

令和元年6月24日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19845

研究課題名（和文）移植後拒絶反応におけるOGG1の役割

研究課題名（英文）Role of OGG1 in cardiac allograft rejection

研究代表者

五味淵 俊仁（Gomibuchi, Toshihito）

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：90597668

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：OGG1ノックアウトマウスを用いて、腹部への異所性心移植モデルを作成した。急性拒絶モデルにおいてはコントロール群と比較して生着率に有意差は認めなかった。移植後5日に犠牲死させ移植心を摘出し、組織学的検討を行った。OGG1ノックアウト群において、炎症細胞浸潤や心筋障害の程度は重度であった。IL-1、80HdG、OGG1について免疫染色を行い、解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、OGG1と移植免疫についての研究は無く、これまでにない独創的な計画であると考えられる。DNA修復酵素であるOGG1が移植後の拒絶反応を抑える新たな標的分子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We used a murine heterotopic cardiac transplantation model using OGG1 knockout mice. There is no difference in graft survival of fully mismatched model compared to control group. Donor hearts were harvested for examination on Days 5. In OGG1 knockout group, a severe infiltration of inflammatory cells was observed in the graft and more myocardial injury was seen. The expression of IL-1, 80HdG and OGG1 was analyzed by immunohistochemistry.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：IL-1 OGG1 心移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

移植医療は、実験的医療の域を脱し世界中で多くの末期臓器不全の患者に恩恵をもたらしている。しかし、移植後拒絶反応は、免疫抑制剤の進歩した現在においてもなお、重要な合併症であり、特に急性拒絶反応は移植後一年以内の死亡率に最も影響を及ぼす因子である。近年、虚血再灌流障害と急性拒絶反応の相互作用による移植後急性炎症の研究がすすんでおり、移植後早期の炎症をいかに抑制するかが、グラフト生着の長期成績を左右すると考えられるに至っている。脳、心、腎などの臓器における虚血後の再還流は、その過程で生成される reactive oxygen species(ROS)により臓器障害を惹起するとされている。ROSの蓄積による酸化ストレスは細胞へのストレスの中で重要なものの一つである。すなわち DNA やヌクレオチドなどの核酸が反応性の高い活性酸素にさらされると、塩基の損傷などが起こり、細胞は増殖を停止し DNA の修復を行う。これが適切に修復されないと、突然変異やアポトーシス機構を誘導し自ら細胞死を引き起こす。この中で最近注目されているのが 8-oxoguanine で、OGG1 はこれを除去修復する DNA 修復酵素である。OGG1 と虚血再還流障害の関連については、Fitton らは犬の心臓の虚血再灌流障害によって、心筋内に OGG1 が蓄積していることを報告し(Fitton et al., Ann Thorac Surg 2005;80:1812-20)、その他にも、Kosieradzki らは腎移植での虚血再還流障害は急性拒絶反応に影響していると報告している(Kosieradzki et al., Transplant Proc. 2008 Dec;40(10):3279-88)。また Tanaka らはマウスの心移植モデルにおいて、虚血再還流障害の影響を改善させることで急性および慢性拒絶反応が減少したと報告している。(Tanaka et al., Blood 2004 Dec 1;104(12):3789-96)

## 2. 研究の目的

急性拒絶反応における DNA 修復酵素の一つである OGG1 の役割について、OGG1 ノックアウトマウスを用いた異所性心移植モデルを用いて解析したい。この研究成果は OGG1 を介した虚血再還流障害の制御により、急性拒絶反応を抑制しうる有用な治療戦略として期待できると考えている。

## 3. 研究の方法

### (1) 急性拒絶モデル作成および生着率の比較

6週から8週の雄の OGG1 ノックアウトマウス(C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>)バックグラウンド)をドナー、BALB/c (H-2<sup>d</sup>)マウスをレシピエントに用い、腹部への異所性心移植モデルを作成する。コントロール群として、C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>)マウスをドナー、BALB/c (H-2<sup>d</sup>)マウスをレシピエントとした MHC フルミスマッチモデルを作成する。移植後は移植心の拍動を確認、拍動の消失をもって拒絶とし、生着率を比較検討する。

### (2) 組織学的検討

このコントロール群においては、移植後 6 日から 10 日で移植心は拒絶されるので、移植後 5 日に犠牲死させ移植心を摘出する。摘出した移植心は、2 分割しパラフィン包埋標本、凍結標本とする。HE 染色にて炎症細胞浸潤や心筋傷害の程度を観察し比較検討する。IL-1、80HdG、OGG1 について免疫染色を行い両群間で比較検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 急性拒絶モデルのグラフト生着率

