

博士論文

移植気道リモデリング機構の解明

此枝 千尋

要旨

肺移植後遠隔期の最大の問題点として移植肺内気道の線維化を主病変とする慢性拒絶があげられる。移植気道の線維化機構が解明されることにより、線維化の予防法が同定されれば、肺移植患者の長期予後は劇的に改善すると考えられる。本研究ではマウスの気管移植モデルを用いて移植気道の線維化機構を組織学的に検討した。まず上皮間葉移行の関与を検討し、次いで線維化を引き起こす線維芽細胞がドナーもしくはレシピエントどちらに由来するのかを検討した。結果、異系移植片が線維化に至る過程においてドナー上皮が上皮間葉移行を起こす可能性があることと、線維化層における線維芽細胞の多くはレシピエント由来であることが示された。

目次	頁
序文	4
第1章	12
1.1 方法	12
1.2 結果	17
1.3 考察	23
1.4 結論	27
第2章	28
1.1 方法	29
1.2 結果	33
1.3 考察	40
1.4 結論	44
考察	45
参考文献	49
謝辭	62

序文

肺移植は慢性肺疾患による終末期呼吸不全患者を救命するほぼ唯一の手段である。肺の機能を長期間代替しうる人工臓器もしくは臓器再生による治療がいまだ現実的でないため、この状況はしばらく続くと考えられる。ヒトの肺移植は、1963年にミシシッピ大学の Hardy らにより世界初の片肺移植が行われた¹ことから始まるが、その後 20 年以上、長期生存例を認めなかった。1970 年代に強力な免疫抑制剤であるシクロスポリンが発見され、急性期の拒絶反応が抑制可能となった。そして 1983 年にトロント大学のグループによって末期の肺線維症に対して施行された右肺移植症例が初めての長期生存例と報告されている²。その後さらなる免疫抑制剤や各種感染症に対する薬物療法の進歩により、移植後の、急性期における生存率は劇的に改善したが^{3,4}、肺移植後の長期生存率の改善はいまだ十分でない。国際心肺移植学会（International society for heart and lung transplantation : ISHLT）の統計によると肺移植後の 3 年生存率は 60-70%程度であり、同学会の心臓移植後の 3 年生存率の報告より 10%程度も低い⁵。これは肺移植後慢性期に Chronic lung allograft dysfunction（CLAD）に相当する Bronchial obliterans syndrome（BOS）と言われる慢性拒絶の状態が移植肺に高率に起こることによる^{4,6}。BOS は病理学的には細気管支が線維性に閉塞する閉塞性細気管支炎（Obliterative bronchiolitis : OB）であり組織学的所見の特徴は線維化である⁷。肺移植後は発症時期の差はあるもののこの線維化がほぼ必発であり、

再移植が必要となる一因となっている。他の移植臓器においても線維化は起こり得ることを考えると、なぜ肺においてこれほど臨床上問題となる線維化が高率に起こり、長期予後が改善しないのか、未解決の問題である。肺は気道により外界と接する特殊な臓器であることに一因があるかもしれない。肺移植後、長期生存率の改善のためには、OB、移植気道の線維化のメカニズムを解明し、予防・治療法を模索することが必須である。また、線維化は移植臓器以外においても種々の病態・臓器で起こり得るため線維化機構の解明は医学全体にとって非常に重要な課題であると考えられる。

肺移植後の BOS に関しての研究が劇的には進歩しない大きな理由の一つは、高い再現性をもった正確な BOS の動物実験モデルが存在しないことにある。いくつかの動物において肺移植モデルは作成されてきたが、遺伝的なバックグラウンドの不明瞭さの問題もあり、どれも正確な BOS のモデルとは判断できない状態である⁸⁻¹⁰。近年になってマウスの肺移植をカフを用いた手技により成功させたとの報告があり¹¹、それに続いてマウスの minor histocompatibility ミスマッチペアの肺移植により OB モデルを作成したとの画期的な報告¹²があるが、この報告における OB の再現率は 50%程度と低く、マウス肺移植という習得に時間を要する非常に高度な技術を必要とするモデルであることを考慮すると、汎用に至るかは疑問である。

小動物、特にマウスの肺移植例が報告される以前から、BOS のモデル、もしくは

移植気道の線維化のモデルとして汎用されてきたものはマウスの気管移植モデルであった^{13,14}。移植気道の線維化を解明するために今回選択したモデルはこのモデルである。中枢気道である気管をレシピエントに移植するモデルであるが、皮下や腹腔内、肺内に移植する異所性移植モデル¹³と頸部でレシピエントの気管と吻合する同所性モデルがある¹⁴。マウス異所性気管移植モデル（Heterotopic tracheal transplantation : HTT）は1990年代に Hertz らにより報告されたモデルである¹³。マウス主要組織適合性抗原（MHC）ミスマッチペアにおいて、ドナーの気管をレシピエントの皮下に移植すると術後21日目に内腔が線維性閉塞する、これが OB に相当するとしたモデルである。マウス異所性モデルにおいては皮下移植のみでなく腹腔内への移植や肺内への移植^{15,16}といった工夫がなされてきた。肺内への異所性気管移植は肺の免疫学的な環境のグラフトへの影響が加味されるという改良である¹⁶。異所性移植モデルにおいては移植部位が異なってもグラフトの内腔の線維性閉塞が OB に相当するという考えは同じであり、今回は異所性気管移植モデルの中で最も汎用されている皮下移植を選択した^{13,17-19}。

次に同所性気管移植モデル（Orthotopic tracheal transplantation : OTT）であるが、このモデルは2002年に Genden らによって報告されたモデルである¹⁴。Genden は耳鼻咽喉科医であり、これを気管そのものの移植モデルとして報告した。そのため、2002年の最初の論文¹⁴においては、術後急性期（術後2日目）に異系移植において気道狭窄音を聴取する、という急性期拒絶のモデルとしての言及の

みしか記載が無いが、2003年の引き続きの論文²⁰において、移植気管内腔はレシピエントの上皮細胞によって再上皮化が起こること、術後遠隔期（28日目以降）において、移植気管の上皮下に線維芽細胞の出現・線維化が起こるということを報告した。OTTでは内腔閉塞は起こらないため異系移植例においても移植術後長期生存が可能である。マウスOTTは移植気道における線維化を研究する上では非常に有用なモデルであり、Gendenらの報告以後このモデルを用いて多くの研究がなされてきた²¹⁻²⁴。気管は中枢気道であり、中枢気道の上皮下に起こる線維化を末梢気道が閉塞するOBにまったく等しいとすることはできないが、高い再現性をもって移植気道における線維化を観察することが可能で、線維化機構の解明に適している。またこのマウスOTTモデルは、OBの前病変であるLymphocytic bronchitisを示しているとされ²⁵、OBの正確なモデルが存在しない現状において、移植気道における線維化機構を解明する上で欠かせないモデルである。

線維化においては、蓄積することで線維化へとつながる細胞外基質を産生する線維芽細胞が中心的役割を担うが、移植気道において線維芽細胞の起源はいまだ明らかでない。線維芽細胞の起源を明らかにすることは、移植肺におけるOB、移植臓器における線維化機構を解明し、これらの発症を予防する方法を模索するための肝要なステップの一つと考える。

移植臓器における線維芽細胞の起源としては以下のように大きく三つの説がある。

① レシピエントの骨髄由来細胞説

② レシピエントあるいはドナー由来の局所に存在する線維芽細胞もしくはその前駆細胞が関与するという説

③ 上皮が上皮間葉移行 (Epithelial mesenchymal transition : EMT) という現象を起こし線維芽細胞になるという説

である。いずれの説も支持する報告がいまだに出ている。肺のみならず腎臓や肝臓等においても線維芽細胞の起源に関する研究はなされているがどの臓器においても線維芽細胞の起源は確定されてはいない。

まず①のレシピエント骨髄由来細胞であるが、骨髄由来でかつ局所において線維芽細胞になるとされるものに **Fibrocyte** という白血球の 1 グループがある。これは創傷治癒の研究において同定されたもので、1994 年に **Bucala** らにより最初に報告された²⁶。それまで創傷治癒における線維芽細胞は局所に存在する線維芽細胞が関与するという説が主流であったが、**Bucala** らは受傷部位に浸潤する炎症細胞の群の中に紡錘形の細胞が散見されることから **Fibrocyte** の存在を推測し、血中で同定に成功した。**Fibrocyte** は白血球の細胞表面マーカーである **CD34** や **CD45** が陽性であり、かつ **Collagen 1** や **Vimentin** といった細胞内マーカーが陽性とされる。この **Fibrocyte**、創傷治癒のみならず臓器の病的線維化に関与するという報告があるが²⁷⁻²⁹、近年になり移植臓器の線維化においても役割を担う可能性が示唆されている^{30,31}。

二つ目の候補であるドナーもしくはレシピエント由来の局所に存在する線維芽細

胞であるが³²、この可能性も否定することはできない。肺内にも線維芽細胞は存在するためこれが移植肺において **OB** の原因となる可能性がある。

三つ目の選択肢である上皮間葉移行は、1980 年代初めに **Elizabeth Hay** らが提唱した、上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象である^{33,34}。最初は発生過程（初期胚発生における原腸陥入、神経提細胞の運動や器官形成等）において起こると報告された。一方、**EMT** の獲得が運動性の亢進や細胞外基質の蓄積をもたらすことから、癌細胞の浸潤や線維症との関連も示唆されている^{35,36}。また病的な組織の線維化^{37,38}や移植臓器の線維化³⁹⁻⁴²においても関与を示唆する報告がある。

上皮間葉移行の過程で細胞では上皮系のタンパク質発現が減弱し、間葉系のタンパク質発現が開始する。上皮は細胞間接着や局在性などの上皮としての機能を失い、代わりに運動能など間葉系細胞に特徴的な機能を獲得する^{43,44}。線維化機構において **EMT** の関与を検証するには、上皮系マーカーの発現減弱と間葉系マーカーの発現獲得を検討するか、もしくは **EMT** 関連転写因子の検討を行うのが手法の一つである。上皮系マーカーの一つである **E-cadherin** は、上皮細胞の代表的な接着分子であり、細胞間接着に寄与しているが、**EMT** 獲得に伴いその発現が抑制されることから、**EMT** の代表的な指標の 1 つとなっている⁴⁵。腫瘍においては **E-cadherin** の発現消失が浸潤癌への傾向を示すという報告がある⁴⁶。一方 **EMT** において獲得される間葉系マーカーとしては線維芽細胞や筋線維芽細胞（myo-fibroblast）のマーカーである **alpha smooth muscle actin** (α **SMA**) や

S100A4 (別名 Fibroblast-specific protein1: FSP1)、Vimentin、N-cadherin などが用いられる⁴⁷⁻⁴⁹。間葉系マーカーに関しては EMT 特異的と断定できるものは無く、あくまで間葉系細胞に一般的に発現するタンパク質である。上皮系マーカーの発現抑制、間葉系マーカーの発現獲得には種々の遺伝子発現を調節する因子が関与するが、上皮系マーカー E-cadherin は転写調節での解析が多くなされ、Snail、SIP1、Twist、E2A(E47/E12)などの転写因子が E-cadherin の発現を調節することが報告されている⁵⁰⁻⁵⁴。SIP1 は dEF1/Zfh1 ファミリーを形成する homeodomain/zinc finger 型転写因子であるが、dEF1/Zfh1 がコードする ZEB-1 と SIP1(ZEB-2)は、共に E-cadherin のプロモーター上に結合し転写を抑制する。そのため ZEB1 や SIP1 は EMT 関連転写因子と呼ばれることがある。今回上皮系・間葉系マーカーとともにこの転写因子に関しても組織学的な発現を検討した。これら転写因子の上流に存在し、EMT を誘導するシグナルとして最も解析が進んでいるサイトカインは TGF- β であり⁵⁵⁻⁵⁷、TGF- β から Smad への経路が EMT 誘導の主経路⁵⁵と考えられている。

以上のように線維芽細胞の起源はいまだ特定されておらず、移植臓器において線維芽細胞の起源を明らかにすることは線維化の予防法を模索する上で解決すべき疑問である。

上述した OTT モデルの異系移植片においては、上皮下の線維化に先立ち、炎症細胞浸潤を伴う上皮の劇的な形態変化が見られることが知られており、また、移植

気管が拒絶されず生着した状態においては上皮がキメラの状態であることも報告されている²¹。一方 OTT の移植片の拒絶過程において上皮は重要な役割を担うという報告がある²²。これらのことから線維化過程において上皮は非常に重要な役割を持つ可能性、EMT が移植臓器の線維化に関与する可能性は高いと考えた。移植気道における EMT の関与を動物実験モデルで検討した報告は非常に少ないのが現状であり、本研究の目的を、動物実験モデルにおいて線維芽細胞の起源、移植気道線維化への EMT の関与を解明することとした。

第 1 章では、マウス同所性気管移植モデルにおける EMT の関与を組織学的に検討した。第 2 章では、マウス同所性・異所性気管移植モデルを用い、移植ペアの一方に GFP マウスを使用することにより線維化層における線維芽細胞がドナーとレシピエントどちらに由来するかを検討した。

第1章 マウス同所性気管移植における上皮間葉移行の組織学的検討

1.1. 方法

① マウス同所性気管移植

動物の取り扱い、日本の「動物の愛護及び管理に関する法律」並びに「東京大学動物実験実施規則」「東京大学動物実験実施マニュアル」に従った。すべてのマウスは Specific pathogen free 条件のものを日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した。マウス主要組織適合性抗原 (Major histocompatibility complex : MHC) ミスマッチペアである BALB/c (H-2^d) と C57BL/6 (B6 ; H-2^b)、6 週齢以上の体格を合わせたメスを用いた。ドナーを BALB/c、レシピエントを C57BL/6 とした異系 (allogeneic) 移植群と BALB/c から BALB/c への同系 (syngeneic) 移植群を作成した (図1)。

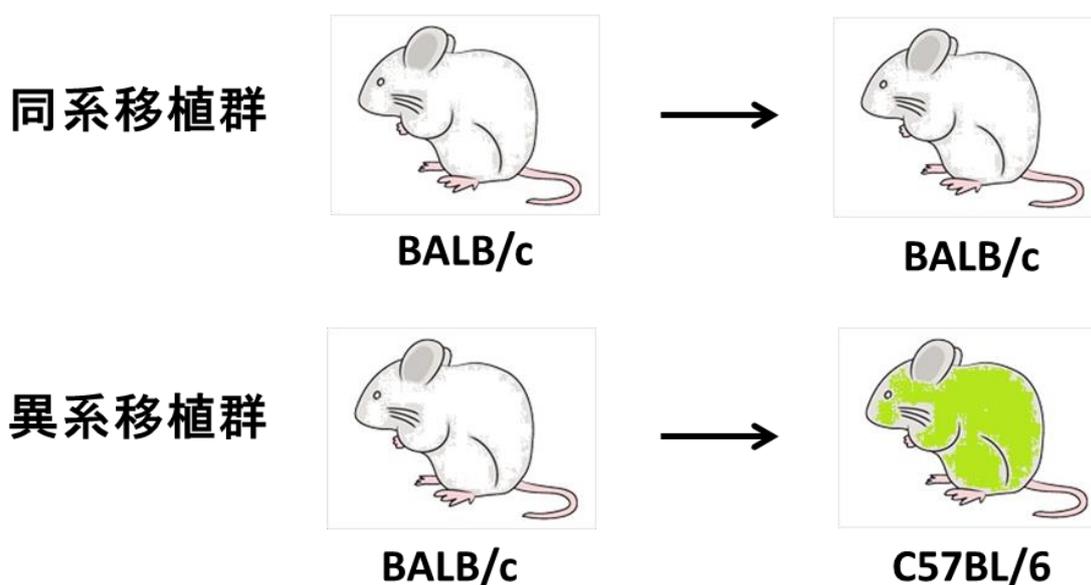


図1. マウス同所性気管移植

具体的方法は以下に述べるように今までの論文報告の通りである^{13,20}。ペントバルビタール 50mg/kg 腹腔内投与により全身麻酔とした後、実体顕微鏡下にマイクロサージャリー用の手術器械を用いて手術を行った。まずドナー手術、仰臥位でマウスを固定し前頸部正中に皮膚切開を置き、唾液腺を正中で分けていき、気管周囲を取り巻く strap muscles に到達、これを切離し気管を確認後、気管鞘を切開した後、気管軟骨輪 7 rings 分の気管グラフトを摘出し、常温の生理食塩水内に保存しておいた。次いでレシピエントに同様の皮膚切開を置き、strap muscles まで到達、ドナーと異なり後で吻合部を被覆するため strap muscles は温存した。Strap muscles を正中で分け、5-0 絹糸を用いて両脇に牽引固定し視野を確保した。気管鞘を切開し、これにより気管の左右両壁に接して走行する反回神経とそれに伴走する血管を気管から離した。細い血管から出血した際は綿棒による圧迫により止血を得た。甲状軟骨より 1-2 rings 尾側のレベルで気管を全切開しグラフトを間置するように両端を端々吻合した。吻合は 10-0 ナイロン糸を用いて両端単結節 3 針ずつ行った。血液等の分泌物が一度気管に入ると吸引は不可能なため周囲の分泌物は適宜綿棒により除去しながら行った。図 2 に吻合後の写真を示す。吻合による狭窄が無いことを確認した後、strap muscles の絹糸固定を外して元に戻すことにより吻合部を被覆した。皮膚を 5-0 絹糸で結節縫合し、手術を終了した。気管移植操作中はレシピエント独自の尾側気管断端からの自発呼吸で呼吸は維持されるため人工呼吸器を要さなかった。術後、レシピエントをランプにより加温

した。ドナーの皮膚切開からレシピエントの手術終了までの所要時間は約 25 分間であり、移植片である気管の常温生理食塩水内での保存時間は5分程度であった。



図2. 同所性気管移植吻合後（実体顕微鏡像）
5-0 絹糸（黒）にて strap muscles を左右に牽引
グラフト間置し、10-0 ナイロンで両端吻合

② 免疫組織学的検討

マウス同所性気管移植術後2日目～12日目、14日目、28日目にレシピエントを安楽死させ、グラフト採取した。採取後はただちに OCT コンパウンド (optimal cutting temperature, Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan)内にグラフトを包埋しドライアイス上で凍結、 -80°C で保存した。各病日につき異系移植グループ3例、同系移植グループ3例ずつ作成した。すべてのグラフトにおいてヘマトキシリン・エオジン染色 (H&E 染色) を行い組織学的な経時的変化を検討した。

また、上皮系マーカーとして E-cadherin (M108, Takara Bio, Shiga, Japan) を、間葉系マーカー（の中でも fibroblast のマーカー）として Alpha smooth muscle actin (α SMA) (C6198, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)と S100A4 (別名 Fibroblast-specific protein1: FSP1) (ab27957, Abcam, Cambridge, UK)を選択し、これらに対する特異的な抗体を用いて上皮系マーカーと間葉系マーカーの上皮・

上皮下における発現を免疫染色を用いて経時的に検討した。また EMT の関与を検討するため EMT 関連転写因子である Zeb1 (HPA027524, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) も免疫染色した。染色は蛍光免疫組織染色法を選択した。凍結保存したグラフトを薄切し、シランコーティングスライド (513618, MUTO PURE CHEMICALS, Tokyo, Japan) 上に 5 μ m 切片を作成、乾燥後に 4%パラホルムアルデヒド (163-20145, Wako, Osaka, Japan) で 10 分間固定 (4°C) し、トリス緩衝生理食塩水 (Tris buffered saline : TBS) で 5 分間 \times 3 回洗浄、ブロッキング剤 (BROCKACE, DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan) を散布し室温で 1 時間ブロッキング後、E-cadherin \cdot α SMA \cdot S100A4 各々に対する一次抗体をかけ、37°C で 40 分間インキュベートした。 α SMA に関しては一次抗体そのものが蛍光色素 (Cy3) で標識してあるものであったため二次抗体は不要であった。 α SMA 単染色の際は一次染色後に核染色のための DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride, D1306, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を散布し 2-3 分インキュベート、TBS で 5 分間 \times 3 回洗浄後に蛍光用封入剤 (S3023, Dako, Glostrup, Denmark) で封入した。それ以外のものに関しては、一次抗体反応後、TBS で 5 分間洗浄を 3 回施行し、蛍光標識二次抗体をかけて 37°C、40 分間インキュベートした後、DAPI にて核染色を行い TBS 洗浄後封入した。すべての抗体、試薬は購入したものを使用した。蛍光染色したスライドは遮光にて取扱い、封入翌日にマニキュアでカバーガラスを囲って

更なる乾燥を予防し、2 - 3 日以内に蛍光顕微鏡にて観察した。

③ 血中 TGF- β 1 の測定

ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) 法を用いて血中の TGF- β を測定した。マウス同所性気管移植術後 4 日目、7 日目、10 日目、35 日目それぞれにおいて異系移植群・同系移植群 n=3 ずつ血液採取した。ジエチルエーテル吸入麻酔下に心臓採血し、採取した血液を 2 時間室温で静置後、20000rpm で 20 分間遠心、上清を採取し、TGF- β 1 測定キット (Quantikine ELISA MB100B, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いてサンドイッチ法で反応させ、マイクロプレートリーダーで測定した。計測した吸光度から濃度を算出した。

④ 上皮細胞採取と PCR

採取した気管グラフトから上皮細胞を採取し、逆転写 Polymerase chain reaction (PCR) の手法を用いて α SMA や E-cadherin の発現の定量化を行った。グラフトの内腔を細い棒状の物で機械的に擦過し、上皮細胞を採取する方法を選択した。まず通常のマウス気管において上皮細胞が採取可能かどうか試行した。具体的には、7 気管輪の長さのマウス気管を縦方向に切開し、細い標本ピンの頭で内腔を数回擦過、これを氷上の生理食塩水内に懸濁し遠心し集めたものを OCT コンパウンド内に凍結包埋し、5 μ m 切片を作成、H&E 染色し観察した。観察により上皮細胞採取が可能な方法であると判断後、グラフトの上皮細胞採取を行った。上皮細胞から PCR までの工程は、細胞採取→RNA 沈殿→cDNA に逆転写→PCR という

通常のステップでは細胞数が減少する可能性があったため、一つステップを減らす目的で、RNA を一旦沈殿させるという工程なしで浮遊細胞から cDNA を作成するキット (18080-300, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用した。このキットを用い、マウスの上皮細胞から作成した cDNA を PCR にかけてハウスキーピング遺伝子である Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) とともに α SMA や E-Cadherin の発現を測定した。同所性気管移植後 7 日目のマウス (異系移植群と同系移植群) のグラフトにおいて計 5 回 (各回、異系移植群 n=2、同系移植群 n=2) 上皮細胞の PCR を行った。

1.2. 結果

① 移植気管の経時的変化 (H&E 染色での観察)

異系移植群においては、術後 4 日目からグラフト全体に炎症細胞浸潤が起こり、術後 7 日目には図 3 (E) に認めるように最も激しい炎症細胞浸潤を認めた (n=3/3)。上皮は炎症細胞により細胞が非常に密な状態となり、上皮は著しい偽重層化の状態を呈した。術後 8 日目以降、炎症の沈静化とともにグラフト内腔の上皮細胞が剥がれ落ちる時期があり (図 3 (F))、最終的に術後 28 日目に上皮は一層の扁平な状態となり、上皮下には線維化が出現した (図 3 (G)) (n=3/3)。上皮の著しい形態変化の後に上皮下の線維化が完成するという経過を示した。

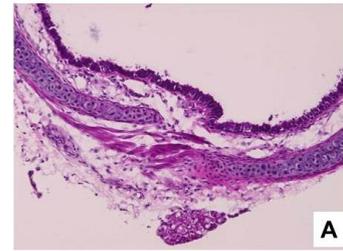
図3. マウス同所性気管移植後の経時的変化(H&E染色、すべて倍率200倍)

(A) 正常なマウス気管 (BALB/c)

(B,E) 術後7日目のグラフト、異系群(E)において著しい炎症細胞浸潤と上皮の偽重層化を認める。

(C,F) 術後10日目のグラフト、異系群(F)では部分的に上皮が剥離。

(D,G) 術後28日目のグラフト、同系群では正常気管と著変ないが、異系群(G)では扁平な上皮と上皮下の肥厚、線維化を認める。



	同系移植群	異系移植群
Day 7	B	E
Day 10	C	F
Day 28	D	G

② 免疫染色

α SMA染色を経時的に観察したところ、異系移植群の術後7日目において上皮内に間葉系マーカーである α SMA発現細胞を認めた (n=3/3)。この上皮内 α SMA陽性細胞は術後6日目や8日目にも認めたが、最も炎症が著しい時期である術後7日目が多であった。同じく間葉系マーカーである S100A4 も上皮内に発現を認めたがこれは特徴的な経時変化を示さなかった。いずれもコントロールである同系移植群においては上皮内陽性細胞を認めなかった。(図4)

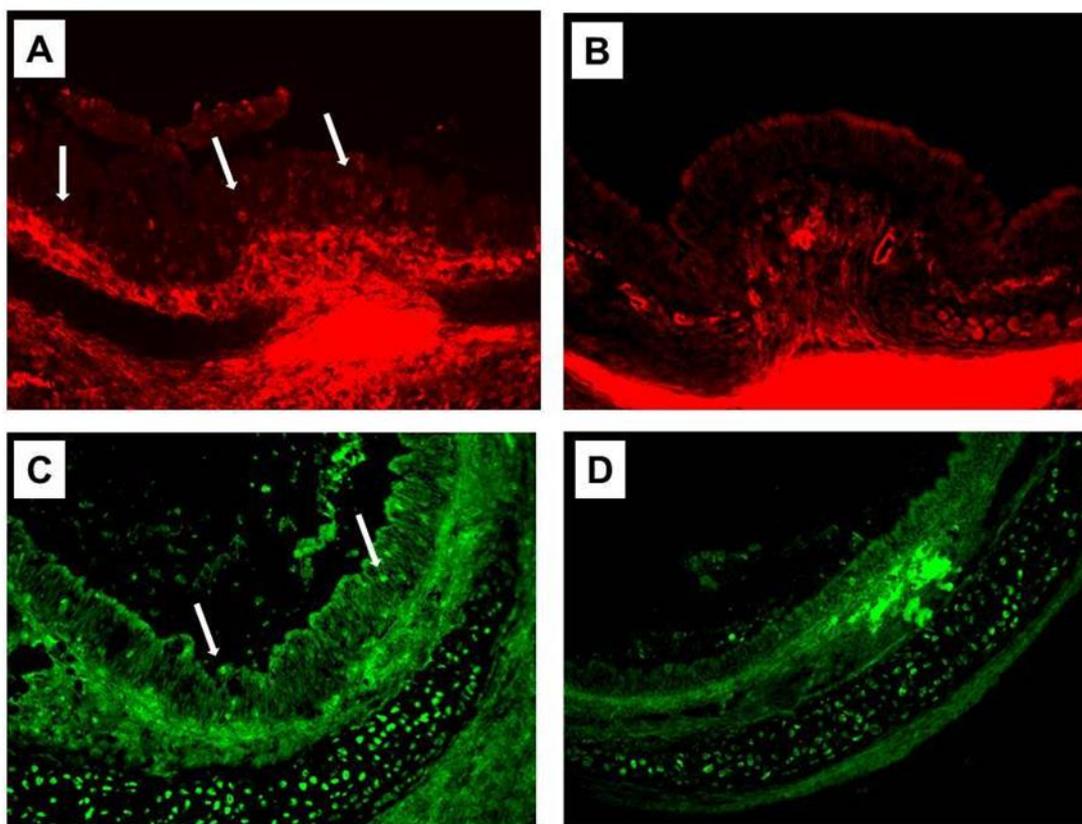


図4. 同所性気管移植後7日目の免疫組織染色。(すべて倍率200倍) (A) 異系移植後7日目、多くの上皮細胞に α -SMA(赤)発現を認める。(B) 同系移植後7日目、上皮内 α -SMAは認めない。(C) 異系移植後7日目、S100A4(緑)の上皮内発現を多く認める。(D) 同系移植後7日目、S100A4発現は認めない。

次に間葉系マーカー α SMA と上皮系マーカー E-cadherin を同時二重染色し、これを観察したところ、異系移植群において、術後 7 日目の α SMA 陽性細胞では E-cadherin の発現が減弱していた (n=3/3)。(図 5)

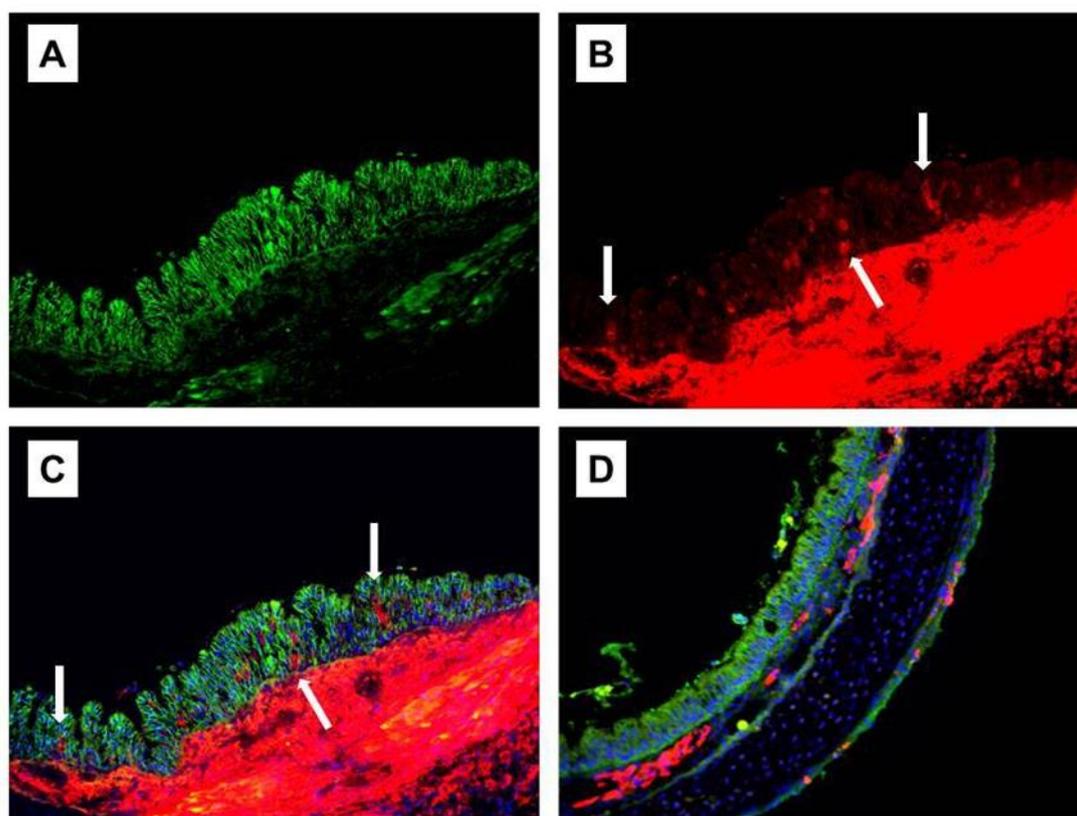
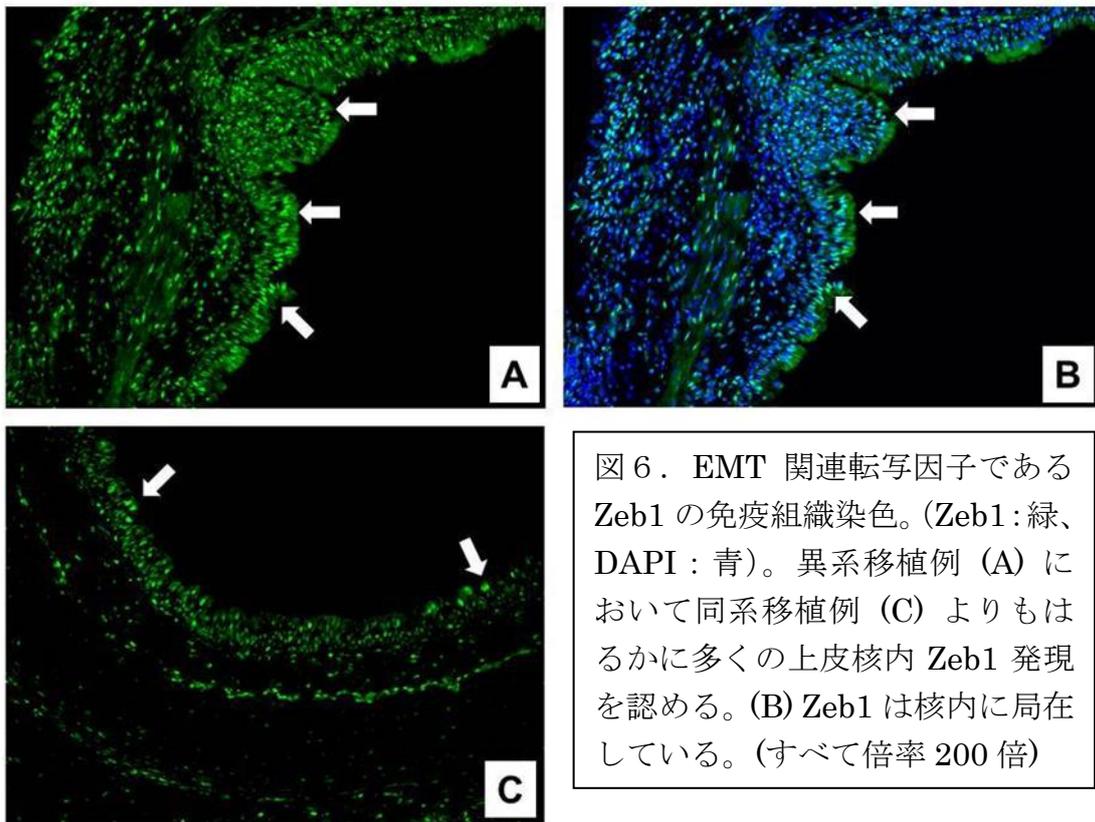


図 5 . 同所性気管移植後 7 日目の免疫組織染色 (E-Cadherin : 緑、 α -SMA : 赤、DAPI : 青)。異系移植の 1 例 (A, B and C)、同系移植例(D)。(A) E-Cadherin は多くの上皮細胞に発現している。(B) 異系移植例では α -SMA も上皮内に多く発現している。(C) E-Cadherin と α -SMA の同時染色、 α -SMA 陽性細胞においては E-Cadherin の発現が減弱している。(D) 同系移植においては上皮内 α -SMA 発現は認めない。(すべて倍率 200 倍)

次いで EMT 関連転写因子である Zeb1 の蛍光免疫染色を経時的に観察するとこれは術後第 2～4 日目に上皮細胞核内発現を多く認めた。異系移植群と同系移植群どちらにおいても発現を認めたが同系移植群より異系移植群の方に明らかに多くの発現を認めた。(図 6)



③ TGF- β 1 の測定

ELISA 法で測定した TGF- β 1 の血中濃度は図 5 のようになった。各病日においてばらつきが大きく、有意な傾向を認めなかった。

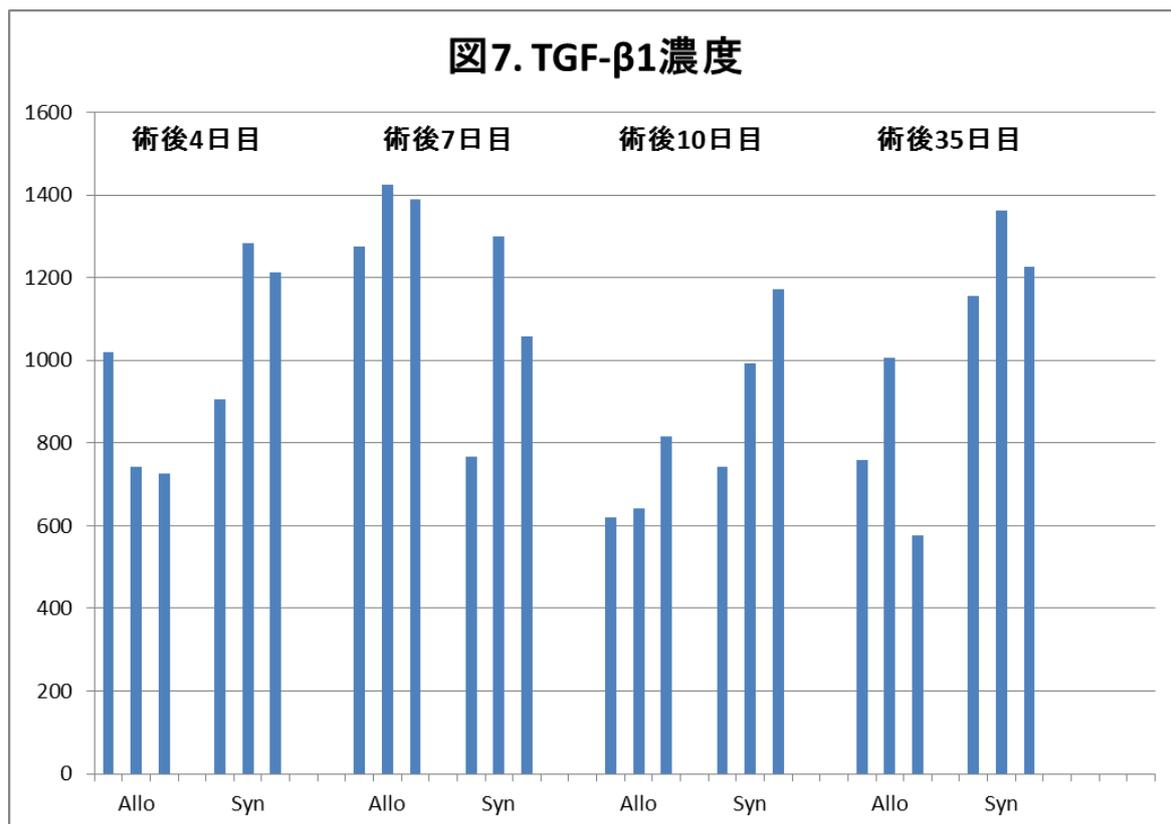


図7. ELISA 法にて測定した TGF-β1 の血中濃度
(Allo : 異系移植群、Syn : 同系移植群)

④ 上皮細胞採取と PCR

通常のマウス気管より上皮細胞を採取し、H&E 染色後観察したところ図6のような線毛上皮細胞の集塊を認め、擦過法により上皮細胞採取が可能であると判断したが、実際に OTT 術後 7 日目のグラフトから上皮細胞採取し cDNA を合成後、PCR を施行したもののハウスキーピング遺伝子である GAPDH においても検討に値すると考えられる Ct 値 (PCR 増幅産物がある一定量に達したときのサイクル数) が得られなかった。

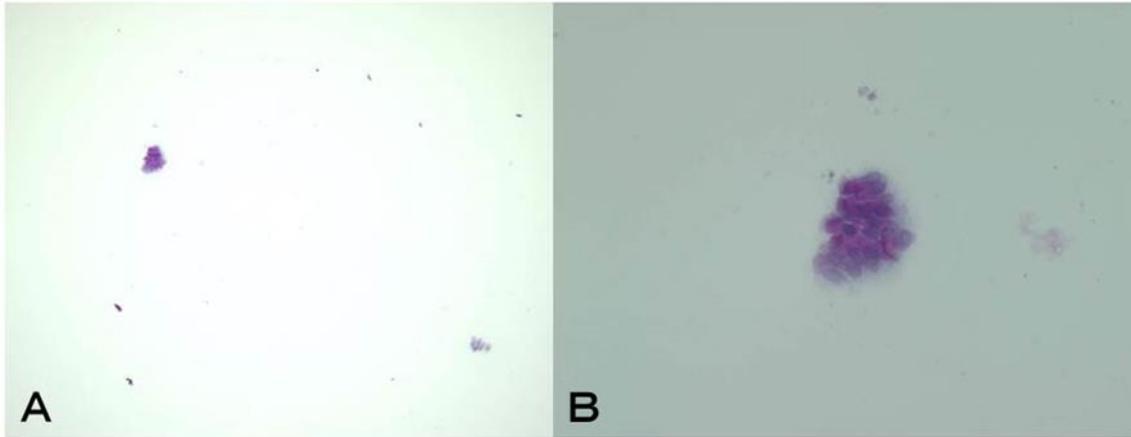


図8. 擦過にて採取したマウス気管上皮細胞。H&E 染色。(A) 100 倍にて細胞塊が散見される。(B) 400 倍で観察すると線毛を有する細胞の集塊を認め、気管内腔の上皮線毛細胞の形態に相当する。

1.3. 考察

異系移植片は、著しい炎症細胞浸潤と上皮の形態変化の後に上皮下に細胞外基質が蓄積する線維化を呈した。上皮下の線維化に先立ち上皮の劇的な変化が起こっており、一連の変化は関連していると考えられることから、上皮が線維化に先立つ一連の変化の誘因となっている可能性が考えられる。傷害を受けた上皮からのなんらかのシグナルにより線維化を引き起こす線維芽細胞が呼び寄せられる可能性や、上皮そのものが線維性物質の供給源である線維芽細胞になる上皮間葉移行が起こっている可能性があると推測される。

そこで免疫組織染色を用いて、移植気管の上皮細胞における上皮系・間葉系タンパク質の発現の変化を経時的に観察したところ、異系移植群において間葉系マー

カーである α SMA が上皮細胞内に発現する時期があることが判明した。 α SMA は間葉系細胞である線維芽細胞や筋線維芽細胞に発現するとされるタンパク質であり、これらのマーカーとして広く利用されている。 OTT モデルにおいて上皮内の α SMA の発現時期は、グラフトの炎症が始まりそれが最もピークとなる術後 7 日目の時期であった。そしてこの α SMA 陽性細胞においては上皮系マーカーである E-cadherin の発現が減弱もしくは消失していた。 MHC の異なる気管を移植したことにより、急性期反応として炎症細胞が集簇し、なんらかのシグナルの結果、上皮細胞のうちのいくつかが上皮系マーカーである E-cadherin の発現を失い間葉系の α SMA の発現を獲得したと考えられる。しかし α SMA 陽性細胞が炎症細胞浸潤の著しい時期に出現することから、この α SMA 陽性細胞は元々の上皮細胞に由来する細胞では無く、炎症細胞である可能性も考えられる。術後 7 日目のグラフトにおいて連続切片を作成し、他の上皮系マーカーである Cytokeratin 等の染色や、炎症細胞特異的なマーカーを染色することで α SMA 陽性細胞が元の上皮細胞であるかどうかを明らかにできる可能性がある。

次に α SMA や E-cadherin の発現を制御している転写調節因子は何かと考え、E-cadherin の転写を制御する Zeb1 の免疫組織染色を行ったところ、術後 7 日目の変化の前、術後 2 ~ 4 日目にかけて上皮細胞の核内に Zeb1 が出現することが判明した。 Zeb1 は転写制御因子であるため機能する際は核内に移行する。 Zeb1 の核内移行はこれが E-cadherin の転写制御因子として働いていることを示すと考え

らえるが、この Zeb1 は特に Allograft において上皮以外にも発現を認めており、EMT の指標と考えるには不十分な結果であった。一方、Zeb1 はコントロール群である同系移植群においても発現していたがこれにはグラフトの移植に伴う虚血の影響が考えられた。虚血そのものも上皮が変化を起こす契機になる可能性を示す報告がある⁵⁸。

一方 α SMA と同じく線維芽細胞のマーカーとされる S100A4 であるが、これも異系移植群において上皮内に発現を認めたが、有意な経時的变化を認めなかった。

S100A4 は別名 fibroblast-specific protein1 という名を持つように線維芽細胞特異的とされたタンパク質であったが、最近では fibroblast 特異的では無いという報告があり^{59,60}、EMT の指標とするには不適であったと考えられる。S100 タンパク質は細胞の運動能に強く関与しマクロファージにも発現しているとされ、今回のモデルで上皮内に認めた S100A4 陽性細胞は炎症細胞の可能性もあると考えた。

上皮間葉移行のマーカーを選択する際、上皮系マーカーにおいてはこれまでの研究・報告から明らかになっていることの多い E-cadherin を迷わず選択できたが、間葉系マーカーは E-cadherin ほどにメカニズムが解明されたものが存在せず選択に難渋した。文献での検討の結果、これまでマウス気管移植モデルにおいて比較的高頻度に利用されており線維芽細胞に特異度が高いと考えられかつ良い抗体が入手可能であった α SMA をまず選択し⁶¹、ついで Fibroblast-specific protein 1 と言われる S100A4 を選択した^{38,62}。 α SMA においては有意な結果を得たが、

S100A4 に関しては有意な結果を認めなかった。S100A4 は線維芽細胞のみならず上皮間葉移行の指標として適するものではないと考えられる。

上皮間葉移行の最も重要なシグナルは TGF- β である⁵⁵。TGF- β のうち TGF- β 1 に関して免疫組織染色を施行したが、有意な結果が得られなかった。一方、ELISA 法による血中 TGF- β 1 の測定に関しても、今回の検討では異系移植群においてもなんらの経時的傾向も認めなかった。各グループの症例数を増やすことで傾向が見えてくる可能性はあるが、TGF- β は血小板に多く含まれるとされることから、血清採取の際には細心の注意が必要であり、今回は血小板からの TGF- β がいくつかのサンプルで混入した可能性があると考えた。また TGF- β 刺激により EMT が誘導されるという報告は多いものの^{53,55} 臓器レベルに EMT が起こる際に血中 TGF- β が上昇するという明らかな報告は無く、EMT が起こるかどうかは血中 TGF- β レベルに依存しない可能性がある⁶³。TGF- β の検討は今後の課題である。

以上、マウス同所性移植気管モデルにおける組織学的検討の結果、上皮内での間葉系マーカー α SMA の発現とその細胞における上皮系マーカー E-cadherin の減弱があきらかとなった。次にこの組織学的な経時的変化を別の手法において定量化したいと考え、擦過により採取した上皮細胞の PCR を行ったのだが、検討に値する結果を得られなかった。これは収集可能な上皮細胞数が非常に少ないためと考えられる。気道の上皮細胞のみを収集する方法はいくつか報告があるが^{64,65}、とりわけ小動物においてはこれが手技上難しく、確立された方法が存在しない。

文献上報告のある方法を比較検討した結果^{64,65}、グラフトの内腔を細い棒状の物で機械的に擦過し、上皮細胞を収集する方法を選択したのだが、この方法は断念せざるを得なかった。マウス上皮細胞の収集方法は今後の研究課題の一つとして残った。

1.4. 結論

マウス同所性気管移植における組織学的検討から、異系移植片が線維化に至る過程において、上皮間葉移行が線維化に先行して起こる可能性が示唆された。

第2章 移植気道の線維化における線維芽細胞の起源：GFP マウスを用いた検討

グラフトの線維化過程には上皮間葉移行が関与する可能性が示唆されたため、引き続き線維芽細胞の由来（ドナーあるいはレシピエント）を検討した。先述したように線維芽細胞の起源には多くの三つの説があるが、上皮間葉移行が関与するのであれば線維芽細胞は基本的にはドナー由来と考えられ、また骨髄由来の細胞が線維芽細胞となるのであればそれはレシピエント由来である。局在する線維芽細胞もしくはその前駆細胞が関与する場合はどちらに由来するとも考えられるが、第1章の結果において上皮間葉移行の関与が示唆されたことから、移植気道の線維化における線維芽細胞はドナー由来の可能性が高いと仮説を立てた。ドナーとレシピエントどちらに由来するのかを明らかにすることは線維芽細胞の起源を特定する重要なステップである。ドナー由来細胞とレシピエント由来細胞を区別する方法としては、遺伝子導入により全身にGFPを発するGFPマウスを使用した。まずマウス同所性気管移植における検討を行い、次いでマウス異所性気管移植においても同様の検討を行った。両者はマウス気管移植という点では共通だが、同所性と異所性という異なるモデルであり、両者の結果を総合して判断することが重要と考えられた。例えば、同所性気管移植においては移植気管の再上皮は両吻合部から入り込んだレシピエントの上皮細胞が関与するという説があるが⁶⁶、これが正しいとするならば、吻合部から入り込んだレシピエントの上皮細胞が上

皮間葉移行を起こす可能性も否定できない。異所性気管移植においては吻合部が存在しないため線維化の中の線維芽細胞がドナー由来であれば上皮間葉移行の可能性が強く示唆されることとなる。これら二つの気管移植モデルに GFP マウスを用いて線維芽細胞の由来を組織学的に検討した。

2.1. 方法

マウスは第 1 章と同じく日本エスエルシー株式会社より購入したマウスを使用した。GFP マウスは日本エスエルシーから購入した C57BL/6 系統を使用した⁶⁷。

① マウス同所性気管移植

第 1 章と同じ手技で同所性気管移植を行った。同系移植群は第 1 章と同じく

BALB/c (Balb) から BALB/c への組み合わせ、異系移植群は BALB/c から全身に GFP を発現する GFP 遺伝子導入マウス C57BL/6-Tg (B6-Tg) への組み合わせの

グループ A と、GFP マウス (B6-Tg) から BALB/c への組み合わせのグループ B

の二つのグループを作成した。計 3 グループ、それぞれ n=5 ずつ作成し、同所性

気管移植術後 28 日目に安楽死させ気管グラフトを採取、採取したグラフトはただ

ちにドライアイス上で OCT コンパウンド (optimal cutting temperature, Sakura

Finetek Japan, Tokyo, Japan) 内に凍結包埋した。凍結検体は -80°C にて保存した。

② マウス異所性気管移植

同所性移植と同じく、コントロールとして同系移植群 BALB/c から BALB/c への

移植を行い、異系移植群としては BALB/c から B6-Tg へのグループ C と B6-Tg から BALB/c へのグループ D の計 3 グループ行った。各グループで n=3 ずつ異所性気管移植を行い術後 28 日目にグラフト採取した。具体的な方法は以下のように既報告に従った^{13,21}。週齢を合わせたメスの組み合わせを用いて、ペントバルビタール 50mg/kg 腹腔内投与により全身麻酔とした後、同所性移植同様にドナーからグラフトである気管を 7 気管輪相当の長さ採取、生理食塩水内にグラフトを保存しておきレシピエントの手術に移行。レシピエントの前頸部正中に皮膚切開を置き、グラフトを皮下に留置し、5-0 絹糸で皮膚を縫合、手術を終了した。ドナー手術開始からレシピエント手術終了までの所要時間は約 10~15 分であり、グラフトの常温生理食塩水内での保存時間は 5 分未満であった。術後 28 日目にレシピエントを安楽死させ、皮下からグラフトを摘出、ドライアイス上で OCT コンパウンド内に凍結包埋、-80℃で検体を保存した。

③ 免疫組織学的検討

すべての標本において H&E 染色を行った。

免疫染色も第 1 章と同様に行った。凍結標本からシランコーティングスライドガラス (513618, MUTO PURE CHEMICALS, Tokyo, Japan) 上に 5 μ m 切片を作成、乾燥後に 4%パラホルムアルデヒド (163-20145, Wako, Osaka, Japan) で 4℃、10 分間固定、TBS で 5 分間洗浄を 3 回施行後、ブロッキング剤 (BROCKACE, DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan) を散布し室温で 1 時間インキュベート後、

α SMA、GFP (G10362, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 各々に対する一次抗体を混合してふりかけ、37°Cで40分間インキュベートした。 α SMAに関しては第1章で使用したのと同じ一次抗体そのものが蛍光色素で標識してあるものを使用した。TBSで5分間洗浄を3回施行後、抗GFP抗体に対する蛍光標識二次抗体をかけて37°C、40分間インキュベート、DAPIにて核染色を行いTBS洗浄後、蛍光用封入剤で封入した。蛍光染色したスライドは遮光にて保存し、乾燥後、マニキュアでカバーガラスの四辺を囲った後、2-3日以内に蛍光顕微鏡にて観察した。

④ 結果の統計

同所性移植においては上皮下の線維化中の α SMA陽性領域の中のGFP陽性領域を計測、異所性移植においては内腔の α SMA陽性領域内のGFP陽性領域をImage J Software (version 1.4.3.67, National Institute of Health, USA) を用いて計測した。測定結果からSPSS 11.0 (Dr. SPSS II for Windows, standard version, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を用いて箱ひげ図を作成した。

⑤ PCR法による血中Fibrocyte出現時期の同定

Polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて線維芽細胞の前駆細胞であるFibrocyteの血中への出現時期を推定した。OTT術後のマウスの血液を採取し、RNAを抽出、逆転写によりcDNAを合成、リアルタイムPCR法でマウス血液中のCollagen1の測定を行い、Fibrocyteの上昇時期を推測した。具体的には以下に

記載の通りである。マウス同所性気管移植術後 4 日目、7 日目、10 日目、28 日目を評価日とし、各評価日につき異系移植群 (BALB/c→B6) n=3、同系移植群 (BALB/c→BALB/c) n=3 として OTT を施行し、全採血を行った。少量の血液から RNA を抽出可能なチューブとキット (76544, 73224, QIAGEN, Venlo, Netherlands) を使用し RNA を抽出した後、逆転写により cDNA を合成、Fibrocyte に発現する Collagen 1 とハウスキーピング遺伝子である GAPDH のリアルタイム PCR を施行した。

⑥ フローサイトメトリーによる Fibrocyte の検出

マウス同所性気管移植術後 10 日目の血液を用いてフローサイトメトリーを行った。白血球に発現する表面マーカー CD45 が陽性でかつ細胞内に存在する Collagen 1 が陽性の細胞を Fibrocyte であるため、これを検出することを試みた。マウス OTT の異系移植と同系移植を行い (それぞれ n=10)、術後 10 日目に安楽死させ全採血し、フローサイトメトリーにかけた。フローサイトメトリーは文献上一般的な方法で行った^{26,30}。具体的には、2mmol/l EDTA 入り溶液に採血した後、ACK buffer を用いて溶血し、洗浄後、蛍光標識付の抗 CD45 抗体 (103108, BioLegend, San Diego, USA) で 4°C、40 分間染色した後、細胞内抗原認識のためのキット (A07803, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いて細胞に穴をあけ、抗 Collagen 1 抗体 (600-401-103, Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA, USA) を用いて 4°C、40 分間反応させた。抗マウス Collagen1 抗体は蛍光標識付のものが購入

不可能であったためさらに蛍光標識二次抗体を用いて 4℃、40 分間反応させた後、フローサイトメーターで測定した。

2.2. 結果

① 同所性気管移植

異系移植群ではどちらの組み合わせにおいても同等に術後 28 日目に上皮下の線維化を認めた (図 9)。

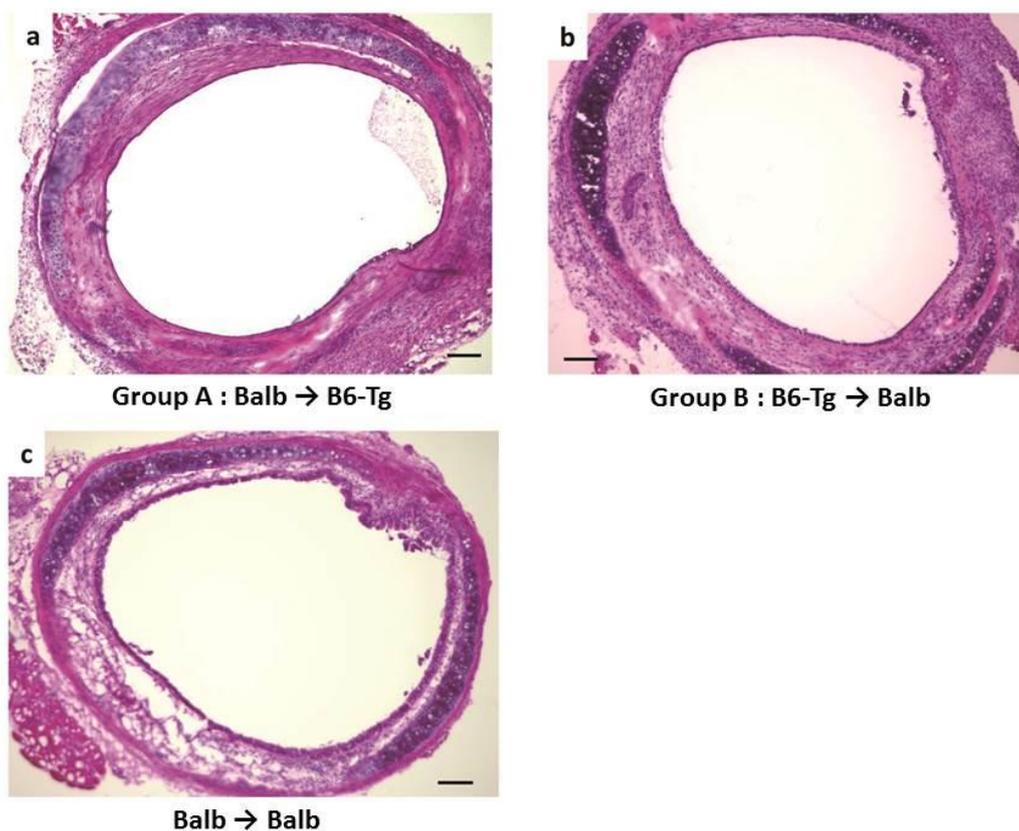


図 9. 同所性気管移植後 28 日目の H&E 染色。上皮下の線維化は Group A (a) においても Group B (b) においても認める。同系移植例においては認めない(c)。

BALB/c から B6-Tg への移植群では上皮下の α SMA 陽性細胞はほとんどが GFP 陽性であり (n=5/5) (図 1 0)、逆に B6-Tg から BALB/c への移植群では上皮下の α SMA 陽性細胞は GFP 陰性であった (n=5/5) (図 1 1)。

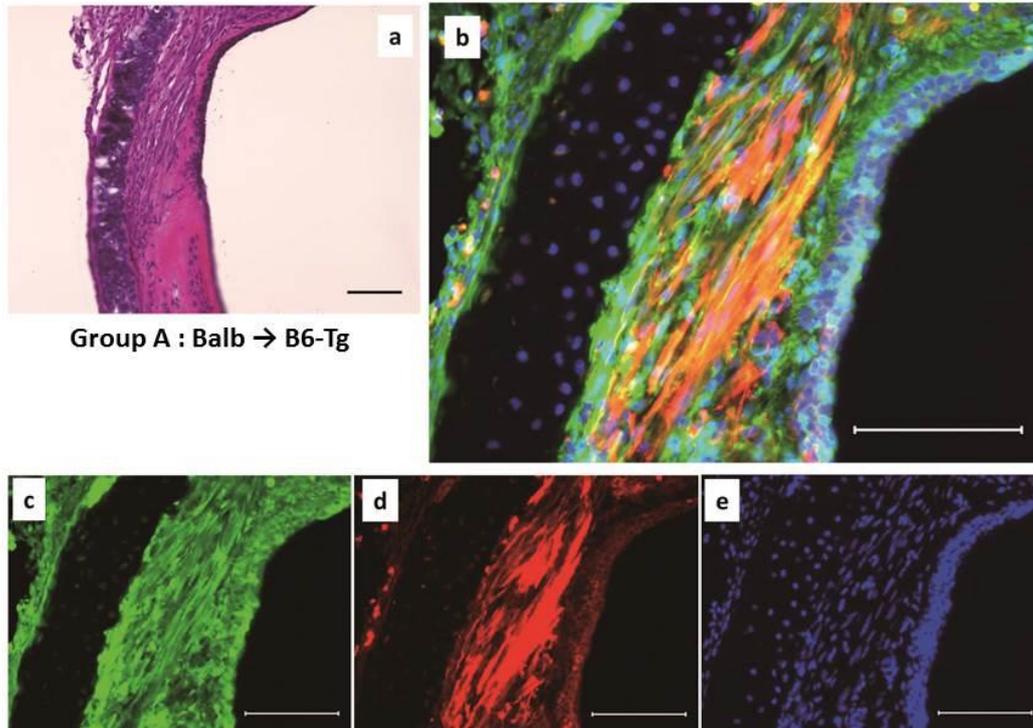


図 1 0. BALB/c から B6-Tg への同所性気管移植後 28 日目の H&E 染色 (a) と免疫染色 (α -SMA : 赤、GFP : 緑、DAPI : 青)。(a) 上皮下の線維化を認める。(b) 上皮下の α -SMA 陽性領域は GFP 陽性である。(スケールはすべて 100 μ m。)

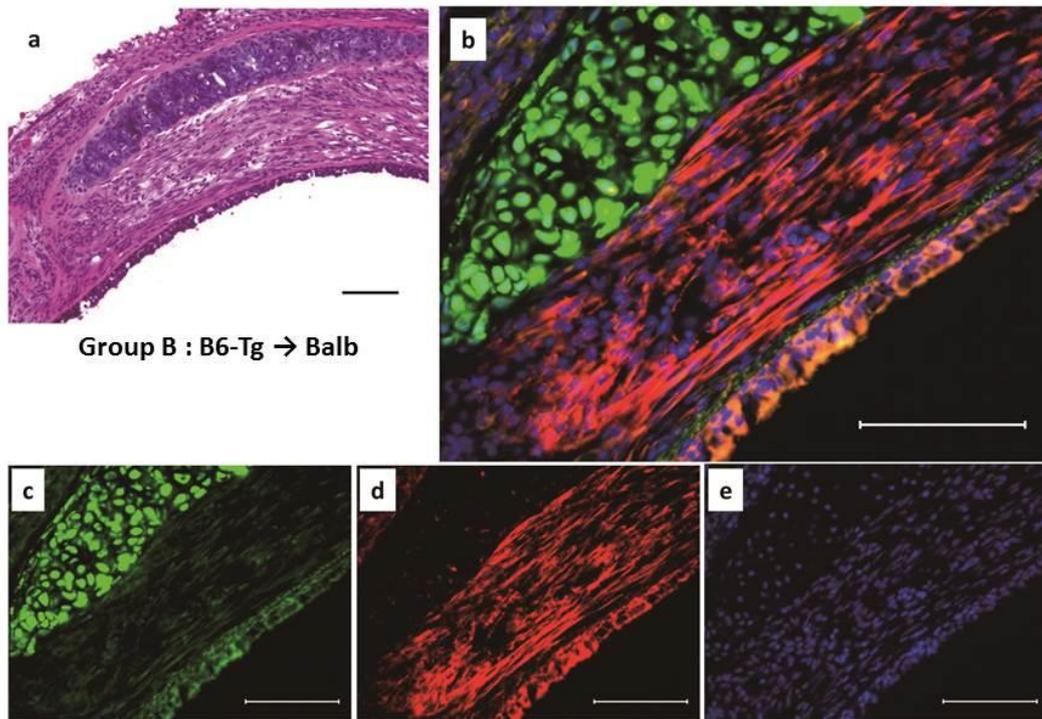


図 1 1 . B6-Tg から BALB/c への同所性気管移植後 28 日目の H&E 染色 (a) と免疫染色 (α -SMA: 赤、GFP: 緑、DAPI: 青)。(a) 上皮下の線維化を認める。(b) 上皮下の α -SMA 陽性領域は GFP 陰性である。(スケールはすべて 100 μ m。)

計測した結果は図 1 2 に示した通りであり、BALB/c から B6-Tg への移植群グループ A では α SMA 陽性細胞の 67~99% が GFP 陽性であり、逆の B6-Tg から BALB/c への移植群グループ B では α SMA 陽性細胞の数%のみ (1.5%~40%) が GFP 陽性であった。

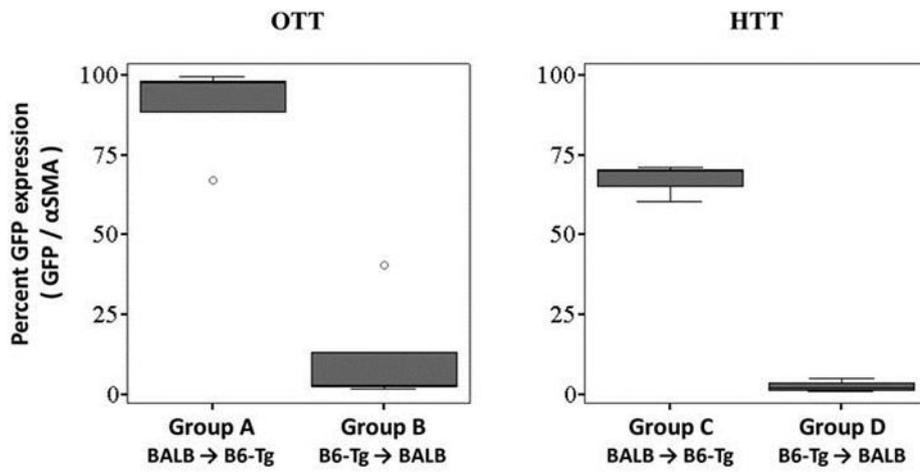


図 1 2 . Image J software を用いて算出した α-SMA 陽性領域に対する GFP 陽性領域の割合。

② 異所性気管移植

異系移植群ではどちらの組み合わせにおいても同等に術後 28 日目には内腔に線維性物質の沈着を認めた (図 1 3)。

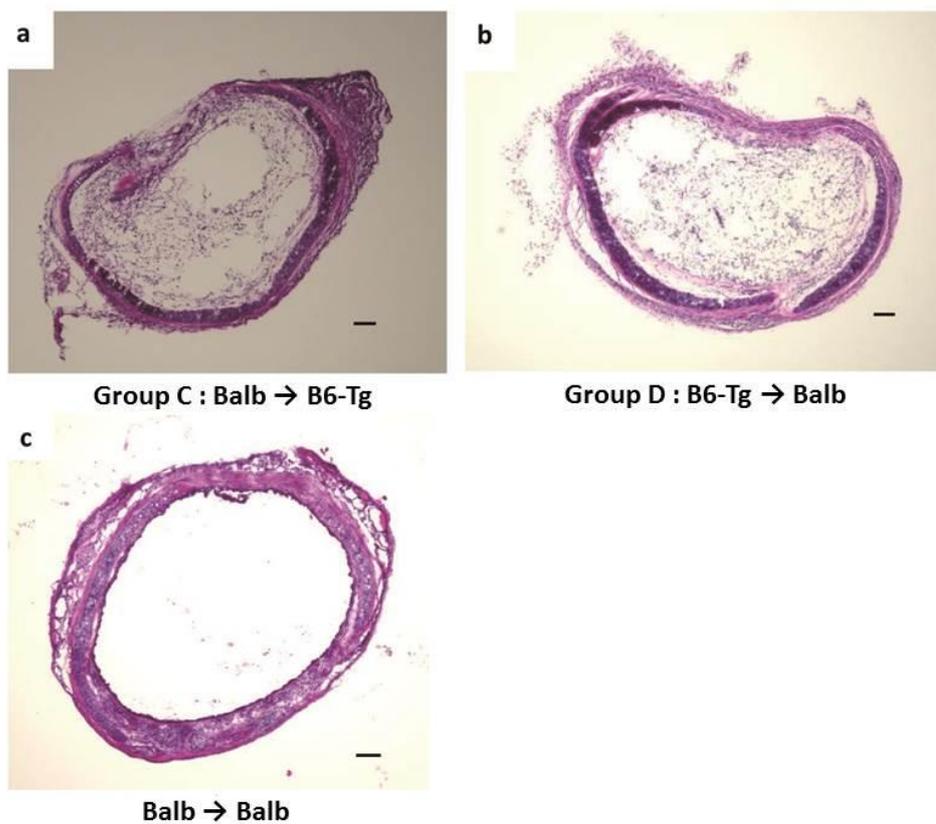


図 1 3 . 異所性気管移植後 28 日目の H&E 染色。内腔の狭窄・閉塞は Group C (a) 、 Group D (b) どちらにおいても認める。同系移植例においては認めない(c)。

BALB/c から B6-Tg への移植群グループ C では内腔の α SMA 陽性細胞の多くは GFP 陽性であり (n=3/3) (図 1 4)、逆に B6-Tg から BALB/c への移植群グループ D では内腔の α SMA 陽性細胞は GFP 陰性であった (n=3/3) (図 1 5)。

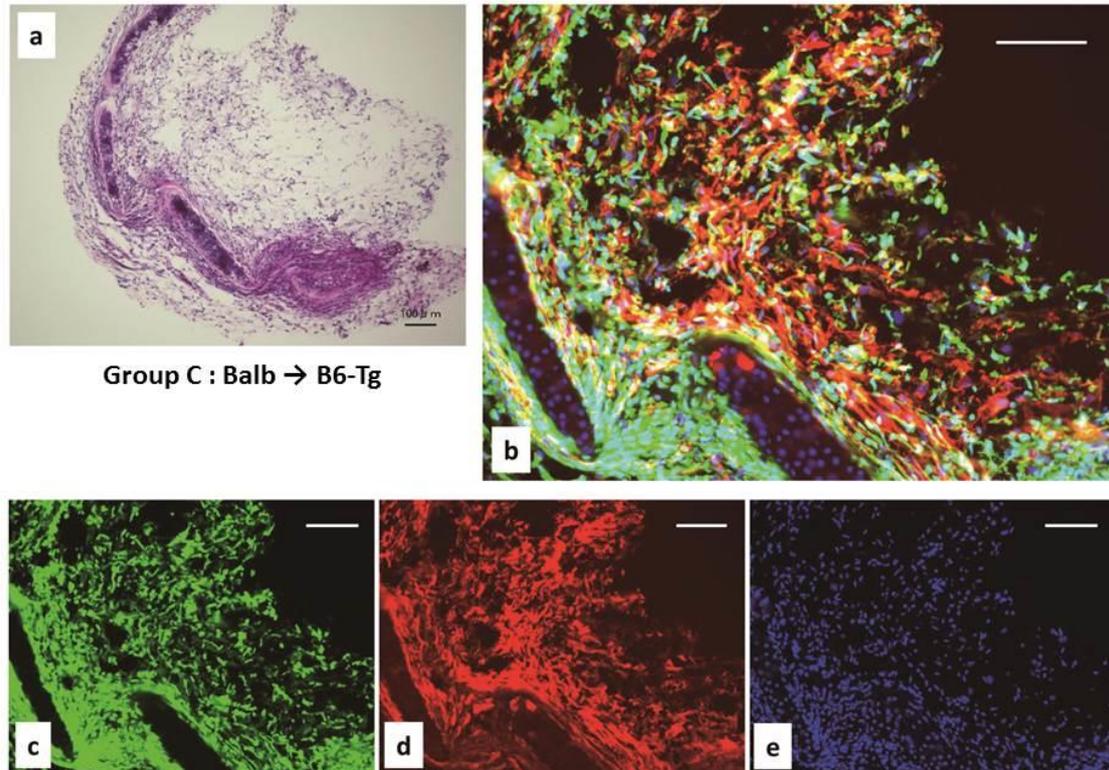


図 1 4 . BALB/c から B6-Tg への異所性気管移植後 28 日目の H&E 染色 (a) と免疫染色 (α -SMA : 赤、GFP : 緑、DAPI : 青)。(a) 内腔の線維性閉塞を認める。(b) 内腔の α -SMA 陽性領域の多くは GFP 陽性である。(スケールはすべて 100 μ m。)

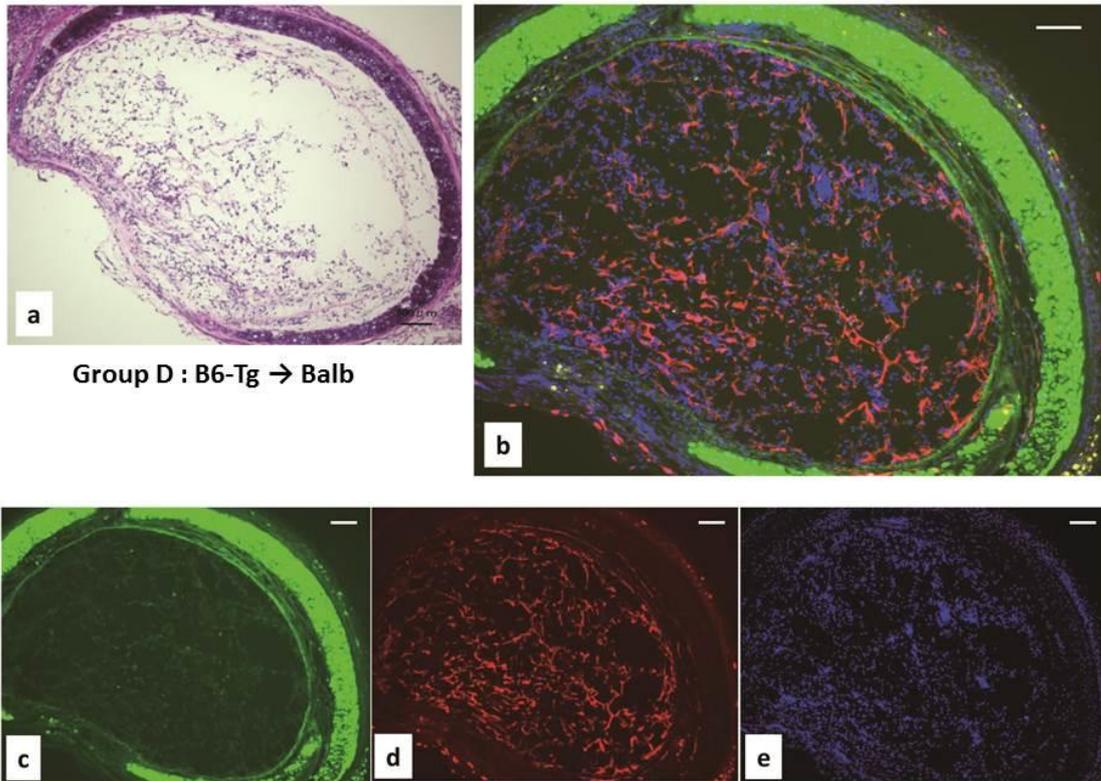


図 1 5 . B6-Tg から BALB/c への異所性気管移植後 28 日目の H&E 染色 (a) と免疫染色 (α -SMA : 赤、GFP : 緑、DAPI : 青)。(a) 内腔の線維性閉塞を認める。(b) 内腔には GFP 陽性細胞をほとんど認めず、上皮下の α -SMA 陽性領域は GFP 陰性である。(スケールはすべて $100\mu\text{m}$ 。)

数値化した結果は図 1 2 に示した通りであり、BALB/c から B6-Tg への移植群では α SMA 陽性細胞のうち 60-70%が GFP 陽性で、B6-Tg から BALB/c への移植群グループ D では内腔の α SMA 陽性細胞のうち GFP 陽性は 5%未満 (0.8~5.0%) であった。

③ PCR 法による血中 Fibrocyte 出現時期の同定

術後 10 日目の Allograft のみにおいて 3 例中の 3 例すべてに Collagen 1 を検出した。他の病日においては Isograft に Collagen 1 陽性を認めたものもあったが、n=3 すべてで Collagen1 陽性であったのは術後 10 日目の異系移植群のみであった。

④ フローサイトメトリーによる Fibrocyte の検出

術後 10 日目の異系移植群においても同系移植群においても血中の CD45 陽性かつ Collagen1 陽性の細胞グループの有意な増加を認めなかった。

2.3. 考察

今回の組織学的検討から、同所性、異所性どちらのモデルにおいても、移植気管の線維化における線維芽細胞のほとんどがレシピエントに由来することが示唆された。つまり線維芽細胞の起源は、上皮間葉移行ではなくレシピエントの骨髄由来細胞もしくは局所に存在する線維芽細胞やその前駆細胞と考えられた。

しかし今回の GFP マウスを用いた検討の解釈においては大きく二つ注意すべき点があると考えられる。まず、入手可能な GFP マウスが C57BL/6 系統しか存在しなかったため、BALB/c から B6 への移植の組み合わせのみでなく、逆の組み合わせ B6 から BALB/c への移植も行ったことである。逆の組み合わせで十分な拒絶現象を示すか否かについては検討の余地があると考えられる。文献的には BALB/c から

B6 への移植ペアの使用例が圧倒的に多く、B6 から BALB/c への組み合わせを用いた実験報告例は散見される程度である⁶⁸⁻⁷⁰。しかし本研究結果からどちらの組み合わせにおいても遠隔期の線維化は同程度に起こることが示されたが、BALB/c と C57BL/6 では遺伝的系統が異なり、BALB/c はアルビノ個体という特殊な個体であることを考えると、逆の組み合わせでは、詳細なメカニズムは異なる可能性は否定できない。

次に、GFP 発現の評価法に関してである。当初 GFP であるので抗体を用いずとも蛍光顕微鏡で観察可能と考えていたが、実際は抗 GFP 抗体を用いることが必要であった。この点からも GFP 発現に関しては偽陰性である可能性があることや、評価の困難さが推測できた。今回用いた GFP マウスは元々岡部らが作成し 1997 年に報告した全身に ubiquitous に GFP を発色するマウスである⁶⁷。当時の技術であり、特定の染色体・遺伝子部位をターゲットにするものでなく、受精卵に遺伝子を注入する方法で作成された。原著報告ではすべての臓器において GFP を発現すると報告されているが、同マウスにおいては臓器により GFP の表出が異なることが 2010 年に De-Fu Ma らにより報告されている⁷¹。De-Fu Ma らは、抗 GFP 抗体を用いて本マウスの種々の臓器を染色し、各臓器の GFP の表出度合を weak、intermediate、strong と分類しているが、これによると気管の上皮細胞において GFP 陽性細胞は sporadic もしくは weak な expression との報告している。全身に GFP 陽性細胞を有するとされるマウスではあるが、組織学的に検討する際は、

臓器や組織・細胞における表出の差を常に考慮すべきなのである。最初、線維化における検討の前に第1章で検出したマウス同所性気管移植の術後7日目の α SMA陽性細胞がドナー由来かレシピエント由来かGFPマウスを用いて明らかにしたいと検討したのだが、De-Fu Maらの報告と同様に、気管上皮は陽性コントロールであるGFPマウスそのものの気管においてもGFPの発現が均一で無く、ばらつきが大きいため上皮を検討するにはこのGFPマウスは不適であると断念した。しかしながら間葉系組織特に筋組織に関してはGFPマウスそのものの気管においてGFPは均一に高発現を認めていたため今回の検討は評価に値すると判断した。GFPマウスを用いた染色結果を検討する際は、染色上GFPが陰性であってもGFPマウス由来の細胞である可能性が残るため、結果の解釈には注意が必要と考えられる。

上記のような結果解釈における注意点はありますが、GFPマウスを用いた本章の結果からは、線維芽細胞の起源はレシピエント由来の細胞であることが示唆された。ではこの線維芽細胞はレシピエントのどこからやって来るのかということが次なる疑問である。レシピエントの骨髄由来細胞であるのか、もしくは局在する線維芽細胞であるのか、である。

近年、序文で述べたように移植気道の線維化過程に、骨髄由来の線維芽細胞前駆細胞であるFibrocyte関与の報告が散見される^{30,31,72}。従ってGFPマウスを用いた検討後、次なる研究のターゲットをFibrocyteと考えた。異系移植片が急性拒絶

を受けた際に産生されるなんらかのシグナルにより骨髄から線維芽細胞の前駆細胞である **Fibrocyte** が血流に乗り移植片へと移行し、線維芽細胞になると仮定した。**Fibrocyte** がどの時点で **Fibrocyte** たる標識 (CD34+ CD45+ Collagen1+ α SMA-) を失い最終的な線維芽細胞 (CD34- CD45- Collagen1+ α SMA+) へ分化するのか²⁹ 確定はしていないが、**Fibrocyte** は血中でフローサイトメトリーという手法により同定されており、マウスの気管移植モデルにおいて **Fibrocyte** が関与すると仮定すれば、線維化の出現に先立ち **Fibrocyte** が血中に出現する時期があるはずである。ではどの時期に **Fibrocyte** が出現するのであろうか。これを明らかにする方法のひとつはマウス気管移植術後、線維化が出現する時期までの連日のマウス血液をフローサイトメトリーにかけることであるが、マウスという小動物においてフローサイトメトリーにかける十分量の血液を連日確保することが困難であったため、フローサイトメトリーの前段階として、PCR 法を用いて **Fibrocyte** 出現の時期を推定した。結果、術後 10 日目の **Allograft** のみにおいて 3 例中の 3 例すべてに **Collagen 1** を検出したことからこれを受けて、術後 10 日目に標的を絞り、白血球に発現する表面マーカー **CD45** が陽性でかつ細胞内に存在する **Collagen 1** が陽性の細胞を **Fibrocyte** として検出することを目的としてフローサイトメトリーを施行したのである。**Fibrocyte** は創傷治癒の過程で出現するため同系移植群においても出現する可能性はあるが、同系移植群に比較すると異系移植群においては有意に血中の **Fibrocyte** は増加すると仮定した。しかしこれにはまず手技上の困難

さがあった。Collagen 1 はそもそも細胞外の構成成分として存在するタンパク質であり、確実に機能するフローサイトメトリー用抗 Collagen 1 抗体とコントロール用 IgG を入手するのが困難であったのである。抗体の選択などの試行錯誤を繰り返し、検討に値する抗体を決定したが、結果として Fibrocyte の検出に至らなかった。既報告³⁰からも Fibrocyte は血中の population が非常に少ないと推測される上に、マウスの血液という少量の検体であったためと考えている。マウスの気管という全身に比するとごく小さな移植片の移植のみで出現する Fibrocyte 量は通常のフローサイトメトリーでの検出では難しい可能性もある。または、異系移植の線維化に関与するレシピエントの骨髄由来細胞は血中では Fibrocyte として存在するのではなく、Fibrocyte よりさらに未分化な状態で存在する可能性や、間葉系幹細胞が関与する可能性も考えられる。そうであれば検出のターゲットとするべきは別の細胞群であったということになる。レシピエントの骨髄由来であっても具体的にどの細胞に由来するのか更なる研究が必要である。

2.4. 結論

GFP マウスを用いたマウス気管移植モデルにおける組織学的検討から、移植気道の線維化を引き起こす線維芽細胞はレシピエント由来であることが示唆された。

考察

移植気道のリモデリングに関して、第1章の検討では上皮間葉移行の関与が示唆されたが、第2章では線維芽細胞はレシピエントの骨髄もしくは局在する線維芽細胞に由来することが示唆された。線維芽細胞の起源の候補として、①上皮間葉移行によるもの（ドナー上皮細胞由来）②骨髄由来細胞（レシピエント由来）③局所の線維芽細胞（レシピエントもしくはドナー由来）の三つが考えられ、これらの中のいずれかだとするならば、第1章は①、第2章は②もしくは③を支持する結果であり、相反する結果のようである。しかしどちらも再現性を認める結果である。第1章と第2章では、結果的に気管移植後の異なる時期に着目したことを考慮すると、第1章の上皮における変化も、第2章の線維化における検討も、移植後の拒絶～線維化という大きな流れにおいて、それぞれ重要な一点を捉えたものだと考える。

第1章の検討において術後7日目前後の炎症細胞浸潤が著しい時期に間葉系マーカーの発現を示す上皮内細胞は全体の上皮細胞の中の少数である。線維化が完成した時期における検討である第2章の結果では、線維化における線維芽細胞はレシピエント由来が大半である。ドナー上皮間葉移行の関与はあっても少数派であり、線維芽細胞の大半はレシピエントの細胞に由来するものであると考えられる。つまり今回の結果は、移植気道における線維芽細胞の起源は単一ではなく、二つ以上の起源を有する可能性を示唆している。

線維化というのは移植のみならず各種臓器の病的状態において起こりうる。様々な病態において起こる「線維化」であるが、異なる臓器・病態における線維化の中のある部分は共通のメカニズムで起こり、ある部分は異なるメカニズムで起こっていると推測される。個々の臓器、個々の病態において線維化メカニズムは少しずつ異なる可能性がある。最近、肺移植後の線維化においても、慢性拒絶の状態はいくつかの臨床病態に分けて考えられるようになってきた。以前は慢性拒絶の状態は基本的にはすべて **Bronchial obliterans syndrome (BOS)** とされていたが、この中に呼吸機能において閉塞性障害よりはむしろ拘束性障害を特徴とする、発症が突然で進行が早い一群が存在することが明らかとなり、これらは

Restrictive allograft syndrome (RAS) と呼ばれるようになった⁷³。RAS は予後が不良であるとされている。またあるグループは以前の BOS の中に症状が抗生物質 **Azithromycin** により改善する **neutrophilic reversible allograft dysfunction**

(NRAD) という一群があると提唱している⁷⁴。この NRAD は移植後の気管支肺胞洗浄液における好中球が 15%以上と高値であり、予後が比較的良好である。このように一口に肺移植後のリモデリング、線維化といってもいくつかの病態があり、線維化のメカニズムもいくつかの機構が混在していると考えられ、これが線維化機構の解明を一層困難にしている大きな原因の一つである。そして BOS の正確な動物実験モデルが存在しない現在においては BOS、RAS、NRAD それぞれの正確な動物実験モデルが存在しないのが現状である。今回、マウス同所性気管移

植モデルと異所性気管移植モデルを移植気道の線維化モデルという大きな範疇の中で同様に用いたが、OTT と HTT は移植気道の線維化モデルの中でも異なる機構のモデルである可能性がある。HTT は BOS のモデルとして多用されているが、今回検討した限りではOTT と異なり線維化中に非常に多くの炎症細胞浸潤を認めた。HTT は最近の概念の中ではNRAD のモデルであるのかもしれない。一方OTT に関しては線維化層において炎症は沈静化しており、NRAD ではなく BOS もしくはRAS のモデルではないかと推測される。正確な BOS のモデルが存在しない現在においてはどちらも有用なモデルであると考えているが、どの臨床病態を示すモデルであるのかを今後解明する必要がある、さらなる動物実験モデルの改良は今後の課題である。

上記のように正確な動物実験モデルが存在しないという理由から、移植気道のリモデリングに関しては、これまで *in vivo* での研究、報告の数が非常に少ない。今回の研究の最も重要な点は、移植気道のリモデリングを動物モデルで組織学的に検討した点にあると考えている。しかしながら *in vivo* の検討、特に組織染色は、多くの結果が客観的に数値化される *in vitro* の実験と異なり、結果解釈が非常に難しく評価に注意が必要である。今回得られた組織学的な検討結果の別手法での検討が今後の課題と考える。

移植気道の線維化機構が解明されることにより、その予防法の模索につながり、その結果、肺移植後の患者の QOL や予後が劇的に改善され得る。本研究より、移

植片の線維芽細胞の起源の大半はレシピエント由来の細胞であることが判明した。

このレシピエント由来の線維芽細胞前駆細胞が移植片において線維芽細胞に分化する過程をブロックすることが、移植臓器の線維化を防止するための重要な方法である。本研究が、レシピエント由来の線維芽細胞前駆細胞の同定、前駆細胞から線維芽細胞への分化を引き起こす機構の解明へとつながれば、分化過程をブロックする薬剤の開発への道筋が明らかとなる。今回の研究が、線維化機構解明のための一つのステップになり得たと思われる。

参考文献

- 1) Hardy JD, Webb WR, Dalton ML, Walker GR. Lung homotransplantations in man. JAMA 186:1065-74, 1963.
- 2) Toronto Lung Transplant Group. Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. N Engl J Med. 314:1140-5. 1986
- 3) Keenan RJ, Konishi H, Kawai A, Paradis IL, Nunley DR, Iacono AT, Hardesty RL, Weyant RJ, Griffith BP. Clinical trial of tacrolimus versus cyclosporine in lung transplantation. Ann Thorac Surg. 60:580-4. 1995
- 4) Yusen RD, Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, Kirk R, Lund LH, Rahmel AO, Stehlik J; International Society for Heart and Lung Transplantation. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirtieth adult lung and heart-lung transplant report--2013; focus theme: age. J Heart Lung Transplant. 32:965-78. 2013
- 5) <http://www.ishlt.org/registries/heartlungregistry.asp> (January/7/2014)
- 6) Zamora MR. Updates in lung transplantation. Clin Transpl. 2012:185-92.
- 7) Boehler A, Estenne M. Post-transplant bronchiolitis obliterans. Eur Respir J 22: 1007–1018. 2003
- 8) Allan JS, Wain JC, Schwarze ML, Houser SL, Benjamin LC, Madsen JC,

- Sachs DH. Modeling chronic lung allograft rejection in miniature swine. *Transplantation*. 73:447-53. 2002
- 9) Matumura Y, Marchevsky A, Zuo XJ, Kass RM, Matloff JM, Jordan SC. Assessment of pathological changes associated with chronic allograft rejection and tolerance in two experimental models of rat lung transplantation. *Transplantation* 59: 1509-1517; 1995
- 10) Sato M, Keshavjee S, Liu M. Translational research: Animal models of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Am J Transplant*. 9: 1981-1987; 2009
- 11) Okazaki M, Krupnick AS, Kornfeld CG, Lai JM, Ritter JH, Richardson SB, Huang HJ, Das NA, Patterson GA, Gelman AE, Kreisel D. A mouse model of orthotopic vascularized aerated lung transplantation. *Am J Transplant*. 7:1672-9. 2007
- 12) Suzuki H, Fan L, Wilkes DS. Development of obliterative bronchiolitis in a murine model of orthotopic lung transplantation. *J Vis Exp*. 10,65. 2012
- 13) Hertz MI, Jessurun J, King MB, Savik SK, Murray JJ. Reproduction of the obliterative bronchiolitis lesion after heterotopic transplantation of mouse airways. *Am J Pathol*. 142:1945-51. 1993
- 14) Genden EM, Boros P, Liu J, Bromberg JS, Mayer L. Orthotopic tracheal

