

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究C

研究期間：平成22年度～平成24年度

課題番号：22591537

研究課題名（和文） 同種組織移植におけるメチシリン耐性菌増殖抑制メカニズムの解明

研究課題名（英文） Mechanism of anti-infectious property of heart-valve and vascular homograft

against *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* -impact of cryopreservation manipulation

研究代表者

齋藤 綾 (SAITO AYA)

東京大学医学部附属病院心臓外科・助教

研究者番号：10431868

研究成果の概要（和文）：

以前の研究から、同種血管移植後（新鮮グラフト）には移植片が免疫応答に関連するIDOを介した抗感染能を取得している可能性が示唆されてきた。本研究では、同種移植後の移植片として新鮮グラフトのみならず凍結保存後のグラフトにおいてもMRSAの増殖を抑制する機能を獲得しており移植片局所における特異的炎症反応の存在（T cell response、 $IFN\gamma$ ・ $TNF\alpha$ の遺伝子発現）を確認した。更に、同種移植時に発現する $IFN\gamma$ の刺激により抗感染性に関与すると考えられるtryptophan代謝酵素IDO（indoleamine 2,3-deoxygenase）についても凍結保存グラフトで遺伝子・蛋白レベルで発現していることが確認できた。これらにより、同種移植後 $IFN\gamma$ の刺激により移植片に発現したIDOが移植片のもつ抗感染性メカニズムがグラフトの凍結保存加工を経た後も期待できる効果であることが実証された。臨床的に観察されてきた同種凍結保存心臓弁・血管組織（所謂「ホモグラフト」）のMRSA抗感染性が科学的実証できたと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Recent experiments with fresh vascular allografts showed suppression of MRSA growth by the induction of immune response and tryptophan metabolism via the IDO pathway. In this study, the impact of cryopreservation on a potential key role in the anti-MRSA resistance was analyzed. Brown Norway and Lewis rats were used for allogeneic transplantation models, and fresh allograft (FA) and cryopreserved allograft (CA) were used as conduits. The grafts were recovered on postoperative day 7 and 14 and submitted for real-time PCR and MRSA proliferation assay. $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ and IDO gene expression in FA was higher than in CA on days 7 and 14, and both FA and CA groups showed significant suppression of MRSA growth compare to control group. In conclusion, both FA and CA suppressed MRSA proliferation. IDO expression in CA was lower than in FA, but sufficient to suppress MRSA growth was expected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,900,000	570,000	2,470,000
23年度	1,000,000	300,000	1,300,000
24年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

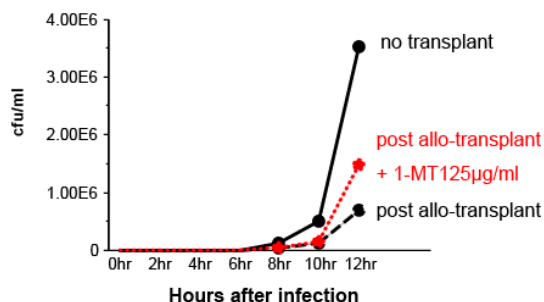
科研費の分科・細目：外科系臨床学・胸部外科学

キーワード：心臓血管外科学、MRSA

1. 研究開始当初の背景

凍結保存同種心臓弁・血管組織は約 40 年前より一般的な人工弁や人工血管と同様の代用グラフトとして心臓血管外科手術に用いられてきた。1980 年代には、凍結保存同種心臓弁・大動脈組織（ホモグラフト）を感染性心内膜炎・感染性大動脈瘤に用いた場合に人工弁・人工血管よりも治療成績が著明に良好であることが臨床的によく知られるようになった。以降、ホモグラフトの感染性心血管病変への使用は徐々に定着していった。しかし、このグラフトの抗感染性に関する見解は経験に基づく臨床的印象の域を越えず、科学的なメカニズムは解明されていなかった。

