

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20946

研究課題名（和文）大動物を用いた移植肺内免疫制御機構の解析に基づく拒絶抑制標的の同定

研究課題名（英文）Analysis of immunoregulatory mechanisms in transplanted lungs in large animals to identify targets for rejection.

研究代表者

市成 ゆりか（ICHINARI, Yurika）

鹿児島大学・先端科学研究推進センター・特任研究員

研究者番号：50630050

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：肺移植が直面する課題として、ドナー数の絶対的な不足が挙げられる。ドナー拡大を目指した心停止ドナー移植が注目されるが、ドナー温虚血が不可避であるため、虚血再灌流障害の制御は依然として重要な課題である。本研究では移植医療における障害進展や抑制因子を明確にし、その制御による新たな治療法の確立を図るため、損傷関連分子パターンと虚血再灌流障害進展、あるいは異所性3次リンパ組織の関連性を評価した。その結果、HMGB1を標的とすることにより、3次リンパ装置形成との関連性は評価できなかったものの、虚血再灌流障害の進展が強く制御さ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

ドナー臓器の絶対的な不足という移植医療の最大の課題を克服するための一つの対策として、術後の虚血再灌流障害を抑制する新たな治療法の探索を、ミニミニブタを用いた評価により行った。手術時に放出される損傷関連分子パターンであるHMGB1を標的にすることにより、虚血再灌流障害の進展が抑制されることが明らかになった。しかし、近年病態進展因子として注目される異所性3次リンパ装置との関連は明確ではなかった。本研究では、病態進展やその抑制機序の解明に基づく新たな治療法の確立を目指し、学術的意義を有する研究を実施した。

研究成果の概要（英文）：One of the challenges facing lung transplantation is the absolute shortage of donors. Although donors after circulatory death have attracted attention to increase the number of donors, the control of ischemia-reperfusion injury (IRI) remains an important issue due to the inevitable warm ischemia of donors. In this study, we investigated the damage-associated molecular patterns (DAMPs) and the tertiary lymphoid structure (TLS) to clarify the factors that suppress the progression of injury in transplantation to establish new therapeutic strategies to control IRI. The results showed that targeting HMGB1 strongly regulates IRI progression, although the association with TLS formation could not be evaluated.

研究分野：移植・再生医療

キーワード：移植・再生 3次リンパ装置 損傷関連分子パターン 虚血再灌流障害 HMGB1 肺移植 ミニブタ

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺移植が直面する課題として、ドナー数の絶対的な不足が挙げられる。ドナー拡大を目指した心停止ドナー移植が注目されるが、ドナー温虚血が不可避であり、虚血再灌流障害 (ischemic-reperfusion injury: IRI) に起因する急性機能不全の危険に加え、自然免疫を主体とする血管内皮や気道上皮障害は、獲得免疫を活性化し急性・慢性拒絶を惹起し、更に複雑な因子が絡み慢性移植肺機能不全 (chronic lung allograft dysfunction: CLAD) 進展の誘因となる。CLAD に対する有効な治療が確立されていないことから、IRI 制御は、急性期・慢性期グラフト機能不全の制御という観点を含めたドナー拡大をはかるためには、依然として重要課題である。

(2) 臓器移植では、外科的操作、ドナー脳死や心停止、臓器への血液再灌流など、様々な過程で放出される損傷関連分子パターン (damage-associated molecular pattern: DAMP) を免疫細胞が感知することが、グラフト局所の有害な炎症反応の契機となり、IRI や拒絶、組織線維化の進展に關与する (*J Clin Invest* 2017)。また近年、1 次リンパ組織 (胸腺、骨髄) 2 次リンパ組織 (リンパ節、扁桃腺、パイエル板) に対し、異所性 3 次リンパ組織 (tertiary lymphoid structure: TLS) が DAMP により障害を受けたグラフト内に血管やリンパ管新生を介して誘導され、局所免疫活性化の場となり、ドナー特異的抗体の供給源や、炎症性サイトカイン持続産生による慢性移植臓器障害へ關与することが報告されている (*Front Immunol* 2016)。一方 DAMP には、組織修復に關与する抗炎症性 DAMP や免疫制御に働く制御性 DAMP など、グラフト長期保護に有益な DAMP が報告されること (*Front Immunol* 2021) また TLS に関しても、リンパ管形成はリンパ流出と免疫細胞輸送促進のため有益に働くことや (*J Clin Invest* 2015) 制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) を介した免疫制御の場となることが報告される (*J Clin Invest* 2020)。このように、DAMP や TLS の役割は一見相反する様々な報告があることから、「臓器固有因子や環境因子が複雑に絡み合う移植医療において、炎症性や修復性 DAMP はどのように TLS 誘導に関わり局所免疫機構を司り、障害進展や修復機転に關与するののか」という点を解明することによって、新たな治療標的を同定しうるのではないかと」という観点から、病態発生機序に基づく治療法の探索が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝背景が確立した大動物である主要組織適合性抗原 (Major histocompatibility complex: MHC) 確立ミニブタを用いて、臓器内因子 (intrinsic factor) や、手術関連因子 (臓器虚血や血管・リンパ管損傷/新生) アロ抗原応答、免疫抑制剤など移植臓器を取り巻く環境因子 (extrinsic factor) が複雑に絡み合う移植における DAMP や TLS の機能解析をはかり、新たな治療法の開発に結びつけることを目的とする。本研究では特に、強い血管内皮活性化・障害、炎症/凝固反応を生じ、自然免疫系が主に關与する IRI モデルを用い、DAMP の経時的解析および TLS 誘導との関連性、抗 DAMP 治療が IRI 進展や TLS 誘導に及ぼす影響を評価し、臓器内免疫調整因子としての DAMP/TLS の役割の解明をはかる。

