

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591431

研究課題名(和文)造血幹細胞移植後肺合併症とレニン・アンジオテンシン系

研究課題名(英文) Renin-angiotensin system and non-infectious pulmonary complication after stem cell transplantation

研究代表者

鬼塚 真仁 (ONIZUKA, MAKOTO)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：80366012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：移植後肺合併症発症マウスモデルにおいて、AT1受容体拮抗剤投与群では、組織学的に有意に繊維化が軽減していることが判明した。しかし、マウス生存率ではAT1受容体拮抗剤投与群と非投与群間で有意な差を認めなかった。この原因として、ほとんどのマウスが重症GVHDを発症したためと考えられた。組織学的に、肺繊維化を軽減することが明らかとなり、GVHDをAT1受容体拮抗剤が抑えることはできないものの、移植後非感染性肺合併症の発症予防には有力な薬剤であることが示唆される結果を得た。現在、論文作成中である。

研究成果の概要(英文)：Angiotensin 1 receptor antagonist may be a candidate drug for prevent developing non-infectious pulmonary complication after hematopoietic stem cell transplantation. However, in mice transplantation model, we could not see survival benefit by AT1 receptor antagonist. But AT1 receptor antagonist reduces the incident of mice pulmonary fibrosis in the model.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血幹細胞移植 移植後肺合併症 レニン・アンジオテンシン系 マウス肺合併症モデル

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植(HSCT)は血液悪性腫瘍のみならず、種々の悪性腫瘍、再生不良性貧血、先天性代謝疾患などに対する根治術として期待される治療法であり、高い治癒率が期待出来る治療であるが、ドナー・レシピエント間の免疫応答に起因する移植後合併症による移植関連死亡率が高率であることが本治療法の問題点である。

移植後合併症で最も重大な問題は移植片対宿主病(GVHD)であるが、GVHDと同様に発症のメカニズムが解明されず、治療法が確立されていない非感染性移植後肺合併症はHSCT症例の7~14%程度で発症し致死率が50~80%ときわめて重篤な合併症である。進行性の呼吸不全を特徴としており、造血幹細胞移植施設において常に問題となっている合併症である。原因として同種免疫反応・前処置・薬剤毒性などの関与が考えられているが、依然として不明である。移植後肺合併症マウスモデルでの検討では、同種免疫反応による炎症性サイトカインの関与がこれまでに示されている。しかし、実臨床においては多くの症例で免疫抑制剤が無効であり、同種免疫反応の関与があるのか否かははっきりせず、同種免疫反応以外の因子が存在することを示唆する。

我々は、その病理組織像が肺線維症や特発性間質性肺炎と類似していることに着目し、HSCT後の非感染性移植後肺合併症もRA系が関与すると考えている。これは、これまでに我が非感染性移植後肺合併症に対する疾患関連遺伝子多型解析を調査し、ACE(Angiotensin converting enzyme)遺伝子のInsertion/Deletion 遺伝子多型が移植後肺合併症発症例においてDeletionをホモで有しているDDの場合に非感染性移植後肺合併症が有意に高頻度であることを確認しているためである(M Onizuka et al, Bone Marrow Transplantat. 36(7):617-620, 2005)。この遺伝子多型の関与は特発性間質性肺炎においても指摘されており(Morrison CD et al, Hum Pathol. 32: 521-528, 2001)、RA系の肺線維化への関与を示唆する所見である。ACE遺伝子多型はACE産生能に影響し、遺伝子型がDD > ID > IIの順にACE血中濃度が高くなり、Angiotensin IIの血中濃度が高くなる。Angiotensin IIは肺繊維芽細胞上皮に存在するAT1レセプターを介して組織の線維化を促すことが知られており、ACE遺伝子多型でDDを遺伝子型として持つ症例は組織が線維化を起こしやすことが知られている。特に、肺では損傷治癒の過程でACEは線維化を促進することが証明されている(Imai et al, Nature 2005)。これらのことから、DDを有する症例では非感染性移植後肺合併症を発症しやすいと考える。

2. 研究の目的

移植後肺合併症は、造血幹細胞移植(HSCT)後合併症の中でも致死率が高く治療法が確立されていない。その発症のメカニズムは不明であるが、病理組織学的には肺組織の繊維化が確認される。一方で肺線維症の発症にレニン・アンジオテンシン(RA)系が関与することが報告された。我々は移植後肺合併症におけるRA系の関与を確認するため、ACE遺伝子多型を解析し、移植後肺合併症発症に関与していることを独立した2つの集団で確認した。本研究は移植後肺合併症発症にRA系がどの様に関与するか明らかにし、その知見を元に、予防および治療法を開発することを目的とする。

これまでの臨床症例における研究から非感染性移植後肺合併症の発症にレニン・アンジオテンシン系が関与することが示唆される結果を得ているが、動物実験を行い具体的に発症のメカニズムにどう関与するのかを解明する必要がある。また最大の興味事項は、これまで有効な治療法がなかった移植後肺合併症に対する治療法としてACE阻害剤あるいはAT1受容体拮抗剤が有効かどうかを確認する必要がある。そのために、本研究では、3年間の研究により次の4点について明らかにしてゆく計画である。

(1) C57BL/6マウスをドナーとしB6マウスをレシピエントとする、造血幹細胞移植後肺合併症マウスモデルを用い、ACE阻害剤・AT1受容体拮抗剤を投与の有無による肺組織の変化を、組織学的と分子生物学的手法により定量化する。

(2) ACE阻害剤・AT1受容体拮抗剤の繊維化に対する影響は両者で異なっており、どちらの薬剤が移植後肺合併症の発症を効率よく抑制するかを確認する。ここで、ACE阻害剤とAT1受容体拮抗剤の繊維化抑制を詳細に比較することにより、RA系と移植後肺合併症発症の関連をより明確にすることが可能と考える。