我々はこれまでの実験で同種組織の抗感染性について実験的に探るべく近交系ラットを用いた同種血管移植を行い、特に IDO に注目し検討を重ねてきた。まず移植後血管における炎症性サイトカインの発現を確認し、同種移植群 (allogeneic transplantation) では TNF α 、INF γ 、IDO のいずれの遺伝子も発現しており経時的に増加もしくは一定の発現を確認した。次に免疫組織学的検討により自家移植群の血管では認められない炎症性細胞の浸潤が、同種移植群では高度なリンパ球を主体とした炎症性細胞の浸潤を認めた。また、細胞浸潤が或る部位での IDO 発現が確認された。移植後摘出組織と MRSA の混合培養による検討では同種移植後の血管を用いた場合に明らかな MRSA 増殖抑制を呈することが観察された。



更に、IDO に対する Trp 代謝拮抗阻害剤 (1-MT) を MRSA 混合培養系に追加し MRSA 増殖曲線を検討したところ、同種移植群 (IDO 陽性群) における MRSA 増殖は 1-MT 添加無しの培養系に比べ明らかな MRSA の増殖が多いことが確認された。(左図)

以上により、新鮮グラフトを用いた同種移植後の血管組織には IFN γ を介した特異的炎症反応が惹起されておりさらに IDO が発現していることが分かった。IDO 拮抗剤 (1-MT) を用いた実験を追加することで、同種組織が発揮する抗感染性には IDO が関連していることが示唆された。

これまでの研究は初期段階として新鮮グラフトのみを使用してきたが、実際の臨床に即した場合は凍結保存後のグラフトにも同じ抗感染性効果が期待できるか否かについては未確認であった。

2. 研究の目的

本研究では、同種移植片が有する抗感染性のメカニズムについて、免疫寛容と同時に抗感染性を呈するといわれるトリプトファン (Trp) 代謝酵素 Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) に注目し、ラット同種移植後グラフト内での IDO 発現とグラフト抗感染性との関連性について MRSA を用いた基礎的検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

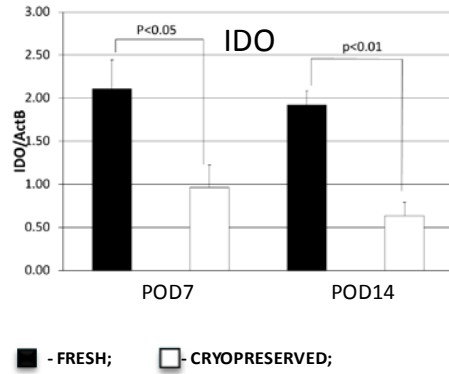
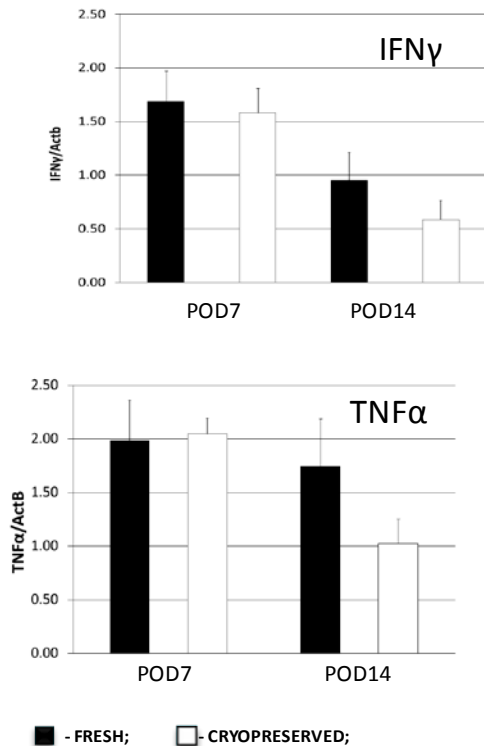
近交系ラット (Lewes rat (Lew), Brown Norway rat (BN)) を用いた胸部下行大動脈-腎動脈下腹部大動脈移植の動物モデルを用いて実験を行った。移植の組み合わせは Lew \rightarrow BN (同種移植群, allotransplantation) とした。グラフトは更に新鮮グラフト (fresh allograft: FA) と凍結保存グラフト (cryopreserved allograft: CA) の 2 種類として移植に用いた。凍結保存方法は、ヒト凍結

