

平成 22 年 6 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591490
 研究課題名（和文）遺伝子発現プロファイリングによる閉塞性細気管支炎（慢性肺拒絶）の発生機序の解明
 研究課題名（英文）Analysis of pathogenesis of obliterative bronchiolitis using gene expression profiling
 研究代表者
 森川雅之（MORIKAWA MASAYUKI）
 札幌医科大学・医学部・研究員
 研究者番号：60264537

研究成果の概要：臓器移植より多くの命が救われるようになった一方で、慢性拒絶による臓器不全で死に至る場合が少なくない。慢性拒絶の発生機構を知ることを目的として、ラット気管の大網移植モデルにより同種の免疫依存性ならびに免疫非依存性の気管閉塞に関わる因子を同定した。これらの分子群の機能調節によって、移植された臓器組織の生着率の向上につながるかどうか検討を重ねたい。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：移植免疫、慢性拒絶、閉塞性細気管支炎、DNA マイクロアレイ、遺伝子発現プロファイリング

1. 研究開始当初の背景

(1) 臓器移植後遠隔期の重要な合併症として慢性拒絶がある。血管や気管枝など移植臓器の管腔構造に線維性閉塞が生じて、手術後の重篤な臓器不全の主因であり今もって有効な予防治療法がない。移植組織の慢性拒絶発生機構の解明が切望されている。

(2) 臓器移植後の慢性拒絶のメカニズムを明らかにするため、我々は肺移植後慢性期に出現する閉塞性細気管支炎の実験モデルと

して、ラットの気管大網移植の実験系（同種移植後1ヵ月で内腔の線維性閉塞が生じる）を用いて検討してきた。すなわちT細胞を欠如するヌードマウスをレシピエントとした場合には線維性閉塞が起こらないことから、慢性拒絶がT細胞依存性の現象であること、さらにT細胞への副刺激を抑制する抗CTLA4抗体や白血球接着分子LFA-1に対する抗体を用いた場合で発生軽減されることなどを報告してきた。

(3) 一方で脱上皮処理を行った気管の移植、

あるいはレシピエントへの線維化を促進する PDGF や bFGF の投与により同系移植においても同種移植と同様の線維性閉塞が再現されることから、同種免疫非依存性応答の重要性も指摘されている。同種移植 14 日後にレシピエントから取り出した気管は上皮が脱落し、これを同系移植と類似した環境をもたらすレシピエントに再移植を行った場合でも 21 日後には線維性閉塞に至る。したがって移植後早期の一定期間同種免疫による移植片の上皮に組織障害があれば、後の変化は同種免疫非依存性に進行し、線維性閉塞が出現するまで同種免疫による組織障害が継続的に存在することは必須でないのかもしれない。

2. 研究の目的

(1) 本研究ではラット気管大網移植モデルにおける免疫依存性および非依存性機序を明らかにすることを目的として、それぞれの慢性拒絶状態の気管移植片における遺伝子発現プロファイルを比較検討した。

(2) 特異的に重要な遺伝子の同定とその後の機能解析から遺伝子の役割を検討する。このモデルによって、同系の免疫応答と非免疫応答を還元的に解析できるモデルと考えた。

3. 研究の方法

(1) ラット気管移植：ラットより気管を採取して腹部大網内に移植した。対照群を同系移植(LEW ラット->LEW)とし、同種移植群(BN->LEW)(同種免疫応答が介在)、脱上皮処理+同系移植群(LEW->LEW)(同種免疫応答非依存性)を実験群とした。

(2) RNA 抽出および RNA プローブの合成：大網に移植した気管は OTC コンパウンドにより凍結保存した。その凍結材料を厚さ 10mm で薄切しプレパラートに付着後エタノール-酢酸にて固定した。それらを脱スクレアーゼ水で処理し、組織片より total RNA を抽出してプローブ用 aRNA を合成した。

(3) マイクロアレイ解析：aRNA は Cy3 あるいは Cy5 でラベルし、マイクロアレイ解析を行った。得られた結果に基づき発現変動遺伝子を抽出し、遺伝子オンロジー解析やパスウェイ解析を行い検討した。

