

論文の内容の要旨

論文題目 線維芽細胞に発現する toll-like receptor 4 が
気道アログラフト線維化に及ぼす影響

氏名 川島 光明

肺移植は終末期呼吸器病変に対する唯一の治療手段である。現在では、世界で累計 47000 件以上、年間 3000 件以上施行されているが、その長期予後は 5 年生存率が約 55%と未だ不良である。これは他の固形臓器移植と比べて著しく悪く、例えば、他の臓器の 5 年生存率は、心臓約 76%、肝臓約 70% (グラフト生存率)、腎臓約 74% (グラフト生存率) である。技術の進歩に伴い、肺移植後急性期の成績は年々向上しているものの、肺移植後慢性期の予後はここ 20 年間改善が見られていない。肺移植後 1 年以後～3 年目までの死因で最多のものは慢性期移植肺機能不全 (CLAD) 44.9%、感染症 22.3%、悪性腫瘍 9.8%、心血管イベント 4.4%と報告されている。いわゆる慢性拒絶である、慢性期移植肺機能不全 (CLAD) が、肺移植後の長期生存を妨げていることが見て取れる。CLAD の本態は移植された肺に起こる不可逆的な組織リモデリングであり、既存の免疫抑制剤で防ぐことができないため、内科的な予防法や治療法が確立されておらず、進行した場合の最終的な治療法は再肺移植である。なお CLAD の病態は 2 型に分けられ、組織リモデリングが細気管支周囲特異的に起きる bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) と、細気管支周囲に加え臓側胸膜や肺胞構造にも病変が巻き込まれる restrictive allograft syndrome (RAS) が報告されている。なぜこのように 2 型の異なる形をとるのかは現在の所不明であり、治療法開発のためにも病態解明を進めることは希求される。

肺移植は、移植された臓器が常に外界からの刺激に暴露され続けるという点で他の固形臓器移植と

異なっており、この特徴が CLAD の発症に関与していると考えられている。外界からの刺激を認識する生体機構の一つとして、toll-like receptor (TLR) が挙げられ、近年移植免疫との関与が報告されている。TLR は哺乳類の細胞膜に存在しており、ヒトでは 10 種類以上の報告がある。TLR は病原体の菌体成分を認識し生体防御の反応を司るため、常在細菌叢に恒常的に曝される肺のような臓器では特に重要ではないかと考えられる。移植免疫においては、TLR シグナルが樹状細胞を介して、アロ免疫反応を修飾すると信じられており、とくに TLR4 についての報告が多い。このため、我々は TLR4 と気道の組織リモデリングの関係を解明するために動物実験を開始した。ところが、実験をすすめるうちに preliminary data として「TLR シグナルは気道アログラフトに浸潤する筋線維芽細胞の数に顕著な影響があるものの T 細胞の数にはあまり影響を及ぼしていない」、という所見が得られたため、「TLR シグナルは線維芽細胞を直接活性化させ、獲得免疫系に独立した機序で気道アログラフトの線維化に貢献する」との仮説を立てて検証を進めた。

気道アログラフトにおける TLR4 の役割を検証するために、in vivo の実験としてマウス同所性気管移植モデルを採用し、また in vitro で混合リンパ球培養と、肺線維芽細胞の培養を行った。同所性気管移植モデルは、ドナーマウスから摘出した気管を、横切したレシピエントマウスの気管に端々吻合する手技で、グラフトが気道の常在細菌叢などに曝され、かつ気道の線維化が高頻度に再現可能であるという特徴を持つ。レシピエントを C3H 由来の wild type mouse もしくは TLR4 mutant mouse、ドナーを Balb/c として、主要組織適合抗原 (MHC) major mismatch pair の組み合わせで手術を行った。非免疫抑制群と、軽度免疫抑制群 (術後 10 日目まで cyclosporin を投与) の 2 群に分けて行い、術後 21 日目にグラフトを摘出して病理学的な評価を行った。病理学的な評価は HE 染色と免疫染色 (α smooth muscle action (α SMA)、CD3) を用いた。混合リンパ球培養は、気管アログラフトの移植を受けたレシピエントマウスと、ナイーブのドナーマウスから、それぞれ脾臓を採取し細胞懸濁液を作成し、レシピエントのリンパ球は CFSE で染色、ドナーのリンパ球はマイトマイシン C で処理をした上で混合し、アロ反応性 T 細胞の増殖をフローサイトメーターで評価した。線維芽細胞はマウス肺から初代培養して継代した後に、TLR4 のリガンドである lipopolysaccharide (LPS) や線維芽細胞の活性化に重要である transforming

