (%), (C)リンパ球 (%), および(D)好中球 (%). 箱ひげ図は、中央値と四分位範囲を最小値と最大値で表す。ns、有意差なし。* $p < 0.05$ 。BALF、気管支肺胞洗浄液。DSF、ジスルフィラム; TCC、総細胞数。

考察

この研究では、免疫抑制剤を使用せずに、DSF がラットの マイナーミスマッチ肺移植後の急性拒絶反応を軽減できることを示した。DSF は同種移植片の細気管支周囲のマクロファージと T 細胞の浸潤を減少させ、これが閉塞性細気管支炎 (BO) の予防に寄与する可能性がある。さらに、肺におけるマクロファージおよび炎症性サイトカインに関連する遺伝子の発現は、DSF 治療後に低下した。これらの結果は、マクロファージが肺移植後の急性拒絶反応に関与しており、DSF がそれらの走化性を抑制するという我々の仮説を裏付けるものである。

リンパ性細気管支炎は肺移植後の慢性拒絶の一つとされる閉塞性細気管支炎・BO の前駆病変とみなされているため、この研究で観察されたリンパ球性細気管支炎に対する DSF の抑制効果は BO の予防に寄与する可能性がある。炎症誘発性サイトカインである IL-6 は、肺移植後の急性拒絶反応に強く関係しており、IL-6 シグナル伝達の抑制は BO の発症を阻害すると報告されている。今回の研究では、同種移植片における IL-6 の発現が DSF グループで抑制されていたため、DSF は BO を阻害できる可能性があると考えられる。

さらに、ヒト肺組織の BO 病変では、NF- κ B と STAT3 の活性化、および CD4 + T 細胞とマクロファージの割合の増加が報告されている。DSF が NF- κ B 経路を阻害するというデータもあり、DSF が急性肺拒絶反応だけでなく BO やそれに続く CLAD の発症も予防することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshiyasu Nobuyuki, Matsuki Rei, Sato Masaaki, Urushiyama Hirokazu, Toda Etsuko, Terasaki Yasuhiro, Suzuki Masaki, Shinozaki-Ushiku Aya, Terashima Yuya, Nakajima Jun	4. 巻 37
2. 論文標題 Disulfiram, an Anti-alcoholic Drug, Targets Macrophages and Attenuates Acute Rejection in Rat Lung Allografts	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Transplant International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/ti.2024.12556	査読の有無 無
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0件

〔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	漆山 博和 (Urushiyama Hirokazu) (20725303)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	寺崎 泰弘 (Terasaki Yasuhiro) (50332870)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	
研究分担者	寺島 裕也 (Terashima Yuya) (90538729)	東京大学・医学部附属病院・客員研究員 (12601)	

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
---------	---------