

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860639

研究課題名(和文) 移植後閉塞性細気管支炎に対するc-kitの役割

研究課題名(英文) The role of c-Kit in mice model of heterotopic tracheal transplantation

研究代表者

早稲田 優子 (Waseda, Yuko)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：80536037

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)：本モデルではallograftにて気道が閉塞するが、c-Kitノックアウトマウスを使用しても差がなかった。また、realtime-PCRや免疫染色にてもc-Kitの差は認めず、B0の気道閉塞にc-Kitは関与しないことが分かった。C57BL/6-CAGEGFPを用いたところ、気道閉塞部位に浸潤した細胞はレシピエント由来と判明し、また気道閉塞にはfibrocyteが関与することが分かった。allograftにimatinibを全課程で投与したところ気道閉塞は有意に抑えられたが後期投与では差がなかった。これらは早期遊走されるfibrocyteだけでなく、骨髄血液のfibrocyteも抑制していた。

研究成果の概要(英文)：Tracheal allografts developed epithelial injury and complete luminal occlusion by day 28, whereas isografts showed intact epithelium without relation of c-Kit. Notably, the administration of imatinib, from day 0 of transplantation, to mice recipients of allografts significantly reduced the tracheal luminal occlusion. In addition, in tracheal allografts, the number of fibrocytes increased significantly between days 3 and 7 of transplantation as compared with isografts, and this recipient-derived fibrocyte infiltration was inhibited by imatinib. Analysis of fibrocyte populations in bone marrow and peripheral blood revealed the same trend, with significant lower number of fibrocytes in the allograft recipients treated with imatinib. Furthermore, in vitro studies showed that imatinib inhibited the differentiation of cultured blood derived monocytes into fibrocytes.

研究分野：呼吸器

キーワード：病態機序解明

1. 研究開始当初の背景

近年我が国において、脳死肺移植、生体肺移植が増加しつつある。肺移植は原発性肺高血圧症や特発性間質性肺炎、肺気腫など難治性肺疾患治療の最終手段であり、肺移植により予後が改善し、社会復帰する例もみられる。一方で、肺移植後の約50%に閉塞性細気管支炎 (BO) を発症することが知られており、BOは生命予後に関わる重大な合併症である (J Heart Lung Transplant 2010;29:1104-1118.)

BOは慢性移植片対宿主病 (cGVHD) との関連が報告されており (論文. Hum Pathol 26: 668-675, 1995, Schwarzer AP et. al. Transplantation 54: 1002-1008, 1992) 内科的治療としてはcGVHDに準じてステロイド療法、免疫抑制療法など、またBOに対してアジスロマイシン療法 (Susan G et. al. Am J Respir Crit Care Med 168: 121-125, 2003) やスピリーバによる気道拡張療法 (Barisione G et. al. 19: Chest Epub ahead of print, 2010) が有効であるとの報告もあるが、実際の臨床ではこれらの治療を行っても通常は1年以内に急速に増悪する。

唯一の治療法としては外科的再移植があげられるが、現実的には、ドナー確保やレシピエントの状態により難しいことが多い。

また、急性白血病を始めとする血液悪性疾患の治療として同種造血幹細胞移植 (SCT) は有効な治療として確立されている。ただし、SCTを行った症例の5%前後は合併症として閉塞性細気管支炎 (BO) を生じる (Afessa B et. al. Bone Marrow Transplant. 28: 425-434, 2001, Holland HK et. al. Blood 72: 21-627, 1988)

2003年から2009年の間、金沢大学附属病院呼吸器内科にてSCT後に発症したBO症例 (病理組織にて確定診断) を3例経験した。うち2例 (どちらも原疾患は急性リンパ性白血病) はBOを発症してから月単位の進行をし、そのうち1例は人工呼吸器管理となった上で、生体肺移植を行い、もう1例は急速にBOが進行したため、生体肺移植を予定していたところ、準備段階で原疾患の再発が判明しBOがあるため原疾患の治療も行えず死亡した。それに比して残りの1例は原疾患が慢性骨髄性白血病 (CML) であり、SCT後にBOが発症、同時期に原疾患も再発しCMLのBcr-ablに対して効果があるチロシンキナーゼ阻害薬、イマチニブの投与が開始となっ

