

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19536

研究課題名（和文）加齢グラフト内誘導性気管支関連リンパ節の形成過程と大動物移植肺拒絶への関与の解明

研究課題名（英文）Association between iBALT formation process and lung injury in aged grafts in large animals.

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：加齢ドナー肺では3次リンパ組織（iBALT）が誘導されやすく、移植肺障害・拒絶促進因子になるという研究仮説を明かにすることを目的とする計画を立案した。今回の検討からは、年齢の相違はiBALT誘導を含む肺傷害の進行に影響を与えなかった。一方、加齢による移植肺障害進展機序の解明をはかるためには、温虚血再灌流のみでは不十分であり、冷虚血を含めた高度の虚血因子、獲得免疫系、リンパ管・血管新生等の関与を加味した肺移植モデルによる評価を進める必要があることが明らかとなった。老化に伴う病態解析を、ブタを用いて実施するためには、ブタの加齢性変化に関する基礎的データの更なる蓄積を含めた研究継続が必須である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌やウイルス感染などにより、肺組織内に誘導性気管支関連リンパ組織（iBALT）と呼ばれる3次リンパ組織が誘導されることが明らかになり、病態形成への関与が注目されている。高齢ドナー臓器を用いた肺移植は予後不良である原因を探索するため、ブタの年齢とiBALT誘導に着目した様々な検討を実施した。今回の検討モデルからは加齢とiBALT誘導との関連性を評価することは困難であったが、iBALTの進展に必要な因子の解明、あるいは研究を継続発展させるための課題は明確化された。従って近年、社会的に非常に注目される老化と疾病との因果関係やその制御に結び付けるための研究として高い意義を有すると考える。

研究成果の概要（英文）：Transplantation using aged donor organs has a poor prognosis. We designed a plan to clarify the research hypothesis that tertiary lymphoid tissue (iBALT) is more likely to be induced in aged donor lungs and is a factor promoting transplant lung injury and rejection. In this study, age differences did not affect the progression of lung injury, including iBALT induction. On the other hand, it became clear that warm ischemia-reperfusion alone is not sufficient to elucidate the mechanism of progression of transplant lung injury with age, and it is necessary to evaluate lung transplantation models with high levels of ischemia, including cold ischemia, acquired immune system, lymphangiogenesis, angiogenesis, and other factors. To analyze the pathophysiology of aging in pigs, it is essential to continue research, including further accumulation of basic data on age-related changes in pigs.

研究分野：移植・再生医療

キーワード：移植・再生 誘導性気管支関連リンパ組織 3次リンパ節 加齢 肺移植 大動物 拒絶反応 虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

(1) 血管内皮保護や抗炎症効果を示す一酸化炭素や硫化水素に着目した実験 (*Journal Thorac Cardiovasc Surg* 2010, *Transplantation* 2010, *J Surg Res* 2017, *Xenotransplantation* 2018, *J Gastrointest Surg* 2020) を通じて得た、ドナーに対する短期治療により拒絶抑制効果が得られるという結果から、外界と直面する肺には免疫担当細胞が豊富に存在するという特異性に基づき、「肺内での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ドナー由来の局所因子の役割を解明し、治療標的へ結びつけ、全身へ副作用の少ない有用な治療戦略の確立」を考え研究を進めてきた。ドナー因子という観点では、これまで種々の論文により、加齢ドナーが移植予後に悪影響を及ぼすことが示されていたが (*J Clin Invest* 2017)、加齢因子がグラフト障害を惹起する機序については未解決の課題であった。

