

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790958
 研究課題名（和文） IL-18 結合蛋白遺伝子導入による肝虚血再灌流障害抑制法の開発と肝移植への応用
 研究課題名（英文） Gene delivery of IL-18 binding protein to the liver after ischemia reperfusion injury
 研究代表者
 篠田 昌宏（SHINODA MASAHIRO）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：50286499

研究成果の概要：

肝移植におけるインターロイキン 18（以下 IL-18）の作用と役割を解明するとともに、移植時の虚血再灌流障害の抑制を目的とする。IL-18 を抑制するため、移植肝に対しアデノウイルスベクターを用いて、IL-18 の抑制性受容体である IL-18 binding protein（以下 IL-18BP）の遺伝子を導入し、虚血再灌流障害の抑制効果を検討した。結果 IL-18 制御によって IFN- γ の発現を培養上清の濃度依存性に抑制することを確認した。また同種異系移植において、IL-18 制御によって生存日数と ALT の血中濃度や肝組織中の各種ケモカイン濃度が有意に改善することを確認した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝臓外科学

1. 研究開始当初の背景

肝移植において心停止ドナーの肝臓の viability が不良で primary graft nonfunction をきたす原因は虚血再灌流障害にほかならない。肝虚血再灌流障害を効率良く抑制できれば、心停止ドナーからの肝移植が可能になると思われる。IL-18 は肝虚血

再灌流障害の key mediator として最近注目されつつあり、IL-18 阻害が肝虚血再灌流障害の抑制に重要な役割を果たす可能性が極めて高いと考えこの研究に着想した。

2. 研究の目的

本研究では、肝移植における IL-18 の作用と、IL-18 を介した NK 細胞の役割を解明するとともに、肝移植後の虚血再灌流障害および急性拒絶反応の抑制を目的とする。炎症性サイトカインである IL-18 を選択的に抑制するため、移植肝に対しアデノウイルスベクターを用いて、IL-18 の抑制性受容体である IL-18BP の遺伝子を導入し、虚血再灌流障害および急性拒絶反応の抑制効果を検討するとともに、移植肝内のナチュラルキラー細胞（以下 NK 細胞）の作用や活性を検討する。最終的には肝移植時の移植肝に対する遺伝子治療を目指す。

3. 研究の方法

(1) IL-18BP の遺伝子を発現する Ad-RGD を作製し、*in vitro* で遺伝子発現を確認した。さらに、同ベクターが生理活性を持つことを確認するため、以下のような方法を用いた。はじめに作成した Ad-RGD を HeLa 細胞に感染させて培養し、2 日後の培養上清を採取した。また、ラットの脾細胞を調整し、recombinant IL-18 を用いて刺激することで、インターフェロン（以下 IFN- γ ）を発現する実験系を再現した。同実験系に採取した HeLa 細胞の培養上清を加え、IFN- γ の発現を検討した。また、実際にラット肝にベクターを門脈内注入し、ウイルスの導入効率を X-gal 染色にて観察した。

(2) IL-18 阻害が虚血再灌流障害と肝移植の予後を改善することを確認するため、以下の方法を用いた。ラット肝移植モデルを使用し、移植肝に遺伝子導入後、肝移植を行なった。まず同種同系群にて虚血再灌流障害を軽減するか否かを、AST, ALT の血中濃度測定等にて検討した。また、同種異系群にて急性拒絶反応抑制効果を、移植後生存日数にて評価した。

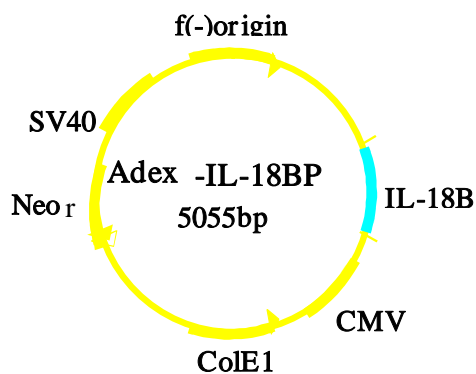


図 1 : IL-18BP を発現するアデノウイルスベクター (Adex-IL18BP)

4. 研究成果

(1) Ad-RGD によって IL-18BP を遺伝子導入した HeLa 細胞の培養上清の濃度依存性に INF- γ の発現が抑制することを確認した。このことから、作成した Ad-RGD が生理活性を持つ IL-18BP を持つことが示された。In vivo においても、ドナーラットに Ad-RGD を全身投与することによって肝組織に IL-18BP 遺伝子が発現することをリアルタイム PCR にて確認した。
遺伝子導入した肝では下図のごとく高い導入効率を認めた。

