

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592054

研究課題名(和文) 移植後拒絶反応におけるASCの役割

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

研究代表者

瀬戸 達一郎 (SETO, Tatsuichiro)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：70362118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ASC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。しかし慢性拒絶モデルにおいては、ASCノックアウト群で有意に高かった。移植後21日、42日に犠牲死させ移植心を摘出し、組織学的検討を行った。ASC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軽度であった。またエラスチカ・ワンギーソン染色による冠動脈の内膜肥厚の解析においても、ASCノックアウト群において軽度であった。IL-1、IL-18について免疫染色、RT-PCR法によるmRNAの発現、ERIZAによりタンパク量について解析した。

研究成果の概要(英文)：We used a murine heterotopic cardiac transplantation model using ASC knockout mice. There is no difference in graft survival of fully mismatched model compared to control group. However we found that graft survival of minor mismatched model significantly prolonged compared to control group. Donor hearts were harvested for examination on Days 21 and 42. In ASC knockout group, a slight infiltration of inflammatory cells was observed in the graft and less myocardial injury was seen. The intimal hyperplasia of ASC knockout group was significantly reduced compared to control group. The expression of IL-1, IL-18 and other inflammatory cytokines were analyzed by immunohistochemistry, real-time reverse transcript-polymerase chain reaction and ELISA.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：インフラマソーム IL-1 ASC 心移植

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。

最近免疫応答にはTLR経路とは異なった炎症カスケードが存在することが明らかにされた。このカスケードにおける認識センサーとして働いているのがインフラマソームであり痛風やアルツハイマーなど感染が直接関与しない炎症状態における新たな炎症惹起経路として注目されている。Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC)はインフラマソーム活性化におけるアダプター分子であり、カスパー1と結合しこれを活性化する。その結果炎症性サイトカインであるIL-1やIL-18の産生・分泌が誘導され、炎症反応が惹起されると考えられている。ASCはこのインフラマソームの中心構成分子として機能していることから、申請者らは感染を伴わない炎症反応の一形態としての急性拒絶反応に注目し、マウスallograftモデルでの急性拒絶反応におけるASCの役割とその治療標的としての可能性について研究を重ねている。

急性拒絶反応は、組織学的に炎症細胞の浸潤と細胞壊死やアポトーシスを含む心筋細胞傷害壊死を伴い、炎症性サイトカインであるIL-1およびIL-18の発現増強が認められる(Rao, et al., J Immunol 179:6536-6546, 2007)。IL-1は適応免疫反応を促進することが知られており、周術期の

虚血再灌流障害と同種免疫反応の増強に關与する(Yamamoto, et al., Genes Cells 9:1055-1067, 2004)。さらに、虚血再灌流障害の際に生ずる急性炎症の進展に中心的な役割を果たし(Tanaka, et al., J Heart Lung Transplant 24:1906-1914, 2005)、心移植後早期のalloantigen非依存性の炎症機転の重要なメディエーターの一つと考えられている(Simeoni, et al., Eur J Cardiothrac Surg 31:222-228, 2007)。申請者はマウス異所性心移植モデルを用いて、移植心におけるASCとIL-1の関連を解析し、移植心急性拒絶に伴ってASCおよびIL-1の間質での発現が増強することを見出した。ASCおよびIL-1の発現は急性拒絶の組織像と相関して増加しており、またこれらの発現はタクロリムス投与によって抑制されるため、ASCが急性拒絶におけるkey moleculeである可能性が示唆された。(Seto, T et al., J Heart Lung Transplant 2010;29:352-259)

2. 研究の目的

これまでに、インフラマソームと移植免疫についての研究は皆無である。本研究は、心移植後急性拒絶反応における炎症反応の影響を、インフラマソームの構成成分であるアポトーシス関連スベック様カード蛋白質(Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain:ASC)の解析により明らかにすることを目的とする。インフラマソームを介した移植心の炎症の制御により、ASCなどのインフラマソーム構成成分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あると考えている。

3. 研究の方法

(1) 急性拒絶モデル作成と生着率の比較

6週から8週の雄のBALB/c (H-2^d)マウスをドナー、ASCノックアウトマウス(C57BL/6 (H-2^b)バックグラウンド)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、BALB/c (H-2^d)マウスをドナー、C57BL/6 (H-2^b)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。移植後は触診にて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) 慢性拒絶モデル作成と生着率の比較

