



Apoptosis is involved in acute cardiac allograft rejection in rats

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 影山, 善彦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1078

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 225号	学位授与年月日	平成 9年 3月26日
氏名	影山善彦		
論文題目	Apoptosis is involved in acute cardiac allograft rejection in rats (ラット心移植急性拒絶反応におけるアポトーシスの関与)		

博士(医学) 影山善彦

論文題目

Apoptosis is involved in acute cardiac allograft rejection in rats

(ラット心移植急性拒絶反応におけるアポトーシスの関与)

論文の内容の要旨

【はじめに】

アポトーシスは、固体発生における組織・臓器形成に重要な働きを示すと同時に、癌、ウイルス、自己免疫疾患等の様々な病態に関わっている。また、細胞増殖を阻害する種々の要因（増殖因子の除去、放射線、抗癌剤等）によっても細胞にアポトーシスが誘導されることが知られている。近年臓器移植においてもその関与が注目されつつあるが、特に急性拒絶反応において中心的な役割を果たすとされる、細胞障害性 T 細胞 (CTL; cytotoxic T lymphocyte) が誘導するアポトーシスには、perforin/granzyme pathway と Fas/Fas ligand pathway という 2 つの pathway が存在することが明らかにされた。今回私達は、心移植の急性拒絶反応におけるアポトーシスには、これら 2 つの pathway が関与していることを明らかにするために、ラットの異所性心移植モデルを用いて形態学的・生化学的に検討した。

【方法】

動物は、近交系雄 DA ラット (RT-1^d) と Lewis ラット (RT-1^l) を使用し、頸部への異所性心移植を行った。コントロールは Lewis ラット間の同種同系移植 (isograft) とし (Group 1)、同種異系移植 (allograft) のドナーには DA ラットを、レシピエントには Lewis ラットを使用した (Group 2)。移植手術は原則的に Heron の方法に従い、ドナーの上行大動脈および肺動脈を、それぞれレシピエントの右総頸動脈および右外頸静脈に、カフテクニックにより吻合した。拒絶の判定は移植後連日、指針と触診にて行い搏動が完全に触れなくなった状態を拒絶と判定した。上記の実験モデルにおいて、allograft は移植後 6 日目に拒絶されることを確認し、これをもとに移植後 1、3、5 日目にレシピエントを犠牲死させ左室心筋を採取し、以下の事項について検討した。(1) in situ DNA nick-end labeling 法。ApoTag™ Plus Kit (Oncor 社、USA) を使用し、アポトーシスの結果断片化した DNA の 3'OH 末端に digoxigenin-nucleotide を結合させ、digoxigenin を免疫組織学的に検出し、アポトーシス細胞の占める面積比 (apoptotic index; AI) を計測した。(2) reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により、granzyme B、perforin、Fas、Fas ligand の mRNA の発現を検討した。PCR の条件は、denature; 94℃ /30秒、annealing; 60℃ /30秒、extension; 72℃ /90秒として 40 サイクル行い、アガロースゲル電気泳動した。(3) Hematoxylin-Eosin 染色および抗 T 細胞レセプター抗体 (R73) を用いた免疫組織染色により、左室心筋組織の変化と T 細胞浸潤の程度を観察した。(4) 透過型電子顕微鏡により、移植後 3 日目のアポトーシス細胞を観察した。

【結果】

(1) isograft ではアポトーシス細胞は検出されなかったが、allograft では移植後 3 日目と 5 日目で有意に検出された (AI; 3 日目: 0.064 ± 0.07 , 5 日目: 0.094 ± 0.017) ($p < 0.05$)。 (2) RT-PCR 法では、granzyme B、perforin、Fas ligand の mRNA は、allograft の 3、5 日目で強く発現していた。Fas mRNA は isograft、allograft の双方に発現していた。(3) T 細胞の浸潤は、allograft で経時的に著明に増加し、

5日目には左室心筋の一部にネクロシスが認められた。(4) 透過型電子顕微鏡にて、破壊された細胞核、細胞表面の微絨毛の消失、アポトーシス小体が観察された。

【結 論】

以上の結果より、ラット同種異系心移植における急性拒絶反応の過程で、比較的早期より perforin/granzyme pathway と Fas/Fas ligand pathway を介してアポトーシスが誘導されていることが示された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

臓器移植における急性拒絶反応には、細胞性免疫、特に細胞傷害性 T 細胞 (CTL; cytotoxic T lymphocytes) が重要な役割を果たすことが知られている。申請者は、心移植の急性拒絶反応に CTL によるアポトーシスが関与している可能性、およびその機序について、ラットの異所性心移植モデルを用いて形態学的、生化学的に検討を行った。

〔対象及び方法〕

近交系雄性 DA ラット (RT-1^l) をドナー、Lewis ラット (RT-1ⁱ) をレシピエントとし、頸部への異所性心移植を Heron の方法で行った。移植後、1、3、5日目の左心室筋を採取し、以下の検討を行った。(1) アポトーシスの検出は TUNEL (TdT-mediated dUTP-X nick end labeling) 法と透過型電子顕微鏡で行った。TUNEL 法では、更に免疫組織学的に検出されたアポトーシス細胞の占める面積比を AI (apoptotic index) として、計測した。(2) グランザイム B、パーフォリン、Fas、Fas リガンドの mRNA の検出は、reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) によって行った。(3) 左心筋組織の変化と T 細胞浸潤の程度は Hematoxylin-Eosin 染色および抗 T 細胞レセプター抗体 (R73) による免疫組織学的染色により観察した。

〔結 果〕

(1) DA ラット→Lewis ラットの allograft では、移植心の平均生着時間は6日であった。この移植心で、移植後3日目と5日目にアポトーシス細胞が検出された。又、5日目では一部に壊死も認められた。透過型電子顕微鏡でも移植後3日目で典型的なアポトーシスの所見が得られた。コントロールの isograft ではアポトーシス細胞は観察されなかった。(2) グランザイム B、パーフォリン、Fas リガンドの mRNA は移植後3日目と5日目の allograft に強く発現していた。これに対し、Fas mRNA は isograft、allograft の両者に構成的に発現していた。(3) T 細胞の浸潤は allograft に認められ、これは経時的に増加した。

〔結 論〕

ラット同種異系心移植における急性拒絶反応では、早期より心筋にアポトーシスが誘導された。このアポトーシスには浸潤 T 細胞によるパーフォリン/グランザイム B 経路と Fas/Fas リガンド経路が関与することが示唆された。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) コントロールとして isograft を使用しているが、autograft を使うべきではないか
- 2) RT-PCR の条件は適切か
- 3) AI をアポトーシスの程度の指標とした根拠は

- 4) TUNEL 法の特異性について
- 5) 移植後 5 日目に観察されたネクローシスはどのような機序でおきるのか、また、その急性拒絶反応における意味は
- 6) 拒絶反応をおこしたラットの T 細胞の細胞障害活性は測定したか
- 7) グランザイム B、パーフォリン、Fas リガンドの蛋白レベルでの発現は検討したか
- 8) 心筋のアポトーシスに関し、DNA の断片化 (ladder 形成) は観察したか
- 9) FK506 を使用するとアポトーシスは抑えられるか
- 10) T 細胞、およびパーフォリン / グランザイム B 経路と Fas リガンド / Fas 経路が心筋のアポトーシスに関与しているという直接証拠は

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士 (医学) の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 小 出 幸 夫

副査 教授 藤 田 公 生 副査 助教授 中 村 達