

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592640

研究課題名(和文) ラット下肢同種移植の急性拒絶反応における小胞体ストレス応答

研究課題名(英文) Endoplasmic reticulum stress response of the acute rejection in a rat composite tissue allotransplantation model

研究代表者

李 陽成 (Lee, Yang Sung)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：90466566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：ラット下肢同種移植モデルを使用し、急性拒絶反応における小胞体ストレス応答の関与を観察する上で、これまで拒絶反応を起こさないとされていた関節軟骨について注目した。しかし実際には移植後数日でアポトーシス細胞の増加を認め、アポトーシス経路としてのカスパーゼ3も増加しており、関節軟骨においても拒絶反応が起きていることを認めた。逆にこれまで拒絶反応に関与しているとされているheat shock proteinの上昇は認められず、この結果は関節軟骨において他の組織とは異なる拒絶反応メカニズムが起きていることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：To observe the involvement of endoplasmic reticulum stress response in acute rejection, we focused the articular cartilage in rat lower limb composite tissue allotransplantation model that had not been rejected so far. However apoptotic chondrocytes were increased in a few days after allotransplantation, and caspase-3 positive ratio were also increased in allotransplantation group, therefore acute rejection was occurred to the articular cartilage in allotransplantation. Conversely heat shock protein (HSP) that were concerned acute rejection, were not increased, therefore we suggested the acute rejection mechanism of articular cartilage were differ from another tissue.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：同種混合組織移植 小胞体ストレス反応 再建外科 関節軟骨

## 1. 研究開始当初の背景

近年顔面や四肢の外傷性広範囲欠損に対して顔面移植や手移植術を始めとした同種複合組織移植が臨床的に行われている。これらの成功の背景としてマイクロサージェリー技術の進歩もさることながら、同種複合組織移植分野における免疫抑制療法や免疫寛容療法の進歩によるものが多い。しかし他の臓器と異なり、同種複合組織移植ではその性質上よりいっそう長期安全な免疫抑制療法が望まれるが、拒絶反応メカニズムそのものについては未だ説明されていない点が多いというのが現状である。そこで我々はこれまでに、同種複合組織移植モデルにおいて拒絶反応に heat shock protein (HSP) が関与していることを報告してきた。これらのメカニズムは "chaperoning of immunity" と呼ばれ、HSP と移植抗原が複合体を形成し、抗原提示細胞に取り込まれ、直接、もしくは間接的に抗原提示を行うことで、急性拒絶反応における免疫応答に関与していると考えられている。

また最近になり小胞体ストレス応答が注目されている。細胞内環境を制御する多くの蛋白質は小胞体を経由して合成、修飾されている。この過程に不具合を生じることにより合成された蛋白質は小胞体ストレスを引き起こして細胞死 (アポトーシス) を引き起こす。それに対して細胞死を回避する防御機構も存在しており、小胞体ストレス応答と呼ばれ細胞死に大きく関与していることが知られている。

これまで我々が注目してきた HSP を始めとした "molecular chaperone" は細胞蛋白質の三次元構造を制御する蛋白質であり、その障害は小胞体ストレス応答との関連が示唆される。また小胞体ストレス応答に重要な役割を示す GRP78/BiP は HSP family に属している蛋白質の一つであり、これらが拒絶反応にも関与しており、重要なメカニズムの一つであることがこれまでの我々の研究から示唆される。

## 2. 研究の目的

(1) 細胞死が拒絶反応に関与していることは心臓、肝臓移植モデルでも知られており、移植後日数が経過するにつれて、アポトーシス細胞が増加してくる。逆に関節軟骨は拒絶反応が起きにくいことから、海外では骨軟骨組織の欠損創に対して同種骨軟骨移植術が臨床的に行われている。その際、軟骨の凍結ストレスや、移植時の物理的ストレスが影響しアポトーシスを引き起こしていることから、拒絶反応のみを評価した報告はこれまで認められなかった。今回同種複合組織移植モデルを用いることで、これらの移植ストレスを回避し、関節軟骨において同種移植後のアポトーシス細胞の経時的変化を観察することで、軟骨細胞における拒絶反応そのものを評価した。

(2) これまで我々は同種複合組織移植モデルにおける皮膚において経時的に HSP の増加が認められ、急性期拒絶反応に HSP が関与していることを報告してきた。同様に関節軟骨においても同種移植術後経時的に HSP の変化を観察する。さらに molecular chaperone の一つである GRP78 タンパクにおいても評価を行い、小胞体ストレス応答が拒絶反応にどのように関与するかを目的とした。

