

ラット下肢同種移植モデルにおける
関節軟骨の急性拒絶反応に関する研究

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

外科病態学講座形成外科学分野

澁谷 暢人

目次

I、要約	3
II、研究背景	5
III-1、実験1：軟骨組織の拒絶反応	
1、研究目的	7
2、研究方法	8
3、研究結果	12
III-2、実験2：軟骨の拒絶反応による apoptosis 経路	
1、研究目的	15
2、研究方法	16
3、研究結果	20
III-3、実験3：拒絶反応と Heat Shock Protein との関連	
1、研究目的	22
2、研究方法	23
3、研究結果	24
IV、考察	25
V、結語	32
VI、謝辞	33
VII、凡例	34
VIII、文献	40
IX、図	46
X、表	68

I、要約

背景 近年、顔面や四肢の外傷性広範囲欠損に対して顔面移植や手移植をはじめとした同種複合組織術が臨床的に行われている。これらの成功の背景としてはマイクロサージェリー技術の進歩や免疫抑制療法が目覚ましい発展が挙げられるが、同種複合組織では他臓器よりもいっそうの、安全な長期生着が望まれる。しかし拒絶反応メカニズムそのものは未だ解明されていないところが多く、複合組織移植においては各組織ごとに免疫反応が異なっているため、それぞれの組織についての検討が必要である。特に軟骨組織はこれまで拒絶反応を起こさない組織として認識されてきた。実際、海外では臨床上、関節リウマチや外傷性軟骨欠損に対して同種骨軟骨移植術が行われており、長期的に良好な結果を残している。しかしその中でも **graft failure** は散見されており、移植時の物理的ストレス、保存時の凍結ストレスが原因とする報告はあるものの、拒絶反応に言及したものは少ない。今回私は膝関節軟骨の免疫特性について、物理的ストレス、凍結ストレスを除外したラット下肢同種複合組織移植モデルを用いて軟骨組織における拒絶反応の有無、およびそのメカニズムを検証した。

方法 実験群として **minor mismatch** の関係にある Fisher344 と Lewis のラット同種下肢移植、および対照群として Lewis ラット同士のラット下肢同系移植を行った。これらの群に対して拒絶反応の指標として軟骨細胞の経時的な **apoptosis** の発現を検討するため TUNEL 法および透過型電子顕微鏡による超微形態学的評価を行った。さらに **apoptosis** の経路として **caspase-3** の免疫組織学的染色法、および **Laser Captured Microdissection** 法により軟骨細胞を抽出、**quantitative real-time PCR** 法にて **caspase-3** の遺伝子発現を検討した。また拒絶反応に関与するとされている **HSP70**、**HSP60** につい

て免疫組織化学染色法にて経時的局在変化を検討した。

結果 同種移植群において術後7日目に有意に TUNEL 陽性細胞の増加が認められた。また術後12日目には電子顕微鏡下に軟骨細胞の核濃縮が認められ、同種移植群において経時的な軟骨細胞の apoptosis 増加を認めた。Caspase-3 は同種移植群において術後7日目に陽性率の増加が認められたが、caspase-3 の遺伝子レベルにおいては術後7日目以降減少していた。HSP70、HSP60 については同種、同系移植群共に有意な変化は認められなかった。

考察 これまで軟骨組織は細胞外基質に守られ、拒絶反応を起こさないとされていた。しかし本研究により軟骨組織でも術後軟骨細胞の apoptosis の増加が認められることから、移植後かなり早い段階で拒絶反応が起きていると考えられる。これらの反応には caspase-3 が関与しており遺伝子レベルにおいてはより早い段階で変化が起きている可能性が示唆される。しかし HSP70、HSP60 の増加が認められないことから、他臓器のような抗原提示細胞による cross-presentation が起きているわけではないと考えられ軟骨組織の特殊性が認められた。

結論 同種複合組織移植において軟骨組織でも拒絶反応が起きていることが本研究により初めて示唆され、その反応には caspase-3 を介した経路が関与している。さらに拒絶反応のメカニズムを解明することにより同種骨軟骨移植術、同種複合組織移植術の更なる成功へつながると考える。

II、研究背景

広範囲の軟部組織欠損、切断された四肢に対して 1962 年以降、マイクロサージェリーの目覚ましい技術充進により、遊離自家複合組織移植による再建が可能となってきた。しかしそれらの再建でも donor 部位の犠牲や整容上の問題点も多いことから、2005 年フランスにて世界で初めて、顔面の広範囲欠損に対する遊離同種顔面移植が行われた。以降世界中で同種顔面移植術が行われ現在までに 23 例の報告がなされている¹⁾²⁾。これらの成功はマイクロサージェリーの技術充進もさることながら、同種複合組織移植分野における免疫抑制療法や免疫寛容療法の進歩によるものが大きい。しかし他の実質臓器と異なり同種複合組織移植術では、その性質上異種組織が混在し、組織ごとに免疫反応が異なっていることが挙げられる。さらには、拒絶反応メカニズムそのものについては未だ解明されていない点が多いというのが現状である。

現在のところ、拒絶反応は移植後の時間経過を基準に、①ドナー抗原への既存抗体により数分以内に起こる超急性期拒絶、②移植片に应答したエフェクターT細胞や抗体により、移植後数日後より誘導される急性拒絶、また③長期にわたる移植片の機能喪失や繊維化による慢性拒絶に分けられる。特に移植免疫におけるエフェクターT細胞のメカニズムは図1に示すように、ドナー由来の抗原提示細胞による直接提示、レシピエント由来抗原提示細胞がドナーペプチドを取り込むことによる間接提示が行われ、認識されることでT細胞分化と成熟が起こる。成熟したT細胞はドナー細胞に対して抗原認識を行い、細胞死シグナルを送り込み拒絶反応を引き起こすことが解っている。

このようなメカニズムが解明されている裏で、拒絶反応メカニズムがあまり検討されていない組織の一つに関節軟骨組織が挙げられる。軟骨組織は非常に特殊な組織で、周囲が強固な組織で覆われ、血流がなく関節液からの栄養でのみ生存している組織である。また拒絶反応を起こしにくい組織としてもこれまで広く知られてきた。そのため海外では1世紀も前から、広範囲の関節欠損や変形性関節症に対して同種軟骨組織移植が行われており、臨床上の長期成功例が報告されて有用な治療法の一つとされている³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾。しかしそれら報告の中には **graft failure** に陥るものも散見されており、原因としては **graft** を採取する際のドリリングや移植する際の打ち込み刺激などの物理的ストレスによるもの⁷⁾、また **graft** を貯蔵する際の冷凍および冷蔵によるストレスによるもの⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾が挙げられている。**Graft failure** に拒絶反応が関与していることが示唆されているものの⁸⁾、これまで軟骨の拒絶反応について検討している報告は少ない。今回、私は軟骨組織が免疫学的に特殊な組織であるのか、もしそうであればどのようなメカニズムで免疫から逃れているのかを検討するべく研究計画を建て、その全体像を図2に示した。本研究を行うことで、同種軟骨移植、しいては同種複合組織の更なる長期安全な成功を導くものと考えている。

III-1、実験 1

軟骨組織の拒絶反応

1、研究目的

軟骨組織は拒絶反応がおこりにくいことで知られている。Langer ら¹¹⁾はラットの股関節軟骨を、関節面をそのままに同種のラット背部に移植したモデルを用い拒絶反応が起こらないと述べている。私はこの関節軟骨の免疫特権について再検討を行った。モデルとしては軟骨に対して直接物理的ストレスがかからず、さらに凍結ストレスを除外する目的で、ラット下肢同種複合組織移植モデルを用いた。

拒絶反応の評価には、心臓、肝臓、腎臓の同種移植分野において apoptosis が拒絶反応に関与していると報告されており¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾、軟骨組織においても同様であると考えられる。そこで同種複合組織移植における膝関節軟骨の apoptosis の有無を検討するため、形態学的評価法として Hematoxylin-Eosin (HE)染色により観察した。また apoptosis の検出には DNA の断裂を検出する Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labeling (TUNEL)法を用いた。これは DNA 鎖分解物(nicks)の 3'-OH 末端に TdT の酵素反応により dUTP が標識されることで検出される¹⁵⁾。さらに 2009 年の The Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD)による分類において、apoptosis の診断、検出には生化学的 (DNA laddering などの DNA の断裂) な証明のほか、超微細構造的な変化の証明を必要としており¹⁶⁾、透過型電子顕微鏡 (Transmission Emission Microscopy; TEM)による超微形態学的な診断を行った。

2、研究方法

実験動物および実験群

実験動物管理は、Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, revised in 1996)に従って行われ、また本研究における動物実験計画は、東北大学大学院医学系研究科動物実験委員会により承認された（承認番号 2011 医動-83）

実験動物としては、体重 280-380g のオス Lewis(LEW)(RT-1^l)ラット 99 匹、および体重 240-320g のオス Fisher344(F344)(RT-1^{vl})ラット 32 匹を使用した。この 2 系統は、MHC 抗原は一致するが、minor 抗原は不一致である。これらのラットはともに SPF ラットで、日本エスエルシーより購入した。

実験群は次の 2 群に分けて検討を行った。Allo group：同種移植群として Fisher344 ラットの右下肢を LEW ラットへの同所性移植を行う同種移植群（Fisher344 to Lewis：FL）および、Iso group：対照群として LEW ラットの右下肢を別の LEW ラットへの同所性移植を行う同系移植群(Lewis to Lewis：LL)とした。それぞれの群について、移植片の再還流後 30 分（第 0 日）、および術後（postoperative days ;PODs）第 1、3、7、12、18 日目にサンプルを採取した。（n=5 each）。さらに電子顕微鏡での観察目的に同種移植術後 12 日目に別にサンプルを採取した（n=2）。

移植手技

ラット下肢移植手技に関しては、いくつかのモデルの報告があり、本研究においては Press ら¹⁷⁾が報告した標準モデルを若干改変し、Lee ら¹⁸⁾によるラット同種下肢移植モデルと同一の手技にて行った。麻酔は気化麻酔器を用いて、まず麻酔ボックス内

