

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791470

研究課題名(和文)人工酸素運搬体投与による肺移植後拒絶反応軽減の基礎的研究

研究課題名(英文) Hemoglobin vesicles ameliorate allograft airway rejection

研究代表者

加勢田 馨 (Kaoru, Kaseda)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70624435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：BALB/cマウスから気管を摘出し臓器保存液中に4時間保存後、異種移植としてC57BL/6マウスに移植した。1週間後に犠牲死させた。また人工酸素運搬体を臓器保存液に加えながら4時間保存後異所移植としてC57BL/6マウスに移植し1週間後に犠牲死させた。Real time PCRで炎症性サイトカインの測定、また病理組織での拒絶反応を検討した。検討したマウスの数が少ないためか人工酸素運搬体投与群で拒絶反応が抑制された傾向はあったが有意差は認めなかった。今後はT細胞の表面抗原の発現によりどのT細胞が関与しているか検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Acute rejection after lung transplantation is the main risk factor for the development of bronchiolitis obliterans (BO). Hemoglobin-vesicles (HbV) have been developed for use as artificial oxygen carriers and this can provide anti-inflammatory effects and may serve to limit tissue injury in airway transplant. Here, we tested the ability of HbV to prevent airway rejection. Tracheal grafts from BALB/c or C57BL/6 were transplanted to C57BL/6 recipients. Experimental groups were treated with HbV. Histopathological evaluation of luminal obliteration was blindly reviewed. Immunohistochemistry and real-time RT-PCR analyses were performed. Allografts treated with HbV revealed a reduction of thickening in epithelial and subepithelial airway layers at day 7 in orthotopic trachea transplantation model compared with allografts treated with vehicle. There was also a concordant decrease in CD3+ lymphocytes and macrophages in HbV treated allografts.

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：肺移植

1. 研究開始当初の背景

肺移植は重症呼吸不全疾患に対する唯一の根本的治療である。しかし近年の免疫抑制剤の進歩にかかわらず拒絶反応はいまだに移植レシピエントの主要な死因である。末梢の気管支が次第に閉塞する Bronchiolitis obliterans は5年以上生存した肺移植後のレシピエントの内 50 から 60%の確率で発症する拒絶反応の病態である。現在この Bronchiolitis obliterans に対する治療法は確立しておらず、ブレークスルーが求められている。免疫抑制剤の投与は当然行われているが、免疫抑制剤での Bronchiolitis obliterans の予防は完全ではない。

現在までに一酸化炭素投与に気管移植拒絶反応が軽減されるという報告を我々のグループは報告してきた。人工酸素運搬体の拒絶反応に対するメカニズムは未知であるが、可能性として H0-1 の誘導やT細胞への影響などで研究する価値があると考えられる。また人工酸素運搬体により拒絶反応が抑制されるという報告が散見され、気管移植モデルにおいても人工酸素運搬体による拒絶反応が抑制される可能性がある。

2. 研究の目的

人工酸素運搬体の投与によりT細胞の組織への浸潤を抑え、拒絶反応を抑えるという仮説を検討する。細胞培養による実験と動物実験において検討する。

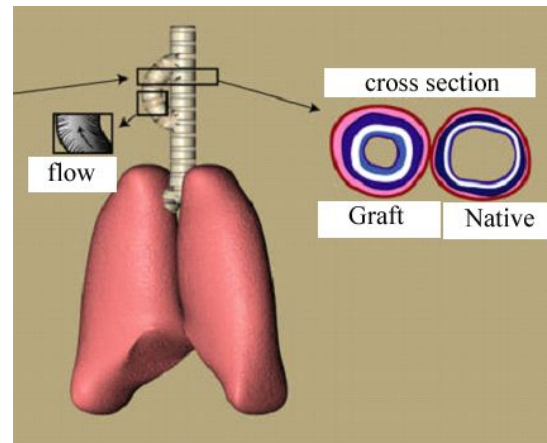
3. 研究の方法

In vitro でのT細胞の培養実験によりT細胞がどのようなサイトカインを発現するか検討する。またどのようなサイトカインが発現されるか検討した後に、人工酸素運搬体との共培養によりサイトカインの発現量に変化が出るのか検討する。

その後マウスの気管移植モデルにおいてどのようなサイトカインが異種移植 (allograft) において高発現するのか検討する。比較対象は同種移植の isograft。その後人工酸素運搬体を気管保存液中に混注し、気管グラフトの人工酸素運搬体との接触実験により、どの炎症性サイトカインが高発現するか検討する。また気管移植モデルにおいて人工酸素運搬体投与群、非投与群での lymphocytic bronchitis の程度を評価する。

