厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療 研究事業）
分担研究報告書

骨髄内骨髄移植マウスモデルを用いた移植後肺障害に関する検討

分担研究者　品川　克至（岡山大学医学部　血液・腫瘍内科　講師）

研究要旨

移植後肺障害 Idiopathic pneumonia syndrome (IPS)は、移植後に肺胞障害により発症する予後不良な肺合併症である。肺への放射線照射 RT とドナー免疫担当細胞の関与などが想定されているが未解明な部分が多い。我々は骨髄内骨髄移植（IBM-SCT）では静脈内骨髄移植（IV-SCT）よりも移植後に肺へトラップされるドナー細胞が少なく、IPS の発症が軽減されると仮定し IPS のマウスモデルにより比較検討した。移植 6 週後の気管支肺胞洗浄では、IBM-SCT において IV-SCT よりも回収液中の総細胞数および T 細胞数が有意に少なく、組織学的にも細胞浸潤、組織障害が軽度であった。また *in vivo* bioluminescence imaging (BLI)分析では、移植後 1 時間では IV-SCT でほとんどの細胞が肺に取り込まれたが、IBM-SCT では肺に取り込まれた細胞は有意に少なかった。移植後 2 日目の肺局所組織での各種ケモカイン mRNA 発現は、IV-SCT で高い傾向にあり特に CCL2 では有意であった。一方、移植後 5 日目の BLI 分析では syngeneic の系において肺への取り込みは IV-SCT と IBM-SCT で差はなかったが、allogeneic の系では移植後 2 日目よりさらに有意に IV-SCT で増加した。肺障害のメカニズムとして移植 2 日までのドナー細胞の肺へのトラップに加え、各種ケモカイン mRNA 発現増加が allo 免疫反応を誘導していると考えられた。以上から IPS は IBM-SCT において軽度である可能性が示唆され、移植後早期の輸注細胞の肺での物理的動態およびケモカイン発現の差異がこれらの現象に関与していると考えられた。

A. 研究目的

移植後肺障害 Idiopathic pneumonia syndrome (IPS) は、移植後に広汎な肺胞障害を生じて発症する予後不良な肺合併症の総称であり、肺への放射線照射 RT とドナー免疫担当細胞の関与などが考えられている。診断基準は、a) 広範な肺胞障害の存在、b) 下気道感染症の否定、である。胸部 X-P、CT 上の多発浸潤影の出現、肺炎の臨床症状、肺機能障害（低 O_2 血症、拘束性肺機能障害）が見られる。また細菌、真菌、ウイルス感染を否定することが必要である。頻度は、同種移植では再生不良性貧血など非腫瘍性疾患では 3~7%、白血病など腫瘍性疾患では 7~10%、自己移植後では 6%といわれており、悪性腫瘍に対する同種移植後に多い。発症時期は移植後、中央値で 21 日といわれているが、2 ヶ月以降の発症もある。死亡率は 60~82%であり予後はきわめて不良である。発症に関与する危険因子として、前述の悪性腫瘍に対する同種移植の他、高齢、全身放射線照射(TBI)、移植片対宿主病(GVHD)などが推定されている。

病態メカニズムは明らかでないが、TBI による組織障害によりサイトカインの誘導や、肺上皮細胞での MHC、補助シグナル、接着因子の発現上昇などが発生し、肺局所へのドナー細胞の流入と活性化がおこり、肺胞上皮とドナーT 細胞の接触による免疫反応、および RT による肺障害の両者により発症することが推定されている。

ドナー免疫担当細胞を含む造血幹細胞は、静脈内骨髄移植（IV-SCT）後では多くが肺へトラップされるが、骨髄内骨髄移植（IBM-SCT）後では少な

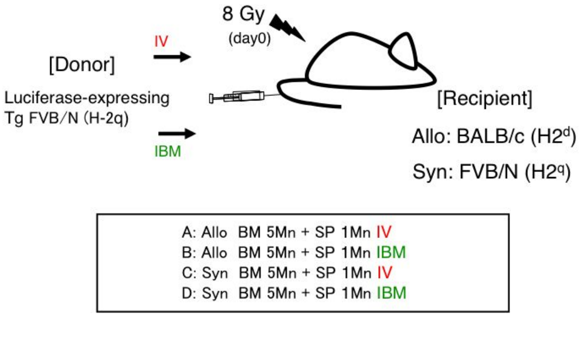
いと考えられる。池原らは、マウスモデルを用いて、IBM-SCT では IV-SCT よりも GVHD が抑制されることを報告している。我々は IBM-SCT では IV-SCT よりも IPS の発症が軽減されるとの仮設を立て、マウスモデルを用いて IPS に関して IBM-SCT と IV-SCT との比較検討を行った。