で 5%イソフルランにて導入した後、簡易マスクを用い 2%イソフルランにて維持麻酔として行った。抗生剤および抗凝固剤は使用しなかった。大腿部近位 1/3 にて donor および recipient の下肢を切断、大腿動静脈・坐骨神経は graft では可及的近位にて、また recipient は遠位にて離断した。この際、血管攣縮防止および除痛目的に 2%リドカインを少量局所投与した。大腿骨はダイヤモンドソーにて離断した後 graft は生食ガーゼに包み 4℃にて移植時まで保存した。Graft 移植はまず大腿骨に 18 ゲージの注射針を髓内釘として骨接合に用い、次に大腿内転筋群を 5-0 ナイロンで縫合し血管吻合の土台とした。その後大腿動静脈・神経に対し 10-0 ナイロンにて顕微鏡下に端端吻合を行った。大腿動静脈吻合後 graft への再還流が十分であることを確認した後、坐骨神経を同様に吻合し大腿筋群を 5-0 ナイロンにて、また inguinal fat pad および皮膚を 6-0 ナイロンにて縫合した。実験のシェーマ、および術中写真を図 3 に示す。術後は移植下肢への自傷行為防止のため、graft 採取までプラスチックコルセットを装着した。術後は飼育ゲージに対し 1 個体ずつの管理とし飲料ボトルに水 400ml 中アセトアミノフェン 200mg を混和させ疼痛管理とした。

サンプル採取

前述のごとく、術後 0 日、1、3、7、12、18 日目にイソフルランによる全身麻酔下
に開胸した後、左心室から大動脈へステンレスカテーテルを挿入し 4%パラホルムアル
デヒド緩衝液にて 60 分間の全身還流固定を行った後、膝関節を採取した。同様に
negative control として移植術を行っていない Lewis ラットも全身還流の後サンプル採
取を行った (n=5)。採取した膝関節は同緩衝液にて 24 時間、浸漬固定を行った後 10%

EDTA に浸漬、4℃下にて 3 週間の脱灰を行った。脱灰が終了後膝関節に対して長軸方向に切断し、それぞれをパラフィン包埋し、組織学的および免疫組織化学的方法に使用した。電子顕微鏡観察目的には、同様に全身麻酔下に同種移植下肢を採取、関節軟骨を傷つけないように膝関節包を解放し 15 番メスにて鋭的に軟骨層を削りだし、4%パラホルムアルデヒド緩衝液へ浸漬した。またこちらも negative control として移植を行っていない Lewis ラットから同様に軟骨のみを採取した (n=2)。

組織学的方法

パラフィン包埋された各サンプルに付き、マイクロトームにて 3 μ m の厚さで薄切し、それぞれ 2 枚ずつのプレパラートを作成し hematoxylin-eosin(HE)染色を行った。Hotokebuchi ら¹⁹⁾によると minor-mismatch の関係にある同種移植群においては 4 週間までは軟骨層の構造変化を認めていないことから、軟骨構造の変性(degeneration architecture)、炎症性細胞浸潤(cellular infiltration)、核の濃縮像(condense nuclei)の 3 点を評価基準とし、評価者 2 名によって各プレパラート上でそれぞれの所見が確認できたものの有無をカウントした。また典型的な軟骨層の構造変化、細胞の浸潤像を図 4 に示す。本研究では、各標本について同系移植群と同種移植群での経時的組織学的変化を検証した。

TUNEL

Apoptosis を起こした軟骨細胞の有無を経時的に評価するため、TUNEL 法を行った。TUNEL 染色には In Situ Cell Death Detection Kit, AP (1684809; Roche Diagnostics GmbH)

を用いた。まず、各パラフィン包埋より、ミクロトームにて $3\mu\text{m}$ で薄切した切片を用い、キシレンで脱パラフィンを行い、エタノールに浸漬し精製水にて再水和を行った。その後 Proteinase K (S3020; DakoCytomation, Inc.) を 37°C のインキュベーター下にて15分間反応させることにより、ホルマリンによる cross-link の加水分解を行った。PBSにて洗浄した後、あらかじめ調整しておいたキット内の TUNEL 反応液 (TdT 酵素溶液 $5\mu\text{l}$ +標識溶液 $45\mu\text{l}$) を添加し 37°C のインキュベーター下にて60分間反応させた。これにより切断された DNA の $3'$ -OH 末端に標識される。さらに標識された DNA 断片分解物を光学顕微鏡下にて観察するため、キット中のコンバーター-AP 溶液を添加し、 37°C インキュベーター下にて60分間反応させ、PBSにて洗浄した後、Fast Red (11496549001; Roche Diagnostics GmbH)を添加し暗室にて常温、10分間染色した。対比染色としてヘマトキシリン染色を行ったのち、観察者2名により光学顕微鏡下(x200)において1視野中の TUNEL 陽性細胞をカウントし陽性率(陽性細胞/全軟骨細胞)を求めた。また positive control には TUNEL 反応液添加前に DNase I を添加し 37°C インキュベーター下で10分間反応させたものを用い、negative control には TUNEL 反応液中の TdT 酵素溶液を添加しないものを用いて行った。

Transmission Electron Microscopy (TEM)

超微形態学的に apoptosis 細胞を検出するため、apoptosis が起きていると考えられる同種移植術後12日目、および移植操作の及んでいない Lewis ラットの膝軟骨について透過型電子顕微鏡(Transmission Electron Microscopy; TEM)にて観察を行った。サンプルは前述のごとくメスにて鋭的に削りだした軟骨を、4%パラホルムアルデヒド

緩衝液に入れ、4°Cで一晩浸漬浸透させた。その後 0.1M カコジル酸緩衝液 (cacodylate buffer; CB) にて数回洗浄し、2-3 日 EDTA による脱灰を行った。剃刀の刃が入るようになったところでCBにより洗浄をした後、2.5%グルタルアルデヒド(glutaraldehyde; GA)にて4°Cで2時間固定、その後1%四酸化オスミウム(OsO₄)にて4°Cで2時間反応させた。蒸留水で洗浄した後、1%酢酸ウランにて常温で50分反応させた後、エタノールにて脱水を行い、エポン樹脂にて包埋した。その後薄切切片を作成し光学顕微鏡で確認した後、超薄切切片を作成、2%酢酸ウラン液で8分、鉛染色液で4分間染色し、透過型電子顕微鏡 (H-7600; (株)日立ハイテクフィールドイニング) にて観察した。サンプルは病理学者1名、観察者1名の2名により形態学的な評価を行った。

統計学的解析

すべての数値データは、平均値±標準偏差として示した。TUNEL 陽性率については two-way repeated measures ANOVA を採用し、多重比較として Tukey の HSD 検定を行った。解析には JMP® 10 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を使用した。p 値が 0.05 未満の場合、統計学的に有意とした。

3、研究結果

ラット下肢移植

下肢移植は同系移植群 34 例、同種移植群 36 例の合計 70 例行われ、各 30 例を組織学的、免疫組織化学的、LCM に使用し、同種移植群 2 例を電子顕微鏡、各 2 例ずつを PCR 検証実験に用いた。コントロールとして手術操作を行っていない Lewis ラッ

ト9匹を用いた。グラフトの虚血時間は 94.3 ± 4.85 分間であった。術後感染はいつさい認められなかった。また、移植したすべてのラットについては、実験期間中に食思不振や活動低下といった、全身状態の悪化を思わせる所見は認められなかった。またサンプル採取に際して移植術後12日まで、下肢の血流は維持されており、同種移植群の18日目において皮膚の黒色変化があるものの、下肢血流はわずかに認められていた。

組織学的検討

Iso group (同系移植群；対照群) いずれの術後日数においても関節軟骨の層構造、炎症所見、細胞の変性は認められなかった。術後0日、術後18日後のHE組織写真を図5右に提示する。

Allo group (同種移植群；実験群) 関節軟骨については術後18日目においても明らかな軟骨層の変化を認めなかった。また同様に炎症性細胞の浸潤も認められなかった。術後18日目において実験群の一部で軟骨細胞が若干縮小しており、クロマチンの濃縮が認められ、nuclear condensationを疑わせる所見を認めた。術後0日、術後18日後のHE組織写真を図5左に提示する。また以上の結果を表1に示す。

TUNEL

同系移植群においては、術後0日に1視野中、TUNEL陽性細胞がわずかに認められた。しかし全観察期間中にTUNEL陽性細胞が明らかに増加することはなかった。同種移植群においては、術後0日目には同系移植群と同様に数個のTUNEL陽性細胞

が認められたが、術後 7 日目には徐々に陽性細胞の増加があり、術後 18 日目には約半数の軟骨細胞において TUNEL 陽性を示した。同系、同種移植群における術後 0 日、18 日目の TUNEL 染色写真を図 6 に提示する。また全術後期間中の 1 視野(x200)における全軟骨細胞中の TUNEL 陽性細胞の割合(%)を図 7 に示す。同系、同種移植群共に術後 0 日から 3 日目にかけてほぼ同等の陽性率であったが、次第に増加傾向を示し、術後 18 日目において有意に増加していた。また術後 7 日目から術後 18 日目にかけて同期間の同系移植群と比較して、有意に陽性細胞の増加が認められた。(術後 7 日 $p=0.0431$ 、術後 12 日 $p=0.014$ 、術後 18 日 $p=0.0024$)

TEM

TEM による正常な軟骨の形態を図 8 左に示す。軟骨細胞は非常に小胞体(endoplasmic reticulum; ER)が発達しており、ゴルジ体(Golgi body; G)が目立ち、円形で大きな核を持つ。また細胞膜には endocytosis による鋸歯状構造がみられ、盛んなタンパク質合成が行われているのがわかる。同種移植後 12 日目の軟骨細胞を図 8 右に示す。ER や Golgi body は比較的保たれており、ミトコンドリア(mitochondria; M)も観察できる。また核にはクロマチンの凝集が認められ縮小しており、nuclear condensation と診断される。細胞周囲は細胞外基質に覆われているためか、細胞周囲の鋸歯状変化にはあまり変化は認められなかった。細胞自体も正常と比較し半分程度に小さくなっているのが認められることから、同種移植術後 12 日目には軟骨細胞が apoptosis を起こしていると考えられる。

III-2、実験 2

軟骨の拒絶反応による apoptosis 経路

1、研究目的

前述の研究結果により TUNEL 陽性細胞の増加、および TEM による軟骨細胞の apoptosis が検出されたことにより、軟骨組織においても同種移植術後経時的に拒絶反応が起きていると考えられる。このことは現在まで指摘されていた、軟骨組織における免疫特権とは異なっている。しかし HE 染色でも認められるように明らかな炎症細胞や免疫細胞の軟骨への浸潤は認められず、そのメカニズムはやはり特殊であると言わざるを得ない。そこで我々は apoptosis を起こす経路について検討を行った。