(4) 定量 PCR: Total RNA より相補的 DNA を合成し、ABI Prism7000 を用いて TaqMan

PCR を行った。TaqMan プローブはラット遺伝子特異的な MGB プローブを用いた。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイのデータに基づき発現変動遺伝子を抽出し、遺伝子オンロジー解析やパスウェイ解析を行い検討した所、同系移植した気管支 (ISO 気管支)、異系間移植した気管支 (ALLO 気管支)、同系移植ではあるが気管支粘膜を脱落処理した後同系移植した気管支 (Denude-ISO 気管支) の 3 群間で差異が認められた。

(2) 特に変動値が明確であったものを 9 種類選び、8 個体の気管支組織より total RNA を抽出して定量 PCR による再解析を行ったところ、2つの遺伝子がマイクロアレイによる変動と同じ挙動を示した。

(3) すなわち Denude-ISO 気管支で特異的な発現上昇を確認できた遺伝子は coagulation factor II (thrombin) 受容体であり、その発現は ISO 気管支はもとより ALLO 気管支でも低い傾向を示していた。coagulation factor II 受容体は 7 回膜貫通型の G 蛋白共役型受容体に属し、組織の線維化や炎症反応に調節に深く関わっているため、Denude-ISO 気管支におけるその機能的意義に大変興味を持たれた。

また RAS-related C3 botulinum substrate 2 (RAC2) は ALLO 気管支で発現が高かった遺伝子であり、Th2 細胞に高発現する small GTP-binding protein として知られる。従って同種間の免疫細胞応答が活発に行われていたことを示しているものと考えられた。

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 7 件)

- ① Kubo T, Ichimiya S, Tonooka A, Nagashima T, Kikuchi T, Sato N. : p63 induces CD4(+) T-cell chemoattractant TARC/CCL17 in human epithelial cell. J Interferon Cytokine Res. 28 : 725-732, 2008. 査読有
- ② Tsukahara T, Kawaguchi S, Torigoe T, Kimura S, Murase M, Ichimiya S, Wada T, Kaya M, Nagoya S, Ishii T, Tatezaki S, Yamashita T, Sato N. : Prognostic impact

and immunogenicity of a novel osteosarcoma antigen, papillomavirus binding factor, in patients with osteosarcoma. *Cancer Sci.* 99 : 368-375, 2008. 査読有

③ Sakata K, Someya M, Omatsu M, Asanuma H, Hasegawa T, Ichimiya S, Hareyama M, Himi T. : The enhanced expression of the matrix metalloproteinase 9 in nasal NK/T-cell lymphoma. *BMC Cancer* 7 : 229, 2007. 査読有

④ Koshiba S, Ichimiya S, Nagashima T, Tonooka A, Kubo T, Kikuchi T, Himi T, Sato N. : Tonsillar crypt epithelium of palmoplantar pustulosis secretes interleukin-6 to support B-cell development via p63/p73 transcription factors. *J Pathol.* 214 : 75-84, 2008. 査読有

⑤ Kurose M, Kojima T, Koizumi J, Kamekura R, Ninomiya T, Murata M, Ichimiya S, Osanai M, Chiba H, Himi T, Sawada N. : Induction of claudins in passaged hTERT-transfected human nasal epithelial cells with an extended life span. *Cell Tissue Res.* 330 : 63-74, 2007. 査読有

⑥ Kikuchi T, Naruse TK, Onizuka M, Li S, Kimura T, Oka A, Morishima Y, Kulski JK, Ichimiya S, Sato N, Inoko H. : Mapping of susceptibility and protective loci for acute GVHD in unrelated HLA-matched bone marrow transplantation donors and recipients using 155 microsatellite markers on chromosome 22. *Immunogenetics* 59 : 99-108, 2007. 査読有

⑦ Tabata A, Morikawa M, Miyajima M, Bennett BL, Satoh Y, Huang J, Tamura Y, Sato N, Abe T. Suppression of alloreactivity and allograft rejection by SP600125, a small molecule inhibitor of c-Jun N-terminal kinase. *Transplantation* 83: 1358-64, 2007. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

① 一宮慎吾 : 診断講習会—マントル細胞リンパ腫の病理組織診断. 第 96 回日本病理学会総会. 金沢. 5月17日、2008.