ている。本患者はBOの進行が他の2例と比して明らかに遅く、年単位でわずかに進行しているのみであった。また、イマチニブの副作用に対して1カ月ほどイマチニブを中止したが、中止後呼吸機能検査が増悪し、BOの急速な進行が考えられた。そのうち第二世代チロシンキナーゼ阻害薬であるダサチニブを投与したところ呼吸機能の改善を認めた。このことから、BOの進行を阻止するものとして、チロシンキナーゼ阻害薬の関与が考えられた。文献の検索では、cGVHDに対してイマチニブが効果があったというものが散見される (Olivieri A et. al. Blood 114: 709-718, 2009, Margo L et. al. Bone Marrow Transplantation 42: 757-760, 2008)

平成23年度科学研究費助成事業の中の“同種造血幹細胞移植後閉塞性細気管支炎に対するイマチニブの効果” (若手研究B; 研究代表者 早稲田優子) の中で、当初はマウスの同種造血幹細胞移植を行い、BOを作成する予定であった。しかしこのBOモデルは、同種造血幹細胞移植の手技が煩雑であること、BO発症が少ないことから、モデルとして用いることは難しいと判断した。現在BOモデルとしては、異種マウス気管移植モデル (Heterotopic tracheal transplantation: HTT) が最も多用されている (Am J Pathol 1993;142:1945-1951, Am J Transplant. 2009;9(9):1981-1987) 過去の文献をもとに、我々はHTTによるBOモデルの作成 (ドナーBALB/c レシピエントB57BL/6) に成功した。

我々は、BOにc-Kitが関与しており、さらにレシピエント側のc-Kitが気道閉塞に関与すると仮説を立て、c-kitノックアウトマウス (WBB6F1-W/Wv) を用いてBOモデルを作成した (下記参照)。結果は、c-kitノックアウトマウスの気管をドナーとして移植した組み合わせで、有意に気道閉塞が抑制された (下記参照)。結果は当初の仮説と異なり、レシピエント側のc-Kitは気道閉塞には影響せず、ドナー側にc-Kitノックアウトマウスの気管を用いた場合に気道閉塞が抑制された。以上より、BOにc-Kitが関与していること、および移植気管側のc-KitがBO形成に関与していることが示唆された。

2. 研究の目的

そこで、さらに発展しレシピエント側のBO発症部位にc-kitが存在し、そこを阻害することでBOが減少すると

いう仮説を立て、今回の実験を計画した。

3. 研究の方法

【平成25年度】

A. マウス移植後BOモデルにおけるc-kitの 確認

(1) BOモデル作成

8週齢のC57BL/6マウスをレシピエントとし、8週齢のBALB/cマウスをドナーとする。Hertzらの方法により (Am J Pathol 1993;142:1945-1951) BOモデルを作成

ドナーマウスを屠殺し、気管を取り出す。取り出した後は、ユーロコリンズ液により処理を行う。

レシピエントマウスの皮下に取り出した気管を移植する。移植日から28日後にレシピエントマウスを屠殺し、皮下から移植した気管を取り出す。

ホルマリン処理を行い、パラフィンブロック作成し、未染標本を作製。

H-E染色を行い、BO発症の割合を評価する。

(2) c-kitノックアウトマウスを用いたBO 抑制の確認

上記手順より、BOはほぼ100%に出来ることが予想される。

c-kit ノックアウトマウスとして (WBB6F₁-W/W^v, 三共ラボ) を使用する。

1. ドナー(ノックアウト)+レシピエント(ワイルドタイプ) 群
2. ドナー(ワイルドタイプ)+レシピエント(ノックアウト) 群
3. ドナー(ノックアウト)+レシピエント(ノックアウト) 群
4. ドナー(ワイルドタイプ)+レシピエント(ワイルドタイプ) 群