Caspase の活性化は apoptosis の重要な過程の一つであり²⁰⁾、caspase-3 は apoptosis の早期に関連する最も重要な protease である。正常な細胞内においては procaspase という形態とっており、apoptosis のシグナルを受け取ることで、procaspase 自身の直接分解や、その上流に位置する initiator caspase (caspase-2,-8,-9,-10 など)により活性化され、cleaved もしくは active caspase となる。活性化された caspase-3 が DNA 分解酵素 CAD (Caspase Activated DNase)をさらに活性化し apoptosis を起こす²¹⁾²²⁾。図 9 に示すように軟骨における Apoptosis には様々な経路があり、その下流に caspase-3 が位置する。今回我々は軟骨の拒絶反応経路に caspase-3 が関与しているかを検討した。培養軟骨細胞系など in vitro では、caspase-3 活性を特定のアミノ酸やペプチドを分解、発光させることで分析することが可能²³⁾²⁴⁾であるが、本研究のような in situ においては困難であり、active caspase3 の免疫染色により陽性細胞のカウントによって検証し

ている報告がある²⁵⁾ことから、本実験においては active caspase3 の免疫染色法、さらには mRNA の定量法を用いて検証した。これらを検証することで、拒絶反応メカニズム解析への first step とした。

2、研究方法

免疫組織化学的方法

軟骨組織の拒絶反応経路に active caspase-3 が関与しているかを検討するため、免疫組織化学染色を行った。まず、コーティングスライドに作成した未染標本を TUNEL 法と同様に、マイクロトームにて 3 μ m に薄切し脱パラフィンおよび再水和を行った。その後 proteinase K を室温にて 8 分間反応させ、抗原賦活化とした。その後、0.25% casein および carrier protein、さらに 15mM sodium azide を含有した、Non-Specific Staining Blocking Reagent (X0909; DakoCytomation, Inc.) を室温にて 10 分間反応させ、その後 Peroxidase Blocking Reagent (bottle 1; K4006; ENVISION+/HRP (horseradish peroxidase) kit; DakoCytomation, Inc.) を室温にて 10 分間反応させた。以上の準備の後、一次抗体として rabbit polyclonal antibody to anti-active caspase-3 (ab13847; Abcam, Cambridge, UK) を 1000 倍希釈にて 4°C 冷蔵下に 12 時間反応させた。二次抗体反応のため、TBST にて洗浄した後、HRP-Labeled Dextran-Polymer Conjugated Anti-Rabbit IgG Reagent (K4002; DakoCytomation, Inc.) を室温にて 60 分反応させた。発色は Liquid DAB (3,3'-diaminobensidine) system (bottle 3a & 3b) にて行い、対比染色としてヘマトキシリン染色を行った。評価は TUNEL 法と同様に二重盲検法にて行い、光学顕微鏡下 (x200) 1 視野における陽性細胞の率で求めた。また negative control として一次抗体反応の際

に一次抗体を抜いた抗体希釈液のみで行うものを使用した。

Laser Captured Microdissection (LCM)

軟骨組織は周囲が骨や骨髄組織に覆われており、新鮮軟骨組織のみを採取し、タンパク質などの定量検定を行うことは非常に困難である。そこで我々は、Laser Captured Microdissection (LCM)法を用いて、パラフィン包埋ブロックから軟骨組織のみの単一採取を行った。

通常のマイクロトームを RNase away で処理し RNase 除去した後、10 μ m の厚さで薄切を行った。採取する際の器具はすべてオートクレーブによる滅菌処理を行い、RNase free water を使用した。スライドガラスは LCM 用 PEN-Membrane 2,0 μ m (11505189; Leica; MicroDissect GmbH, Herborn)を使用した。PEN スライドにのせた切片は滅菌シートにてカバーし、43 $^{\circ}$ Cの保温器上に 6 時間置き充分乾燥させた。脱パラフィン、再水和には特級試薬のキシレンおよびエタノールを用い RNase free water を用いた。再水和した後ヘマトキシリンで染色した後、RNase free water で洗浄しクリーンベンチ内で充分乾燥させた。LMD7000 (Leica)を用い、スライドグラストレイを RNase away で RNase を除去した後、スライドグラスをセット、また PCR チューブトレイには 1.5 μ l の PCR チューブをセットし、キャップには RNeasy FFPE kit (73504; QIAGEN GmbH, Germany)内の Buffer PKD を 30 μ l 入れた。LMD7000 のプロトコールに従い、x6.3 の倍率で軟骨層のみをすべて Laser にて切除、Buffer を入れた PCR チューブに回収した(図 10)。さらに PCR チューブには Buffer PKD を入れてスピンドウンし切片を回収した。回収した切片に RNeasy FFPE kit 内の proteinase K を添加し 56 $^{\circ}$ Cの恒温槽で 15 分、さ

らに 80°Cの恒温槽で 15 分反応を行い、これにより核酸のホルムアルデヒドとのクロスリンクを外した。氷冷した後 20000g にて遠心した後、上清へ kit 中 DNase I 溶液を加えて室温にて 15 分間反応させ DNase I を除去した後、Buffer RBC を加えて混和、さらに無水エタノールを加えて RNA を析出、付属のスピンカラムで分離した。その後 Buffer RPE で洗浄した後、RNase free water を 20 μ l 入れスピンドウンし total RNA を抽出した。抽出した total RNA は NanoDrop D-2000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)で濃度確認した。

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

抽出した total RNA は Primescript RT reagent kit for real-time PCR (RR037A; TaKaRa, Japan)を用いて逆転写反応を行い、complimentary DNA (cDNA)を作成した。を行った。逆転写によって得られた cDNA をテンプレートとし、SYBR® Premix ExTaq II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa)を用いて、*TaKaRa Ex Taq* HS、dNTP Mixture、Mg²⁺および SYBR® Green I を含む反応混合液 25 μ l に ROX Dye II 1 μ l、テンプレート 3 μ l およびプライマー (10 μ M) 2 μ l を加え total 50 μ l とした。使用したプライマーは caspase-3 およびハウスキーピング遺伝子である、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)に対する特異的プライマーを用いた (表 2)。調整した試薬は Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA)を用いて、初期変性 95°C 30 秒、以降 PCR 反応を 95°C 5 秒、60°C 60 秒にて 45 サイクルを行い、最後に融解曲線分析を行った。得られたデータは Sequence Detection Software version 1.2.3 (Applied Biosystems, CA)を用いて解析し各データに付き Ct 値を求め、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法²⁶⁾により以下の計算式にて遺伝子の

比較定量を行った。

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad ; \quad \Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{GAPDH}}) - (Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{GAPDH}})$$

反応後の産物は融解曲線にてピークが単一であることを確認し、さらに2%のアガロースゲル内で電気泳動し、0.5 μ l/ml 濃度のエチジウムブロマイドで染色した後、UVトランスイルミネーターにて確認した。

PCR 検証実験

RNA の抽出を Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) サンプルから行う場合、ホルマリン固定時や、クロスリンクを外す際に RNA の質が低下することが懸念される。そのため新鮮サンプルから RNA を抽出して caspase-3 の遺伝子発現が正しいものかを検証した。サンプルとしては、操作を行っていないラットの膝関節 (n=2)、および同種移植術後 3 日目、および 12 日目、また同系移植術後 3 日目および 12 日目 (それぞれ n=2) に屠殺し、膝関節より直接軟骨をメスにて削りだした。採取した軟骨は ISOGEN (Nippon Gene Co., Ltd) に入れ、液体窒素にて凍結し破砕した。十分混和した後、12000g にて 10 分間遠心したのち、上清を回収。クロロホルムとイソアミルアルコールを加え、充分混和させた後、12000g にて 15 分間遠心し RNA 相を抽出した。抽出した RNA 相にイソプロパノールを加え、遠心したのち、沈殿物を採取した。沈殿物を 70% エタノールで洗ったのち、RNase-free water にて沈殿物を溶解し total RNA を抽出した。抽出した total RNA は NanoDrop D-2000 で濃度確認した。

この total RNA を前述の実験のごとく Primescript RT reagent kit for real-time PCR にて逆転写を行い cDNA を作成、これをテンプレートとして quantitative real-time PCR を

行った。プロトコールは前実験と同様に表 2 に示すプライマーおよび、SYBR® Premix ExTaq II (Tli RNaseH Plus)の試薬を用いてサンプルを作成した。PCR には Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System を用い、初期変性 95°C 30 秒、以降 PCR 反応を 95°C 5 秒、60°C 60 秒にて 45 サイクルを行い、最後に融解曲線分析を行った。得られたデータは Sequence Detection Software version 1.2.3 (Applied Biosystems, CA)を用いて解析し各データに付き Ct 値を求め、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法により求めた。

統計学的解析

すべての数値データは、平均値±標準偏差として示し、active caspase-3 陽性率および、caspase-3 遺伝子発現量については two-way repeated measures ANOVA を採用し、多重比較として Tukey の HSD 検定を行った。解析には JMP® 10 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を使用した。p 値が 0.05 未満の場合、統計学的に有意とした。

3、研究結果

免疫組織化学的方法

active caspase-3 同種移植、同系移植群共に術後 0 日から 3 日までほぼ同様の陽性細胞を認めた。また同種移植群においては術後 12 日目に active caspase-3 陽性細胞が増加している (図 11 左中)、しかし術後 18 日目には陽性細胞が減少していた (図 11 左下)。同系移植群においては明らかな変化は認められなかった。全移植期間中の active caspase-3 陽性率を図 12 に示す。同種移植群において術後 7 日目 ($p=0.0457$)、術後 12

日目($p=0.0176$)において有意に増加が認められるが、術後 18 日目には陽性細胞が減少していた ($p=0.0175$)。対照的に同系移植群においては観察期間中に明らかな増加は認められなかった。

Quantitative real-time RCR

Caspase-3 mRNA の遺伝子発現量を図 13 に示す。同種移植群において有意ではないが、術後 0 日から術後 1 日目に増加傾向が認められる。しかしその後は遺伝子発現量は次第に減少してきており、術後 7 日目($p=0.022$)、術後 12 日目($p=0.0058$)、術後 18 日目($p=0.0005$)に有意に減少していた。同系移植群においては有意な変化は認められなかった。

検証実験

新鮮サンプルから採取した軟骨より抽出した mRNA の遺伝子発現量を図 14 に示す。同種移植群においては移植後 3 日目、特に 12 日目において caspase-3 遺伝子の発現量の減少傾向が認められた。同系移植群においては術後経過を通して変動は少ない傾向にあることが認められた。