B. 研究方法

ドナーマウスに C57BL/6J を用い、RT で前処置したレシピエントマウス B6D2F1 に IV-SCT と IBM-SCT を行い比較検討した。

移植後の、体重および GVHD スコア、生存率を評価した。また移植後 6 週間後に、気管支肺胞洗浄 bronchoalveolar lavage (BAL)を行い、回収液中の細胞を解析した。また肺組織の病理所見を検討するとともに、肺組織から抽出した mRNA におけるサイトカイン発現レベルを測定した。次にドナーマウスに FVB/N lac+、レシピエントに BALB/c を用いた系で、*in vivo* bioluminescence imaging (BLI)分析により移植後輸注細胞の体内分布の時間的、場所的推移に関して IV-SCT と IBM-SCT で比較検討した。(図１)

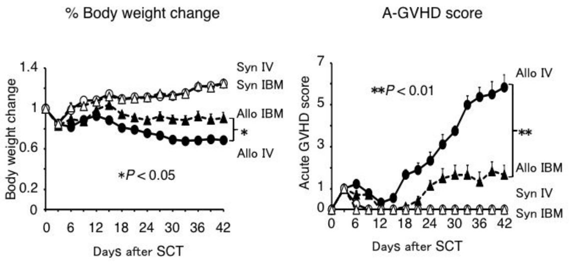
(図 1)



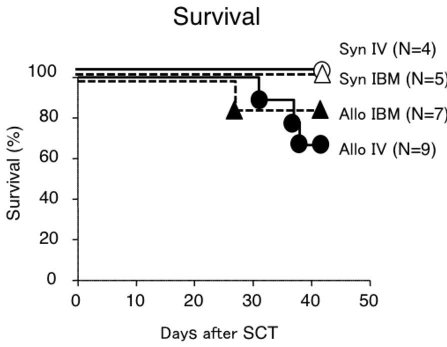
C. 研究結果

移植 6 週後において、IBM-SCT で体重減少が低く(p<0.05)、また GVHD スコアも低く(p<0.01)、生存率が高かった。(図 2, 3)

(図 2)

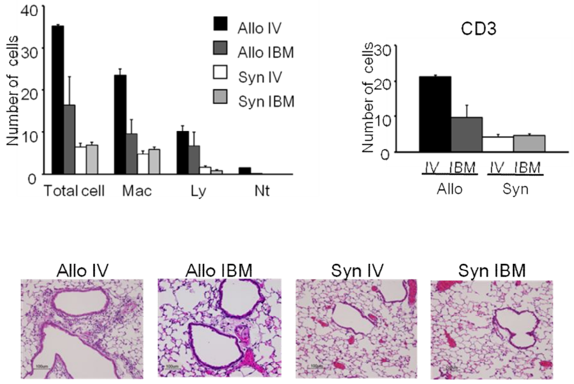


(図 3)



同じく移植 6 週後の BAL の解析では、回収洗浄液中の総細胞数および T 細胞数は、IBM-SCT において IV-SCT よりも少ない傾向にあり、組織学的にも IBM-SCT において細胞浸潤、組織障害が軽度であった。(図 4)

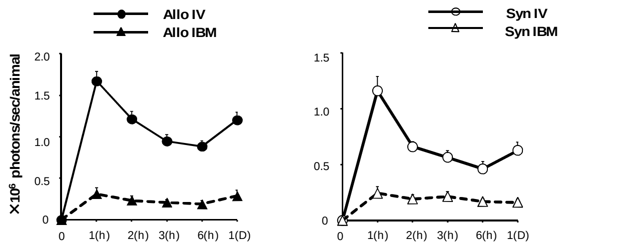
(図 4)