気管移植モデルは図に示す如くマウスの背部に気管を移植するモデルともとからあるマウスの気管を取り換える同所移植があり、両方のモデルを採用した。拒絶反応がおこらない isograft と拒絶反応がおこる allograft にて検討した。

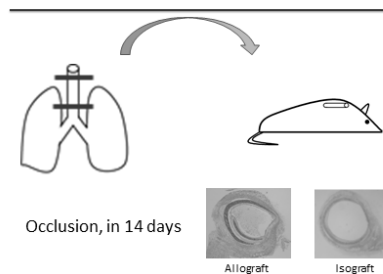
以下に示すのはマウス気管の同所移植である。グラフトは約1週間で気管上皮、上皮下層が肥厚し、T細胞やマクロファージの浸潤が見られる。



図の Graft というところが移植した気管。この図は異種移植を示し、気管上皮、上皮下層が肥厚しているところを示している。

以下に示すのはマウス気管の異種移植。術後約2週間で異種移植は完全に閉塞するが、同種移植は2週間でも閉塞は下の図のように見られず、またT細胞の浸潤も認めない。

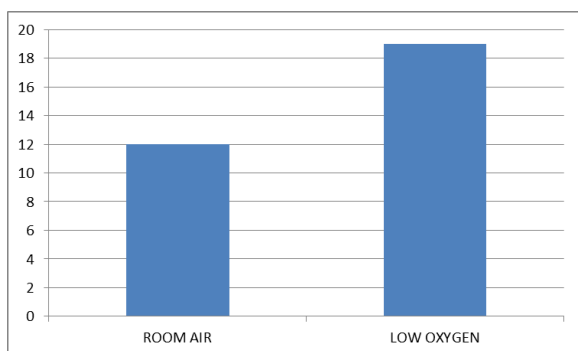
Mouse heterotopic trachea transplantation



4. 研究成果

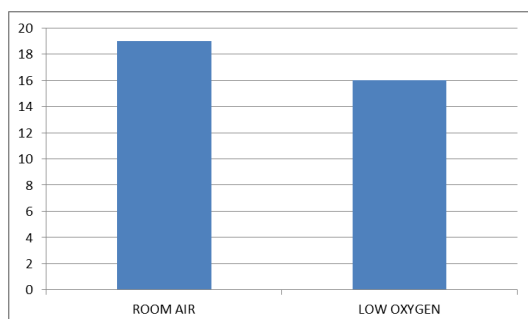
(In vitro での検討)

まずはサイトカインの発現を検討した。
In vitro の T 細胞の低酸素刺激試験では下の図のごとくインターロイキン 2 の発現が増加していることが認められた。



<IL-2>

また IL-10 の発現は特に変化を認めなかった。

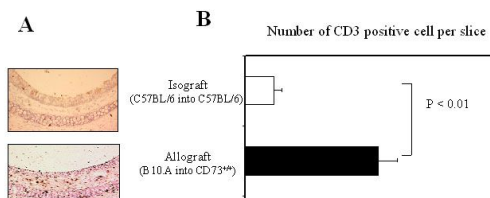


<IL-10>

人工酸素運搬体との T 細胞の in vitro の接触実験では有意なデータは現在のところとれていないため、再実験が必要であると考えている。濃度や温度などの条件設定が必要であると考えられる。

(In vivo マウス気管移植モデルでの検討)

マウス気管移植モデルにおいてまず、異種移植、同種移植、での発現を検討した。



上記の図で示すように T 細胞の浸潤が allograft においては増加していることが確認された。

人工酸素運搬体を保存液中に使用した実験では有意 T 細胞の浸潤に有意な差は現在のところ見られていない。マウスの実験検体数が足りない、接触時間、保存液中ではなくレシピエントへの直接投与などが考えられるので、今後の研究で検討する予定である。

結論

人工酸素運搬体の投与により気管移植後の拒絶反応が抑制される可能性はあるが、マウスのモデルでサイトカインの発現、T 細胞の浸潤に関しては明らかな有意差を持つての証明はできていない。投与方法やさらなる in vitro での接触実験など基礎実験が必要であると考えられる。また詳細なメカニズムの検討、人工酸素運搬体をキャリアーとして酸素以外のガスの利用、などが考えられる。また今回のモデルは気管移植モデルであるため、今後は肺移植モデルにおいても検討されるべきと考えられた。

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 1 件)

1. Ohtsuka T, Kaseda K, Shigenobu T, Hato T, Kamiyama I, Goto T, Kohno M, Shimoda M. Carbon monoxide-releasing molecule attenuates allograft airway rejection. *Transpl Int*. 査読あり
2014 Mar 15. doi: 10.1111/tri.12314. [Epub ahead of print]

[学会発表](計 0 件)

[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〕

6．研究組織

(1)研究代表者

加勢田 馨 (KASEDA KAORU)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：70624435