## 3. 研究の方法

minor mismatch の関係にある F344 ラットの下肢を LEW ラットへ移植したものを同種移植モデルとし、LEW ラットから LEW ラットへ移植したものを同系移植モデルとした。術後 0 日、1 日、3 日、7 日、12 日、18 日目にホルマリン全身灌流固定した後、パラフィン包埋、3mm の切片を作製し HE 染色、TUNEL 染色、および caspase-3、HSP70、HSP60 の免疫染色を行った。またパラフィンブロックから 10mm 切片を切り出し、レーザーマイクロダイセクション法にて軟骨組織のみを採取、スピンドラム法にて mRNA を抽出した。さらに同術後日数にて関節軟骨を削りだし、液体窒素で凍結、ISOGEN を用いて mRNA を抽出し、real-time PCR 法にて遺伝子解析を行った。

さらに移植を行っていないモデルおよび、同種移植後 12 日目のモデルから、軟骨のみを削り、EDTA にて脱灰したのちオスミウム、ウランにて染色した後、超薄切片を作製、電子顕微鏡サンプルとし観察した。

## 4. 研究成果

(1) 関節軟骨面の明らかな構造変化は認められなかったが、当初の仮説に反して TUNEL 陽性細胞は術後日数が経過するにつれて増加 (図 1) また同種移植後 12 日目に電子顕微鏡下ではアポトーシス細胞が確認された (図 2)。

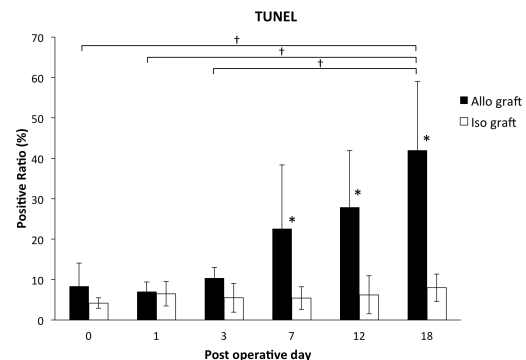


図 1

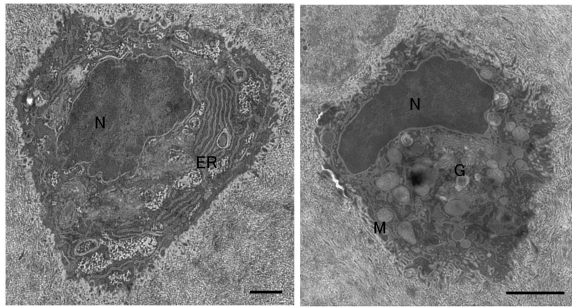


図2 (左: 正常軟骨、右: アポトーシス軟骨) さらに caspase-3 陽性細胞も術後日数が経過するにつれて増加傾向を認めた (図3)。

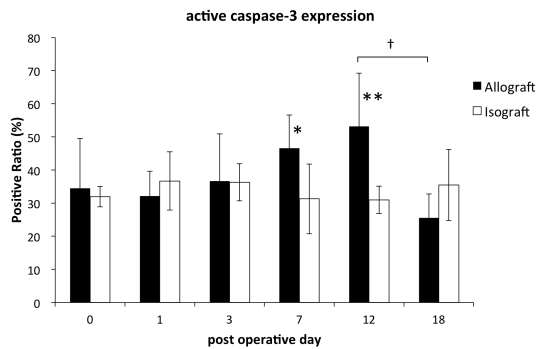


図3

Caspase-3 mRNA においては術後1日目に軽度増加が認められ、以降は減少傾向にあった。(図4) caspase-3 カスケードはアポトーシス経路としては下流に位置し、アポトーシスの実行因子である。mRNA の減少はアポトーシス細胞や caspase-3 の増加による、negative feedback がかったものと考えられ、結果として、同種複合組織移植モデルにおける関節軟骨でも拒絶反応は引き起こされていると考えられる。

