

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861240

研究課題名(和文)肺移植後の慢性閉塞性細気管支炎の病態解明及び治療法の開発

研究課題名(英文)The study of obliterans bronchiolitis immunopathogenesis and therapy after lung transplant.

研究代表者

鈴木 秀海 (Suzuki, Hidemi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60422226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の主目的は、肺移植後の最大の長期予後規定因子である慢性拒絶反応(慢性閉塞性肺疾患：OB)に関する病態解明と治療方法の開発である。実際OBの研究は長年行われてきているもののその機序に関しては依然不明のままであり、マウスを使った基礎実験に期待が寄せられている。マウスのマイナー組織適合抗原ミスマッチモデルで同所性肺移植の28日後にOBを約50%に生じるため、その詳細な機序について解析を行った。OB群ではIL-17が重要な役割を果たしており、IL-10が抑制的に作用していた。またマイナー抗原により移植後21日目にIL-17が誘導されており、IL-17を抑制する治療戦略が有効な可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Due to no effective therapies for obliterative bronchiolitis(OB), the leading cause of death in lung transplant patients, there has been an intensive search for pre-clinical models that replicate OB. We initiated the OB model using minor histoincompatible antigen murine orthotopic single-left lung transplants.

We reported that minor, but not major, histocompatibility antigens account for the 50% rate of OB after 28 day after transplant in murine orthotopic lung transplants. IL-10 induction was associated with the absence of OB, whereas, OB development was IL-17 dependent. Donor mice derived minor histoincompatible antigen contribute to OB development and IL-17 induction. Strategies to identify minor histoincompatible antigen and prevent IL-17 induction in clinical lung transplantation could be useful to reduce the risk of OB development.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺移植 拒絶反応 肺再生 自己免疫

1. 研究開始当初の背景

肺移植は、末期呼吸不全疾患に対する治療法として確立してきた。肺移植の予後は手術方法や周術期管理、免疫抑制剤を始めとする薬物の改良などにより、年代ごとに改善しているものの、未だに国際的には5年生存率が約50% (日本では5年生存率約70%) と、他臓器 (心臓・肝臓・腎臓など) の移植と比較すると予後不良である。肺移植後の最大の予後不良因子である慢性拒絶反応 (閉塞性細気管支炎 (OB)) は、いまだにその病態が解明されておらず、その原因の一つに強力な小動物のOBモデルの欠損が考えられてきた。我々ラットのカフテクニックをマウス同所性胚移植に応用し、さらにマイナー組織適合抗原 (miHAg) の mismatch を利用することによりマウス同所性肺移植後のOBモデル (ドナー C57BL/10 レシピエント C57BL/6 による肺移植後 28 日目に約 50% で OB を発症するモデル) の作成に成功した。IL-17 が OB 発症に関与していることや、IL-10 が抑制的に作用することを報告してきたが、拒絶反応の機序についての詳細は不明なままである。

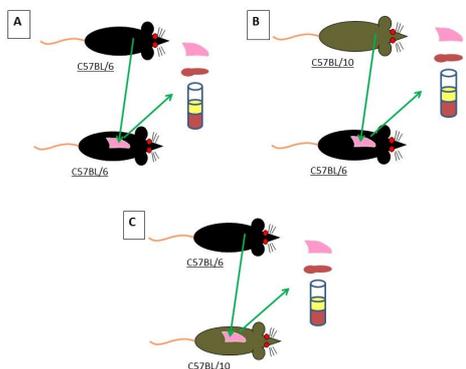
2. 研究の目的

肺移植後の慢性拒絶反応の詳細な病態解明を目的に、OBモデルにおけるマイナー組織適合抗原の不一致と、それに関連するサイトカイン、及びそれを発現している細胞との関連について免疫組織学的な解析を行った。

3. 研究の方法

A群; C57BL/6 C57BL/6 (isograft), B群; C57BL/10 C57BL/6, C群; C57BL/6 C57BL/10 (B群とC; miHAg mismatch) の組み合わせによる同所性左片肺移植を行い、3群間で病理組織所見と quantitative RT-PCR による各種サイトカインの発現を経時的に比較した。(図1) また移植肺からフローサイトメトリーにより IL-17 を誘導する細胞の検出を試みた。さらに IL-17R fusion protein の投与により IL-17 を中和したレシピエントや CD4 ノックアウトマウスに肺移植を行い拒絶反応の変化を解析した。