III-3、実験 3

拒絶反応と Heat Shock Protein との関連

1、研究目的

前章において軟骨拒絶反応経路に caspase-3 が関与していることが判明した。従ってさらなるメカニズムの解析には、その上流において検討する必要がある。これまでの先行研究では、同種複合組織移植モデルを使用し、皮膚組織において Heat Shock Protein (HSP)が関与していることを報告してきた¹⁸⁾。HSP はそもそも細胞保護機構の中で最も重要なタンパク質の一つであり、細胞内において種々のタンパク質の立体構造の保持、膜輸送などに重要な役割を果たしている。また種々のストレスに応答して誘導され変性タンパク質を再賦活化することでも知られている²⁷⁾²⁸⁾。近年、細胞外においても自然免疫系と獲得免疫系を link させる新しい機能を持つことが明らかになり、Srivastava ら²⁹⁾は、”chaperoning of immunity”と呼ばれる生体防御系を提唱している(図 15)。この中で HSP は種々のストレスについて生体防御系を発動させる danger signal として機能しており³⁰⁾、前述の先行研究では皮膚拒絶反応によって HSP60 および HSP70 が誘導されていることを報告してきた¹⁸⁾。

これらの拒絶反応メカニズムには抗原提示細胞の膜表面にある cross-presentation receptor が関与する。したがって、軟骨組織のように細胞浸潤が認められない組織においてもこのように HSP が danger signal として関与するかを検討した。

2、研究方法

免疫組織化学的方法

HSP60 および HSP70 の発現を検討するため、免疫組織化学染色を行った。前節の active caspase-3 の免疫組織学的方法と同様に、マイクロトームにて 3 μ m で薄切した切片を用い脱パラフィンおよび再水和を行い、proteinase K を室温にて 8 分間反応させ、抗原賦活化とした。その後特異的反応ブロック、内因性 peroxidase ブロックを行った。以上の準備の後、HSP70 の一次抗体としては、mouse monoclonal anti-HSP70 (W27) antibody (SC-24; Santa Cruz Biotechnology, Inc.)および HSP60 の一次抗体として、mouse monoclonal anti-HSP60 (LK1) antibody (H4149; SIGMA)をそれぞれ 200 倍希釈した後、4 $^{\circ}$ C 冷蔵下にて 12 時間反応させた。マウスの一次抗体試薬についてはラット免疫グロブリンと 50%交差反応性を示すため、5%normal rat serum (140-07051; 和光純薬)を HRP-Labeled Dextran-Polymer Conjugated Anti-Mouse IgG Reagent (K4006; DakoCytomation, Inc.)に混合させ、交差反応基吸着を 60 分間行った。一次抗体反応済み標本を TBST にて洗浄後、上述の処理を行った二次抗体にて室温、60 分間反応を行った。発色は Liquid DAB (3,3'-diaminobensidine) system (bottle 3a & 3b)にて行い、対比染色としてヘマトキシリン染色を行った。評価は active caspase-3 免疫組織化学染色と同様に二重盲検法にて行い、光学顕微鏡下 (x200) 1 視野における陽性細胞の率で求めた。また negative control として一次抗体反応の際に一次抗体を抜いた抗体希釈液のみで行うものを使用した。

統計学的解析

すべての数値データは、平均値±標準偏差として示し、HSP70、および HSP60 陽性率においては two-way repeated measures ANOVA を採用し、多重比較として Tukey の HSD 検定を行った。解析には JMP® 10 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を使用した。p 値が 0.05 未満の場合、統計学的に有意とした。

3、研究結果

免疫組織化学的方法

HSP70. 術後 0 日より同系、同種移植群共に、軽度陽性細胞が認められるものの、経時的に明らかな変化は認められなかった。陽性細胞そのものは関節軟骨表層に多い印象である。術後 0 日目および 18 日目の組織写真を図 16 に示す。陽性率は術後経過を通して、同系、同種移植群に有意な差は認められず、術後 18 日目に同種移植群における陽性細胞が同系移植群と比較し、低下していた。(図 17、 $p=0.0316$)

HSP60. 術後 0 日および 18 日目の組織写真を図 18 に示す。HSP70 と同様術後を通して同系移植群、同種移植群共に明らかな増加は認められなかった。また術後 18 日目においても陽性細胞の減少は認められなかった。陽性率をグラフにしたものを図 19 に示す。陽性率においても全術後期間中に明らかな変化は認められなかった。

VI、考察

1、軟骨の拒絶反応

顔面や四肢の広範囲な欠損、切断に対して同種複合組織移植術が行われ、成功例が報告されつつある。しかし、心臓、肝臓移植とは異なり”life-saving procedure”ではないため、免疫抑制療法による副作用にはよりいっそうの注意を払わなくてはならない³¹⁾。したがって免疫寛容療法の発展や、より毒性の少ない免疫抑制剤の開発の為には、複合組織移植という heterogeneous な組織、それぞれについて、拒絶反応メカニズムを解明していく必要がある。

今回私が着目したのが、軟骨組織である。軟骨組織の免疫特異性は古くから知られており、実際臨床においては同種軟骨移植術が行われ、多くの成果が報告されている。しかしその中でも graft failure が散見されており、それらの原因として移植時の物理的なストレス⁷⁾、および凍結、冷蔵によるストレスが挙げられる⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。したがって、私は軟骨の免疫特異性のみを検討するためそれらのストレスを除外した、同種複合組織移植モデルを用い、拒絶反応の評価の指標として apoptosis 細胞の有無、つまり TUNEL 染色および電子顕微鏡による超微形態学的観察をおこなった。また軟骨組織そのものに血流依存はないものの、周囲組織の虚血による影響を除外するという理由でもこのモデルは妥当であると考えた。しかし結果としては、移植後 7 日目には TUNEL 陽性細胞の増加が認められ apoptosis が起きていると考えられた。2009 年の細胞死研究会¹⁶⁾において apoptosis の検出には DNA 断裂の有無のほかに細胞の形態学的変化を必要としており、今回の結果による軟骨変化は apoptosis を起こしていると診断した。当

初 Langer ら¹¹⁾が指摘した軟骨の免疫特権というものは、軟骨組織を取り巻く extracellular matrix 細胞外基質によって軟骨細胞が守られているからであるとしている。同時に軟骨細胞単体を分離し移植したモデルについては免疫反応が起きており、軟骨細胞が免疫特異性を有しているのではなく、軟骨組織が周囲に守られるため拒絶反応を起こしにくいと述べている。しかし実際には細胞外基質に守られているにもかかわらず、拒絶反応が起きていることが本研究より、初めて明らかとなり、軟骨という特殊な組織について再検討する必要があると考える。さらに Sirlin らの報告³²⁾によれば、貝殻状に採取した同種骨軟骨移植術において抗ヒト白血球抗体(human leukocyte antigen:HLA)抗体の有無により、術後の変化を MRI にて評価したところ、抗 HLA 抗体陽性の場合、有意に骨の浮腫、軟骨の collapse が出現していることから、軟骨の graft failure に拒絶反応が関与している可能性がある。つまり軟骨の graft failure そのものは凍結や物理的ストレスの他、その割合は述べられていないが拒絶反応を含めた複合的な因子により起きている現象であると推察できる。Hotokebuchi ら¹⁹⁾は本研究と同様にラットの同種複合組織移植を用い、免疫抑制剤を使用しないグループにおいて軟骨の構造変化が移植後 4 週後に起きていると述べている。しかしそれらは HE 染色による軟骨の層構造の形態学的変化のみを指標としたものであり、今回私が示したように、実際には TUNEL 染色の陽性率の増加が認められた術後 7 日目には、既に軟骨細胞の拒絶反応が起きていることを初めて明らかにした。さらには、本研究で示したように同種複合組織移植術において軟骨が apoptosis を起こした場合、軟骨の viability の低下、および chondrocyte の減少が変形性関節症を引き起こす³³⁾ことが懸念されるため、同種複合組織移植においても今後の長期成績向上のためにはその拒絶反応経路の解明

が重要となってくる。

2、軟骨の拒絶反応経路

次に軟骨組織の拒絶反応メカニズムを検討するために caspase-3 について評価を行った。Caspase-3 は apoptosis の重要な key mediator の一つで、その経路の下流に位置する effector caspase である。したがって免疫組織科学的評価により active caspase-3 陽性細胞が 7 日目より増加を示していることは、この軟骨拒絶反応による apoptosis 経路に caspase-3 を介したカスケードを持っていることを示している。この結果は TUNEL 染色の結果と矛盾しない。異なる点としては術後 18 日目に active caspase-3 陽性率は減少に転じており、HE 染色で示したような萎縮した核を持つ軟骨細胞において、active caspase-3 が染まっていないことから、軟骨組織の apoptosis が進んでしまったため、細胞の viability が減少してしまったことが理由として考えられる。

caspase-3 などの protease を検証するにはタンパク質の定量検定が必要であると考えられるが、軟骨組織は周囲が骨、骨髄組織に覆われ、軟骨組織単一のタンパク質採取が非常に煩雑となる。従って私は LCM 法により軟骨組織のみを単一分離することとした。この方法により骨髄組織や周囲の滑膜組織を含めることなく軟骨組織を抽出できるが、本研究では薄切切片を作成する際にホルマリン固定、脱灰を行っている。これにより抽出物は非常に少量となり、ホルマリン固定の影響が避けられない。しかし実際に軟骨組織から LCM 法により抽出した報告や³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾³⁷⁾³⁸⁾、FFPE サンプルより抽出した RNA からの PCR や microarray を行い検証している報告もある³⁹⁾⁴⁰⁾。このため私はタンパク質ではなく RNA の抽出を行うこととした。ここで注意しなくてはなら

ないのが、ホルマリン固定の際の影響としてタンパク質との cross-link が生じ、少なからず RNA が変性していることが挙げられる。今回、proteinase K による酵素反応を用いることで cross-link を解除した。さらに検証実験として、ホルマリン固定から抽出した RNA 量が正確かどうかを、同種移植、同系移植後 3 日目と 12 日目の新鮮関節軟骨より抽出した mRNA にて評価した。結果としては、同種移植群において、いずれも正常軟骨より caspase-3 が低下、さらに同系移植群においては明らかな変化が認められないことから、LCM 法によるホルマリン固定サンプルでも十分な RNA を抽出、質を保つことができることを確認した。

Caspase-3 の遺伝子発現量については、移植 0 日目はほぼ変化はないが、同種移植術後 7 日目より有意に低下が認められた。この結果は caspase-3 の陽性率上昇とは異なっており、タンパク質と遺伝子発現量の変化に解離を生じている。同種移植術後 1 日目には有意ではないが軽度上昇傾向にあり、caspase-3 遺伝子における反応は術後早期に出現している可能性がある。またその後の減少については、active caspase-3 が上昇したことによる negative feedback が働いているのではないかと推察される。実際 Sabbagh らのモデルでは、apoptosis の刺激が起こると直後に caspase-3 遺伝子の増幅が起きるが、その後数時間で減少に転じている⁴¹⁾。このことから apoptosis 刺激を受けた直後に増幅しているのであれば、図 20 に示すように、免疫組織化学的検証よりもさらに早い段階で、軟骨の拒絶反応のシグナルが入力されていると考えられ、前述の TUNEL 法で示した移植術後 7 日目よりもさらに早い段階で拒絶反応が起き始めている可能性が示唆される。ただ術後早期の上昇については有意差を認めていないため、証明するためには n 数を増やす、もしくは術後 2 日目の観察を追加する必要があると

