

平成 21 年 11 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18591536

研究課題名 (和文) 心臓移植後の慢性拒絶反応における Toll-like receptor の関与の解析

研究課題名 (英文) Analysis of chronic rejection after heart transplantation, possible involvement of Toll-like receptor.

研究代表者

赤坂 純逸 (AKAWAKA, JUNITSU)

東北大学・病院・助教

研究者番号：80343044

研究成果の概要：

虚血再灌流障害にたいする Toll-like receptor の関与を検索するために大動物を用いた実験を行なった。15-18 kg のブタをドナーおよびレシピエントとして人工心肺下に同所性心臓移植を行なった。大動脈遮断、6 時間の心保存ののち再灌流後、2 時間で心筋の標本を採取した。形態学的な検索として、potassium pyroantimonate 法でミトコンドリア内のカルシウムの蓄積を観察した。即ち、cacodylate-buffered 2.5% glutaraldehyde で心筋組織を固定し、電子顕微鏡 (Philips CM10) で観察し、ミトコンドリア内にはカルシウムの沈着を定量化した。心筋の interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-10 および tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) をエライザキットを用いて測定するための予備実験を行なった。

小動物の実験では、150-200 g の Lewis rat をドナー、150-200 g の Fischer rat をレシピエントとし、また、Lewis rat をドナー、およびレシピエントとして心移植を行った。免疫抑制剤として、サイクロスポリン A (CsA) 10mg/kg/日を皮下注した。心移植手技は Ono-Lindsey 法に準じて行った。Lurie らの方法で sclerotic grading score (SGS) として表わした冠動脈硬化は、allograft では有意に高いことを確認した。このモデルをもちいて心筋中の IL-1 receptor、IL-1 beta、IL-6 および TNF-alpha の mRNA の発現を測定する方法について検討して心臓移植後の冠動脈硬化症に対する toll-like receptor の関与を検索するために、まず、allograft と isograft で、冠動脈硬化症の程度が異なることを確認した。これは、150-200 g の Lewis rat をドナー、150-200 g の Fischer rat をレシピエントとし、また、Lewis rat をドナー、およびレシピエントとして心移植を行った。免疫抑制剤として、サイクロスポリン A (CsA) 10mg/kg/日を皮下注した。Toll-like receptor の関与を検索する目的で、macrophage infiltration、Toll-like receptor-2、-4 について使用した薬剤、拒絶反応との関係から検索した。これらは心臓移植の長期生存成績を向上させる重要な研究であると考えている。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2006年度 | 1,500,000 | 0 | 1,500,000 |
| 2007年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2008年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 540,000 | 3,840,000 |

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：Toll-like receptor、心臓移植、冠動脈硬化、虚血再灌流障害、interleikin-1 beta

1. 研究開始当初の背景

心臓移植後の慢性拒絶反応、冠動脈病変に関して多くの実験研究が行われているが、いまだ心臓移植の臨床で効果が明らかな治療法、薬剤はないといってよい。これは慢性拒絶反応の機序が明らかにされていないことが一因であると考えられる。TLR が血管の動脈硬化に関与しており、病変の進行に関するシグナルのキー コンポーネントであることが明らかになっている。Vink A らは TLR4がヒトの血管外膜のフィブロブラストやマクロファージに発現しており、マウスのモデルでは血管外膜の TLR4 の活性化は新生内膜の増殖を起こすことを示した。このことから TLR4 は動脈硬化の内膜病変に関与していると結論している (Circulation 2002)。また、Hollestelle SC らは TLR4 欠損マウスを用いた実験で TLR4 が動脈のデモデリングに関与していることを示している (Circulation 2004)。さらに Edfeldt K らは免疫組織学的検討でヒトの動脈硬化病変のプラークには TLR1、TLR2、TLR4が著明に発現していることを示している (Circulation 2002)。これらの報告をはじめ、TLR の発現、活性化は動脈硬化の進行に関与していることを示すデータは多い。次に心臓移植後の急性拒絶反応における TLR の関与に関して Goldstein DR らは minor antigen-mismatch のマウスの皮膚移植モデルを

