

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861127

研究課題名(和文) PPAR リガンドによる肺移植モデルにおける拒絶反応抑制の検討

研究課題名(英文) The effect of PPAR gamma ligand in bronchiolitis obliterans in a mouse tracheal transplant model study

研究代表者

重信 敬夫 (Shigenobu, Takao)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50626702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス気管同所移植モデルにおいて、PPAR のリガンドであるPioglitazoneを用いて、気管移植後の移植グラフトに対する拒絶反応を検討した。Pioglitazone投与群では対照群に比して、移植気管グラフトへの成熟T細胞の浸潤は抑制されなかったが、内腔の閉塞抑制、制御性T細胞の浸潤増加、炎症性サイトカイン産生の抑制が認められた。PioglitazoneがPPAR を介し、炎症性サイトカインの産生を抑制し、制御性T細胞を誘導することで、気管移植後の拒絶反応を抑制していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The administration of pioglitazone, a PPAR gamma agonist, leads to a decrease in tracheal allograft luminal occlusions and the induction of regulatory T cell accumulation in the allograft in a mouse tracheal transplantation model. This indicates a protective role of pioglitazone against bronchiolitis obliterans. The potential mechanism of these effects includes a decrease in inflammatory cytokine production. However, the anti-inflammatory potential, and efficacy in the maintenance of transplant tolerance needs to be validated in the future.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺移植 拒絶反応 PPAR Pioglitazone

1. 研究開始当初の背景

肺移植は内科的治療では治る見込みのない重症、終末期呼吸器疾患の患者に対して残された、最後の治療法である。1983年の最初の肺移植の成功に始まり、現在世界各国で38,000名を超える患者が肺移植を受け、確立した治療法としてのコンセンサスを得ている。国際心肺移植学会の登録によれば、肺移植後の生存中央値は2003年以降の患者で5.9年と、手術及び周術期管理の改善に伴い、高い生存率が認められている。しかし、依然として肺移植後における急性期から慢性期における合併症のコントロールが課題となっている。

その中で、拒絶反応の結果、移植肺の末梢気道内腔が閉塞することによって生じてくるBronchiolitis obliterans syndrome(BOS)は、肺移植後の患者の死亡率、QOL、治療費などに最も大きく関与する合併症として認知されている。国際心肺移植学会の登録によれば、BOSは移植後一年以上経過した患者の慢性期合併症の中で、死亡原因一位の疾患である。加えてBOSの罹患率は、移植後5年で48%、移植後10年で76%と非常に高いことが示されている。

BOSは移植肺の気道に対する種々の免疫応答の結果生じるとされている。組織学的な病因としては、リンパ球の粘膜下への浸潤に始まり、上皮細胞の障害、粘膜潰瘍が引き続き起こり、これらの炎症反応への結果として線維芽細胞及び筋線維芽細胞の分化及び誘導、増殖が起き、末梢気道内腔を閉塞する。

Peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)sは、細胞内代謝、細胞分化に関与する転写因子群であり、核内受容体スーパーファミリーに属する蛋白質である。PPARsは、 α 、 β 、 γ のサブグループに分かれ、特にPPAR α はインスリン感受性関与し、糖尿病治療におけるインスリン抵抗性改善薬の標的分子として認知されている。PPARは様々な細胞で発現しているが、主に脂肪組織に分布し脂肪細胞の分化に関与する他、単球やマクロファージ、T細胞、樹状細胞、血管内皮細胞などの炎症、免疫に関連する細胞で発現している。近年PPARに対するリガンドを用いた臓器移植動物モデル、敗血症動物モデルなどの研究で、抗炎症作用、抗線維化作用、抗酸化作用を示すことが報告されている。

2. 研究の目的

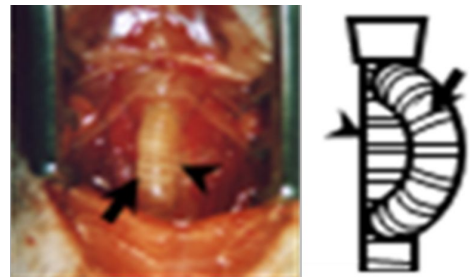
肺移植後の拒絶反応による慢性期の合併症であるBOSにおいて、その高い罹患率及び死亡率という観点から、予防法及び治療法の改善、開発が重要な課題となっている。研究代表者が属するグループでは、これまでに気管移植モデルや肺移植モデルを用いて拒絶反応抑制についての研究を行ってきたが、特にマウスにおいて、ドナーの気管をレシピエントの気管に移植した気管同所移植モデル