考える。もちろんこの時点ではラット下肢 graft の血流は保たれており、虚血による軟骨への外的要因が影響しているとは考えにくく、このことは軟骨そのものが拒絶反応を起こしていることの裏付けにもなる。以上のように軟骨の拒絶反応には caspase3 が関与していることが示された。またリンパ球においては apoptosis が進行すると、細胞の分化、増殖が抑制されることが知られている。軟骨においてはリンパ球とは異なり、既に成熟した細胞であることから分化は起こりにくいと考えられる。また軟骨における apoptosis は図9に示すようにミトコンドリアを経由する系があり、その場合代表的な apoptosis 関連タンパクが p53 である。p53 は DNA 障害が加わることでミトコンドリアへ移動し細胞死を誘導する経路と、転写を介して細胞周期を停止する作用がある。この p53 が関与することで増殖を抑制すると考えられる。本研究においても新鮮軟骨から採取した mRNA から p53 遺伝子を PCR にて検証したところ同種移植群において減少傾向を示した。結果として予測に反していたが caspase3 と同様、軟骨においても p53 が関与しており、細胞増殖抑制に働く可能性があり、今後の検討が必要と考える。

3、軟骨組織の免疫特異性

これまでの先行研究においては同種複合組織移植モデルを用い、皮膚、毛包において HSP70 および HSP60 が移植免疫に関与していることを報告してきた¹⁸⁾。これらのメカニズムは”chaperoning of immunity”と呼ばれ²⁹⁾、自然免疫系と獲得免疫系とを link していると言われている。図15に示したように、移植抗原との複合体である HSP-Ag complex は Toll-like receptor (TLR) 2/4⁴²⁾ といった licensing receptor を介して抗原提示細

胞を活性化し、さらに MHC class I 分子を介して非抗原提示細胞より直接抗原提示されるか、あるいは CD91⁴³⁾、lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1)⁴⁴⁾、CD40⁴⁵⁾といった cross-presentation receptor を介して抗原提示細胞に取り込まれ、間接的に抗原提示される。さらに、licensing receptor により自然免疫系が賦活化されるとサイトカインを放出し獲得免疫系も賦活化される。これらのメカニズムは様々な侵襲に対して生体防御系を発動させる上で重要となる。つまりこれらのメカニズムにおいては抗原提示細胞を中心とした免疫系が関与している。

本研究の結果より同種移植術後経過中に HSP70 および HSP60 の有意な増加は認められなかった。また HE 染色より明らかな細胞浸潤も認められず、炎症性細胞浸潤がないと考える。これらの結果より軟骨の拒絶反応メカニズムにおいては HSP を介した chaperoning of immunity が関与していない可能性があり、これらは心臓、肝臓などの単一組織臓器および皮膚などに起こりうる通常の移植免疫と異なっており、軟骨組織がこれまで拒絶反応が起こりにくいと考えられてきた原因でもある。しかし本研究により軟骨組織は術後の早い段階で拒絶反応を示している。ではその他の臓器と異なるメカニズムとして、現在仮説として私が考えているのは、軟骨組織への栄養やシグナルというものは滑膜や関節液を介して行われている。したがって本研究のように血流を介した細胞性免疫が関与していないのであれば、その経路としては、関節周囲組織、つまり滑膜などが拒絶反応により攻撃され、それによる細胞障害がサイトカインやケモカインなどの液性物質を放出し、関節液を介して細胞死を引き起こしている可能性である (図 21)。しかしこれらを検証するにあたり、関節周囲組織を除去すれば、除去そのものがストレスになり、また軟骨が直接他の組織と接触してしまうため困難

である。その他の視点としては関節液を経時的に抽出し液性物質の検証が有効と思われるが、ラット膝関節では困難であり、今後の課題と考える。

この特殊な軟骨細胞の拒絶反応メカニズムを解明することにより、同種複合組織移植および同種骨軟骨移植術の更なる成功が期待できる。もちろん軟骨の拒絶反応において、necrosis が起きていることも考えられる。本研究においても電子顕微鏡下に necrosis 細胞と考えられるものも散見される。しかし経過中ほとんどの細胞が TUNEL 陽性を示し、また図 4 に見られるような壊死細胞周囲の基質の融解像等が認められないことから、そのほとんどに apoptosis が関与しており、caspase3 が拒絶反応抑制療法のターゲットになりうる。軟骨組織の apoptosis 経路は慢性関節リウマチや、変形性関節症にて研究が進んでいるが⁴⁶⁾⁴⁷⁾⁴⁸⁾、まだ完全には解明されていない。Caspase-3 は軟骨細胞の apoptosis 経路でも重要な要因であると考えられており⁴⁹⁾⁵⁰⁾、外傷性の軟骨損傷に対して non-specific caspase inhibitor である insulin growth factor (IGF)-1⁴⁹⁾や collagenase、ZVAD-fmk を使用し軟骨細胞の viability を改善させている⁵¹⁾⁵²⁾。Kim ら⁹⁾は同種骨軟骨移植片の保存液中に IGF-1 や ZVAD-fmk を加え軟骨組織の viability を維持する”apoptosis inhibition therapy”を報告している。本研究より軟骨の拒絶反応には caspase-3 が関与し、それにより apoptosis が起きていることから、これらの”apoptosis inhibition therapy”も有用であると考ええる。特に同種骨軟骨移植術においては薬剤の全身投与は毒性が強く現実的ではないが、保存液中に強力な apoptosis inhibitor を使用することが可能であり、長所でもある。今後さらに軟骨の拒絶反応メカニズムが解明されれば、さらに上流の apoptosis 刺激を抑制することが可能となる。このようにピンポイントで拒絶反応および apoptosis の抑制ができれば、より安全な”apoptosis

inhibition therapy”や免疫抑制療法ができ、同種複合組織移植術の成功につながっていると考えている。

Ⅶ、結語

本研究において同種複合組織移植モデルを用い、軟骨組織においても拒絶反応が起きており、それはこれまで指摘されているよりもかなり早期に起こしていることを初めて明らかにした。さらにそれらの拒絶反応は caspase-3 が関与しているが、心臓、肝臓などの単一臓器や皮膚などと異なり、chaperoning of immunity が関与していない。軟骨の拒絶反応メカニズムを解明することで同種複合組織移植のみならず同種骨軟骨移植の更なる成功が期待できる。

VIII、謝辞

本研究を遂行するにあたり、私が所属する外科病態学講座形成外科学分野の館正弘教授、今井啓道先生、非常勤講師の李陽成先生はじめ、同門の先生方には長期間にわたって忍耐強い御指導を戴きました。また感染病態解析学分野の菅野恵美先生、外科病態学講座形成外科学分野の大学院生の方々からは、実験に関する多くの知識や御支援を戴きました。病理形態学講座の小野栄夫教授、能勢真人先生には病理学のおよび電子顕微鏡の形態学的御助言を戴きました。実験動物病理プラットフォームの伊達文子さん、岩佐博雄さん、田澤智香さん、新本美紀さんには LMD 法の御指導からサンプル処理に関する御意見、また非常にきれいな電子顕微鏡のサンプル作成をしていただきました。動物実験施設臨床分室の末田輝子さん、木伏智美さん、大内恵理さんには、動物実験に関して様々な御援助を戴きました。さらに、形成外科学の深遠な世界を垣間見させて戴き、東北大学へ快く送り出してくださった元筑波大学臨床医学系形成外科中山凱夫先生、遠藤隆志先生に厚く御礼申し上げます。最後に、これまで如何なる時も日に陰に力となってくれた妻、娘、息子に感謝したく思います。お世話になったすべての方々の名をここで挙げることはできませんが、これまで私を支えてくださった多くの方々の存在なくして、本研究の完成は有り得なかったことを明記し、今後もあらゆる面で自己研鑽に邁進し、形成外科学の発展に微力ながら貢献していきたいと存じます。

IX、凡例

図 1. 基本的な移植免疫のシエーマを示す。急性期拒絶反応においてはドナー由来の抗原提示細胞による直接提示、およびドナー抗原ペプチドを取り込み間接的に抗原提示しているレシピエント由来抗原提示細胞により抗原提示される。それによりレシピエント T 細胞は分化成熟し、細胞障害性 T 細胞となり、ドナー細胞に対して抗原認識し、細胞障害シグナルを送る。それによりドナー細胞は Apoptosis を起こし、拒絶される。

図 2. 本研究における全体像を示す。ラット下肢血管柄付き同種複合組織移植モデルより、膝関節を採取し、関節軟骨について、拒絶反応の有無、Apoptosis 経路、Heat Shock Protein の関与について検証した。

図 3. 左：移植時のシエーマを示す。髓内釘にて骨接合し、大腿筋群を縫合した後、大腿動静脈、神経、坐骨神経をマイクロ下に縫合した。右上：採取した下肢 graft。血管にはマイクロクリップを装着している。右下：血管吻合後。再還流を確認し、皮膚縫合の後、サンプルとした。(A:大腿動脈 V:大腿静脈 FN:大腿神経 B:大腿骨 SN:坐骨神経 Nail:髓内釘)

図 4. 典型的な軟骨変性像を示す。A:変形性関節症における軟骨層。軟骨層のコラーゲン繊維がすり切れ、縦に割かれている。B:変形性関節症により、軟骨層に横亀裂が

生じている。C:関節リウマチの軟骨像。軟骨表層にびらんを形成し、壊死した軟骨細胞とその周囲に細胞外基質の融解(bulbing)を認める。D:関節リウマチ。周囲の炎症性活膜が侵入し、軟骨を覆いびらんを形成している。

図 5 移植下肢膝関節軟骨の HE 染色組織所見。同系移植群においては術後 0 日目（右上）および術後 18 日目（右下）において明らかな細胞浸潤および軟骨の構造変化は認められなかった。同種移植群においては術後 0 日目（左上）には正常な組織像を示していたが、術後 18 日目（左下）には軟骨の層構造の変化、および炎症性細胞浸潤はみられないものの、軟骨細胞の核が縮小（矢印）しているように見える。（×200）

図 6. 関節軟骨の TUNEL 染色所見。術後 0 日目においては同種、同系移植群共に若干の陽性細胞（矢印）が認められる。同系移植群における術後 18 日目には TUNEL 陽性細胞の増加は認められないが、同種移植群術後 18 日目には陽性細胞の増加が認められた。（×200）