保存グラフトをと同様プログラムフリーザーを用いて-1°C/分で-5°C0 まで凍結させ-50°Cから-80°Cまでは-5°C/分で凍結操作を完了させた。凍結グラフトは使用までの間10%DMSO入りRPMI1640培養液に浸漬させ液体窒素タンクで-180°C下保存し、使用時に解凍した。グラフト移植術後7、14日目に移植片を摘出し検体とした。検査項目は realtime PCR による遺伝子発現量の定量 (TNF α 、INF γ 、IDO などの炎症性サイトカイン)、および MRSA と摘出組織片の混合培養による MRSA 増殖曲線に関する検討を行った。なお、対照群は未移植血管 (未移植群、fresh control:FC) とした。

4. 研究成果

①移植後血管における炎症性サイトカインの発現

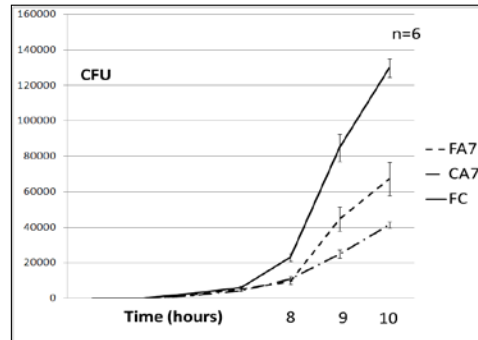
移植後血管における炎症性サイトカインの遺伝子レベルにおける発現を検討した IFN- γ 、TNF α の発現量は移植術後7日目摘出、14日目摘出の両方において、新鮮グラフト群 (FA) と凍結グラフト群 (CA) で同等の RNA 発現量を認めた。IDO については FA、CA 両群共に発現を認めるが、発現量は FA の方が多かった。



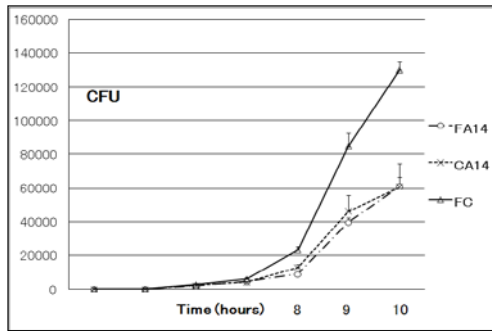
②移植後摘出組織と MRSA 混合培養における MRSA 増殖曲線に関する検討

移植後摘出血管を MRSA と共に混合培養し、培養開始後2時間毎に MRSA の colony 数をカウントし増殖曲線を作成した。なお、この検討では IDO 陽性が確認できている同種新鮮グラフト (FA) と同種凍結保存グラフト (CA) 群を用い、IDO 陰性群として未移植 (FC) 群を用いた。

移植期間7日間で摘出した FA、CA グラフト (FA7、CA7) を用いた培養結果を下図に示した。培養開始6時間後までは全群で MRSA の増殖は明らかでなかったが、培養開始後8時間で増殖速度に明らかな差を認め FC 群で増殖は著明であった。培養開始後10時間では FA 群では FC 群の二分の一以下の MRSA 増殖に、CA 群では FC 群の三分の一以下の MRSA 増殖に留まった。



更に、移植後14日間で摘出したグラフト (FA14、CA14) を用いた混合培養実験も施行した。得られた結果には再現性があり、培養開始8時間目より明らかな MRSA 増殖が FC 群に認められる一方で FA14、CA14 での MRSA 増殖は緩徐な速度に留まり、培養開始10時間での MRSA 菌量は FA14 群、CA14 群共に FC 群の半分以下に留まった。



本研究では、既に報告してきた同種新鮮グラフトにおける MRSA 増殖抑制効果が凍結保存後にもグラフトに維持できているかを検証することが目的であった。以上の結果から、グラフトの抗感染性に関与すると考えられている IDO 酵素 (RNA) の発現は、程度はやや減弱するものの凍結保存グラフトにも十分認められることが確認できた。また、MRSA 混合培養の結果では、凍結保存グラフトは新鮮グラフトと同等の MRSA 増殖抑制効果を発揮できることが確認できた。またその効果は手術直後だけでなく移植後 14 日経過したグラフトにおいても期待できる可能性が示唆された。