(2) 3次リンパ組織は、1次(胸腺、骨髄)、2次(リンパ節、扁桃腺、パイエル板等)リンパ組織に対し、自己免疫やアレルギーなどの慢性炎症や癌病巣に出現する比較的小規模な胚中心様形態をとるリンパ組織であり、肺においても細菌やウイルス感染、各種自己免疫疾患などによって、肺組織内に誘導性気管支関連リンパ組織(inducible bronchus-associated lymphoid tissue: iBALT)と呼ばれる3次リンパ組織が誘導されることが明らかになり、iBALTの病態形成への関与が注目されてきた。近年、急性腎障害モデルによる検討で、若年個体で組織修復が起こる時期に高齢個体では3次リンパ組織の誘導がリンパ球の活性化、炎症の遷延・増悪による線維化を生じることが報告された(*JCI insight* 2016/*Kidney Int* 2020)。高齢ドナー臓器を用いた肺移植は予後不良であるが、腎臓同様に、加齢によって肺内でiBALT形成が生じやすくなることが一因である可能性がある。iBALTの誘導は、加齢による周囲の環境変化の結果、肺内線維芽細胞の形質転換が引き起こされ、T細胞活性化とB細胞のプラズマ細胞への分化を誘導するニッチを提供することで獲得免疫の起点因子の形成に至ると考えられるが、移植の際はこの環境変化として、1)ドナー肺の加齢だけでなくレシピエント個体の年齢因子による影響、2)レシピエントのアロ応答によるT/B細胞の機能を含めたiBALTの構築への影響も考えられるため、ドナー臓器の内因性因子(intrinsic factor)のみならず、レシピエント個体からの外因性因子(extrinsic factor)の2つの要素を含めたiBALTの誘導・機能評価は必須であった。さらに、肺移植に関するこれまでの論文では、iBALTは拒絶進展(*Transplantation* 2012)に関与する、あるいは免疫制御(*J Clin Invest* 2019)に関与するといった、相反する働きを示すことが報告されており、臨床にtranslateしえるMHC確立ミニプタを用いた前臨床肺移植実験によって、移植肺がどのような条件下でグラフト内のiBALT誘導を引き起こし、予後に影響を及ぼすのかを明らかにすることが必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、高齢ドナー臓器を用いた移植は予後不良であるが、加齢ドナー肺では3次リンパ組織(iBALT)が誘導されやすく、移植肺障害・拒絶促進因子になるという研究仮説を明かにすることを目的とする計画を立案した。具体的には、個体の加齢によるiBALT誘導性の相違と虚血再灌流障害の進展や組織修復の関連性をはかること、および、MHC不適合同肺移植モデルにおいて、ドナーあるいはレシピエントの年齢により、移植肺内でのiBALT誘導の相違および拒絶反応との関係性を評価することを目的とする研究を立案した。

3. 研究の方法

(1) 個体の加齢によるiBALT誘導と組織障害/修復過程に及ぼす影響の評価

ミニプタの加齢性変化が3歳以降で始まることから(*Toxicol Pathol* 2019)、加齢個体は3歳以上(40-45 kg)、若年個体は8ヶ月齢前後(25-30 kg)のクラウン系ミニプタを用いる。術後虚血再灌流障害を評価するモデルとして、クラウン系ミニプタを用い、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90分温虚血を誘導後、再灌流するモデルを用いる。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。iBALTについては、形態学的なリンパ組織集簇、homeostatic chemokineとしてCXCL13発現(B細胞集簇性)や抗FDC(CNA.42)抗体(濾胞樹状細胞)を評価する。

(2) 肺移植モデルにおけるドナーあるいはレシピエントの年齢による移植肺内での iBALT 誘導や拒絶反応との関係性を評価

これまでに実施した MHC 確立クラウン系ミニブタ肺移植実験の病理学的解析を用いた検討を実施する。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。移植後に経時的に肺生検や胸部 X 撮影を実施し、(1) と同様な方法によって、移植肺の拒絶反応の進展や、iBALT の誘導について評価を行う。

4. 研究成果

(1) 自然免疫系の関与が強い虚血再灌流障害 IRI モデルを用い、加齢ドナー肺での iBALT 誘導性と肺障害促進への影響を評価した。加齢群は 3 歳以上、若年群は 6 ヶ月齢前後の個体を用いて、動脈と肺静脈血ガス分析、胸部 X 線、肺生検を主な指標として、術後 28 日まで経時に肺障害を評価した。その結果、加齢群と若年群の間で、術後早期の動脈や肺静脈血の血液ガスデータでは、加齢群で P/F 比がやや悪化した (2 日後 210 ± 69 mmHg vs. 292 ± 33 mmHg)。胸部 X 線における肺浸潤影の程度、肺生検の組織学的障害スコア (細胞浸潤、肺胞内浮腫、フィブリン滲出、出血の 4 項目の合計スコア)、炎症性サイトカイン推移のいずれも、加齢群と若年群の間で有意な差は認めなかった。また年齢によって、iBALT 誘導には変化を認めなかった。