図 7. TUNEL 陽性細胞について経時的な陽性率を示す。術後 3 日までは同種、同系移植群ともに明らかな差は認められないが、術後 7 日目には同種移植群において同系移植群よりも有意に陽性細胞の増加が認められた。その後経時的に同種移植群における陽性細胞の増加が認められ、同種移植 18 日目には 0、1、3 日目と比較し優位な増加が認められた。（*, † ;p<0.05）

図 8. 正常軟骨細胞（左）、および同種移植後 12 日目の軟骨細胞（右）の電子顕微鏡画像を示す。正常軟骨細胞では核は円形で、小胞体に富んでおり細胞周囲には endocytosis による鋸歯状変化が認められる。同種移植 12 日目には小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリアなどの細胞小器官が確認され、その形態は比較的保たれているものの、核は濃縮され、縮小している。細胞周囲の鋸歯状変化は細胞外基質のためかそれほど変化は認められない。(Bar=2 μ m、N：核、ER：小胞体、M：ミトコンドリア、G：ゴルジ体)

図 9. 軟骨における Apoptosis 経路を示す。軟骨においては外力による integrin を介したものの、炎症性因子、一酸化窒素、FAS などの Death Receptor によるものが認められる。caspase-3 はその下流に位置している。

図 10. Laser Captured Microdissection 法による軟骨採取の画像を示す。LMD-7000 (Leica) を用い、 $\times 6.3$ 倍率にて図 A のようにマーキングを行い、レーザーにて切除する (図 B)。切除した軟骨組織はスライド下に設置してある buffer を入れた PCR チューブ内に回収した (図 C)。

図 11 Active caspase-3 の免疫組織化学染色像を示す。術後 0 日目には同系、同種移植群において軽度陽性細胞を認める。その後同種移植群においては術後 12 日目に陽性細胞の増加が認められ、術後 18 日目には逆に陽性細胞は目立たなくなる。同系移植群においては術後経過を通して陽性細胞の増加は認められなかった。($\times 200$)

図 12. Active caspase-3 の免疫組織化学染色による陽性率を示す。同系移植群においては術後経過中に明らかな増加は認められなかった。同種移植群において術後 7 日目、12 日目に同日の同系移植群と比較して有意に陽性率の増加を認めたが、術後 18 日目には 12 日目と比べて有意に低下した。(*,**,†;p<0.05)

図 13. 移植膝関節軟骨における Caspase-3 mRNA の経時的発現量を示す。同種移植群においては、術後 7 日目以降、有意に減少が認められる。同系移植群においては遺伝子発現量において明らかな変化は認められなかった。(*;p<0.05)

図 14. 新鮮膝関節軟骨より採取した Caspase-3 mRNA の遺伝子発現量を示す。同種移植群において術後 3 日、12 日ともに低下が認められた。同系移植群においては明らかな変化は認められなかった。(n=2)

図 15. Chaperoning of Immunity の概念図を示す。①抗原ペプチドと HSP 複合体は、MHC class I 分子を介して直接抗原提示されるもの、また②遊離した抗原ペプチド-HSP 複合体が CD91 を介して抗原提示細胞に取り込まれる再抗原提示もしくは cross presentation が行われる。APC:antigen presenting cell、TAP:transporter associated with antigen processing、ER:endoplasmic reticulum

図 16. HSP70 の免疫組織化学的染色像を示す。同種、同系移植群とも術後経過を通して軽度陽性細胞（茶色）が認められ、明らかな変化は認められなかった。（×200）

図 17. HSP70 の免疫組織化学的染色における陽性率を示す。同種、同系移植群共に術後経過中変化は認められないが、同種移植群の術後 18 日目において同系移植群と比較し低下が認められた。（*; $p<0.05$ ）

図 18. HSP60 の免疫組織化学的染色像を示す。同種、同系移植群共に術後より軽度陽性細胞（茶色）が認められ、術後経過を通して明らかな変化は認めなかった。（×200）

図 19. HSP60 の免疫組織化学的染色における陽性率を示す。HSP70 と同様に術後経過を通して、同種、同系移植群共に明らかな変化は認められなかった。

図 20. TUNEL、active caspase3、caspase3 mRNA の発現を経時的に重ねたグラフを示す。TUNEL は術後 18 日をピークとし、active caspase-3 は術後 12 日目にピークを迎えている。さらに有意差は無いがそれよりも早い段階で caspase3 mRNA のピークがあると考えられる。

図 21. 軟骨においては、軟骨外基質がバリアとなり抗原提示細胞や T 細胞が侵入することができない。しかし、おそらくは拒絶反応シグナルとなるものが存在し、それにより軟骨細胞は Apoptosis を起こしていると考えられる。

表 1. HE 染色における形態学的変化を、“軟骨構造の変性”、“細胞性浸潤”、“核の縮小”につき、スライド内で所見が見られたものの有無でカウントした。同種移植術後 18 日目のスライドにおいてのみ核の縮小像が認められた。

表 2. caspase-3、GAPDH の primer を示す。

X、文献

1. Bojovic B, Dorafshar AH, Brown EN et al: Total face, double jaw, and tongue transplant research procurement: an educational model. *Plast Reconstr Surg*, 2012;1304:824-834.
2. Siemionow M, and Ozturk C: An update on facial transplantation cases performed between 2005 and 2010. *Plast Reconstr Surg*, 2011;1286:707e-720e.
3. Convery FR, Akeson WH, Amiel D et al: Long-term survival of chondrocytes in an osteochondral articular cartilage allograft. A case report. *J Bone Joint Surg Am*, 1996;787:1082-1088.
4. Gross AE, Shasha N, and Aubin P: Long-term followup of the use of fresh osteochondral allografts for posttraumatic knee defects. *Clin Orthop Relat Res*, 2005435:79-87.
5. McCulloch PC, Kang RW, Sobhy MH et al: Prospective evaluation of prolonged fresh osteochondral allograft transplantation of the femoral condyle: minimum 2-year follow-up. *Am J Sports Med*, 2007;353:411-420.
6. McGoveran BM, Pritzker KP, Shasha N et al: Long-term chondrocyte viability in a fresh osteochondral allograft. *J Knee Surg*, 2002;152:97-100.
7. Borazjani BH, Chen AC, Bae WC et al: Effect of impact on chondrocyte viability during insertion of human osteochondral grafts. *J Bone Joint Surg Am*, 2006;889:1934-1943.
8. Bedi A, Feeley BT, and Williams RJ: Management of Articular Cartilage Defects of the Knee. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 2010;924:994-1009.

9. Kim HT, Teng MS, and Dang AC: Chondrocyte Apoptosis: Implications for Osteochondral Allograft Transplantation. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2008;4668:1819-1825.
10. Pallante AL, Bae WC, Chen AC et al: Chondrocyte viability is higher after prolonged storage at 37 degrees C than at 4 degrees C for osteochondral grafts. *Am J Sports Med*, 2009;37 Suppl 1:24S-32S.
11. Langer F, and Gross AE: Immunogenicity of allograft articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 1974;562:297-304.
12. Laguens RP, Meckert PM, Martino JS et al: Identification of programmed cell death (apoptosis) in situ by means of specific labeling of nuclear DNA fragments in heart biopsy samples during acute rejection episodes. *J Heart Lung Transplant*, 1996;159:911-918.
13. Masri SC, Yamani MH, Russell MA et al: Sustained apoptosis in human cardiac allografts despite histologic resolution of rejection. *Transplantation*, 2003;765:859-864.
14. Searle J, Kerr JF, Battersby C et al: An electron microscopic study of the mode of donor cell death in unmodified rejection of pig liver allografts. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 1977;554:401-406.
15. Gavrieli Y, Sherman Y, and Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 1992;1193:493-501.

16. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P et al: Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 2009;161:3-11.
17. Press BH, Sibley RK, and Shons AR: Limb allotransplantation in the rat: extended survival and return of nerve function with continuous cyclosporin/prednisone immunosuppression. *Ann Plast Surg*, 1986;164:313-321.
18. Lee YS, Sakurai M, Imai Y et al: Induction of heat shock proteins in a rat composite tissue allotransplantation model of acute rejection. *Plast Reconstr Surg*, 2006;1181:29-40.
19. Hotokebuchi T, Arai K, Takagishi K et al: Limb allografts in rats immunosuppressed with cyclosporine: as a whole-joint allograft. *Plast Reconstr Surg*, 1989;836:1027-1036; discussion 1037-1028.
20. Majno G, and Joris I: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 1995;1461:3-15.
21. Fischer U, Janicke RU, and Schulze-Osthoff K: Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 2003;101:76-100.
22. Kurokawa M, and Kornbluth S: Caspases and kinases in a death grip. *Cell*, 2009;1385:838-854.
23. Kavas A, Cagatay ST, Banerjee S et al: Potential of Raloxifene in reversing osteoarthritis-like alterations in rat chondrocytes: An in vitro model study. *Journal of Biosciences*, 2012;381:135-147.