さらにルシフェラーゼによる発光反応を用いた *in vivo* bioluminescence imaging(BLI)分析による解析では、IBM-SCT では IV-SCT に比し移植後早期(1-6 時間)の肺への移植細胞の集積が少なかった。移植後 1h では IV-SCT 群でほとんどの細胞が肺に取り

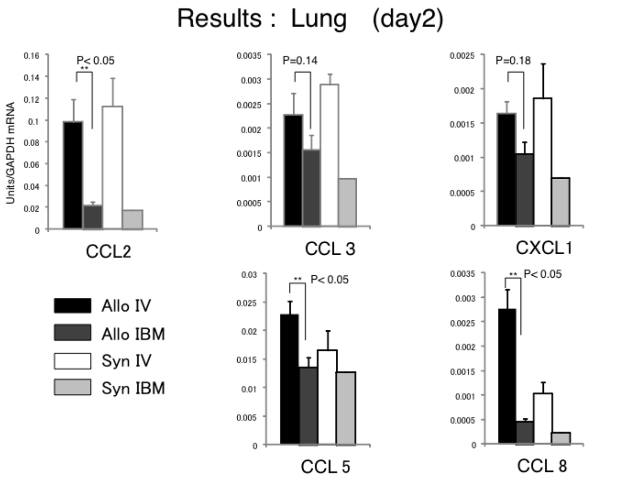
込まれたが、IBM-SCT 群では輸注下肢にとどまり肺に取り込まれた細胞は有意に少なかった(3.1±0.7 vs 16.7±1.1×10^5 photons/sec/animal, IBM-SCT vs IV-SCT;$p<0.01$)。(図 5)

(図 5)



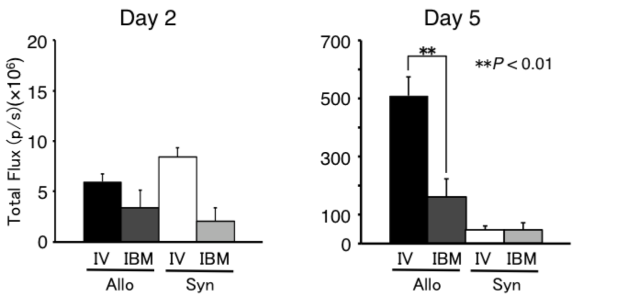
次に移植後 2 日目の肺組織から抽出した mRNA における各種ケモカインの発現レベルは、IV-SCT 群で高い傾向にあり、特に CCL2 では有意であった(0.098±0.020 vs 0.020±0.003 units/GAPDH mRNA ;$p<0.05$)。(図 6)

(図 6)



以上の 2 つの結果は syngeneic の系においても同様の結果が得られたため(2.4±0.6 vs. 11.6±1.3 ×10^5 photons/sec/animal;$p<0.01$)、移植早期の輸注細胞の肺へのとりこみは IV と IBM の輸注手技の違いによることが示唆された。移植後 2 日目と 5 日目の BLI 分析では、5 日目では syngeneic の系において肺への取り込みは IV-SCT 群と IBM-SCT 群で差はなかったが (4.8±1.1 vs. 4.6±2.5×10^7 photons/sec/animal;$p=0.94$)、allogeneic の系では移植後 2 日目よりさらに有意に IV-SCT で増加した (50.9±6.6 vs 16.0±6.2×10^7 photons/sec/animal;$p<0.05$)(図 7)

(図 7)



以上から IPS は IBM-SCT において軽度である可能性が示唆された。また肺障害のメカニズムとして移植 2 日までのドナー細胞の肺へのトラップに加え、各種ケモカイン mRNA 発現増加が allo 免疫反応を誘導していると考えられた。

D. 考察

IPS マウスモデルによる IV-SCT と IBM-SCT の比較研究は過去になく、今回肺局所のリンパ球の集積の差異が経時的に *in vivo* 観察され、その機序がケモカインレベルで証明された意義は大きいと思われる。IBM-SCT が移植後肺障害軽減の点からも有効であることが示唆され臨床応用が期待される。今後さらに IPS 発症に関与する T 細胞を含めた細胞分画の同定と詳細な検討が課題である。