B6.C-H-2^{bm12} マウスをドナー、ASC ノックアウトマウス (C57BL/6 (H-2^b)バックグラウンド) 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する。コントロール群として、B6.C-H-2^{bm12} 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る。移植後は触診にて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。

(3) 組織学的検討

モデルの移植心生着率は、移植後 42 日で 60% から 80%であることを考慮し、移植後 21 日、42 日に犠牲死させ移植心を摘出する。HE 染色にて炎症細胞浸潤や心筋傷害の程度を観察し、Rejection Score(Stewart et al., J Heart Lung Transplant 2005; 24:1710-20) を用いて比較検討する。また、エラスチカ・ワンギーソン染色にて移植後冠動脈病変の解析を行う。冠動脈の内膜肥厚による内腔の閉塞率を定量化し、移植後冠動脈病変の解析を行う。

IL-1、IL-4、IL-6、IL-13、IL-18、TNF- α 、IFN- γ について免疫染色を行い両群間で比較検討する。

(4) サイトカインの解析

移植後 1 日、3 日、7 日、21 日、42 日に犠牲死させ移植心を摘出する。前述のサイトカインについて、RT-PCR にて mRNA の発現を解析する。また、IL-1、IL-18 については、ELISA にてタンパク量についても定量する。

4. 研究成果

(1) 急性拒絶モデルのグラフ生着率

ASC ノックアウト群(n=6)、コントロール群(n=6)とも移植後 6 日から 9 日で拒絶され、両群間に有意差を認めなかった。(図 1)

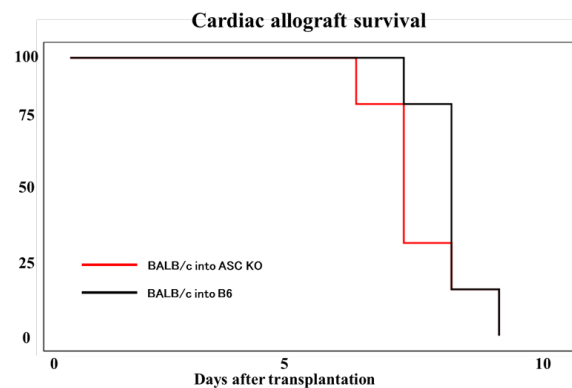


図 1 急性拒絶モデルのグラフト生着率

(2) 慢性拒絶モデルのグラフと生着率

コントロール群(n=10)においては術後 25 日頃より拒絶反応がみられ、6 週間後の生着率が 70%であったのに対し、ASC ノックアウト群(n=7)、では 100%の生着率で、両群間に有意差を認めた。(図 2)

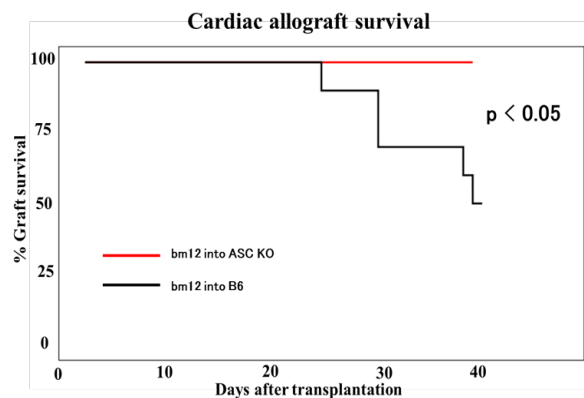


図 2 慢性拒絶モデルのグラフト生着率

(3) 組織学的検討

(i)移植後 21 日に摘出された移植心の HE 染色においては、両群とも間質や一部の筋組織に炎症細胞浸潤を認めた。また軽度の心筋障害を認めた。(図 3)

移植後 42 日に摘出された移植心においては、ASC ノックアウト群では移植後 21 日と同

様に炎症細胞浸潤を認め、心筋障害の程度も軽度であった。コントロール群においては、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。(図4)