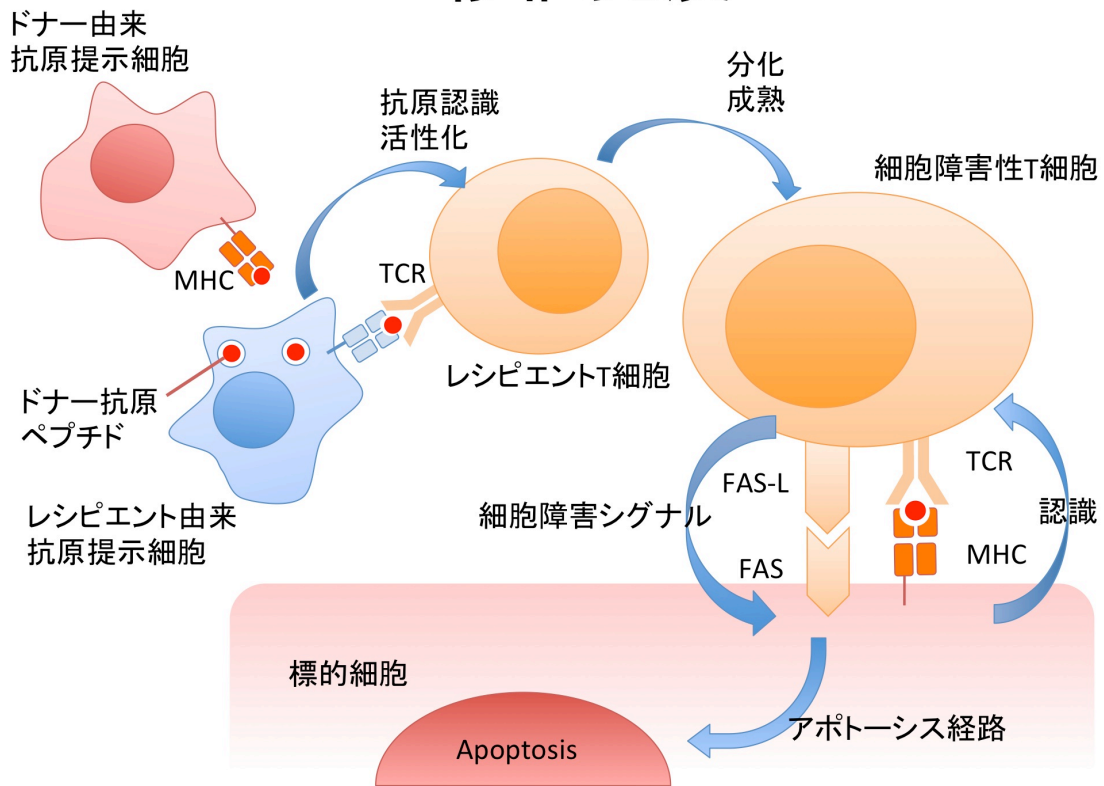
24. Na JY, Kim S, Song K et al: Anti-apoptotic Activity of Ginsenoside Rb1 in Hydrogen Peroxide-treated Chondrocytes: Stabilization of Mitochondria and the Inhibition of Caspase-3. *J Ginseng Res*, 2012;363:242-247.
25. Thomas CM, Fuller CJ, Whittles CE et al: Chondrocyte death by apoptosis is associated with the initiation and severity of articular cartilage degradation. *Int J Rheum Dis*, 2011;142:191-198.
26. Livak KJ, and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001;254:402-408.
27. Ananthan J, Goldberg AL, and Voellmy R: Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science*, 1986;2324749:522-524.
28. De Maio A: Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock*, 1999;111:1-12.
29. Srivastava P: Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol*, 2002;201:395-425.
30. Matzinger P: The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science*, 2002;2965566:301-305.
31. Eun SC: Composite tissue allotransplantation immunology. *Arch Plast Surg*, 2013;402:141-153.
32. Sirlin CB, Brossmann J, Boutin RD et al: Shell osteochondral allografts of the knee: comparison of mr imaging findings and immunologic responses. *Radiology*, 2001;2191:35-43.

33. Mistry D, Oue Y, Chambers MG et al: Chondrocyte death during murine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004;122:131-141.
34. Benayahu D, Socher R, and Shur I: Application of the laser capture microdissection technique for molecular definition of skeletal cell differentiation in vivo. *Methods Mol Biol*, 2008;455:191-201.
35. Benoyahu D, Akavia UD, Socher R et al: Gene expression in skeletal tissues: application of laser capture microdissection. *J Microsc*, 2005;220Pt 1:1-8.
36. Dafna B, Rina S, and Irena S: Laser Capture Microdissection and Laser Pressure Catapulting as Tools to Study Gene Expression in Individual Cells of a Complex Tissue. *2007;82:675-687*.
37. Fukui N, Miyamoto Y, Nakajima M et al: Zonal gene expression of chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*, 2008;5812:3843-3853.
38. Murakami T, Fukunaga T, Takeshita N et al: Expression of Ten-m/Odz3 in the fibrous layer of mandibular condylar cartilage during postnatal growth in mice. *J Anat*, 2010;2173:236-244.
39. Coudry RA, Meireles SI, Stoyanova R et al: Successful application of microarray technology to microdissected formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn*, 2007;91:70-79.
40. Pagedar NA, Wang W, Chen DH et al: Gene expression analysis of distinct populations of cells isolated from mouse and human inner ear FFPE tissue using laser capture

- microdissection--a technical report based on preliminary findings. *Brain Res*, 2006;10911:289-299.
41. Sabbagh L, Bourbonniere M, Sekaly RP et al: Selective up-regulation of caspase-3 gene expression following TCR engagement. *Mol Immunol*, 2005;4211:1345-1354.
 42. Vabulas RM, Braedel S, Hilf N et al: The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J Biol Chem*, 2002;27723:20847-20853.
 43. Basu S, Binder RJ, Ramalingam T et al: CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*, 2001;143:303-313.
 44. Delneste Y, Magistrelli G, Gauchat J et al: Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity*, 2002;173:353-362.
 45. Becker T, Hartl FU, and Wieland F: CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J Cell Biol*, 2002;1587:1277-1285.
 46. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H et al: Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol*, 1995;1461:75-85.
 47. Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S et al: Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 1998;419:1632-1638.
 48. Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D et al: Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 1998;417:1266-1274.

49. Lo MY, and Kim HT: Chondrocyte apoptosis induced by collagen degradation: inhibition by caspase inhibitors and IGF-1. *J Orthop Res*, 2004;221:140-144.
50. Nicholson DW: Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 1999;611:1028-1042.
51. D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC et al: Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001;98:712-719.
52. D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC et al: Prevention of chondrocyte apoptosis. *J Bone Joint Surg Am*, 2001;83-A Suppl 2Pt 1:25-26.

移植免疫



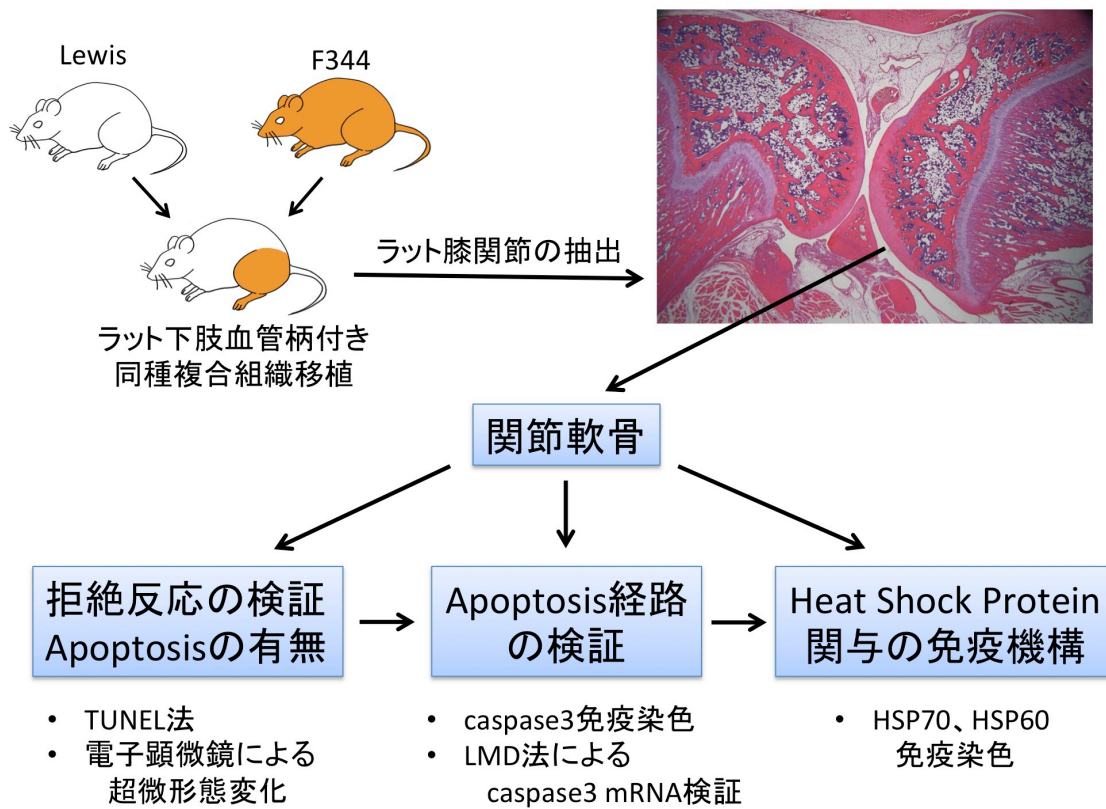
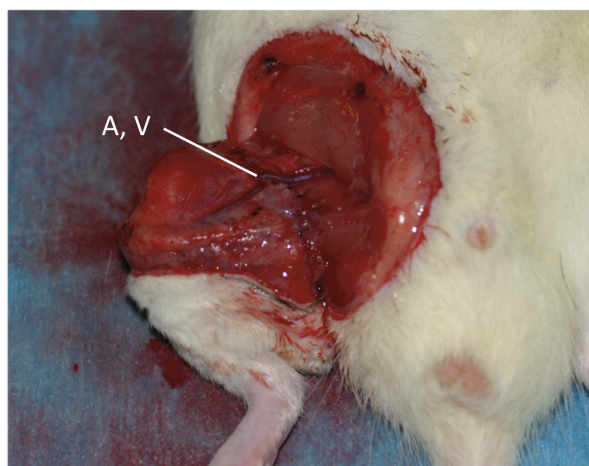
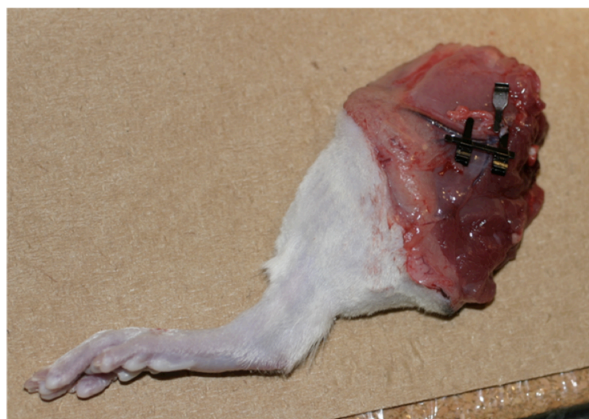
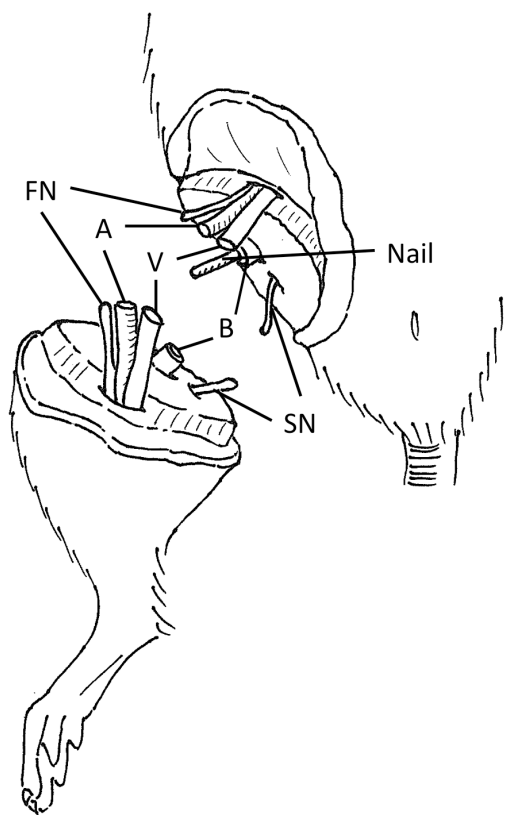
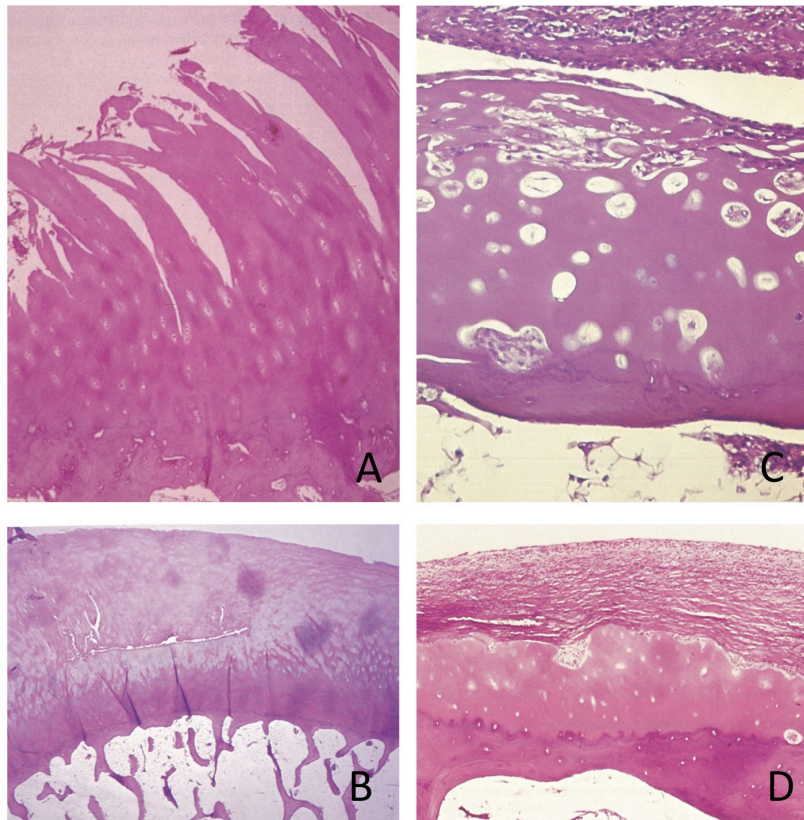
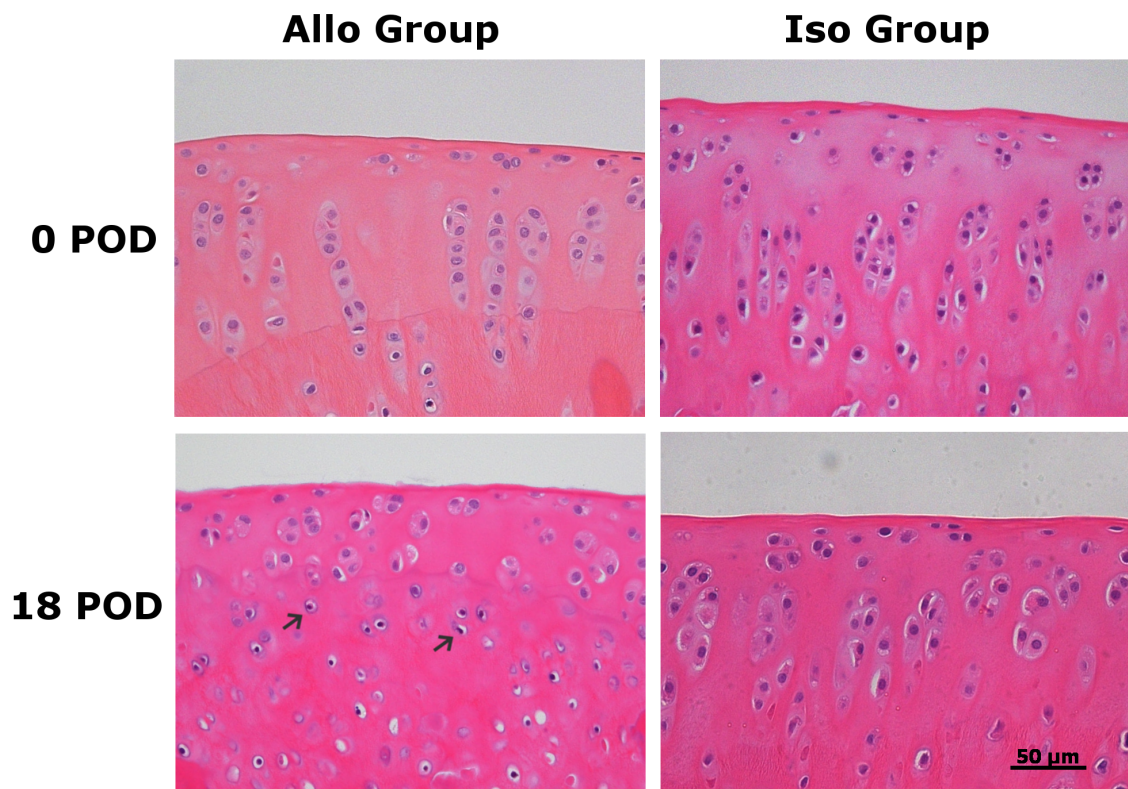