が、ヒト肺移植後のBOSとその前病変と考えられるリンパ球浸潤によって生じるlymphocytic bronchiolitis(LB)の病態を再現性をもって検討できることを確認している(Ohtsuka, J Immunol, 2010)。本研究ではこのマウス気管同所移植モデルに対して、PPARに対するリガンドであり、PPARを介した抗炎症作用、抗酸化作用、抗線維化作用が報告されているチアゾリジン誘導体の一つであるPioglitazoneを投与することで、LBを抑え、移植した気管の閉塞を抑制することで、BOSの予防、更には治療が可能であるという仮説を検討した。

3. 研究の方法

(1)マウス気管同所移植モデルの作成

LBの*In vivo*モデルであるマウス気管同所移植モデル(図1)を、8-10週齢のC57/b16マウス及びBALB/cマウスを用いて下記の3群にて作成し、一週間後に犠牲死させ移植した気管を取り出し、後述する種々の評価を行った。



Arrow head : レシピエントの気管

Arrow ; ドナーの気管

図1 マウス気管同所移植モデル

isograft 群 (n=8)

ドナー:C57/b16 レシピエント:C57/b16

allograft 群 (n=8)

ドナー:C57/b16 レシピエント: BALB/c
+0.5%メチルセルロース

allograft(Pioglitazone 投与群) (n=8)

ドナー:C57/b16 レシピエント: BALB/c
+ Pioglitazone +0.5%メチルセルロース

のモデルには0.5%メチルセルロースを、
のモデルにはPioglitazone 2.5mg/kg/を
0.5%メチルセルロースに溶解し、移植前日から犠牲死する前日まで連日1日2回、腹腔内投与した。

(2)移植グラフトの閉塞率の測定

採取した移植グラフトを凍結保存液につけ-80の液体窒素で凍結させた後、6 μ mの厚さで薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、それぞれの移植グラフトの閉塞率を測定する。

(3)移植グラフトに浸潤したリンパ球の測定

リンパ球浸潤の程度を調べるために、成熟 T 細胞のマーカーである CD3 抗体、及び制御性 T 細胞のマーカーである FoxP3 抗体を用いて、(2)の手法と同様の方法で作成した移植グラフトの薄切切片に対する免疫染色を行い、各切片の T 細胞の数を測定する。

(4)移植グラフトにおけるサイトカイン発現量の比較

凍結させた各移植グラフトから RNeasy Mini Protocol for Tissues kit を用いてトータル RNA を抽出し、High Capacity cDNA Archive kit を用いて cDNA に転写する。そして Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR data-collection system を用いて Real-time PCR を行い、tumor necrosis factor (TNF)-、interferon (IFN)-、interleukins (IL-2, -4, -6, -10)と言ったサイトカインの発現量の比較を行った。

4. 研究成果

(1)Pioglitazone 投与による移植グラフト閉塞の抑制

同種移植の isograft 群では、移植グラフトの閉塞は強く現れないが、異種移植である allograft 群では拒絶反応の結果、移植グラフトの閉塞が顕著に起きる。これに対し、Pioglitazone を投与したグループでは、異種移植にもかかわらず、グラフトの閉塞が抑制されることを確認することができた。(図 2)

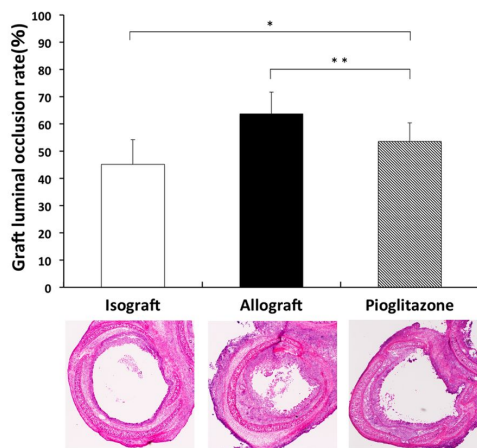


図 2 移植グラフト閉塞率

(2)移植グラフトへの成熟 T 細胞浸潤及び制御性 T 細胞浸潤

当初我々は、Pioglitazone を投与することにより、LB が軽減されることによって移植グラフトの閉塞が抑制されるという仮説を立てていた。つまり移植グラフトそのものへの T 細胞浸潤自体が抑制されると考えていたが、allograft 群において、Pioglitazone を投与しても、成熟 T 細胞の浸潤は抑制されることが確かめられた。(図 3)

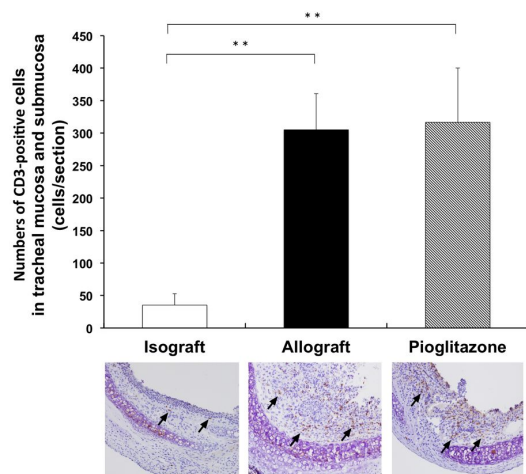


図 3 CD3 陽性細胞数

そこでさらに我々は、この浸潤してきた成熟 T 細胞の中に、免疫応答を抑制的に制御する制御性 T 細胞がどれほど移植グラフト内に浸潤しているかを調べるため、制御性 T 細胞のマーカーである FoxP3 を用いた免疫染色を行い、各切片の制御性 T 細胞の数を測定したところ、Pioglitazone 投与群で顕著な制御性 T 細胞の集積を確認することができた。(図 4)

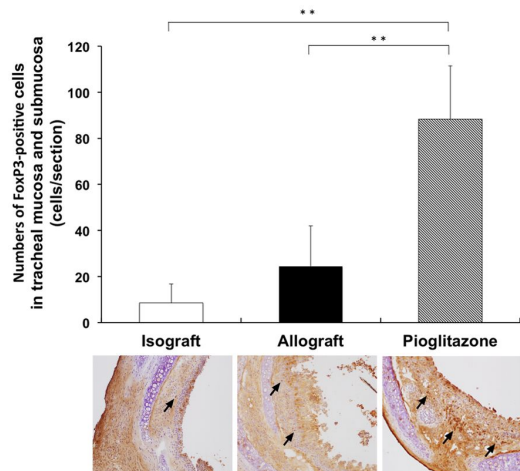


図 4 FoxP3 陽性細胞数

さらにこの Pioglitazone による制御性 T 細胞 T 細胞の分化や誘導、組織への浸潤を裏付けるため、RNA レベルでの制御性 T 細胞のマスター遺伝子である FoxP3 の発現を調べてみたところ、やはり FoxP3 の発現が Pioglitazone 投与群で増加していることを確認することができた。(図 5)これまでに Pioglitazone の投与により制御性 T 細胞の分化誘導が起きるといった文献的報告は非常に少ない。PPAR が制御性 T 細胞の分化誘導に関与しているという報告がある他、動物実験モデルでは、糖尿病、動脈硬化、自己免疫性疾患のモデルなどで、Pioglitazone の投与により炎症が抑えられるという報告の他、制御性 T 細胞 T 細胞の集積が認められたという報告がある。