(3) 治療介入のタイミングはどの時点であるかを、動物実験モデルにより証明する。我々は肺合併症発症には同種免疫反応だけではなく、放射線照射や薬剤毒性などの複数の因子が存在することを想定している。このため、治療介入を移植前処置前より開始する場合、および、ドナー血球による同種免疫反応が起きる頃に開始する場合、あるいは肺合併症が発症してから開始する場合で、最も効果があるのがどの時点かを確認することが、この仮説を裏付けることになる。最終的に、RA系の関与がどのような調整因子に影響するかを解明し、それを薬剤投与により阻止あるいは改善することが可能かどうかを証明する。また、本研究が将来臨床試験に発展する場合に、薬剤開始の時期を決定するテーマである。

3. 研究の方法

移植後肺合併症マウスモデルの至適条件の設定から開始した。

ドナーマウスとして C57BL/6(H-2 ハプロタイプ:b)を、レシピエントマウスとして (C57BL/6×DBA/2)のF1である B6D2F1 (H-2 ハプロタイプ:b/d)を用いた。レシピエントマウスは移植前処置として致死量の全身放射線照射を行った。ドナーマウスからは骨髓細胞(BM)および脾臓細胞(Sp)細胞を採取し、BMは単核球を比重分離した後に抗マウスCD90モノクローナル抗体にてT細胞除去処理した後に造血幹細胞としてレシピエントマウスに尾静脈より移植した。Sp細胞は単核球を比重分離した後、T細胞除去せずにレシピエントマウスに尾静脈よりドナー骨髓有核細胞と脾細胞を混合して移植した。移植する細胞の種類および/または量の違いにより次のモデルを作製し使用した。

正常コントロール群(GVHDが起こらない群): T細胞除去処理 BM細胞(1×10⁷/マウス)のみ移植する群。

肺合併症群:T細胞除去 BM細胞(1×10⁷/マウス)およびSp細胞(5×10⁶/マウス)を移植する。

AT1受容体拮抗剤はOlmesartanを使用した。カリニ肺炎を予防するためにST合剤を飲水に混入し、衛生的環境下において最大18週間飼育する。これらのマウスモデルを使用し、移植後最長で18週間飼育とした。移植後3週、6週、9週、12週、15週、18週と検体を収集した。

ACE阻害剤あるいはAT1受容体拮抗剤が移植後肺合併症マウスモデルに与える影響の検討;薬剤投薬は、放射線前処置開始日より始めた。薬剤投与群と非投与群を作成し、移植後6週から3週間おきに最長18週まで飼育し、移植後3週ごとに非投与群と投与群の肺胞洗浄液、血液、肺、消化管、肝臓、皮膚を採取した。

作用機序の検討;移植後肺合併症マウスモデルにおいてRA系の関与を明確にするためにACE knockoutマウスを用いた移植モデルにおいて、肺合併症の程度を評価する。また、knockoutマウスにおける薬剤投与の影響についても評価検討した。

薬剤投与の至適化;投与開始時期および投与量の検討を行い、至適な薬剤投与条件を決定する。また、すでに発症した移植後肺合併症をACE阻害剤投与により改善するかどうかを検討した。

AT1受容体拮抗剤投与群において、肺の表現系がどのように変化するかを詳細に捕らえる。肺組織を採取してHE、AZAN、Masson trichrome染色などの組織学的な検討により肺の炎症・線維化を確認し、ACE阻害剤投与群と非投与群とで肺の炎症・線維化に差があるか否かを観察した。また、免疫組

織科学的染色法を用いて、詳細を検討した。

また、肺組織におけるACE、Angiotensin II、TGF、HIF1-、CCR4、MIP-1、KL6などの蛋白の発現、および定量PCR法により遺伝子の発現量を定量し、薬剤投与群と非投与群において差が生じるか評価した。

4. 研究成果

移植後肺合併症発症マウスモデルにおいて、AT1受容体拮抗剤投与群では、組織学的に有意に繊維化が軽減していることが判明した。しかし、マウス体重変化、および生存率ではAT1受容体拮抗剤投与群と非投与群間で有意な差を認めなかった。この原因として、使用した移植モデルがドナーマウスとしてC57BL/6(H-2ハプロタイプ:b)を、レシピエントマウスとして(C57BL/6×DBA/2)のF1であるB6D2F1(H-2ハプロタイプ:b/d)を用いたため、ほとんどのマウスが重症GVHDを発症したためであった。

このことは、組織学的に、AT1受容体拮抗剤を投与群と非投与群では皮膚、肝臓、消化管のGVHD像に差が認められなかったことからうかがえた。

一方で組織学的に、肺繊維化を軽減することが明らかとなった。肺繊維化の組織所見は薬剤投与を移植後2週間後に開始した群では非投与群と大きな差を認めなかった。このことから、移植日に前処置の全身放射線照射をおこなうマウス移植モデルでは、移植日からの薬剤投与により繊維化が改善することがうかがわれた。GVHDをAT1受容体拮抗剤が抑えることはできないものの、移植後非感染性肺合併症の発症予防には有力な薬剤であることが示唆される結果を得た。

ACE阻害剤投与による肺合併症予防モデルは今回の研究期間中に検討することができなかったものの、AT1受容体拮抗剤の効果は明らかにすることができた。今後は造血細胞移植症例における前向き臨床試験を計画する。今回のマウス実験の結果は現在論文文化作業を遂行中である。

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)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
該当無し

6．研究組織

(1)研究代表者

鬼塚 真仁 (Onizuka Makoto)
東海大学・医学部・講師
研究社番号：2080366012