の4群を8匹ずつ計32匹作製する。

投与開始から14日後にマウスを屠殺し、マウスから移植気管を取り出す。

半分はホルマリン処理を行い、パラフィンブロック作成し、未染標本を作製。

H-E染色、CD117 (c-kit) の免疫染色を行う。

半分は-80 の冷蔵庫で保存。

H-E染色においてBO発症の割合を評価する。CD117 (c-kit) 免疫染色においてCD-117陽性細胞の割合を評価する。

(3) c-kitノックアウトマウスを用いた時 系列BO検体の作成

(2)で、BOが抑制すると思われる、1. ドナー(ノックアウト)+レシピエント(ワイルドタイプ) 群の時系列を作成する。

移植後 day1,3,7,14,28 で取り出し、それぞれ8匹ずつHE染色と-80 保存検体を作成する。

B. マウス移植後BOモデルにおけるイマチニブの効果

(1) 上記報告した移植マウスに対してイ マチニブ投与によるBO抑制の確認

チロシンキナーゼ阻害薬であるイマチニブ 100mg/kg (ノバルティスファーマより提供) をアラビアゴムにより作成したゲルに懸濁し、毎日経口投与する。

投与開始から60日後にマウスを屠殺し、マウスから肺を取り出し、かつ心臓穿刺にて採血を行う。

ホルマリン処理を行い、パラフィンブロック作成し、未染標本を作製。

H-E染色、CD117 (c-kit) の免疫染色を行う。

一部は-80 の冷蔵庫で保存。

H-E染色においてBO発症の割合を評価する。

CD117 (c-kit) 免疫染色においてCD-117陽性細胞の割合を評価する。

線維化の指標として Schrier らの方法に従い、肺組織のヒドロキシプロリン測定を行う (Schrier et. al. Am Rev Respir Dis 127: 614-617, 1983)。

(2) 上記報告した移植マウスに対して、 投与時期によるBOの抑制の確認

1. レシピエント (移植前2週間イマチニブを投与) + ドナー群
2. レシピエント + ドナー (移植前2週間イマチニブを投与) 群
3. レシピエント (移植前2週間イマチニブを投与) + ドナー (移植前2週間イマチニブを投与) 群
4. レシピエント (移植前2週間+移植後4週間イマチニブを投与) + ドナー (移植前2週間イマチニブを投与) 群
5. レシピエント (移植後4週間イマチニブを投与) + ドナー群

チロシンキナーゼ阻害薬であるイマチニブ 100mg/kgをアラビアゴムにより作成したゲルに懸濁し、毎日経口投与する。

投与開始から60日後にマウスを屠殺し、マウスから肺を取り出し、かつ心臓穿刺にて採血を行う。

ホルマリン処理を行い、パラフィンブロック作成し、未染標本を作製。

H-E染色、CD117 (c-kit) の免疫染色を行う。

一部は-80 の冷蔵庫で保存。

H-E染色においてBO発症の割合を評価する。

CD117 (c-kit) 免疫染色においてCD-117陽性細胞の割合を評価する。

線維化の指標として Schrier らの方法に従い、肺組織のヒドロキシプロリン測定を行う (Schrier et. al. Am Rev

【平成 26 年度】

A. マウス移植後BOモデルにおけるc-kitの
確認 (平成25年度より継続)

B. マウス移植後BOモデルにおけるイマチ
ニブの効果 (平成25年度より継続)

C. マウスBOモデルにおける炎症性サイト
カイン動態への影響

両モデルの未染標本に特殊免疫染色を施行し評価する (抗 SCF 抗体, 抗 CD4 抗体, 抗 CD8 抗体, 抗 neutrophil 抗体, 抗 macrophage 抗体, 抗 TGF- β 抗体, 抗 Ki67+抗体)。両モデルにおける CCL2 (MCP-1)、CXCL1 (KC)、CXCL2 (MIP-2)、IFN- γ 、TNF- α 、VEGF、IL-10、IL-5、IL-6、IL-13、IL-12p70、IL-17 を Luminex 社のマルチプレックスアッセイにて測定、PDGF-AB、CXCL10 (IP-10)、TGF- β は R&D 社の ELISA キットにて測定。

