



Title	Selective Chemokine and Receptor Gene Expressions in Allografts That Develop Transplant Vasculopathy
Author(s)	堀口, 敬
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43878">https://hdl.handle.net/11094/43878</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 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

氏名	堀 口 敬
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 3 2 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 14 年 10 月 30 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	Selective Chemokine and Receptor Gene Expressions in Allografts That Develop Transplant Vasculopathy. (ラット心移植後冠動脈硬化症におけるケモカインとその受容体遺伝子の発現動態)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松 田 暉  (副査) 教 授 堀 正 二 教 授 宮 坂 昌 之

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目的〕

移植後冠動脈硬化症 (TV) は心移植患者の長期予後を規定する最重要因子であるが、発症機構が不明なことより有効な治療法がない。最近、TV での新生内膜が宿主骨髓細胞の遊走・分化によって生じる事が示された。そこで、骨髓前駆細胞を病変部位へ遊走せしめる分子が、TV の診断・治療に大きな役割を果たすと考えられるが、未だこれらは同定されていない。ここで、ケモカインとその受容体が有力な候補分子と予想されるが、ケモカイン族分子の種類が多さとリガンドとその受容体関係の複雑さが候補分子の特定を困難にしている。

本研究では、high throughput な遺伝子発現解析手段である realtime RT-PCR 法を用い、核酸配列が既知のすべてのケモカインとその受容体遺伝子の実験的 TV での発現動態を明らかにすることで、本症に関与するケモカイン候補分子の選択を試みた。

#### 〔方法〕

8-12 週令の純系 SPF ラットを用い、2 種類の TV モデルで検討を行った。

#### 実験 1：心再移植モデル

非主要組織適合性抗原不一致の WKY(RT-1<sup>b</sup>)心 LEW(RT-1<sup>a</sup>)に移植し、3 または 5 日後に(WKYxLEW)F1 に再移植した (ALLO3、ALLO5 群)。同系群として LEW 心を LEW に移植し、5 日後に LEW に再移植した (ISO5 群)。再移植 1、14、30、60 日後に移植心を摘出し、RNA 抽出と形態学的評価を行った (各時間点；n=5)。

#### 実験 2：大動脈移植モデル

心再移植での結果の普遍性を検討するため、大動脈移植で同様の測定を行った。宿主と同系、非主要組織適合性抗原不一致または主要組織適合性抗原不一致の LEW、F344(RT-1<sup>b</sup>)、ACI(RT-1<sup>av</sup>)各胸部大動脈を LEW ラットの腹部に異所性移植した (L-L 群、F-L 群、A-L 群)。移植後 1、2、4、8 週後に移植大動脈を摘出し、RNA 抽出と形態学的評価を行った (各時間点；n=6)。

1)ケモカイン・受容体遺伝子の発現量測定；GeneBank には 14 種のラットケモカイン遺伝子と 13 種のケモカイン受容体遺伝子配列が登録されており、そのすべてに対して realtime RT-PCR 法 (TaqMan assay) による mRNA 定量

系を作成した。

2)形態評価；血管狭窄の評価は、移植心冠動脈に対しては Lurie らの方法に準じた狭窄度 (Score) の算出で半定量的に行い、移植大動脈に対してはコンピューター画像解析による内膜/中膜面積比 (%I/M ratio) の算出で定量的に行った。ケモカイン受容体 CXCR3、CCR2、CCR5 および CXCR3 のリガンド IP10 については免疫染色による発現部位の検討を行った。

3)統計学的解析；多群間の遺伝子発現量の比較は ANOVA 解析で行い、有意差検定には Bonferroni 法を用いた。

〔成績〕

1. 心再移植モデルでは ALLO5 群にのみ内膜肥厚病変が発生した。内膜肥厚は再移植 30 日後から有意に出現し、60 日まで進行した (ISO5、ALLO3、ALLO5 : Score  $0.42 \pm 0.19$ 、 $0.88 \pm 0.09$ 、 $2.1 \pm 0.24$ 、ISO5 vs ALLO3  $p=0.27$ 、ALLO3 vs ALLO5  $p<0.0001$ )。

2. ISO5 群と ALLO3 群で発現上昇せず、ALLO5 群のみで有意に発現上昇するケモカインとその受容体遺伝子を探索した。受容体では CXCR3、CCR5、CCR2 が、ケモカインでは IP10、RANTES が内膜肥厚と関連した発現パターンを示した。また、CXCR3 とそのリガンド IP10 は、ALLO5 群で再移植後 30 日にピークを持つ発現パターンを示した。

3. 大動脈移植モデルでは F-L 群と A-L 群で、移植 4 週以後に有意の新生内膜の発生を認めた。移植後 8 週の %I/M ratio は L-L、F-L、A-L 各群で、 $1.76 \pm 1.40$ 、 $29.6 \pm 2.58$ 、 $53.1 \pm 23.3$  (すべての組み合わせの比較で  $p<0.0167$ ) で、主要組織適合性不一致の場合により強い病変を認めたが、病変発生の時期はほぼ同一であった。

4. 大動脈移植モデルでのケモカインと受容体遺伝子の発現パターンは心移植の場合とほぼ一致した。CXCR3、CCR5、CCR2 遺伝子の発現上昇の程度は、血管組織のみからなる移植大動脈では移植心より有意に強かった (各  $p<0.0001$ )。

5. 免疫染色において CXCR3 と IP10 のみが特有の発現を示した。CXCR3 は新生内膜の最内層に強い発現を認め、IP10 は病的血管周囲にその発現を認めた。

〔総括〕

1) ラット心移植後の冠動脈硬化症発症におけるケモカインとその受容体遺伝子の発現動態を系統的に検討した。

2) 2 種類の異なるラット移植モデルにおいて、内膜肥厚病変と関連して 3 種のケモカインとその受容体遺伝子：IP10-CXCR3、RANTES-CCR5、MCP1-CCR2 の発現上昇を認めた。

3) IP10-CXCR3 の発現時期と局在部位より、骨髄前駆細胞の病変内膜への遊走に、本ケモカイン-受容体系が関与する可能性が示唆された。

4) 以上より、一部のケモカインとその受容体は移植後冠動脈硬化症の発症に関与する可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

ケモカインとその受容体システムは移植後動脈硬化症 (TV) に関与すると考えられるが、体系的な研究報告はほとんどない。本研究は核酸配列既知の全ラットケモカイン/受容体遺伝子に対して、定量 RT-PCR 法による発現測定系を作成し、ラット心移植と大動脈移植の 2 つの TV モデルにおいて、血管内膜の形態学的変化とケモカイン/受容体遺伝子発現の時間的経過を定量的に検討した。一部のケモカイン/受容体の発現部位は免疫組織染色法で同定した。その結果、両モデルにおいて、受容体 CXCR3、CCR5、CCR2 に形態変化と関連した遺伝子発現誘導を認めた。また、各々のリガンド IP10、RANTES、MCP1 も TV 発生グラフトに強く発現誘導された。特に IP10 は病変血管周囲に局在し、CXCR3 は新生内膜内層に高度に発現していた。以上より 3 種のケモカイン・受容体遺伝子系：IP10/CXCR3、RANTES/CCR5、MCP1/CCR2 の発現が TV の発症に関与する可能性が示唆された。本研究は心移植後冠動脈硬化症の予防あるいは治療を考えるうえで新しい可能性を示したものであり、学位に値すると考える。