(図1)

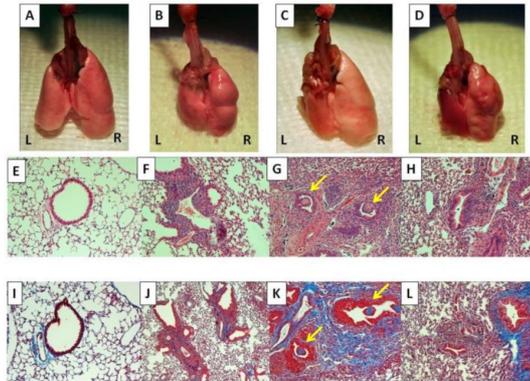


4. 研究成果

A群では拒絶反応は軽度であり、肉眼的にも

病理学的にも炎症所見はわずかであったが、B群では移植後 28 日には約 50% に OB 所見を認めた。(図2) C群ではB群と同程度の拒絶反応スコアを示すものの、OBの割合は有意にB群より低い傾向を示した。(表1)

(図2)

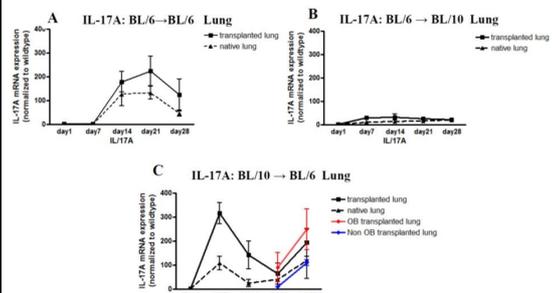


(表1)

Donor	BL/6→	BL/10→	BL/6→
Recipient	BL/6	BL/6	BL/10
Rejection Pathology	0.67 ± 0.89	*3.33 ± 0.82	*3.29 ± 0.76
"A" Scores at day 28			
OB/Total mice at day 21 and 28	3/24 (12.5%)	**14/34 (42.1%)	**2/16 (12.5%)

サイトカインの発現を解析すると、isograft では肺でも全身でも優位な IL-17 の上昇は認められなかった。また同様に C 群においても肺の局所において IL-17 の有意な発現が確認されなかった。一方 B 群の OB モデルにおいては、そのうちの OB 群では非 OB 群と比較して移植後 21 日の全身の IL-17A mRNA expression と 28 日目の血漿中 IL-17A が有意に高値を示した。また肺の局所においても IL-17A が OB 群において有意に高く発現が確認された。(図3)

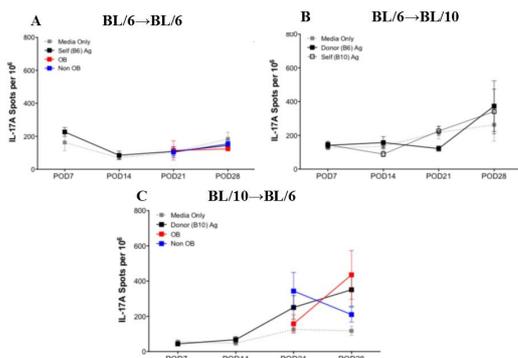
(図3)



一方非 OB 群が OB 群より 21 日目に IL-10 の上昇を認めており、IL-10 が抑制的に作用していることが示された。

さらにそれぞれのドナー抗原に対する全身性のサイトカインの反応を、serum をサンプルに ELISA で解析すると OB モデルの OB 群において有意に IL-17 が全身性にサイトカイン発現することが示された。(図 4)

(図 4)



さらに IL-17 を、中和抗体を用いることにより発現を抑制させると、拒絶反応が抑制され、OB は制御された。さらに OB の所見を有するレシピエントの肺からは CD4+IL-17A+細胞が検出され、CD4 ノックアウトマウスをレシピエントに用いた移植では有意に拒絶反応は抑制された。

