

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591615
 研究課題名（和文）メチシリン耐性黄色ブドウ球菌増殖抑制効みたホモグラフト
 抗感染性機序の解明
 研究課題名（英文）Mechanism of anti-infectious capacity of cryopreserved heart-valve and vascular
 allograft against *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*
 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

研究成果の概要：

本研究において、同種移植後の移植片が 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 γ ・TNF α の遺伝子発現）を確認した。更に、同種移植時に発現する IFN γ の刺激により抗感染性に関与すると考えられるIDOが移植片局所において遺伝子・蛋白レベルで発現していることが確認できた。移植片のIDOと抗感染性との関連については、特にIDOによるTrp代謝産物の系に注目して検証した。Trp代謝産物のうち3-Hydroxykynurenineが抗菌活性を持つことが確認された。これらの結果は、同種移植後IFN γ 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のメカニズムにおいて重要な役割を担っていることを示唆し、ホモグラフトのMRSA感染に対する科学的実証であると考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
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：Indoleamine 2,3-dioxygenase（IDO）、同種心臓弁移植・血管移植

1. 研究開始当初の背景

凍結保存同種心臓弁・血管組織はおよそ40年ほど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年代にはいと、

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。

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。

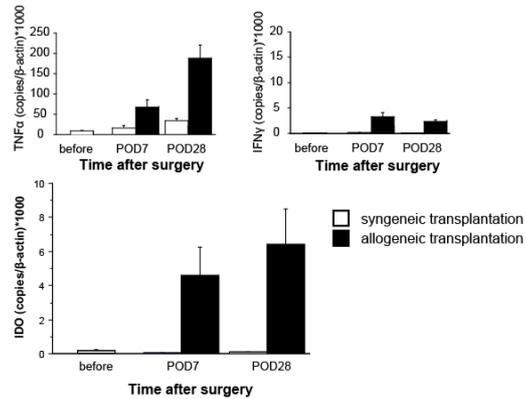
3. 研究の方法

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-Lew (自家移植群) および Lew-BN (同種移植群) とし、術後 7・28 日目に移植片を摘出し検体とした。摘出片に対し realtime PCR による遺伝子発現量の定量 (TNF、INF、IDO などの炎症性サイトカイン) 免疫染色による IDO のタンパクレベルにおける発現、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) とした。更に、IDO による Trp 代謝産物を個別に MRSA 増殖への影響を見るために各要素を含む培地を用いて MRSA 増殖曲線を検討した。また、IDO の関与をより特異的に検討するために IDO の拮抗阻害剤である 1-methyltryptophan (1-MT) を用い増殖曲線に及ぼす変化を観察した。最後に移植血管組織内に Trp 代謝産物のいずれかが含有されているか否か HPLC 法により確認した。

4. 研究成果

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ところ、自家移植群 (syngeneic transplantation) においては術後 7 日および 28 日共に炎症性サイトカインの発現は殆ど認めなかったのに対し、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いた。さらに経時的に増加もしくは一定の発現を認めた。この 2 群間における遺伝子発現量は有意に同種移植群にて高値であった。

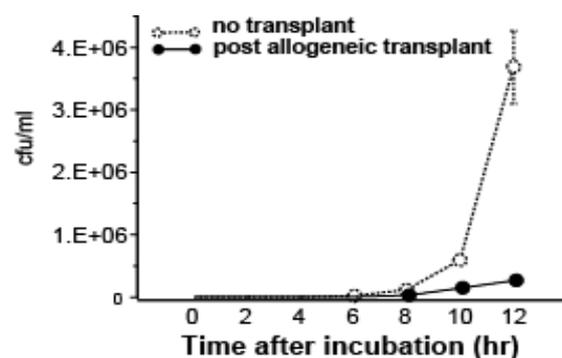


免疫組織学的検討

自家移植および同種移植後の摘出血管について免疫組織染色を行い IDO のタンパクレベルにおける発現について検討した。自家移植群の血管では、内膜肥厚は認めるものの炎症性細胞の浸潤は血管のいずれの部位にも認めなかった。一方で、同種移植群では内膜の一部および外膜の全般に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は IDO の発現が明らかに認められた。

