The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Effects of Gene Transfection of Human bcl-2 on Concordant Cardiac Xenografts in Hamster to Rat Model
Author(s)	小林, 靖彦
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43765
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【10】

氏　　名	小林靖彦（こばやし やすひこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　16550　号
学位授与年月日	平成13年10月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Effects of Gene Transfection of Human bcl-2 on Concordant Cardiac Xenografts in Hamster to Rat Model （ハムスター・ラット異種心移植モデルにおける異種移植心に対するhuman bcl-2遺伝子導入の効果に関する実験的検討）
論文審査委員	（主査） 教授　松田　暉 （副査） 教授　白倉　良太　　教授　妙中　義之

論文内容の要旨

【目的】

臓器移植におけるドナー不足の解決策の1つとして異種移植があるが、種差の少ない間でのconcordant異種移植においては、cyclosporine（CyA）とcyclophosphamide等の免疫抑制剤を併せて投与することにより、移植グラフトの生着期間が心移植で延長する事が報告されている。しかし、長期的には、血管内塞栓や血管内皮の肥厚、あるいは高度な血管動脈硬化といった血管病変を主体とするdelayed xenograft rejectionにより移植心は拒絶される。最近になり、cyclosporineに補体活性化を抑制するcobra venom factor（CVF）を併せて投与することにより、移植心の血管病変の発生が抑えられ、生着が延長されることが報告された。その報告によると、移植心の冠動脈に血管病変はほとんど認められず、移植心の血管内皮細胞や心筋細胞にA20、bcl-2、bcl-xLといった細胞保護的な遺伝子が発現していることが認められている。このことからこのような遺伝子が血管病変を主体とするdelayed xenograft rejectionを抑制している可能性が示唆された。そこで、細胞保護的な遺伝子を移植心に遺伝子導入することにより、移植心の冠動脈病変が抑制されるという仮説を立てた。本研究では、ハムスターからラットへの異種心移植モデルを用いて、concordant異種移植心にHVJ-liposome法を用いてhuman bcl-2を発現させ、移植心の冠動脈病変が抑制されるかどうかを検討した。

【方法ならびに成績】

（方法）

ドナーに9-10週齢（体重：90-100g）のGolden Syrian Hamsterを、レシピエントに10週齢（体重：220-260g）のWister Lewis（LEW/Crj）ラットを用い、Ono and Lindesy法に従って異所性心移植を施行した。レシピエントをhuman bcl-2遺伝子を導入したB(＋)群（n＝17）と導入しなかったB(－)群（n＝20）の2群に分け、両群ともにCVF0.2mg/kg（im）を術前日と術当日に、FK5061.0mg/kg（im）を術当日より毎日投与した。遺伝子導入は、HVJ-liposome法を用いて、経冠動脈的に全心臓にhuman bcl-2遺伝子を導入した。両群ともに、心移植後1週目、2週目、3-4週目、1ケ月以上後に、3-4匹ずつレシピエントを犠牲死させ、移植心を心拍動下に摘出した。まずB(＋)群で移植後1週目に摘出した移植心において、マウス抗human bcl-2抗体を用いたWestern blotting法によりhuman bcl-2のmRNAの発現を確認した。次に移植心におけるhuman Bcl-2蛋白の発現を、マウス抗human bcl-2抗体を用いて免疫組織学的に染色し同定した。最後に移植心切片をH-E染色とElastic Van Gieson染色で染

色し、Billingham 分類に準じて冠動脈病変を5段階にスコア化した。

（成績）

1）Western blotting 法による human bcl-2 の蛋白発現の検討

B(+) 群で移植後1週目の摘出心において、negative control である無処置のハムスター心や脾臓と比較して高度に human bcl-2 の蛋白が発現していた。

2）移植心における human Bcl-2 蛋白の発現の検討

human Bcl-2 蛋白は B(+) 群の導入後1及び2週間目に移植心の冠動脈内皮細胞に発現していたが、B(+) 群の3週目以降の移植心や、B(−) 群の移植心には発現していなかった。

3）移植心における GCAS スコアから見た冠動脈病変

移植後1及び2週目には B(+) 群の移植心の GCAS スコアは、B(−) 群よりも有意に低値であったが、移植後3週目以後は差を認めなかった。

		1週目	2週目	3－4週目	1ケ月目以上
GCAS スコア	B(−)群	1.1±0.7*	1.8±0.6*	1.9±0.6	2.1±0.9
	B(+)群	0.6±0.6	0.8±0.7	2.1±0.8	2.7±0.7
bcl-2 染色	B(−)群	−	−	−	−
	B(+)群	+	+	+	−

*：$p<0.05$

【総括】

ハムスター・ラット異種心移植モデルにおいて、HVJ-lipsome 法を用いて bcl-2 遺伝子を異種移植心の冠血管内皮細胞に導入した。Human Bcl-2 蛋白の冠動脈内における発現は移植後2週間以内に認められ、その時期に遺伝子導入群の GCAS スコアが非導入群に比し有意に低値であった。以上より、血管内皮細胞における human bcl-2 等のアポトーシス抑制蛋白遺伝子導入により、concordant 異種移植心の冠動脈病変を抑制する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

臓器移植の分野では、ドナー不足の問題から異種移植の臨床応用の研究が進んでいる。その中で免疫抑制剤と補体制御剤の組み合わせにより、concordant 異種移植心の生着期間の延長が報告されている。しかし、長期的にみると血管内塞栓や血管内皮の肥厚、あるいは高度な血管動脈硬化といった血管病変を主体とする遅発性異種拒絶反応が長期的な生着を妨げている。一方、長期生着した concordant 異種移植心の冠血管内皮には、例えばA20、bcl-2、bcl-xL といった、いわゆる細胞保護因子が発現していることが報告されるに至り、これらが冠動脈病変を抑制している可能性が示唆されてきた。しかし、かかる細胞保護因子について具体的に検討した報告はない。そこで本研究では、導入効率の良い HVJ-liposome 法を用いて細胞保護的遺伝子の一つと考えられる human bcl-2 をハムスター・ラット異種移植心に導入した。その結果、human bcl-2 が発現している移植後2週目までの時期で冠動脈硬化が、対象に比べて有意に抑制されることが明らかになった。この研究成果は、concordant 異種移植モデルでの細胞保護因子と血管病変の関連性を示唆するものであり、異種移植における拒絶のメカニズムを解明する上で貴重な知見を示したものであり、学位の授与に値するものと考える。