D. 総括

BOモデルにおけるc-kit発現の確認

ノックアウトマウスを用いた検体による

c-kitの発現を検討

イマチニブ投与によるBOの割合の変化を
検討

イマチニブ投与によるc-kit発現量の変化の
検討

サイトカインから見た炎症と線維化の変化
の検討

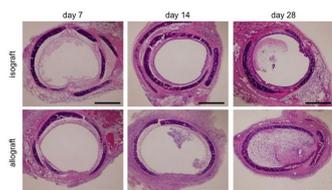
BOモデルに対するイマチニブ投与の有用性の検討

4. 研究成果

Allograft で気道が閉塞する

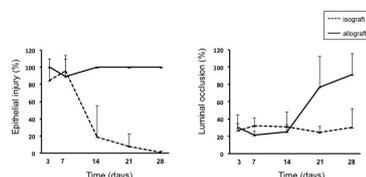
HTTモデルの isograft と allograft を作成し、day 3、7、14、21、28 で上皮欠損率と気道閉塞率を測定した。気道上皮は、isograft、allograft とともに day 3、day 7 で上皮が欠損したが、isograft では day 14 より再上皮化がみられ、day 28 までに上皮は再生した。しかし allograft ではどの時期においても再上皮化を認めなかった。気道閉塞については、isograft では気道閉塞が見られなかったのに対し、allograft では day 28 までに気道は閉塞した (Fig.1A, B)。

Fig.1 A



Error bar = 500 μ m

Fig.1 B



BO の気道閉塞に c-kit は関与しない

気道閉塞に Kit が関与するかどうかを検証するため、c-Kit ノックアウトマウスを使用して移植モデルを作成した。

はじめに c-kit ノックアウトマウスとして (WBB6F1-W/Wv, 三共ラボ) を使用した。下記の 4 群を作成し、28 日後に移植気管を取り出して評価を行った。

1. BALB/c (ドナー) WBB6F1-+/+ (レシピエント)
2. BALB/c (ドナー) WBB6F1-W/Wv (レシピエント)
3. WBB6F1-+/+ (ドナー) BALB/c (レシピエント)
4. WBB6F1-W/Wv (ドナー) BALB/c (レシピエント)

WBB6F1-W/Wv をドナーとして用いた群で、有意に気道閉塞が抑えられた。

c-kit ノックアウトマウスとして上記を用いたが、このマウスは WB 系で第 5 染色体上に W 突然変異遺伝子を持つマウス (WB-W/+) と、C57BL/6 系で Wv 遺伝子を持つマウス (C57BL/6-+/Wv) を掛け合わせで産生されたマウスである。実験 (1) では BALB/c と C57BL/6 を用いており、実験 (2) でも掛け合わせマウスより遺伝的背景が C57BL/6 の c-kit ノックアウトマウスを用いる方が望ましい。

理研バイオリソースセンターに遺伝的背景が C57BL/6 の c-kit ノックアウトマウス (C57BL/6-Wsh/Wsh) が存在することが判明した。これは点突然変異個体を起源とし、C57BL/6J に繰り返し戻し交配して育成されたマウスである。マウスを購入した上で同様に実験を行った。

1. BALB/c (ドナー) C57BL/6 (レシピエント)
2. BALB/c (ドナー) C57BL/6-Wsh/Wsh (レシピエント)
3. C57BL/6 (ドナー) BALB/c (レシピエント)
4. C57BL/6-Wsh/Wsh (ドナー) BALB/c (レシピエント)

