

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591537
 研究課題名（和文）移植肺インターロイキン 10 経気道的遺伝子導入による拒絶反応抑制効果
 研究課題名（英文）Effect of trans-bronchial interleukin-10 gene transfer on prevention of lung allograft rejection
 研究代表者 近藤 丘（KONDO TAKASHI）
 東北大学・加齢医学研究所・教授
 研究者番号：10195901

研究成果の概要：

BN ラットの左肺にヒト IL-10 遺伝子を経気道的に遺伝子導入した後、MHC 不適合の Lew ラットに同所性に移植した。移植後 6 日目の病理学的評価で、移植肺の拒絶反応の stage および炎症反応の程度が、IL-10 群においてコントロール群に比べ有意に軽減されていた。本研究の結果から、移植肺への IL-10 遺伝子の経気道的導入が、ラット移植肺急性拒絶反応を有意に抑制することが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	600,000	0	600,000
2007 年度	300,000	90,000	390,000
2008 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	1,200,000	180,000	1,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：呼吸器外科学

1. 研究開始当初の背景

肺移植は終末期呼吸器疾患患者に対する有効な治療法として確立しているが、術後生存率は他の臓器移植に比較し未だ満足できるものではない。この主な原因として、急性・慢性の拒絶反応や感染症の頻度が他の臓器移植に比べ高いことが挙げられる。肺移植の

成績向上のためには、効果的で副作用の少ない新たな拒絶反応予防戦略の開発が重要である。我々はこれまでの研究で、近交系ラット WKY→F344 の組み合わせでは、肺移植後急性拒絶反応の自然寛解、すなわちトレランスが導入されることを発見し、その移植肺内では、interleukin-10 (IL-10) の発現が増強

していることを報告した。つづいて我々は、移植肺にアデノウイルスベクターを用いて IL-10 遺伝子導入を行い、IL-10 を過剰発現させることによって拒絶反応を制御することができるかどうかについて、ラット肺移植モデルを用いて検討したが、拒絶反応を有意に抑制させるには至らなかった。アデノウイルスベクター自体の抗原性が、移植肺内に炎症を惹起し、IL-10 遺伝子導入による免疫抑制効果が相殺された可能性が想定された。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、非ウイルス性遺伝子導入法であるリポフェクション法による肺への経気道的遺伝子導入が可能であるかどうか、また本法を用いた移植肺への経気道的 human interleukin-10 (hIL-10) 遺伝子の導入が、急性拒絶反応を抑制し得るか否かについて検討することとした。

3. 研究の方法

遺伝子導入の可否を検討するためのレポーター遺伝子として、b-ガラクトシダーゼ発現プラスミド pCMVb を購入した。同プラスミドの b-ガラクトシダーゼ遺伝子部位に hIL-10 を組み込んだ pCMVhIL-10 を作製し、hIL-10 発現プラスミドとした。まず、リポフェクション法による *in vivo* 経気道的遺伝子導入が可能であるか検討するため、SD ラットの左肺にリポフェクション試薬と pCMVb の複合体 (DNA-脂質複合体) を経気道的に注入し、3 日後にこれを X-gal 染色することにより、b-ガラクトシダーゼの発現を検討した。つづいて、*ex vivo* 経気道的遺伝子導入が可能であるか検討するために、同系同所性肺移植モデル (LEW ラット→LEW ラット) において、ド

ナー肺摘出後に pCMVb (DNA-脂質複合体) を経気道的に注入した。レシピエントへ同所性に移植し、3 日後に移植肺を X-gal 染色し、b-ガラクトシダーゼの発現を検討した。さらに、この *ex vivo* 経気道的遺伝子導入法による hIL-10 遺伝子導入が、急性拒絶反応を抑制し得るか否かについて、MHC 不適合ラット肺移植モデル (BN ラット→LEW ラット) を用いて検討した。コントロール群 (n = 6) では肺移植片に pCMVb を、IL-10 群 (n = 7) では pCMVhIL-10 を、経気道的に遺伝子導入してレシピエントに移植し、6 日後に移植肺を摘出し、拒絶反応の程度を組織学的に検討した。両群において、それぞれ拒絶反応の stage を病理学的にグレーディングするとともに、拒絶反応に伴う移植肺の炎症所見について、病理学的パラメーター (血管周囲リンパ球浸潤、気管支周囲リンパ球浸潤、細気管支周囲リンパ球浸潤、浮腫、肺胞内出血、壊死) を設定し、それぞれの所見が切片内に占める割合に基づいてスコア化した。また、急性拒絶反応に伴う細気管支上皮細胞傷害の程度を検討するため、切片内のすべての細気管支を上皮脱落の程度により、脱落なし、中等度脱落 (1 - 50%)、重度脱落 (51 - 100%) の 3 つのカテゴリーに分類し、上皮脱落の程度の分布に両群間に差があるかどうか検討した。また、hIL-10 遺伝子導入が移植肺内のサイトカインプロファイルへ与える影響を検討するため、移植肺内の 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) サイトカインとして、interleukin-2 (IL-2)、interferon-g (IFN-g)、tumor necrosis factor-a (TNF-a) を、2 型ヘルパー T 細胞 (Th2)