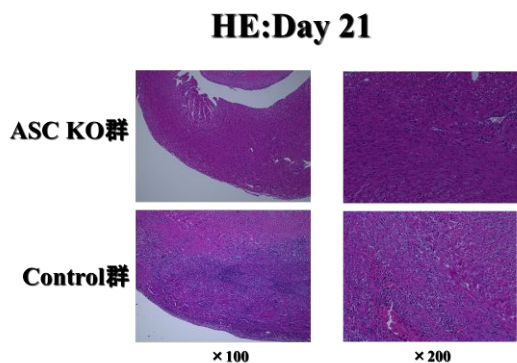


図3 移植後21日におけるHE染色

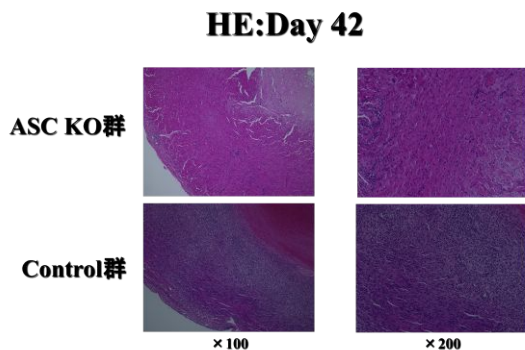


図4 移植後42日におけるHE染色

(ii) 移植後 21 日に摘出された移植心を Rejection Score を用いて比較検討すると、両群間で有意差は認めなかった。(図5)

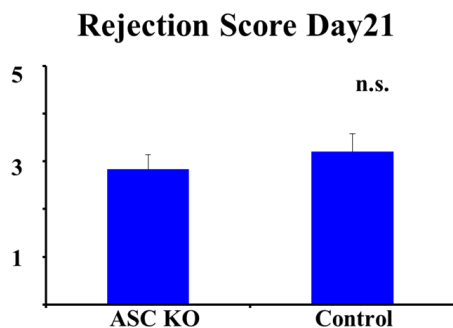


図5 移植後21日における Rejection Score

移植後 42 日に摘出された移植心の検討に

おいて、ASC ノックアウト群においては移植後 21 日と比較して変化は認めなかった。一方コントロール群においては、移植後 21 日と比較して高くなり、ASC ノックアウト群と比較すると有意に高値であった。(図6)

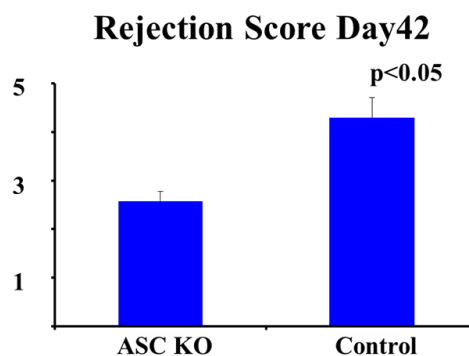


図6 移植後42日における Rejection Score

(iii) エラスチカ・ワンギーソン染色にて移植後冠動脈病変の解析を行うと、拒絶反応に応じて、内膜肥厚の程度に差を生じた。移植後 42 日のコントロール群においては、内膜肥厚が著明で内腔の閉塞を認める。(図7)

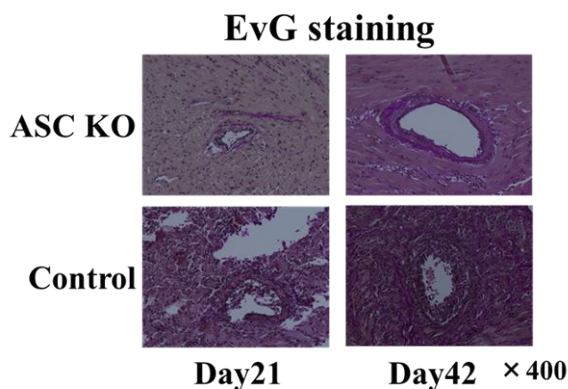


図7 エラスチカ・ワンギーソン染色

続いて冠動脈の内膜肥厚による閉塞率を 0 ~20%を 0、20~40%を 1、40~60%を 2、60~80%を 3、80~100%を 4、100%を 5 とスコア化し、両群において移植後 21 日と 42 日の冠動脈病変を解析した。(図8)

Luminal occlusion

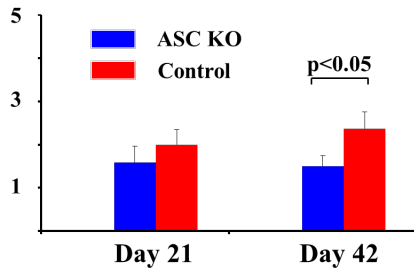


図8 冠動脈の内腔閉塞率

移植後 21 日では、両群間に差を認めなかった。移植後 42 日では ASC ノックアウト群においては変化を認めなかったのに対し、コントロール群では閉塞率は増加し、ASC ノックアウト群と比較し有意差を認めた。これらの変化は、HE 染色で得られた結果と類似していた。すなわち ASC ノックアウト群においては、移植後 21 日と 42 日で変化を認めなかったのに対し、コントロール群では拒絶反応の進行を認めた。