この実験と最初の実験の結果が同じになることを期待

していた。しかし後者では4群ともに気道閉塞し、群間に差は認めなかった。

WBB6F1-W/W^vとC57BL/6-Wsh/Wshの両者の特徴を比較したところ、前者の方が貧血、潰瘍、皮膚炎が強みられる他に大きな差はなかった (Am J Pathol 2005;167:835-848)。当初のWBB6F1-W/W^vを用いた実験の再現性を確認したところ、いずれにも気道閉塞が起こり、4群間に差を認めなかった。

BOモデルにおけるc-kitの関与をさらに検証するため、リアルタイムPCR法を用いて同系移植と異系移植(移植3日後、7日後、14日後、28日後)における移植気管のc-kit mRNA相対量を測定した。また、Kit蛋白発現の局在を免疫染色で検証した。当初は、気道閉塞が起こる異系移植28日後にc-kit mRNA増加がみられ、免疫染色では気道閉塞に関与する線維芽細胞にKit蛋白が発現することを予想していた。

実際は、c-kit mRNAは同系移植の移植28日後に増加していた。また免疫染色では、Kit蛋白は同系移植の上皮細胞に強く発現していた。異系移植ではMast細胞に発現していたが、線維芽細胞に発現は認めなかった。

以上の結果より、BOの気道閉塞にc-kitは関与していないと結論づけた。c-kitをノックアウトしても気道閉塞抑制効果は認めなかった。Kit蛋白は気道上皮に強く発現しており、むしろc-kitは上皮の再生に何らかに関与しているのかもしれない。

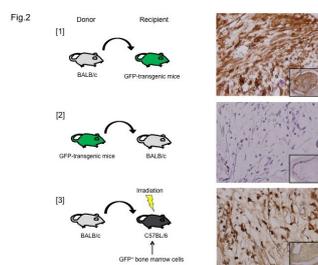
再現性が得られなかった理由として、第一に移植マウス作成の手技の問題が挙げられる。また、当初は摘出した気管をすべてホルマリン固定し、気管の端から切片を作成していた。その場合、気管の端では閉塞の度合いにばらつきがあり、結果に影響を与えたことが想定される。C57BL/6-Wsh/Wshを用いた実験、再現性実験からは、摘出した気管を二分割し、分割した面から切片を作成することで、上記の問題が解決できることが判明した。

以降の実験は、摘出気管を二分割し、片方をホルマリン切片用、片方を凍結切片用(あるいは凍結保存用)に用いている。

ドナー骨髄由来前駆細胞がBOの気道閉塞に関与する

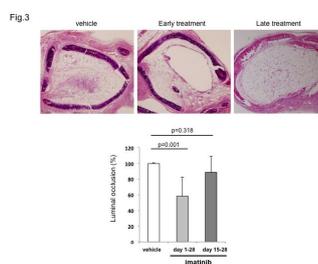
気道閉塞に関与する間葉系細胞の由来を調べるため、C57BL/6-CAG^{EGFP}を用いてHTTモデルを作成し、移植day 28で摘出した気管のGFP陽性細胞数を評価した。

BALB/c C57BL/6-CAG^{EGFP}では、浸潤した細胞の大部分がGFP陽性であった。逆に、C57BL/6-CAG^{EGFP} BALB/cでは、浸潤した細胞の大部分はGFP陰性であった。すなわち、気道閉塞部位に浸潤した細胞はレシピエント由来であった。次に、C57BL/6-CAG^{EGFP}の骨髄をC57BL/6-WTに移植したキメラマウスにBALB/cの気管を移植した。移植気管の浸潤細胞の88.6±5.2%がGFP陽性であり、11.4±5.2%はGFP陰性であった。GFP陽性細胞の中には紡錘形をした間葉系細胞も認めた。以上より、BOモデルの気道閉塞に骨髄由来の前駆細胞(fibrocyte)が関与することが示された (Fig.2)。