サイトカインとして、interleukin-4 (IL-4)、interleukin-10 (IL-10) の mRNA の発現を定量 RT-PCR を用いて比較検討した。

4. 研究成果

【結果】リポフェクション法による pCMVb の in vivo 経気道的遺伝子導入および ex vivo 経気道的遺伝子導入の結果、遺伝子導入した肺は X-gal 染色により全体が青色に染色され、これらの方法による目的遺伝子の導入が可能であることが示された。組織学的検索によって、導入細胞は気管支および細気管支上皮細胞と肺胞上皮細胞であることが明らかになった。MHC 不適合ラット肺移植モデルにおいて、pCMVhIL-10 の ex vivo 経気道的遺伝子導入による急性拒絶反応抑制効果を検討した結果、拒絶反応の stage は IL-10 群において有意に低く ($3.1.0 \pm 0.4$ vs. 3.8 ± 0.4)、拒絶反応の進行が抑制された。血管周囲リンパ球浸潤、気管支周囲リンパ球浸潤、細気管支周囲リンパ球浸潤の各スコアは、両群間に有意差を認めなかったものの、浮腫 (2.3 ± 0.8 vs. 3.2 ± 0.4)、肺胞内出血 (0.3 ± 0.5 vs. 2.2 ± 0.8)、壊死 (0.3 ± 0.5 vs. 1.2 ± 0.5) のスコアは、それぞれ、IL-10 群において有意に軽度であった。急性拒絶反応に伴う細気管支上皮細胞傷害の検討では、コントロール群では 70%以上の細気管支が「中等度脱落」以上の所見を呈したのに対し、IL-10 群では半数以上の細気管支が「脱落なし」を示し、気道上皮脱落の程度は、IL-10 群で有意に軽度であった。移植肺内のサイトカイン発現の検討では、移植後 3 日目に IL-2、TNF- α の発現が IL-10 群で有意に抑制されていた。

【結論】本研究では、リポフェクション法を用いた肺移植片への経気道的遺伝子導入が

可能であることが明らかとなった。また、MHC 不適合ラット肺移植モデルにおいて、同法による hIL-10 の遺伝子導入が急性拒絶反応を抑制することが示された。同時に、hIL-10 遺伝子導入が急性拒絶反応に伴う細気管支上皮細胞傷害に対する保護作用も有することが明らかとなった。hIL-10 遺伝子導入による免疫抑制効果には、移植肺内における移植後早期の Th1 サイトカインの発現抑制が関わりと考えられた。hIL-10 遺伝子導入による拒絶反応抑制は、ヒト肺移植後の免疫抑制療法のアプローチとなり得る可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Oishi H, Okada Y, Kikuchi T, Sado T, Oyaizu T, Hoshikawa Y, Suzuki S, Matsumura Y, Kondo T: Lipid-mediated transbronchial human interleukin-10 gene transfer decreases acute inflammation associated with allograft rejection in a rat model of lung transplantation. Transplant Proc 39: 283-285, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1. 岡田克典, 大石 久, 上野正博, 佐渡 哲, 星川 康, 遠藤千頭, 桜田 晃, 野田雅史, 菅原崇史, 松田安史, 保坂智子, 新井川弘道, 星 史彦, 海津慶子, 松村輔二, 近藤 丘: ワークショップ「肺移植の現状と将来展望」; 肺移植後急性拒絶反応の診断と治療-臨床上的の問題点とラット肺移植モデルを用いた基礎的な研究. 第 108 回日本外科学会総会, 2008 年 5 月 15 日, 長崎.

2. 大石 久, 岡田克典, 上野正博. 佐渡 哲, 野田雅史, 星川 康, 松村輔二, 近藤 丘 : シンポジウム「肺・心肺移植における急性・慢性拒絶反応の診断と治療-現状と将来-」; 末梢血リンパ球の細胞内サイトカイン染色法を用いた肺移植レシピエント拒絶反応モニタリングシステム開発の可能性. 第 43 回日本移植学会総会, 2007 年 11 月 22 日, 仙台.

3. Oishi H, Okada Y, Kikuchi T, Sado T, Hoshikawa Y, Noda M, Matsumura Y, Kondo T, et al: Lipid-mediated human IL-10 gene transfer to the airway of rat lung allograft for prevention of allograft rejection. 42nd Congress of the European Society for Surgical Research, May23 2007, Rotterdam, Holland.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 丘 (KONDO TAKASHI)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号：10195901

(2) 研究分担者

松村 輔二 (MATSUMURA YUJI)
東北大学・加齢医学研究所・准教授
研究者番号：80281997

岡田 克典 (OKADA YOSHINORI)
東北大学・加齢医学研究所・准教授
研究者番号：90323104

星川 康 (HOSHIKAWA YASUSHI)
東北大学・病院・助教
研究者番号：90333814

(3) 連携研究者 なし