② Nagashima T, Ichimiya S, Saito Y, Kikuchi T, Himi T, Takami T and Sato N. : Arachidonate 5-lipoxygenase supports the function of resting B cells. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会. 京都. 12月1日、2008.

③ 塚原智英、木村重治、一宮慎吾、鳥越俊彦、川口哲、和田卓郎、山下敏彦、佐藤昇志 :

Scythe/BAT3 は骨肉腫抗原 PBF に誘導されるアポトーシスを制御する. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋. 10月29日、2008.

④ 長島勉、一宮慎吾、齊藤由幸、菊地智樹、氷見徹夫、佐藤昇志 : 5-LO 関連脂質メディエーターによる抗体産生応答の制御機構. 第 88 回北海道医学大会病理系分科会・第 341 回北海道病理談話会. 札幌. 9月20日、2008.

⑤ 長島勉、一宮慎吾、齊藤由幸、菊地智樹、氷見徹夫、佐藤昇志 : 5-リポキシゲナーゼ関連脂質メディエーターによる抗体産生応答の制御機構. 第 97 回日本病理学会総会. 金沢. 5月15日、2008.

⑥ 長島勉、小柴茂、一宮慎吾、佐藤昇志、氷見徹夫 : 掌蹠膿疱症の扁桃陰窩上皮による IL-6 産生亢進. 第 26 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会総会. 大阪. 2月22日、2008.

⑦ Ichimiya S, Tonooka A, Koshiba S, Kikuchi T, Kubo T, Ilmarinen T, Ulmanen I, Sato N. : AIRE/p63 complex regulates the expression of CIITA in human thymic epithelial cells. The 3rd International p63/p73 workshop. Rome, Italy. Mar 18-21, 2007.

⑧ Ichimiya S, Saito Y, Kikuchi T, Nagashima T, Koshiba S, Tonooka A, Sato N. : Role of arachidonate 5-lipoxygenase in mantle zone B-cells. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会. 東京. 11月20日、2007.

⑨ 菊地智樹、猪子英俊、成瀬妙子、鬼塚真仁、一宮慎吾、佐藤昇志 : マイクロサテライトマーカーを用いたヒト第 22 番染色体領域における骨髄移植後合併症急性 GVHD 関連遺伝子の探索. 第 87 回北海道医学大会病理系分科会・第 40 回北海道病理談話会. 札幌. 9月1日、2007.

⑩ 長島勉、小柴茂、一宮慎吾、菊地智樹、氷見徹夫、佐藤昇志 : 掌蹠膿疱症における扁桃陰窩上皮細胞の機能解析. 第 87 回北海道医学大会病理系分科会・第 40 回北海道病理談話会. 札幌. 9月1日、2007.

⑪ 兵頭秀樹、一宮慎吾、秋葉英成、玉川光春、兵頭かずさ、武田美貴、山直也、河合有里子、佐藤大志、荒谷和紀、小野寺麻希、笠原理子、鷺尾嘉一、晴山雅人、長谷川匡 : 当院における死亡時画像診断 (オートプシーイメージング) —施行までの経過について. 第 116 回日本医学放射線学会北日本地方会・第 61 回日本核医学会北日本地方会. 福島. 6月23日、2007.

〔図書〕(計 1 件)

① 小柴茂、長島勉、一宮慎吾 : 扁桃研究の

新展開—扁桃病巣感染症のメカニズム.
Annual Review 免疫 2007、中外医学社、東京.
p164-171、2007.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

森川雅之 (MORIKAWA MASAYUKI)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：60264537

(2)研究分担者

一宮慎吾 (ICHIMIYA SHINGO)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：30305221

(3)連携研究者