3. 研究の方法

実験動物：MHC 確立クラウン系ミニブタを用いる。

実験モデル：既に確立した、左肺動静脈・主気管支を 120 分温虚血誘導後に再灌流することによって、IRI を誘導するモデルを用いる。

薬物投与：再灌流直後に薬物を経静脈投与する。

評価対象 DAMP：障害進展性の DAMP としては、HMGB1、ATP、ミトコンドリア DNA (mtDNA)、障害修復性 DAMP としては、アネキシン A1、マレイン、リポキシン等が挙げられるが、本研究では様々な病態の進展やその制御に關する報告がなされ、また我々の検討からも IRI 進展への關与が示唆されている HMGB1 に焦点をあてて評価を行う。

血液・移植臓器評価：画像 (胸部 X 線) 血液ガス (動脈血および肺静脈血) 生化学、生検 (H&E、Masson Trichrome、Elastica-Masson、CD3/CD4/CD8、CD4/Foxp3; 制御性 T 細胞、MHC class II/CD14; 樹状細胞、CD68/制御性 CD163; マクロファージ等の評価を行う。

TLS 評価： TLS は増殖徴候を伴う組織化されたリンパ球集合体と定義し CXCL13 発現（B 細胞集簇）や抗 FDC 抗体（胚中心における濾胞樹状細胞）を評価する。

障害進展/制御因子の解析（血液・組織 A）：炎症性サイトカイン（IL-1 /IL-6/TNF- /HMGB1/ヒストン） 抗炎症サイトカイン（IL-10/TGF- /リポキシン/レゾルビン） 接着因子（ICAM-1） ATP/ADP/AMP などの評価を行う。

4 . 研究成果

（1）本研究では、強い血管内皮活性化・障害、炎症/凝固反応を生じ、自然免疫系が主に関与する IRI モデルを用い、DAMP の経時的解析および TLS 誘導との関連性、抗 DAMP 治療が IRI 進展や TLS 誘導に及ぼす影響の評価を実施した。対象となる DAMP として様々なものが挙げられるが、これまでに我々の機関で実施した肺 IRI 実験のサンプルから、ミニプタ肺 IRI モデルで再灌流直後の障害進展に重要と考えられる DAMP として、再灌流後に HMGB1 の上昇が認められる一方、治療により IRI が抑制されている症例では HMGB1 が低下しているという結果が得られていることから、HMGB1 の阻害が IRI 抑制に有効となる可能性を考えた。そこで、HMGB1 が病変進展に直接的に関与するのかどうかを評価するため、再灌流直後に血中に放出される HMGB1 を中和する抗 HMGB1 抗体を再灌流直前に静脈投与したところ、肺の IRI の進展が抑制された。一方で、アイソタイプコントロール抗体を投与しても IRI 進展は抑制されなかった。この結果から、肺 IRI 進展における炎症性 DAMP としての HMGB1 の重要性、またこの DAMP を阻害する抗体投与が重要な治療法になる可能性が示された。

（2）上記の実験モデルを用いて、障害が進展する過程や抑制される際に、肺内の TLS 形成がどのように変化するかを評価した。この結果、今回の肺 IRI モデル（肺動静脈・気管支遮断）では肺内での TLS 形成は明確ではなかった。従って、障害進展 DAMP が TLS 形成に及ぼす影響、あるいは DAMP 阻害が TLS 形成を阻害するかという点は評価しえなかった。

（3）このように、IRI モデルからは DAMP と肺内 TLS 形成への関与は明確とはならなかった。TLS 形成には更なる自然免疫系の活性化が必要である可能性、更に強い手術操作や気管支動脈や気管支周囲リンパ流の関与が必要である可能性（本モデルでは気管支遮断のみであるため、これらの組織は温存されているが、移植手術の際にはこれらの組織は離断されている） 年齢因子が関与する可能性、あるいは TLS 形成には獲得免疫系の活性が重要であることなど、様々な可能性を示唆する結果であると考えた。

（4）上記の点を明かにするための基礎研究として、過去に実施した肺移植実験の検体を用いて障害進展 DAMP が TLS 形成に及ぼす影響を評価した。MHC 適合/不適合間の移植や、ドナー虚血の有無（心停止後の強い温虚血ドナーからの移植や、長時間の冷保存後の移植など）を含む様々な実験モデルでの評価を行ったが、TLS 形成については比較評価できるだけのデータが得られなかった。この原因として、我々の実験モデルでは、移植肺は高度の拒絶反応により 1-2 ヶ月で拒絶され、急速な肺障害のため TLS 形成評価が困難であるのか、逆に拒絶を受けることなく長期生着が得られるため障害刺激が軽度で TLS に至らない可能性が考えられた。今後、臨床に準じた長期免疫抑制剤使用を含めた新しい実験系によって、適切な慢性肺機能不全を呈するモデルの確立（移植肺不全が遷延するモデル）の確立を図ることが、移植肺内の TLS 形成に関わる因子の同定に必要であると考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究協力者	佐原 寿史 (SAHARA Hisashi)		
研究協力者	清水 章 (SHIMIZU Akira)		
研究協力者	竹内 和博 (TAKEUCHI Kazuhiro)		

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