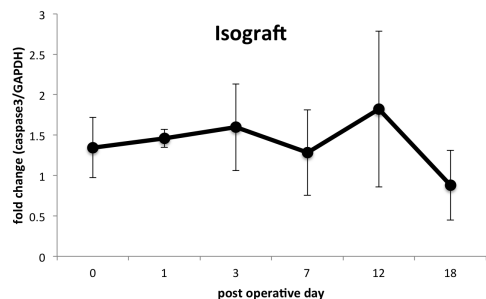
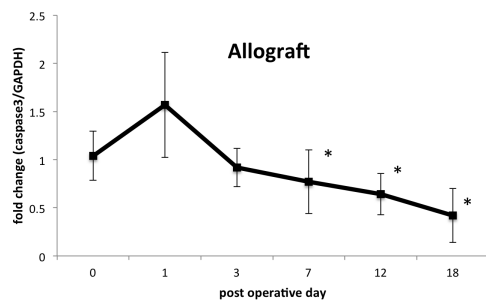


図4

(2) 対照的に拒絶反応に関与しているとされる "molecular chaperone" である HSP70,60 についてはいずれも術後日数が経過しても増加が認められなかった。(図5、6) chaperone タンパクは免疫応答の際、抗原と複合体を形成することから、軟骨細胞においては抗原提示細胞が関与する通常組織の拒絶反応、例えば心臓、肝臓、皮膚とは異なり、細胞性免疫応答を介さない特殊な経路が存在することが予想される。このことから拒絶反応の新たなメカニズムの一つとして考えられた。

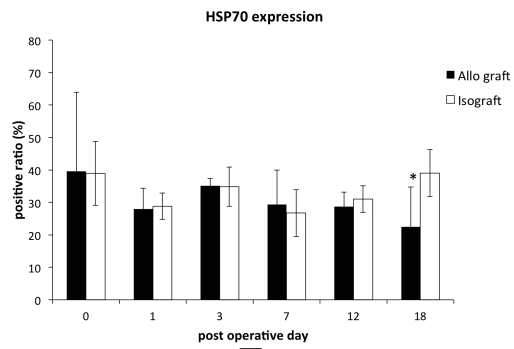


図5

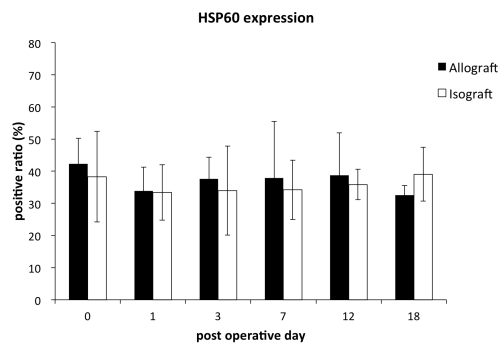


図6

## 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)

Shibuya N, Imai Y, Lee YS, Kochi T, Tachi M: Acute Rejection of the Knee Joint Cartilage in a Rat Composite Tissue Allotransplantation Model: J Bone Joint Surg Am; in press, 2014  
査読あり

澁谷暢人、今井啓道、館正弘: 同種遊離複合組織移植モデルにおける関節軟骨の急性期拒絶反応-軟骨細胞の形態学的変化について- Proceeding of clinical

electron microscopy Vol.32:1-6,2012-  
2013 査読なし

〔学会発表〕(計 5件)

澁谷暢人, 李陽成, 今井啓道, 館正弘  
同種下肢複合組織移植における関節軟骨  
の急性拒絶反応についての研究(第2報)  
第22回日本形成外科学会基礎学術集会  
2013年11月7日 新潟

澁谷暢人, 李陽成, 今井啓道, 館正弘  
同種遊離複合組織移植モデルにおける関  
節軟骨の急性期拒絶反応-軟骨細胞の形  
態学的変化について- 第64回東北臨床  
超微形態懇話会 2013年6月27日 宮  
城

澁谷暢人, 李陽成, 今井啓道, 館正弘  
同種下肢複合組織移植における関節軟骨  
の急性拒絶反応についての研究 第21  
回日本形成外科学会基礎学術集会 2012  
年10月4日 福島

澁谷暢人, 李陽成, 今井啓道, 館正弘  
同種下肢複合組織移植における関節軟骨  
の急性拒絶反応とHeat Shock Proteinと  
の関係についての研究 第22回東北大  
学形成外科同門会学術集会 2012年1月  
14日 宮城

澁谷暢人, 李陽成, 今井啓道, 館正弘  
同種下肢複合組織移植における関節軟骨  
の急性拒絶反応とHeat Shock Proteinと  
の関係についての研究 第20回日本形成  
外科学会基礎学術集会、2011年10月6  
日 東京

〔図書〕(計 0件)

〔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  
<http://prs.main.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 陽成 (LEE YANG-SUNG)  
東北大学・医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：90466566

(2) 研究分担者

今井 啓道 (IMAI YOSHIMICHI)  
東北大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：80323012

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：