imatinibはBOの気道閉塞を抑える

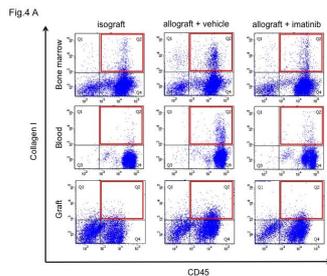
Allograftにimatinib 1mg/kg、10mg/kg、100mg/kgを投与しday 28で評価したところ、vehicle投与群に比べてimatinib 10mg/kg、100mg/kg投与群で気道閉塞が有意に抑えられた。しかし、10mg/kgと100mg/kgでは差がなかった。次に、imatinib 10mg/kgをday 15~28に投与したところ、気道閉塞率はvehicle群と差がなかった。HTTモデルにおいて、imatinibは気道閉塞を抑えるが、移植直後の早期より投与開始する必要があることが分かった (Fig.3)。



imatinibは移植気管内のFibrocyteを制御する

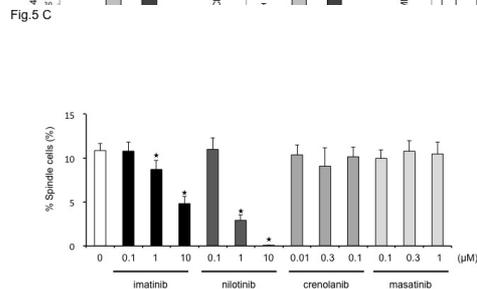
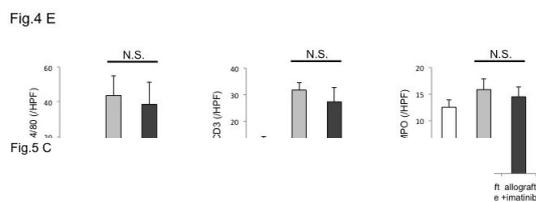
HTTモデルday7におけるisograft群、vehicle群、imatinib群について移植気管内のfibrocyte数(CD45+/ProCol I+)を調べた。fibrocyte数は、isograft群に比べてvehicle群で有意に増加しており、imatinib群で有意に減少していた。次に、骨髄および血液中のfibrocyte数を調べた。骨髄では、isograft群に比べて

allograft 群で fibrocyte 数が有意に多かったが、imatinib 群とは有意差がなかった。一方、血液では、isograft 群に比べて allograft 群で fibrocyte 数が多く、imatinib 群では有意に少なかった (Fig.4A-D)。以上の所見より、imatinib は早期に遊走される fibrocyte を制御するだけでなく、骨髄・血液のレベルでも fibrocyte を抑制していた。この時点で、imatinib は fibrocyte の遊走あるいは分化を抑えることが想定された。



imatinib は炎症細胞に影響を与えない

HTT モデルの早期における imatinib の作用を調べるため、day 7 における isograft 群、vehicle 群、imatinib 群について移植気管中の炎症細胞数を調べた。T リンパ球数 (CD3)、マクロファージ数 (F4/80)、好中球数 (MPO) は、isograft と比べて vehicle 群の方が有意に多かった。しかし、いずれも vehicle 群と imatinib 群で差はなかった。また、血管内皮細胞 (PECAM-1) 周皮細胞 (NG2) が占める割合についても vehicle 群と imatinib 群で差はなかった。Imatinib は fibrocyte 以外の炎症細胞数には影響を与えなかった (Fig.4E)。



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 1 件)

1. S. Watanabe, MD, Y. Waseda, MD, PhD, H. Takato, MD, PhD, J. Hara, MD, PhD, T. Sone, MD, PhD, M.

Abo, MD, PhD, H. Kimura, MD, PhD, K. Kasahara, MD, PhD, Kanazawa/JP

Imatinib Attenuates Bronchiolitis Obliterans via Inhibition of Fibrocytes in a Mouse Model of Heterotopic Tracheal Transplantation, American Respiratory Society 2015, Denver, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

早稲田 優子 (WASEDA, Yuko)

金沢大学医学系・協力研究員

研究者番号 : 80536037

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :