

論文の内容の要旨

論文題目 移植気道リモデリング機構の解明
氏名 此枝 千尋

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。強力な免疫抑制剤であるシクロスポリン発見以後、臓器移植後の急性期における生存率は劇的に改善したが、肺移植後の長期生存率の改善はいまだ十分でない。これは肺移植後慢性期に **Bronchial obliterans syndrome (BOS)** と言われる慢性拒絶状態が移植肺に高率に起こることによる。**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**) であり組織学的特徴は線維化である。肺移植後は発症時期の差はあるがこの線維化がほぼ必発であり再移植が必要となる一因である。

肺移植後長期生存率の改善のためには、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。

本研究では、マウス気管移植モデルを用いて移植気道の線維化機構の解明を行った。マウス気管移植モデルは移植気道の線維化を研究する上で非常に有用なモデルである。レシピエントの気管にグラフトを端々吻合する同所性気管移植 (**Orthotopic tracheal transplantation : OTT**) と皮下にグラフトを移植する異所性気管移植 (**Heterotopic tracheal transplantation : HTT**) がある。**OTT** モデルにおいてはグラフトにおいて上皮下の線維化が起こり、**HTT** モデルにおいてはグラフト内腔の線維性狭窄・閉塞が起こる、これらが移植気道の線維化に相当すると考えられる。

線維化は細胞外基質の蓄積であり、細胞外基質を産生する線維芽細胞が線維化の中心的役割を担うが、移植臓器においてこの線維芽細胞の起源が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が本研究の主目的である。

移植臓器における線維芽細胞の起源としては、以下の三つの説がある。

- ① レシピエントの骨髄由来細胞（血中に存在する前駆細胞は **Fibrocyte** と呼ばれ **CD45**、**CD34** 陽性かつ細胞内 **Collagen1** が陽性である）。
- 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。
- ③ 上皮が上皮間葉移行 (**Epithelial mesenchymal transition : EMT**) を起こし線維芽細胞になる説。

いずれの説も支持する報告がいまだに散見されるのが現状であるが、マウス **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

観察さ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。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。これらのことから、移植気道の線維化過程においては上皮が重要な役割を持つ可能性、EMT が関与する可能性が高いと考えた。

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、本研究の目的は、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にあった。

第 1 章では、マウス OTT モデルにおける EMT の関与を検討した。

【方法】①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 (H2-d) と C57BL/6 (B6 ; H-2b) を用いて同所性気管移植を行った。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。移植術後 2 日目～12 日目、14 日目、28 日目にグラフト採取した。各病日につき異系移植群・同系移植群 n=3 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变化を検討した。また、上皮系マーカーとして E-cadherin、間葉系マーカーとして Alpha smooth muscle actin (α SMA) と S100A4 (別名 Fibroblast-specific protein1: FSP1) を選択し、これらに対する特異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。EMT の関与を検討するため EMT 関連転写因子である Zeb1 染色も行った。免疫染色は蛍光法を選択した。②OTT 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、Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) 法を用いて血中の TGF- β 1 を測定した。③OTT 術後 7 日目の気管グラフトから擦過により上皮細胞を採取し、逆転写 Polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて α SMA や E-cadherin の上皮細胞内発現の定量化を行った。

【結果】①異系移植群の H&E 染色では、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 日目に最も激しい炎症細胞浸潤を認めた。上皮下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、最終的に術後 28 日目に上皮は一層の扁平な状態となり、上皮下に線維化が出現した。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であった。免疫染色においては、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 発現を認めた (n=3/3)。この α SMA 発現細胞においては上皮系マーカー E-Cadherin の発現が減弱していた (n=3/3)。 α SMA と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的变化を示さなかった。一方 EMT 関連転写因子である Zeb1 は異系移植群において術後 2～4 日目に上皮細胞核内発現を多く認めた。②ELISA 法で測定した TGF- β 1 の血中濃度は各病日ごとのばらつきが大きく有意な傾向を認めなかった。③上皮細胞から合成した cDNA で PCR を施行したが、ハウスキーパー遺伝子である GAPDH においても検討に値する Ct 値が得られなかった。

【考察】異系移植群において術後早期に EMT 関連転写因子である Zeb1 が発現し、その後炎症が最もピークの時期に上皮内に α SMA が発現、この α SMA 陽性細胞においては E-cadherin の発現が減弱していた。急性期反応として炎症細胞が集簇し、そ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た。このことは EMT を示唆していると考えられ、EMT を引き起こす主要なサイトカインである TGF- β 1 の血中濃度測定を行ったが有意な結果を得られなかった。TGF- β 1 は血小板に多く含まれるためこれが血清に混入した可能性があった。一方上皮細胞採取においては、マウスという小動物の気管の上皮細胞の採取法の改良が必要であると考えた。

【結論】OTT における組織学的検討から、異系移植におけるグラフトの拒絶過程に上皮間葉移行が関与する可能性が示唆された。

第2章では、OTT・HTT 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。

【方法】①同系移植群 BALB/c 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と、GFP マウス (B6-Tg) から BALB/c への組み合わせのグループの二つのグループを作成した。OTT モデルにおいて計3グループ、それぞれ n=5 ずつ作成し、術後 28 日目に気管グラフトを採取した。HTT モデルにおいては同じく計3グループ、n=3 ずつ作成し、術後 28 日目にグラフト採取した。凍結標本を作製し α SMA と GFP を同時に蛍光免疫染色することにより線維化層の α SMA 領域が GFP 陽性か否かを評価した。 α SMA 領域中の GFP 陽性領域を Image J software を用いて定量化した。②Polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて骨髄由来の線維芽細胞前駆細胞である Fibrocyte の血中への出現時期を推定した。OTT 術後 4 日目、7 日目、10 日目、28 日目の血液を採取し RNA を抽出、逆転写により cDNA を合成、リアルタイム PCR 法で Collagen1 の計測を行い、Fibrocyte の上昇時期を推定した。③OTT 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。CD45 陽性かつ Collagen 1 陽性の細胞を Fibrocyte とし、CD45+Collagen1+の細胞の検出を試みた。異系移植と同系移植を行い (それぞれ n=10)、術後 10 日目に全採血し、フローサイトメトリーにかけた。

【結果】①OTT において BALB/c から B6-Tg への移植群では α SMA 陽性細胞の 67~99% が GFP 陽性であり、逆の B6-Tg から BALB/c への移植群では α SMA 陽性細胞の数%のみ (1.5%~40%) が GFP 陽性であった。HTT においても 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。②術後 10 日目の異系移植片のみにおいて 3 例中 3 例すべてに Collagen 1 を検出した。③術後 10 日目の異系移植群と同系移植群どちらにおいても血中の 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。

【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線維化における線維芽細胞の大半がレシピエントに由来することが示唆されたが、骨髄由来の線維芽細胞の前

駆細胞である Fibrocyte の検出には至らなかった。Fibrocyte は血中の population が非常に少ないと推測されるため検出には手技上の改良が必要と考えた。

【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。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上皮細胞全体の中の少数であったこと、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ったことから、移植気道リモデリングにおいて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。