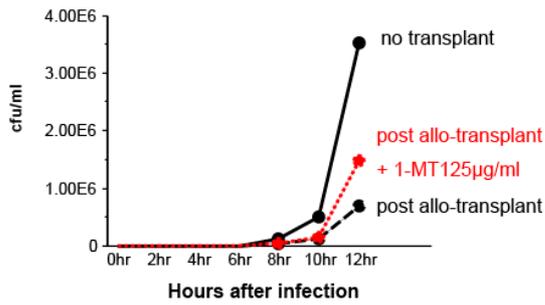
移植後摘出組織と MRSA 混合培養における MRSA 増殖曲線に関する検討

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 陽性群として同種移植群を、IDO 陰性群として未移植群を用いた。培養開始後 8 時間までは両群ともに MRSA の増殖を認めなかったが、10 時間を越えた頃より増殖速度に明らかな差を認めた。培養開始後 12 時間ではおよそ未移植群では洞首位職群よりも約 10 倍程の MRSA 増殖を認めた。

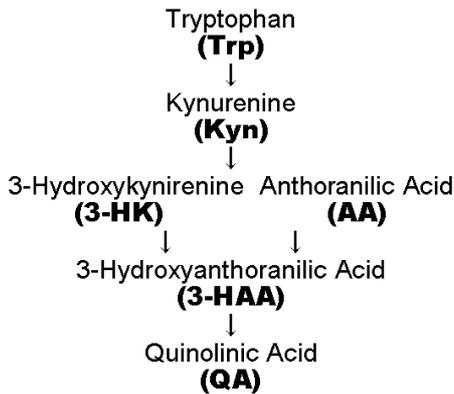


更に、IDO に対する Trp 代謝拮抗阻害剤の 1-MT を培養系に追加し MRSA 増殖曲線を検討したところ、同種移植群 (IDO 陽性群) における MRSA 増殖は 1-MT 添加無しの培養系に比べ明らかな MRSA の増殖を認めた。このことより IDO 陽性血管では MRSA の増殖抑制作用が発揮され、その効果は IDO 阻

害剤により減弱させられることが確認できた。



Trp 代謝産物の抗菌作用における検討
Trp 代謝産物のうち、代表的な kynurenine, 3-hydroxykynurenine, anthranilic acid, quinolinic acid について MRSA および臨床
上代表的な病原菌 (MSSA, E. Coli, P. aeruginosa) を用いて増殖抑制効果を観察した。



結果として、3-HK にはいずれの病原菌に対しても中等度の抗菌作用を認められ、特に MRSA に強めにその効果が発揮されていた。ほかの Trp 代謝産物においては抗菌作用は認められなかった。

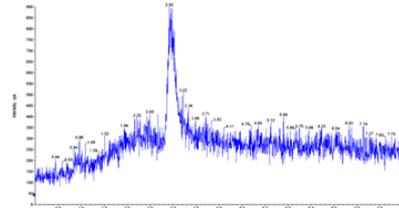
Derivatives of Trp	MIC			
	N315 (MRSA)	S. aureus (MSSA)	E. coli	Ps. aeruginosa
L-Tryptophan	>1024	>1024	>1024	>1024
1-Methyl-L-tryptophan	>1024	>1024	>1024	>1024
L-kynurenine	>1024	>1024	>1024	>1024
3-Hydroxy-DL-kynurenine	128	256	512	512
Anthranilic acid	>1024	>1024	>1024	>1024
Quinolinic acid	>1024	>1024	>1024	>1024

移植後組織内における Trp 代謝産物の含有の抽出・定量
組織内における Trp 代謝産物の存在を確認するために移植後組織をホモジナイズし HPLC にかけることにより検討した。特に Trp の kynurenine pathway の存在を確認