(iv) 図 9 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。両群を比較し、有意な所見は認めなかった。

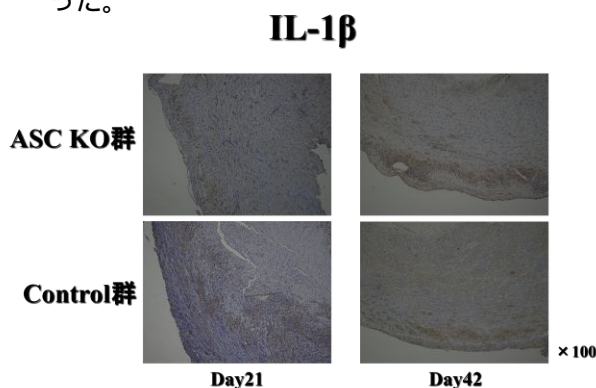


図9 免疫染色 IL-1

図 10 は IL-18 の免疫染色を示す。IL-1 同様に炎症細胞の浸潤に一致して、淡く発現を認めたが、両群を比較し有意な所見は認

めなかった。その他 IL-4、IL-6、IL-13、TNF- α 、IFN- γ についても免疫染色を行ったが、有意な所見は得られなかった。

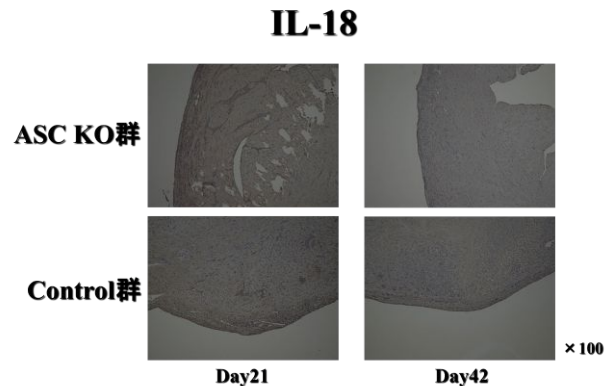


図10 免疫染色 IL-18

(4) サイトカインの解析

移植後 1 日、3 日、7 日、21 日、42 日に犠牲死させ IL-1、IL-4、IL-6、IL-13、IL-18、TNF- α 、IFN- γ 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。

また、ASC の下流にあたる IL-1、IL-18 については、同様に ELISA にてタンパク量を定量した。こちらについても現在データを解析中である。

これまでの研究で、ASC は急性拒絶反応と関連は認めなかったが、慢性拒絶反応には関与していた。ASC ノックアウト群でグラフ生着率が高く、組織学的には炎症細胞浸潤や心筋障害の程度は軽度で、移植後冠動脈病変も軽度であった。慢性拒絶反応との関連を解析すべく移植後 21 日、42 日の摘出心で免疫染色を施行したが、IL-1、IL-18 やその他のサイトカインと有意な所見は認めなかった。そこで、移植後早期の炎症性変化が慢性拒絶に関与している可能性を考慮して、移植後 21 日、42 日の他、移植後 1 日、3 日、7 日の検体も作成した。RT-PCR、ELISA を施行し現在データを解析中である。

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

研究者番号： なし

[学会発表](計2件)

Tatsuichiro Seto The role of the apoptosis-related inflammasome in cardiac allograft rejection World Transplant Congress 2014/7/26~31 San Francisco(USA)

瀬戸 達一郎 移植後拒絶反応におけるASCの関与について 第114回日本外科学会定期学術集会 2014/4/3~5 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル 京都(京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬戸 達一郎 (SETO, Tatsuichiro)
信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師
研究者番号：70362118

(2) 研究分担者

五味淵 俊仁 (GOMIBUCHI, Toshihito)
信州大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：90597668

大橋 伸朗 (OHASHI, Noburo)
信州大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：80623272

(3) 連携研究者

谷口 俊一郎 (TANIGUCHI, Shunichiro)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号：60117166

(4) 研究協力者

上条 しのぶ (KAMIJO, Shinobu)
信州大学・医学部・技能補佐員