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 6 件)

1. Nawata, K., Nishimura, T., Kyo, S., Hisagi, M., Kinoshita, O., Saito, A., Motomura, N., Takamoto, S. and Ono, M., Outcomes of midterm circulatory support by left ventricular assist device implantation with descending aortic anastomosis. *J Artif Organs* 2010. 13: 197-201.
2. Ge, W., Jiang, J., Liu, W., Lian, D., Saito, A., Garcia, B., Li, X. C. and Wang, H., Regulatory T cells are critical to tolerance induction in presensitized mouse transplant recipients through targeting memory T cells. *Am J Transplant* 2010. 10: 1760-1773.
3. Nawata, K., Nishimura, T., Kyo, S., Hisagi, M., Kinoshita, O., Saito, A., Motomura, N., Takamoto, S. and Ono, M., Thrombotic occlusion of the ascending aorta after Toyobo LVAD

implantation with descending aortic perfusion in a post-Bentall patient. *J Artif Organs* 2010. 13: 228-231.

4. Saito, A., Motomura, N., Hattori, O., Kinoshita, O., Shimada, S., Saiki, Y., Kyo, S. and Ono, M., Outcome of surgical repair of aorto-esophageal fistulas with cryopreserved aortic allografts. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2012. 14: 532-537.
5. 齋藤 綾、小野 稔 同種心臓弁・血管臨床と研究 Vol188 :410-414, 2011
6. 齋藤 綾 心臓手術の実際－ホモグラフトを用いた大動脈基部置換術 *Clinical Engineering Vol 23 (3):250-253, 2012*

[学会発表] (計 7 件)

1. Saito A., Motomura N., et.al. Cryopreserved arterial allograft for coronary artery reconstruction in critical infective endocarditis cases, Cryopreserved arterial allograft for coronary artery reconstruction in critical infective endocarditis cases CRYO2010 Bristol, UK, 2010
2. Saito A., Motomura N., et.al. Aortic root replacement with cryopreserved aortic valve allograft - 12-year experience from University of Tokyo Tissue Bank 16th ISC annual meeting. Vienna, Austria, 2011
3. Saito A., Motomura N., et.al. Aortic root replacement in critical infective endocarditis with cryopreserved heart valve allograft - effective use of arterial allografts for coronary artery reconstruction 19th ASCVTS annual meeting, Phuket, Thailand. 2011
4. Saito A., Motomura N., et.al. Surgical outcome of cryopreserved aortic allografts for aorto-esophageal fistula. 26th EACTS annual meeting, Lisbon, Portugal. 2011
5. 齋藤 綾、本村 昇 他。凍結保存心臓弁・血管組織の臨床応用－東京大学組織バンクの活動状況より 第 110 回日本外科学会総会、名古屋。2010
6. 齋藤 綾、本村 昇、他。凍結保存同種血管・心臓弁組織移植－先進医療と保険診療の間で－ 第 75 回日本循環器学会総会、横浜、2011
7. Saito A., Motomura N., et.al. Surgical Strategy for Aorto-esophageal Fistula - Effective use of Endovascular

Stentgrafts and Cryopreserved Aortic Allografts. 第 76 回日本循環器学会総会、福岡. 2012

[図書] (計 1 件)

1. Saito A, Motomura N. Clinical Outcome of Aortic Root Replacement With Cryopreserved Aortic Valve Allografts. AORTIC VALVE SURGERY Edited by Motomura N., InTech, 2011. Chapter 7, 123-136

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 綾 (SAITO AYA)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10431868

(2) 研究分担者

本村 昇 (MOTOMURA NOBORU)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40332580

(3) 連携研究者

野口雅久 (NOGUCHI NORIHISA)
東京薬科大学薬学部・準教授
垣見和宏 (KAKIMI KAZUHIRO)
東京大学・医学部附属病院・特任準教授