- transplantation in the murine model. *Transplantation*. 73:1420-5. 2002
- 15) Wagnetz D, Sato M, Hirayama S, Matsuda Y, Juvet SC, Yeung JC, Guan Z, Zhang L, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Rejection of tracheal allograft by intrapulmonary lymphoid neogenesis in the absence of secondary lymphoid organs. *Transplantation*. 93:1212-20. 2012
- 16) Dutly AE, Andrade CF, Verkaik R, Kugathasan L, Trogadis J, Liu M, Waddell TK, Stewart DJ, Keshavjee S. A novel model for post-transplant obliterative airway disease reveals angiogenesis from the pulmonary circulation. *Am J Transplant*. 5:248-54. 2005
- 17) Xu J, Torres E, Mora AL, Shim H, Ramirez A, Neujahr D, Brigham KL, Rojas M. Attenuation of obliterative bronchiolitis by a CXCR4 antagonist in the murine heterotopic tracheal transplant model. *J Heart Lung Transplant*. 27:1302-10. 2008
- 18) Ramirez AM, Shen Z, Ritzenthaler JD, Roman J. Myofibroblast transdifferentiation in obliterative bronchiolitis: $\text{tgf}\cdot\beta$ signaling through smad3-dependent and independent pathways. *Am J Transplant*. 6:2080-8. 2006
- 19) Zhou H, Latham CW, Zander DS, Margolin SB, Visner GA. Pirfenidone inhibits obliterative airway disease in mouse tracheal allografts. *J Heart*

Lung Transplant. 24:1577-85. 2005

- 20) Genden EM, Iskander A, Bromberg JS, Mayer L. The Kinetics and Pattern of Tracheal Allograft Re-Epithelialization. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28, 673–681, 2003
- 21) Murakawa T, Kerklo MM, Zamora MR, Wei Y, Gill RG, Henson PM, Grover FL, Nicolls MR. Simultaneous LFA-1 and CD40 ligand antagonism prevents airway remodeling in orthotopic airway transplantation: implications for the role of respiratory epithelium as a modulator of fibrosis. *J Immunol.* 174:3869-79. 2005
- 22) Kuo E, Bharat A, Shih J, Street T, Norris J, Liu W, Parks W, Walter M, Patterson GA, Mohanakumar T. Role of airway epithelial injury in murine orthotopic tracheal allograft rejection. *Ann Thorac Surg.* 82:1226-33.2006
- 23) Babu AN, Murakawa T, Thurman JM, Miller EJ, Henson PM, Zamora MR, Voelkel NF, Nicolls MR. Microvascular destruction identifies murine allografts that cannot be rescued from airway fibrosis. *J Clin Invest.* 117:3774-85. 2007
- 24) Chen C, Zhang YZ, Zheng H, Xu BB, Gao W. Suppression of the obliteration process by ventilation in a mouse orthotopic tracheal transplantation model. *Transplantation.* 87:1762-8. 2009

- 25) Lama VN, Harada H, Badri LN, Flint A, Hogaboam CM, McKenzie A, Martinez FJ, Toews GB, Moore BB, Pinsky DJ. Obligatory role for interleukin-13 in obstructive lesion development in airway allografts. *Am J Pathol.* 169:47-60. 2006
- 26) Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med.* 1:71-81. 1994
- 27) Herzog EL, Bucala R. Fibrocytes in health and disease. *Exp Hematol.* 38(7):548-56. 2010
- 28) Reich B, Schmidbauer K, Rodriguez Gomez M, Johannes Hermann F, Göbel N, Brühl H, Ketelsen I, Talke Y, Mack M. Fibrocytes develop outside the kidney but contribute to renal fibrosis in a mouse model. *Kidney Int.* 84:78-89. 2013
- 29) Bellini A, Mattoli S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Invest.* 87: 858–870. 2007
- 30) Gilpin SE, Lung KC, Sato M, Singer LG, Keshavjee S, Waddell TK. Altered progenitor cell and cytokine profiles in bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant.* 31:222-8. 2012

- 31) Gillen JR, Zhao Y, Harris DA, Lapar DJ, Stone ML, Fernandez LG, Kron IL, Lau CL. Rapamycin blocks fibrocyte migration and attenuates bronchiolitis obliterans in a murine model. *Ann Thorac Surg.* 95:1768-75. 2013
- 32) Badri L, Walker NM, Ohtsuka T, Wang Z, Delmar M, Flint A, Peters-Golden M, Toews GB, Pinsky DJ, Krebsbach PH, Lama VN. Epithelial interactions and local engraftment of lung-resident mesenchymal stem cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 45:809-16. 2011
- 33) Hay ED. Matrix-cytoskeletal interactions in the developing eye. *J Cell Biochem.* 27:143-56. 1985
- 34) Hay ED, Zuk A. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am J Kidney Dis.* 26:678-90.1995
- 35) Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442-54. 2002
- 36) Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 432:332-7.2004
- 37) Willis BC, Borok Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:

L525-L534, 2007

- 38) Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* 110:341-350. 2002
- 39) Hodge S, Holmes M, Banerjee B, Musk M, Kicic A, Waterer G, Reynolds PN, Hodge G, Chambers DC. Posttransplant bronchiolitis obliterans syndrome is associated with bronchial epithelial to mesenchymal transition. *Am J Transplant.* 9:727-33. 2009
- 40) Borthwick LA, Parker SM, Brougham KA, Johnson GE, Gorowiec MR, Ward C, Lordan JL, Corris PA, Kirby JA, Fisher AJ. Thorax. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and airway remodelling after human lung transplantation. 64:770-7. 2009
- 41) Borthwick LA, McIlroy EI, Gorowiec MR, Brodlie M, Johnson GE, Ward C, Lordan JL, Corris PA, Kirby JA, Fisher AJ. Inflammation and epithelial to mesenchymal transition in lung transplant recipients: role in dysregulated epithelial wound repair. *Am J Transplant.* 10:498-509. 2010
- 42) Gardner A, Fisher AJ, Richter C, Johnson GE, Moisey EJ, Brodlie M, Ward C, Krippner-Heidenreich A, Mann DA, Borthwick LA. The critical role of TAK1 in accentuated epithelial to mesenchymal transition in obliterative

- bronchiolitis after lung transplantation. *Am J Pathol.* 180:2293-308. 2012
- 43) Greenburg, G. & Hay, E. D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J. Cell. Biol.* 95, 333-9 (1982).
- 44) Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal transitions in development and disease: old views and new perspectives. *Int. J. Dev. Biol.* 53:1541-1547. 2009
- 45) Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 7:415-28. 2007
- 46) Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature.* 392:190-3. 1998
- 47) Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* 119:1429–1437, 2009.
- 48) Chai J, Modak C, Mouazzen W, Narvaez R, Pham J. Epithelial or mesenchymal: Where to draw the line? *BioScience Trends.* 4:130-142.2010
- 49) Ward C, Forrest IA, Murphy DM, Johnson GE, Robertson H, Cawston TE, Fisher AJ, Dark JH, Lordan JL, Kirby JA, Corris PA. Phenotype of airway

- epithelial cells suggests epithelial to mesenchymal cell transition in clinically stable lung transplant recipients. *Thorax*. 60:865-71.2005
- 50) Rogers CD, Saxena A, Bronner ME. Sip1 mediates an E-cadherin-to-N-cadherin switch during cranial neural crest EMT. *J Cell Biol*. 203:835-47. 2013
- 51) Nieto, M. A. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol. Cell. Biol*. 3, 155-66. 2002.
- 52) Yamashita S, Miyagi C, Fukada T, Kagara N, Che YS, Hirano T. Zinc transporter LIVI controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature*. 429:298-302. 2004
- 53) Horiguchi K, Sakamoto K, Koinuma D, Semba K, Inoue A, Inoue S, Fujii H, Yamaguchi A, Miyazawa K, Miyazono K, Saitoh M. TGF- β drives epithelial-mesenchymal transition through δ EF1-mediated downregulation of ESRP. *Oncogene*. 31:3190-201. 2012
- 54) Sánchez-Tilló E, Siles L, de Barrios O, Cuatrecasas M, Vaquero EC, Castells A, Postigo A. Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *Am J Cancer Res*. 1:897-912. 2011
- 55) Miyazono K. Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad*

Ser B Phys Biol Sci. 85:314-23. 2009

- 56) Fuxe J, Vincent T, Garcia de Herreros A. Transcriptional crosstalk between TGF- β and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle*. 9(12):2363-74. 2010
- 57) Zavadil J, Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24;5764-5774. 2005
- 58) Favreau F, Thuillier R, Cau J, Milin S, Manguy E, Maucó G, Zhu X, Lerman LO, Hauet T. Anti-thrombin therapy during warm ischemia and cold preservation prevents chronic kidney graft fibrosis in a DCD model. *Am J Transplant*. 10:30-9. 2010
- 59) Inoue T, Plieth D, Venkov CD, Xu C, Neilson EG. Antibodies against macrophages that overlap in specificity with fibroblasts. *Kidney International*, 67:2488-2493, 2005
- 60) Kong P, Christia P, Saxena A, Su Y, Frangogiannis NG. Lack of specificity of Fibroblast Specific Protein (FSP)1 in cardiac remodeling and fibrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 305:1363-72. 2013
- 61) Sato M, Hirayama S, Lara-Guerra H, Anraku M, Waddell TK, Liu M, Keshavjee S. MMP-dependent migration of extrapulmonary myofibroblast progenitors contributing to posttransplant airway fibrosis in the lung. *Am J*

- Transplant. 9:1027-36. 2009
- 62) Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol.* 130:393-405. 1995
- 63) Panoskaltsis-Mortari A, Tram KV, Price AP, Wendt CH, Blazar BR. A new murine model for bronchiolitis obliterans post-bone marrow transplant. *Am J Respir Crit Care Med.* 176: 713–723, 2007
- 64) You Y, Richer EJ, Huang T, Brody SL. Growth and differentiation of mouse tracheal epithelial cells selection of a proliferative population. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L1315–L1321, 2002
- 65) Ellenberger C, Seeger J, Schoon HA, Ungemach FR. Isolation and culture of primary equine tracheal epithelial cells. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* 44:179–184. 2008
- 66) Mukaida T, Shimizu N, Aoe M, Andou A, Date H, Moriyama S. Origin of regenerated epithelium in cryopreserved tracheal allotransplantation. *Ann Thorac Surg.* 66:205-8. 1998
- 67) Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters* 407: 313-319. 1997
- 68) Zhao J, Han Y, Liang Z, Zhang Z, Lu Q, Yan X, Li X. Sustained local

- application of epidermal growth factor to accelerate reepithelialization of tracheal grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 140:209-15. 2010
- 69) Nusair S, Or R, Junadi S, Amir G, Breuer R. Simultaneous donor marrow cell transplantation with reduced intensity conditioning prevents tracheal allograft obliteration in a bronchiolitis obliterans murine model. *Chest.* 128:4024-9. 2005
- 70) Chen C, Zhang YZ, Zheng H, Xu BB, Gao W. Suppression of the obliteration process by ventilation in a mouse orthotopic tracheal transplantation model. *Transplantation.* 87:1762-8. 2009
- 71) Ma DF, Tezuka H, Kondo T, Sudo K, Niu DF, Nakazawa T, Kawasaki T, Yamane T, Nakamura N, Katoh R. Differential tissue expression of enhanced green fluorescent protein in 'green mice'. *Histol Histopathol.* 25:749-54.2010
- 72) Harris DA, Zhao Y, LaPar DJ, Emaminia A, Steidle JF, Stoler M, Linden J, Kron IL, Lau CL. Inhibiting CXCL12 blocks fibrocyte migration and differentiation and attenuates bronchiolitis obliterans in a murine heterotopic tracheal transplant model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 145(3):854-61. 2013
- 73) Sato M, Waddell TK, Wagnetz U, Roberts HC, Hwang DM, Haroon A,

Wagnetz D, Chaparro C, Singer LG, Hutcheon MA, Keshavjee S. Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction.

J Heart Lung Transplant. 30:735-42. 2011

74) Verleden SE, Vandermeulen E, Ruttens D, Vos R, Vaneylen A, Dupont LJ,

Van Raemdonck DE, Vanaudenaerde BM, Verleden GM. Neutrophilic reversible allograft dysfunction (NRAD) and restrictive allograft syndrome

(RAS). Semin Respir Crit Care Med. 34:352-60. 2013

謝辞：本研究に関して辛抱強くご指導いただきました中島淳教授に深謝をいたします。様々なご助言をいただいた村川知弘先生（呼吸器外科学）、鯉沼代造先生（分子病理学）、垣見和宏先生（免疫細胞治療学）、宮園浩平教授（分子病理学）に深謝いたします。また実験手技につきご助言いただいた森下保幸様（分子病理学）、細井亮宏様（免疫細胞治療学）に深謝いたします。