我々は miHAg mismatch モデルを用いることによりマウスの肺移植後の OB モデルを確立し、その病態はドナー由来のマイナー抗原に起因した IL-17 を中心とした免疫応答に依存していることが示唆された。

今後、遺伝子改変マウスによる移植などからさらなる拒絶反応に関する病態解明進み、マイナー抗原、IL-10、IL-17 または Th17 を標的とした治療薬の開発は肺移植の長期生存への可能性が期待される。

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 3 件)

鈴木秀海、吉野一郎：急性・慢性拒絶反応の診断。医学のあゆみ 査読無、

255(8): 824-827, 2015

Wu Q, Gupta PK, Suzuki H, Wagner SR, Zhang C, Cummings OW, Fan L, Kaplan MH, Wilkes DS, Shilling RA. CD4 T Cells but Not Th17 Cells Are Required for Mouse Lung Transplant Obliterative Bronchiolitis. Am J Transplant. 査読有、2015 Mar 13. PubMed PMID: 25773063.

Suzuki H, Lasbury ME, Fan L, Vittal R, Mickler EA, Benson HL, Shilling R, Wu Q, Weber DJ, Wagner SR, Lasaro M, Devore D, Wang Y, Sandusky GE, Lipking K, Pandya P, Reynolds J, Love R, Wozniak T, Gu H, Brown KM, Wilkes DS. Role of Complement Activation in Obliterative Bronchiolitis Post-Lung Transplantation. J Immunol. 査読有、2013 Sep 16.

[学会発表](計 6 件)

Suzuki H, Yoshida S, Shiina Y, Sata Y, Inage T, Yun T, Yamamoto T, Kamata T, Morimoto J, Sakairi Y, Nakajima T, Tagawa T, Iwata T, Mizobuchi T, Wilkes DS, Yoshino I. Donor Lung Derived Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells Differentially Regulate T Cell Proliferation and Cytokine Production. The 9th Lung transplantation conference program. 2013/10/18 ウェスティンホテル仙台(仙台)

鈴木秀海、吉田成利、中島崇裕、田川哲三、岩田剛和、溝淵輝明、吉野一郎 肺移植後の慢性拒絶反応における液性免疫の関与 第 49 回日本移植学会総会 2013/9/5-2013/9/7 国立京都国際会館(京都)

Suzuki H, Yoshida S, Shiina Y, Sata Y, Inage T, Yun T, Yamamoto T, Kamata T, Morimoto J, Sakairi Y, Nakajima T, Tagawa T, Iwata T, Mizobuchi T, Wilkes DS, Yoshino I. The role of complement activation and IL-17 production in chronic rejection after lung transplant. The 13th Congress of Asian Society of Transplantation. 2013/9/2-2013/9/6 Kyoto, Japan

Wu Q, Suzuki H, Gupta P, Wagner S, Fan L, Wilkes DS, Shilling RA. Th17 Cells Are Not Required For Cellular

Rejection And Fibrosis In A Mouse Model Of Orthotopic Lung Transplant. The annual meeting of American Thoracic Society, 2013/5/17-2013/5/22

Philadelphia Pennsylvania, USA.

鈴木秀海、吉田成利、豊田行英、尹貴正、山本高義、鎌田稔子、森本淳一、坂入祐一、山田義人、田川哲三、岩田剛和、千代雅子、溝淵輝明、WilkesDS、関根康雄、吉野一郎 肺移植後の慢性拒絶反応に対する動物モデルの開発経緯 第 30 回日本呼吸器外科学会総会 2013/5/9-2013/5/10 名古屋国際会議場(名古屋)

鈴木秀海、吉田成利、豊田行英、尹 貴
正、鎌田稔子、森本淳一、坂入祐一、山
田義人、田川哲三、岩田剛和、溝淵輝明、
千代雅子、Fan L, Wilkes DS、吉野一郎
肺移植における慢性拒絶反応の病態解明
と臨床応用への可能性 第 113 回日本外
科学会 定期 学術集会
2013/4/11-2013/4/13 福岡国際会議場/
福岡サンパレス/マリンメッセ福岡(福
岡)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 秀海 (SUZUKI, HIDEMI)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：60422226