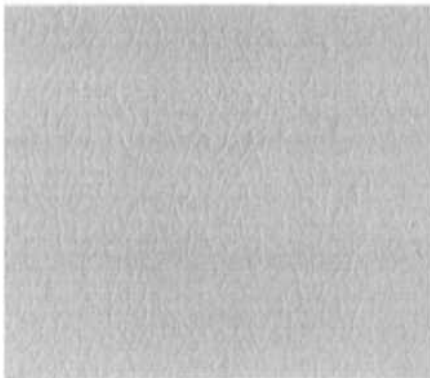
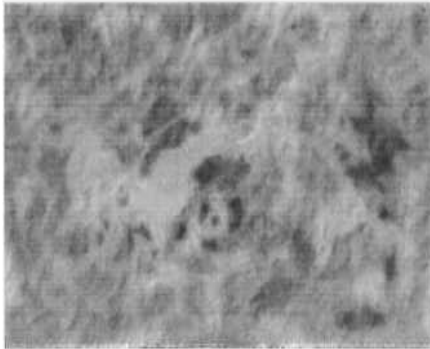


図 2: X-gal 染色。上: 遺伝子導入肝、下: 生食注入肝

(2) 同種同型群において AST, ALT 値が有意に抑制された。また同種異系群においても、IL-18BP 遺伝子導入群 (Adex-IL-18BP) で生存日数が延長することを確認し、移植後 7 日目ではコントロール群 (Adex-LacZ) と比較し、血中の ALT 値 (図 3) や肝組織中の各種ケモカイン濃度 (図 4) に有意差を認めることを確認した。

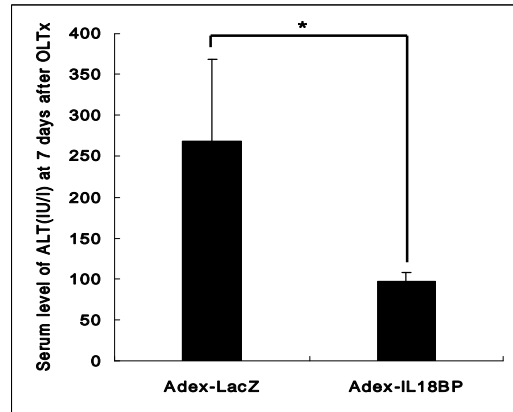


図 3: 移植後 7 日目の血清 ALT

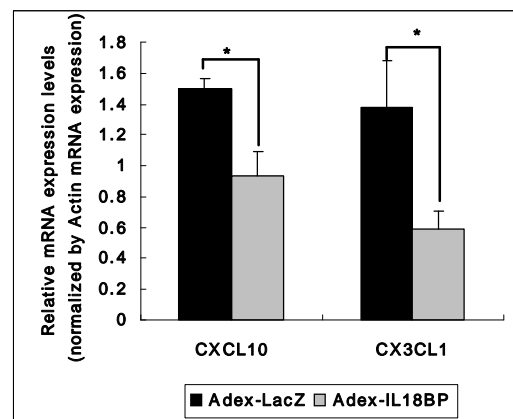


図 4: 移植後 7 日目の肝組織中の各種ケモカイン

なお、現在ブタモデルにて実験結果を検証すべく、ブタモデルを作成中である (下図)。



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0件)

〔学会発表〕(計3件)

小野滋司, 尾原秀明, 篠田昌宏, 田辺稔, 北川雄光ら. ラット肝移植モデルを用いた急性拒絶反応時のIL-18の役割の解明. 第44回日本移植学会総会 大阪, 2008.09.21

Ono S, Obara H, Shinoda M, Tanabe M, Kitagawa Y, et al. The Role of interleukin-18 in the Rat Orthotopic Liver Transplant Model. 2008 American Transplant Congress Tront, 2008.06.03

尾原秀明, 小野滋司, 篠田昌宏, 田辺稔, 北島政樹ら. ラット肝移植モデルにおけるIL-18の役割の解明. 第107回日本外科学会定期学術集会 東京, 2007.04.12

〔図書〕(計0件)

〔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

篠田 昌宏 (SHINODA MASAHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 50286499

(2)研究分担者

(3)連携研究者