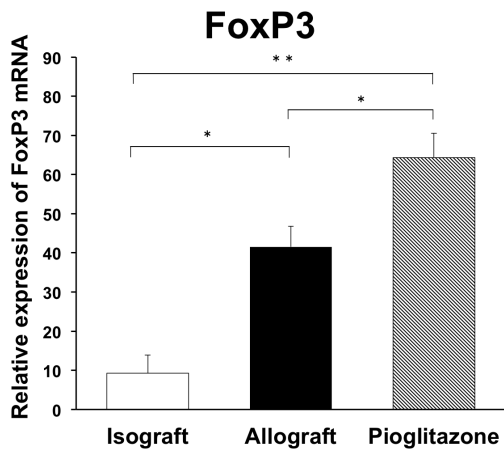


図5 移植グラフトの FoxP3 mRNA 発現量比較

(3)移植グラフトにおけるサイトカイン mRNA 発現量の比較

今回 Real-time PCR で測定した各サイトカインの mRNA 発現量は図6のような結果となった。

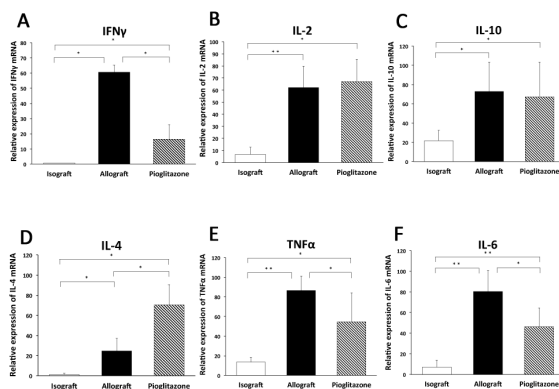


図6 移植グラフトのサイトカイン mRNA 発現量比較

ヘルパーT1細胞やマクロファージから分泌され、移植グラフトに対して炎症を惹起し、拒絶反応において重要な役目を果たしている炎症性サイトカインである IFN、TNF、IL-6 の発現が Pioglitazone 投与群で低下していることが確かめられた。これらの抑制は PPAR のリガンドが、PPAR を介して、炎症を惹起する細胞内情報伝達系における、mitogen-activated protein kinase(MAPK)パスウェイ及び nuclear factor (NF)-B パスウェイを制御した結果生じたものと推測される。また、ヘルパーT2細胞から分泌される IL-4 の発現量の増加を認めた。IL-4 は BOS の患者のうち、比較的症状が抑えられている患者に比べ、症状が強い患者の採血上、IL-4 の数値の低い事が示されており、免疫応答において移植グラフトに対する寛容性を誘導している可能性が示唆されている。

今回の研究で我々は、マウス同所性気管移植モデルに Pioglitazone を投与することで、

移植した気管の閉塞を抑制できることを確認し、さらに免疫応答において抑制性に働く制御性T細胞の分化誘導や、炎症性サイトカインの発現量低下等を介して、LBの軽減、抑制を確認することができた。LBの軽減、抑制は将来的に移植グラフトの恒常的な開存につながる事が予測されるため、BOSの予防に繋がるものと推測される。

更に、Pioglitazoneには、今回の研究で認められたような抗炎症作用の他にも、心移植動物モデルにおいて免疫抑制剤とともに使用された場合に、免疫抑制剤の用量を抑えながらもグラフトの開存率を向上させただけでなく、免疫抑制剤による腎障害を軽減することが示されているなど、移植医療においてより有効な効果が既に報告されている。(Tanaka, J Thorac Cardiovasc Surg, 2009)。将来的に、Pioglitazone はすでに臨床で広く用いられているため、肺移植においても早期に臨床応用されていく可能性がある。さらに、PPAR のリガンドが肺移植における拒絶反応の予防、治療に用いられるだけにとどまらず、肺を含む全ての臓器移植において臓器保護を目的として免疫抑制剤との併用が行われていく可能性がある。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

1. 発表者(代表)名 重信 敬夫

発表表題 Pioglitazone 投与による気管移植動物モデルの拒絶反応抑制、FoxP3 陽性細胞の集積

学会等名 第115回日本外科学会定期学術集会

発表年月日 2015年4月16日

発表場所 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

2. 発表者(代表)名 重信 敬夫

発表表題 Pioglitazone による気管移植モデルの拒絶反応抑制

学会等名 第31回日本肺および心肺移植研究会

発表年月日 2015年1月31日

発表場所 東京大学山上会館(東京都・文京区)

3. 発表者(代表)名 重信 敬夫

発表表題 Pioglitazone によるマウス気管移植モデルでの拒絶反応の軽減

学会等名 第50回日本移植学会総会

発表年月日 2014年9月12日

発表場所 京王プラザホテル(東京都・新宿区)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重信 敬夫 (Shigenobu, Takao)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号: 50626702

(2) 研究協力者

大塚 崇 (Ohtsuka, Takashi)

下田 将之 (Shimoda, Masayuki)