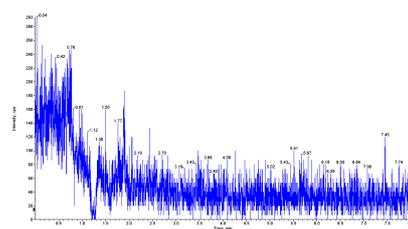
するために kyn および 3-HK を対象とした。まず未移植群における検討ではごく微量の kyn は認められたものの 3-HK は全く検出されなかった。(下図：上 kyn、下 3-HK)

Kyn

a. Pre-transplant



3-HK

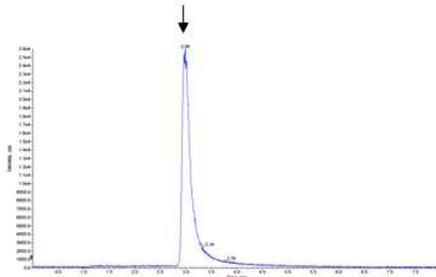


一方で、同種移植後の血管では著明な kyn の存在 (下図・上) を認め、更に 3-HK の組織内含有も明らかに検出された。

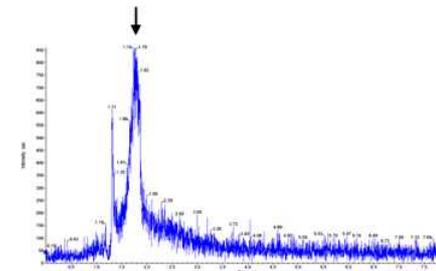
この HPLC の検討により、抗菌作用に貢献する trp 代謝産物 3-HK は同種移植後の血管組織に確かに誘導されていることが確認することが出来、同種移植組織の抗感染性と IDO の作用の関連性が実証された。

b. Post-transplant

Kyn



3-HK



前述 ~ の実験結果により、同種移植により allogeneity の刺激を受けた同種移植血管では IFN γ が発現され、その刺激により IDO が移植片に発現されていることが明らかとなった。この IDO の発現は自家移植又は未移植血管では認められないものであった。更に、同種移植後血管では、今回注目した IDO が遺伝子・タンパクレベルで発現していることが明らかとなった。Trp 代謝産物のうち実際 MRSA 抗菌作用を示す 3-hydroxykynurenine は同種移植後血管に含有されている（未移植血管では検出されず）ことが証明され、IDO の発現およびその酵素活性がホモグラフトの抗感染性に大きく関与している可能性が強く示唆された。今回の一連の実験により、初めてホモグラフトの抗感染性作用が科学的に証明されたと考える。

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 2件)

K. Narui, N. Noguchi, A. Saito, N. Motomura, et.al. Anti-infectious activity of tryptophan metabolites in the L-typtophan-L-kynurenine pathway. Biol. Pharm. Bull 32:41-44, 2009. 査読あり

A. SAITO, N. Motomura, K. Kakimi et.al. Vascular Allografts are Resistant to Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Murine Model J Thorac and CardiovascSurg 136:159-167. 2008 査読あり

[学会発表](計 5件)

E. Karimov, N. Motomira, K. Kakimi, A. Saito, et.al. Impact of cryopreservation on anti-MRSA resistance. ISHLT 2009, 2009 4月 24日 France, 査読あり

A. Saito N. Motomura et al. Clinical application of cryopreserved human allograft tissues. Cryo medicine in cardiovascular surgical field. CRYO2007 2007年 7月 29日, Canada 査読あり

[図書](計 1件)

齋藤 綾、本村 昇、高本眞一：「ホモグラフトに適する弁置換術の実際」

Circulation up-to-date, 4巻 50-58pp,2009

[産業財産権]

出願状況(計 件)

取得状況(計 件)

[その他]

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

村上 新 (MURAKAMI ARATA)

東京大学・医学部附属病院・助教授

研究者番号：70190874

(3)連携研究者

成井 浩治 (NARUI KOJI)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70366417

野口 雅久 (NOGUCHI NORIHISA)

東京薬科大学・薬学部・準教授

研究者番号：50164679

垣見 和宏 (KAKIMI KAZUHIRO)

東京大学・医学部附属病院・特任準教授

研究者番号：80273358