

主 論 文

SOCS3 overexpression in T cells ameliorates chronic airway obstruction in a murine heterotopic tracheal transplantation model

(SOCS3 のリンパ球特異的な過剰発現は、マウスを用いたモデルにおいて、異所性に移植された気管の内腔閉塞を抑制する)

【緒言】

肺移植は、終末期の呼吸不全の患者にとって、生命を救う唯一の治療である。肺移植の成績は向上しているが、術後生存期間中央値は 6.0 年と低く、他臓器の移植と比較し不良である。

肺移植後の合併症の一つに閉塞性細気管支炎症候群 (BOS: bronchiolitis obliterans syndrome) があり、術後 5 年で 50% の患者に生じ、術後 1 年以降の死因では 20% 以上と最も大きな割合を占めている。BOS は、臨床的には 1 秒量の低下で診断され、病理学的にはリンパ球の浸潤と線維化で特徴づけられる obliterative bronchiolitis (OB) の所見がみられる。主にリンパ球による拒絶が関与し生じるとされているが、特異的な予防法、治療法が確立されていないことが大きな問題である。

BOS に対する効果的かつ特異的な治療法を確立するため、我々は本研究で、Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) に着目した。BOS では、リンパ球のうち、特に Th1 と Th1 サイトカインの重要性が知られている。SOCS ファミリータンパク質は、細胞内シグナル伝達の JAK-STAT 経路を抑制する制御タンパク質である。SOCS3 は T 細胞の分化と機能を制御し、免疫抑制効果を示す。具体的には、SOCS3 を T 細胞特異的に過剰発現させると、Th1 が抑制され、Th1 と Th2 のバランスが Th2 優位に変化する。

これらの背景をもとに、我々は、SOCS3 を T 細胞特異的に過剰発現させると、肺移植後の BOS が抑制されるという仮説を立て、マウスの異所性気管移植モデルを用いて検証した。

【材料と方法】

1. マウス

SOCS3 トランスジェニック (SOCS3TG) マウスは、C57/BL/6J を遺伝的背景とし、SOCS3 遺伝子を Lck 近位プロモーターの下流に配置し、リンパ球特異的に SOCS3 を発現させた。Recombination activating gene 1 (RAG1) knockout マウスは、遺伝的背景は C57/BL/6J で、リンパ球欠損マウスである。

2. 異所性気管移植モデル

ドナーマウスから、輪状軟骨から気管分岐部までの気管を摘出した。レシピエントマウスに麻酔を導入後、背部を小切開し鈍的に皮下ポケットを作製、気管グラフトを移植し、創部を縫合閉鎖した。術後、レシピエントマウスに、免疫抑制剤を投与していない。

3. 組織学的評価

移植後のグラフトは摘出し、10%ホルマリン固定後、パラフィンに包埋した。切片をヘマトキシリン-エオジン染色、マッソントリクローム染色し、病理医によりブラインドで組織学的評価を行った。評価項目とスコアは以下のとおりである。(1) 上皮損傷: 0 = 変化なし、1 = 再生性変化、2 = 上皮の脱落 < 50%、3 = 上皮の脱落 50%-99%、4 = 上皮の脱落 100%、(2) 粘膜固有層への炎症細胞浸潤: 0 = < 10 cells/hpf、1 = 10-19 cells/hpf、2 = 20-50 cells/hpf、3 = > 50 cells/hpf。(3) 粘膜固有層の変化: 0 = 変化なし、1 = 紡錘細胞浸潤を伴わない浮腫、2 = 紡錘細胞の増殖領域 < 50%、3 = 紡錘細胞の増殖領域 ≥ 50%。

4. 免疫組織染色

切片を、脱パラフィン化し、内在性ペルオキシダーゼを不活化、抗原を賦活化し、免疫染色を行った。細胞の核はヘマトキシリンで染色した。

5. RNA 抽出と定量的 RT-PCR (qPCR)

摘出した気管グラフトから mRNA を抽出、cDNA を作製し qPCR を行った。相対的発現量の計算には、標的分子の Ct 値を β actin の Ct 値で標準化した後に、isograft の 7 日の値を 1 とし $\Delta \Delta Ct$ 値を用いて計算した。

6. 気管の内腔閉塞率

ヘマトキシリン-エオジン染色の切片を用い、顕微鏡下に撮影した写真画像をイメージ解析ソフトウェアを用いて面積を測定し、以下のように計算した。内腔閉塞率 = $(1 - \text{閉塞のない内腔面積} / \text{気管軟骨の内腔の面積}) \times 100$

7. 統計

両側 Student's t 検定で 2 群比較を行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

1. 異系移植グラフト (allograft) では移植後 21 日目に OB を生じる

はじめに、OB の観察に最適な移植後日数と評価項目を決めるため、同系移植 (isotransplant)、異系移植 (allograft、WT; wild type)、リンパ球欠損マウス