growth factor beta 1 (TGF- β 1) で刺激して一週間培養を行った。筋線維芽細胞に発現している α SMA の mRNA やタンパク質の発現を、real-time PCR や免疫細胞染色で評価し、線維芽細胞の活性化の指標とした。

まず vivo の data であるが、非免疫抑制群においては、wild type mouse と TLR4 mutant mouse のどちらをレシピエントにしても、気管上皮下に α SMA 陽性の筋線維芽細胞が浸潤しており、TLR4 シグナルの有無による影響を見いだすことは出来なかった。このことは、MHC full mismatch pair では獲得免疫系の影響が強すぎるために TLR4 シグナルの影響を評価するのは困難だからだと考えられた。軽度免疫抑制群では TLR4 mutant mouse をレシピエントとした群で、 α SMA 陽性の筋線維芽細胞が著明に少なくなっており、コンピュータを用いた定量的解析において α SMA 陽性面積が有意に小さかった ($p < 0.05$)。しかし、CD3 陽性 T 細胞の数は、wild type mouse と TLR4 mutant mouse で有意な差が認められなかった。

In vivo の data で TLR4 シグナルの有無は獲得免疫系に与える影響が少ないと考えられたが、より詳細な評価を in vitro で行うために混合リンパ球培養 (Mixed lymphocyte reaction: MLR) を行った。MLR においては、allogenic なリンパ球の組み合わせでは、syngenic なリンパ球の組み合わせよりも有意差を持って、アロ反応性 T リンパ球の数が増えていた。アロ反応性 T 細胞の数を、wild type mouse と TLR4 mutant mouse で比較すると、興味深いことに、CD3 陽性 T 細胞数、CD8 陽性 T 細胞数ともに、有意差は無かった。このことは、やはり TLR4 シグナルの有無が本モデルにおいては獲得免疫系に与える影響が大きくないことを示唆していると思われた。

TLR4 シグナルが線維芽細胞の活性化に与える影響を評価するために、線維芽細胞の初代培養を行った。wild type mouse の線維芽細胞に TGF- β 1 を添加した群では、LPS に反応して α SMA 陽性の筋線維芽細胞が顕著に増えていた ($P < 0.05$)。しかし、wild type mouse の線維芽細胞で TGF- β 1 非添加の群や、TLR4 mutant mouse の線維芽細胞では、LPS に対して α SMA の増加は顕著ではなかった。つまり、線維芽細胞は TGF- β 1 の存在下においては TLR4 シグナルで活性化が促進されるが、TGF- β 1 が無ければ TLR4 シグナルのみでは、活性化されなかった。線維芽細胞に対して、TLR4 シグナルは獲

得免疫系の働きに相乗効果を与えるように働いていると思われた。

以上の結果から、TLR4シグナルは気道アログraftの線維化に関与しているものの、アロ反応性 T 細胞の増殖においては顕著な影響を与えておらず、また興味深いことに TGFβ1 と協同して線維芽細胞を直接活性化させていることが示された。このことは、TLR4シグナルがアロ免疫反応に相乗的な機序で気道アログraftの線維化を直接促進させていることを意味しており、気道感染や気道常在細菌叢などが外的刺激として気道アログraftの線維化に潜在的に重要な影響を及ぼしていることを示唆している。BOS で気管支周囲特徴的に線維化が起こるメカニズムは不明であるが、今回我々が示したような外的刺激による線維化が気管支周囲に起こりやすいことが想像される。