用いて、TLR signal adaptor protein である MyD88 のシグナルがない場合は同種移植片の拒絶反応は起きないことを示している (J Clin Invest 2003)。また、Goldstein DR は TLR4 genotype の突然変異により、肺移植後の急性拒絶反応は減少するなど、TLR が同種移植での免疫反応に重要であると説明している (Curr Opin Immunol 2004)。しかし、心臓移植後の慢性拒絶反応、冠動脈病変に対する TLR の関与については殆ど検討されていない。Methe H らは心臓移植を受けた臨床例で TLR4が心臓移植後の慢性拒絶反応、冠動脈病変に関与していることを示唆している。しかし、この報告は症例数も少なく、経時的な変化を観察していないため、心臓移植後の冠動脈病変における TLR の関与をさらに検討する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

新しい免疫抑制剤の導入などにより、心臓移植の1年生存率は向上しているが、慢性期の成績には大きな改善が見られない。これは冠動脈病変を主体とする慢性拒絶反応の発生機序が十分に解明されておらず、臨床的に冠動脈狭窄病変を予防する方法が確立していないことが原因である。これまでも多くの動物実験で心臓移植後の冠動脈病変を予防、軽減する薬剤、遺伝子治療が報告され、臨床

で心臓移植患者に使用されている薬剤もあるが、実質的な効果は期待できないのが現状である。最近の研究から移植後の慢性拒絶反応には Toll-like receptor (TLR) が関与していることが示唆されている。最近、TLR は innate immune system を活性化するのに重要な役割を果たしていることが明らかになっている。TLR はリガンドを認識すると細胞内シグナル伝達系路を活性化し、共通のアダプター分子 MyD88 を介して転写因子である NF- κ B の核移行を促進し、様々な炎症性サイトカインの産生や co-stimulatory molecule の発現を誘導する。人工心肺を使用する心臓手術では術後に循環する endotoxin のレベルは上昇している。さらに、心臓移植では手術操作それ自体、移植心の虚血・再灌流により、心臓移植のレシピエントは TLR (TLR4) のリガンドに曝されることになる。このため、TLR を介しての innate immunity が活性化され、心臓移植後の慢性拒絶反応を起こすものと推測される。本研究は心臓移植後の慢性拒絶反応を抑制するために、その発生機序を明らかにすることを目的としている。まず、大動物であるブタを用いて人工心肺下に同所性心臓移植を行い、急性期の TLR4 の活性化について検索する。続いてラットを用いた異所性心臓移植モデルで isograft、および allograft の移植後、急性期と慢性期の冠動脈病変と移植心に浸潤する TLR4 陽性細胞を定量的に測定する。末梢血単球が release する Interleukin (IL)-6、12、および tumor necrosis factor (TNF) - α の定量を行い、TLR-4 の発現、冠動脈病変の程度との関

係について考察する。さらに、TLR4 ノックアウトマウスを用いる心臓移植実験を行い、TLR4 が心臓移植後の冠動脈病変に関与していることを明らかにする。

3. 研究の方法

大動物を用いる急性実験、人工心肺、虚血再灌流障害による TLR4 の発現について

心臓移植: 15-18 kg のブタをドナーおよびレシピエントとする。ドナーとレシピエントの体重の差は 1 kg 以下となるようにする。ドナーはケタラールで麻酔した後に気管内挿管し、人工呼吸器で調節呼吸を行なった。麻酔はイソフルレンで維持する。薬剤投与用の静脈ライン、血圧連続測定のための動脈ラインを確保し、動物を仰臥位とする。胸骨正中切開で前縦隔に達し、心臓縦切開をおこない、心臓を胸骨に固定した。ドナーを全身ヘパリン化した後に、心筋保護液(セルシオ液)を注入して心停止としてから心臓を摘出して、同液に4時間保存した。レシピエントはドナーと同様の方法で麻酔し、胸骨正中切開を行う。上大静脈、下大静脈脱血、上行大動脈送血で人工心肺を開始した。

心臓移植後、冠動脈。また、再灌流障害の指標として、生検標本を採取し、potassium pyroantimonate 法でミトコンドリア内のカルシウムの蓄積を定量化した。

摘出した心筋の interleukin-1 (IL-1) receptor, IL-1 beta, IL-6 および tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) mRNA 発現の検索 quantitative real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction 法を用いて摘出した

心筋中のIL-1 receptor、IL-1 beta、IL-6 および TNF-alpha の mRNA の発現を測定した。対照群として人工心肺を使用していないブタの心筋を用いた。

心臓移植手術を行う前、および心臓移植施行後3時間で血液を採取し、血清中の TLR4、TNF-alpha、IL-6 の定量を行う。単球表面の TLR は 10,000 個の CD14 陽性細胞を用いて、flowcytometry 法で測定した。モノクローナル抗体を用いて TNF-alpha は immunoassay 法で測定した。

ラットを用いる心臓移植実験

実験動物;150-200g の Lewis rat (RT1I)をドナー、150-200g の Fischer rat (RT1IV)をレシピエントとする (allograft)。また、Lewis rat (RT1I)をドナー、およびレシピエントとして isograft の移植を行った。免疫抑制剤として、サイクロスポリン A(CsA)10mg/kg/日の皮下注を行った。心移植手技:Ono-Lindsey 法に準じ、腹腔内に8-0プロレン糸で縫合して、異所性心移植を行う。ドナーの心臓はヘパリン化した生理食塩水で灌流しながら摘出し、そのまま冷却生理食塩水で保存した。

冠動脈硬化

組織学的検索:標本中の全ての冠動脈のうち、接線方向に切り出された以外の冠動脈を観察した。冠動脈硬化は Lurie らの方法に sclerotic grading score (SGS)として表わした。

SGS 0:正常冠動脈。 SGS 1:10%以下の内腔狭窄がある。 SGS 2:10%以上 50%未満の狭窄がある。 SGS 3:50%以上の内腔狭窄がある

SGS 4:内腔の完全閉塞。 観察した冠動脈の本数により、平均して SGS を算出した。

免疫組織学的検討 通常の病理組織標本と TLR4の免疫染色

摘出した心臓の組織は1)10%バッファー フォルマリンで固定しパラフィン封埋したのち5μmに薄切した。一部は通常のヘマトキシリン エオジン染色およびエラスティカ マッソン染色した。この標本で冠動脈の変化を検討した。冠動脈病変の評価方法はラットの実験と同様に Lurie の方法で行った。2)凍結保存して5μmに薄切する。切片はメタノールに3%過酸化水素水を加えて5分間インキュベートする。カバープレートシステムに固定したのち、PBST(PBSに0.5%Tween 20を加える)。これに、ラビット抗 TLR4血清を1:50として4℃で10時間インキュベートする。その後、室温で1時間、2次抗体(ブタ、抗ラビット)とインキュベートした。

摘出した心筋の interleukin-1 (IL-1) receptor, IL-1 beta, IL-6 および tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) mRNA 発現の検索はブタ、ラットと同様に quantitative real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction 法を用いて行った。

4. 研究成果

potassium pyroantimonate法でミトコンドリア内のカルシウムの蓄積を定量化した。虚血再灌流により、ミトコンドリア内にはカルシウムの沈着がみられたが、コントロールではこの変化はなかった。

TLR-4の発現とミトコンドリア内のカルシウムの蓄積との間には相関関係はなかった。摘出した心筋のinterleukin-1 (IL-1) receptor, IL-1 beta, IL-6 および tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) mRNA 発現の検索を試みたが技術的な問題から定量的な測定はできるには至らなかった。

ラットを使用した実験ではisograftでは心臓移植後の動脈硬化はなかったが、allograftでは動脈閉塞を含む病変が観察された。このことから、この病変は虚血再灌流、冷却保存に起因する機序は関与していないことが推測された。TLR-4が冷保存、再灌流に起因する炎症性変化に重要な役割をはたしていることがKaczorowskiらによって報告されているが、この炎症性変化が心移植後の長期生存とどのように関係しているかは今後の課題であると結論された。

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 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

(1) 研究代表者
赤坂 純逸 (AKASAKA, JUNETSU)
東北大学・病院・助教
研究者番号:80343044

(2) 研究分担者
田林 暁一 (TABAYASHI, KOICHI)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号:90142942

井口 篤志 (IGUCHI, ATSUSHI)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号:90222851

小田 克彦 (ODA, KATSUHIKO)
東北大学・病院・講師
研究者番号:60323002

川本 俊輔 (KAWAMOTO, SHUNSUKE)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号:20400244

(3) 連携研究者