(RAG1KO) への異系移植を行った。isotransplant 群では C57BL/6j から C57BL/6j へ、allotranplant 群では Balb/c から C57BL/6j へ、RAG1KO 群では Balb/c から RAG1KO (遺伝的背景は C57BL/6j) へ移植を行い、移植後 7 日と 21 日に気管グラフトを摘出し評価した。RAG1KO マウスは、リンパ球を欠損しているため OB を生じないことが報告されており、ここではネガティブコントロールとして用いた。上皮損傷と線維増殖性の変化による気管の内腔閉塞は、移植後 21 日の allotranplant 群で認められたが、isotransplant 群と RAG1KO 群では認められなかった。グラフトの所見は、閉塞率と病理学的スコアを用いて定量的に評価した。移植後 21 日のグラフトでは、isotransplant 群、RAG1KO 群と比較し、allotranplant 群で閉塞率と上皮損傷スコアが有意に高かった。これらの結果から、異所性気管移植モデルにおける OB 発生の評価には、移植後 21 日のグラフトにおいて、閉塞率と上皮損傷スコアを用いた定量的な評価が有用であることが示された。

次に、リンパ球特異的な SOCS3 過剰発現の OB への影響を調べるため、レシピエントを SOCS3TG マウス (遺伝的背景は C57BL/6j) とした、Balb/c から SOCS3TG への異系移植を行った (SOCS3TG 群)。SOCS3TG 群では、allotranplant 群 (WT) と比較し、移植後 21 日のグラフトの閉塞率と上皮損傷スコアは有意に低値であり、OB が抑制されていることが示された。

2. SOCS3TG マウスに移植された allograft では移植後 7 日目の Th1 および Th2 サイトカインの発現が変化する

次に、SOCS3TG 群において OB が抑制される機序は、移植後早期の炎症で Th1 が抑えられていることに起因する考え、これを検証した。移植後 7 日と 21 日のグラフトの Th1 サイトカイン (IFN- γ 、CXCL10) と Th2 サイトカイン (IL-4、IL-13) の発現を測定した。WT 群では、isotransplant 群と比較し、移植後 7 日、21 日で Th1 サイトカインが有意に上昇していた。これに対し、SOCS3TG 群では、移植後 7 日で IFN- γ 、CXCL10 とともに WT 群と比較し有意に低値であった。また、IL-4 は有意に高値であった。移植後 21 日では、IFN- γ 、CXCL10、IL-4 は WT と同等の発現であった。

3. SOCS3TG マウスに移植された allograft では移植後 7 日目の T-bet の発現が低い

SOCS3TG 群のグラフトにおける、T 細胞サブセットの変化を調べるため、移植後 7 日のグラフトをさらに解析した。移植後 7 日の気管グラフトの免疫染色では、WT 群、SOCS3TG 群ともに、浸潤細胞の大部分は CD-3 陽性の T 細胞であった。グラフト内に浸潤している CD-3 陽性細胞の数は、SOCS3TG 群で WT 群と比較し変化はなかった。しかし、Th1 の転写因子である T-bet の発現は、SOCS3TG 群では WT 群と比較し有意に低く、Th1 が減少していることが示唆された。

【考察】

本研究では、レシピエントの T 細胞で SOCS3 を過剰発現させると移植後早期の Th1 を介した反応が抑制され、OB の発生が抑制されることを、マウスの異所性気管移植モデルを用いて示した。

近年、肺移植後の BOS の研究では、特定のリンパ球サブセットやサイトカインに着目した報告が増えている。これは、リンパ球を全般的に抑制する現在の免疫抑制剤は重篤な副作用が生じうるため、より特異的な治療が望まれるからである。BOS では、リンパ球の中でも特に Th1 と Th1 サイトカインが重要であることが知られてきた。しかし、これまでの Th1 または Th1 サイトカインをノックアウトしたマウスを用いた研究では、異所性に異系移植された気管の内腔閉塞は抑制されなかった。それとは対照的に、本研究では、SOCS3TG 群において、気管グラフトの内腔閉塞が抑制された。これは、SOCS3 が複合的な作用を持つため、炎症を効果的に抑制できたと考えられた。

本研究は、肺移植に関して SOCS3 に着目した初めての報告である。現在までに、SOCS3 の移植医療に関する報告は3つのみである。1つは、SOCS3 欠損により造血幹細胞移植後の移植片対宿主反応が増悪したという報告、残り2つはそれぞれ、膵島移植と心移植後の拒絶反応が、SOCS3 の導入により改善したという報告である。本研究は、これらの他臓器での報告と同様に、肺移植後の慢性拒絶に対して SOCS3 が抑制効果を有することを証明した。

【結論】

SOCS3 をレシピエントの T 細胞で過剰発現させると、異所性に移植された気管の内腔閉塞が抑制されることを、マウスのモデルで示した。SOCS3 は、肺移植後の BOS に対する新たな治療の標的分子となりうると考えられた。