E. 結論

今回検討した IPS マウスモデルでは IPS は IV-SCT 群に比し IBM-SCT 群において軽度である可能性が示唆され、移植後早期の輸注細胞の肺での物理的動態およびケモカイン発現の差異がこれらの現象に関与していると考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) H Nishimori, Y Maeda, T Teshima, H Sugiyama, K Kobayashi, Y Yamasuji, S Kadohisa, H Uryu, K Takeuchi, T Tanaka, T Yoshino, Y Iwakura and M Tanimoto. Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17 Blood 119:285-295, 2012

2) Teshima T, Maeda Y, Ozaki K. Regulatory T cells and IL-17- producing cells in acute graft-versus-host disease. Immunotherapy. 2011;3(7):833-52

3) Ito Y, Kimura H, Maeda Y, Hashimoto C, Ishida F, Izutsu K, Fukushima N, Isobe Y, Takizawa J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Okamura S, Kobayashi H,Yamaguchi M, Suzumiya J, Hyo R, Nakamura S, Kawa K, Oshimi K, Suzuki R. Pretreatment EBV-DNA copy number is predictive of response and toxicities to SMILE chemotherapy for extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. Clin Cancer Res 2012 Aug 1;18(15):4183-4190

4) Sato Y, Inoue D, Asano N, Takata K, Asaoku H, Maeda Y, Morito T, Okumura H, Ishizawa S, Matsui S, Miyazono T, Takeuchi T, Kuroda N, Orita Y, Takagawa K, Kojima M, Yoshino T. Association between IgG4-related disease and progressively transformed germinal centers of lymph nodes. Mod Pathol. 2012 Jul;25(7):956-67

2. 学会発表

1) Hideaki Fujiwara, Koichiro Kobayashi, Hisakazu Nishimori, Masaaki Nishinohara, Sachiyo Okamoto, Kenichi Matsuoka, Eisei Kondo, Nobuharu Fujii, Katsuji Shinagawa, Mitsune Tanimoto and Yoshinobu Maeda. B7H1 expression on recipient regulate the frequency of IL-17+ IFNg+ T cells and contribute to the pathogenesis of cGVHD. 2013 ASBMT tandem meeting.

2) H Fujiwara, Y Maeda, H Yamane, M Uno, T Yano, T Masunari, S Asakura, K Matsuoka, N Fujii, E Kondo, K Shinagawa, M Tanimoto. Therapeutic Outcome of Localized CD5-positive Diffuse Large B-cell Lymphoma. 74th JSH 2012.

3) Asano T, Fujii N, Saeki K, Hasegawa E, Kuroi T, Matsuoka K, Kondo E, Maeda Y, Shinagawa K, Ichimura K, Tanimoto M. Successful allogenic stem cell transplantation for MDS complicated by severe organizing pneumonia 第 74 回日本血液学会学術集会 2012.10.19

4) 野村昌作，石井一廣，藤田真也，伊藤量基，片山雄太，許　泰一，田中志津，前田嘉信，谷本光音，錦井秀和，藤島直仁，澤田賢一，大田秀一，林　邦雄，竹内麻子，池添隆之，朴　永東，八木秀男，岡田昌也，小川啓恭．同種造血幹細胞移植後のサイトカイン・ケモカイン・可溶性分子の変動に対するリコンビナントトロンボモジュリンの影響について(サイト研究会中間報告)．第 35 回日本造血細胞移植学会総会 2013.3.8(金沢)

5) 西之原正昭，藤原英晃，廻　勇輔，吉岡尚徳，新谷大悟，近藤英生，藤井伸治，前田嘉信，品川克至，谷本光音．悪性リンパ腫に対する臍帯血移植 23 例の検討 第 51 回日本リンパ網内系学会総会

6) 藤原英晃，品川克至，長谷川詠子，佐伯恭昌，黒井大雅，浅野　豪，吉岡尚徳，廻　勇輔，松岡賢市，藤井伸治，近藤英生，前田嘉信，谷本光音．治療抵抗性血液悪性疾患に対するハプロ

移植の検討：単一施設の最新成績. 第 35 回日本造血細胞移植学会総会 2013.3.8(金沢)

7) 浅野　豪，近藤英生，佐伯恭昌，長谷川詠子，黒井大雅，西森久和，松岡賢市，淺田　騰，藤井敬子，藤井伸治，前田嘉信，品川克至，谷本光音．当院同種造血幹細胞移植症例における Disease risk index の有用性の検討. 第 35 回日本造血細胞移植学会総会 2013.3.9(金沢)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきこと無し