OGG1 ノックアウト群(n=4)、コントロール群(n=4)とも移植後 5 日までに拒絶され、両群間に有意差を認めなかった。(図 1)

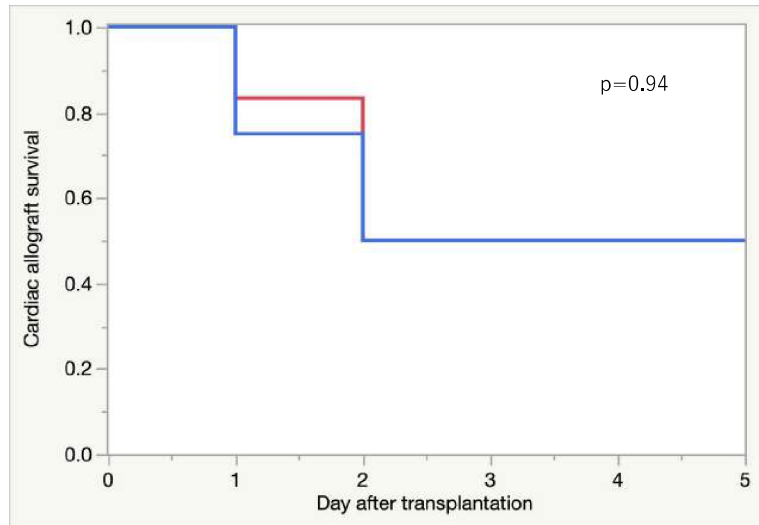


図1 急性拒絶モデルのグラフト生着率

(2) 組織学的検討

( )移植後5日に摘出された移植心のHE染色においては、OGG1 ノックアウト群では広範囲に炎症細胞浸潤、心筋炎を認め、組織の浮腫や出血を認めた。コントロール群においても同様に炎症細胞浸潤や心筋障害を認めたが、ノックアウト群と比較すると程度は軽度であった。(図2)

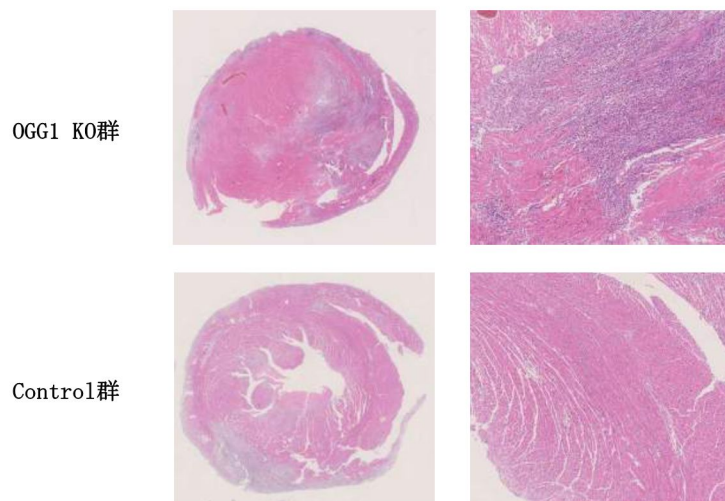


図2 移植後5日におけるHE染色

(ii)図3はIL-1の免疫染色を示す。炎症細胞の浸潤する部位に一致して発現を認めた。コントロール群ではOGG1 ノックアウト群と比較すると発現の程度は軽度であった。

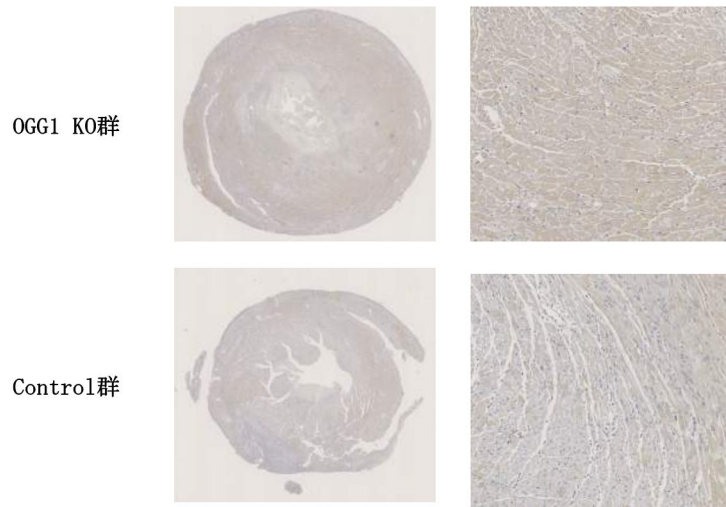


図3 免疫染色 IL-1 $\beta$

図4は80HdGの免疫染色を示す。炎症細胞の浸潤する部位に一致して発現を認めた。OGG1 ノックアウト群では発現が非常に強く、コントロール群ではOGG1 ノックアウト群と比較すると発現の程度は軽度であった。

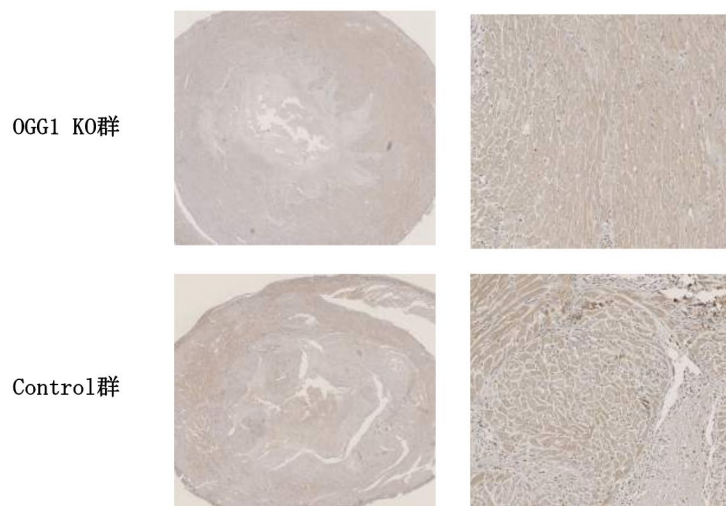


図4 免疫染色 80HdG

図5はOGG1の免疫染色を示す。コントロール群では炎症細胞の浸潤する部位に一致して発現を認めた。OGG1 ノックアウト群では発現は認めなかった。

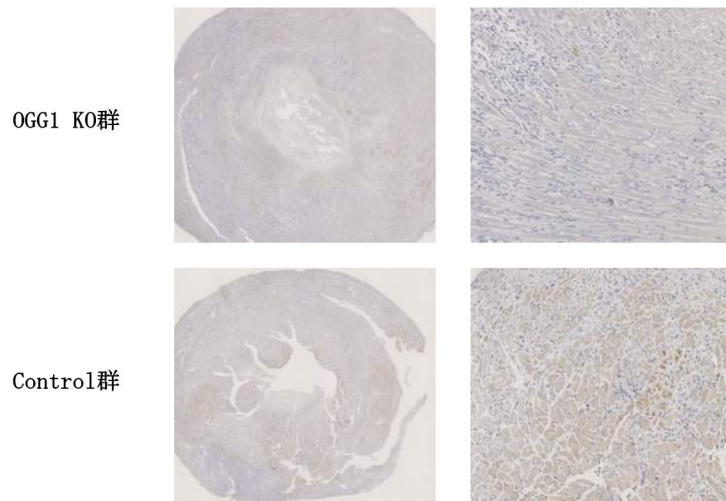


図5 免疫染色 OGG1

### (3) サイトカインの解析

移植後 5 日に犠牲死させ IL-1、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 に関して、RT-PCR を施行した。現在、データの解析を施行中である。

### (4) 慢性拒絶モデル作成と生着率の比較

OGG1 ノックアウトマウス(C57BL/6 (H-2b)バックグラウンド)をドナー、B6.C-H-2bm12 をレシピエントに用い、急性期モデル同様に 異所性心移植モデルを作成した。コントロール群として、B6.C-H-2bm12 マウスをドナーとした MHC マイナーミスマッチモデルを用いた。移植後 21 日、42 日に犠牲死させて移植心を摘出した。現在データを解析中である。

これまでの研究で、OGG1 は急性拒絶反応と関与していた。二群間でグラフト生着率に有意差はなかったが、組織学的には OGG1 ノックアウト群で炎症細胞浸潤や心筋障害の程度は重度であった。急性拒絶反応との関連を解析すべく移植後 5 日の摘出心で IL-1、8OHdG、OGG1 で免疫染色を施行したところ、OGG1 ノックアウト群で IL-1、8OHdG が強く発現していた。RT-PCR、ELISA を施行し現在データを解析中である。また、OGG1 が慢性拒絶に関与している可能性を考慮し、現在慢性拒絶モデルを作成し、現在データを解析中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。