なお今回実施した虚血再灌流障害モデルを移植モデルに当てはめた場合、加齢個体を用いた実験はドナー臓器およびレシピエント個体ともに加齢した状況に相当し、一方で若齢個体を用いた実験は、ドナー臓器およびレシピエント個体も若年である状況に相当する。従って、ドナー臓器とレシピエント個体の年齢による評価を行うためには、移植モデルによって、加齢ドナーから若年もしくは加齢レシピエント、あるいは若年ドナーから若年もしくは加齢レシピエントへの移植手術を実施することによって、今後、臓器の加齢とレシピエントの加齢が iBALT 誘導や移植予後に関係するのかを評価する必要があることを意味する。

(2) MHC 完全不適合間肺移植モデルを用いて、ドナー/レシピエント個体の年齢による iBALT 誘導と拒絶反応との因果関係の評価を行ったが、いずれの症例も拒絶反応が進行する際は細胞性拒絶および液性拒絶反応が急速に進展したため、iBALT の形成を評価することは困難であった。これは、用いた免疫抑制療法がタクロリムス単剤でかつ 12 日間という短期間であったことに起因すると考えられる。臨床医療に準じ、タクロリムスだけでなく、ステロイドやミコフェノール酸モフェチルなどを併用すること、あるいは長期間の免疫抑制療法により緩徐に拒絶反応が進展するモデルを確立することによって、この課題の克服をはかる必要がある。

(3) さらに、今回はこれまでの論文に基づき 3 歳以上から加齢による影響が出始めることを前提とした実験群の年齢設定を行った。ブタはヒトよりも加齢性変化が早く始まるとされるものの (*Cell Transplant* 2021)、一方でエピジェネティック時計の概念の発展から、ブタとヒトの年齢を対比させた場合、今回実験に用いた年齢層は加齢の程度が極めて弱いと考えられる (*GeroScience* 2021)。またブタ組織あるいは血液が加齢によってどのようなプロファイルの変化を起こすのか (リンパ球サブセット解析、あるいは炎症に対する応答性など) などのデータは限られており、今後、加齢ブタに関するデータを蓄積する必要があると考える。

(4) 以上のように、今回の検討からは、年齢の相違は iBALT 誘導を含む肺傷害の進行に影響を与えなかった。一方、加齢による移植肺障害進展機序の解明をはかるためには、温虚血再灌流のみでは不十分であり、冷虚血を含めた高度の虚血因子、獲得免疫系、リンパ管・血管新生等の関与を加味した肺移植モデルによる評価を進める必要があることが明らかとなった。老化に伴う病態解析を、ブタを用いて実施するためには、臨床肺移植に類似した拒絶進展形式をたどるモデルの開発、あるいはブタの組織や血液などの年齢による変化に関する基礎的データの更なる蓄積など様々な課題に関する研究を継続することが必須である。

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 Sahara H, Ichinari Y, Iwanaga T, Sekijima M, Takeuchi K, Shimizu A.
2. 発表標題 Effect of aging on the progression of pulmonary ischemia-reperfusion injury in CLAWN miniature swine.
3. 学会等名 International Society for Heart and Lung Transplantation 43rd Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐原寿史、竹内和博、市成ゆりか、関島光裕、清水章
2. 発表標題 ミニブタの加齢が肺や免疫応答に及ぼす影響の評価
3. 学会等名 第40回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2023年

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 GoTo100yr企画 老化のメカニズム「個体の加齢が肺虚血再灌流障害に及ぼす影響のミニブタによる評価」
3. 学会等名 第48回日本臓器保存生物医学会学術集会
4. 発表年 2022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
研究分担者	関島 光裕 (Sekijima Mitsuhiro) (20568589)	鹿児島大学・先端科学研究推進センター・協力研究者 (17701)	

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	岩永 健裕 (Iwanaga Takehiro) (40518916)	鹿児島大学・先端科学研究推進センター・特任助教 (17701)	
研究分担者	有吉 勇一 (Ariyoshi Yuichi) (10643520)	鹿児島大学・先端科学研究推進センター・学外協力研究者 (17701)	

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