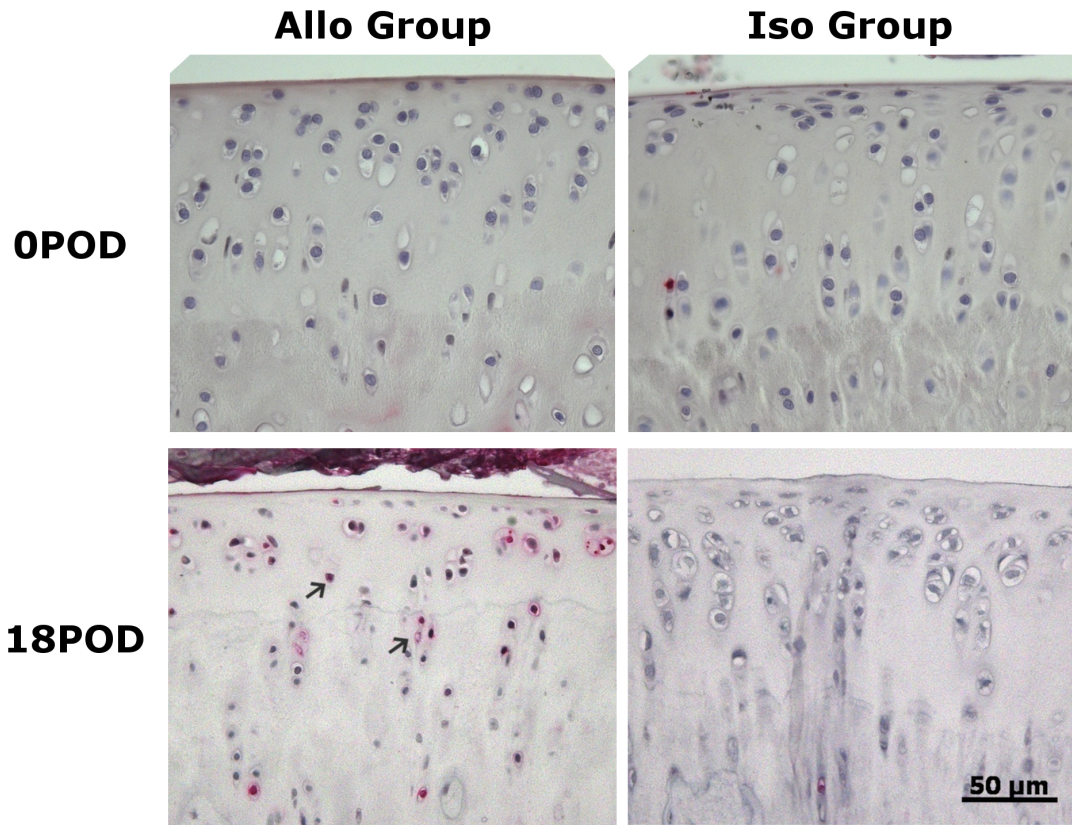
图 3

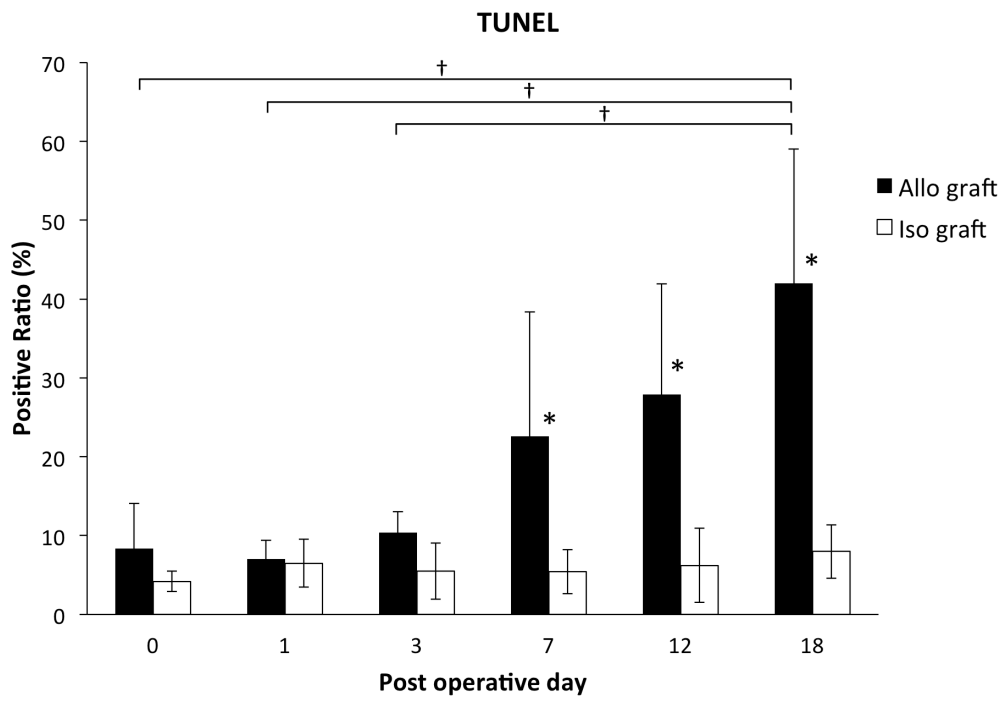


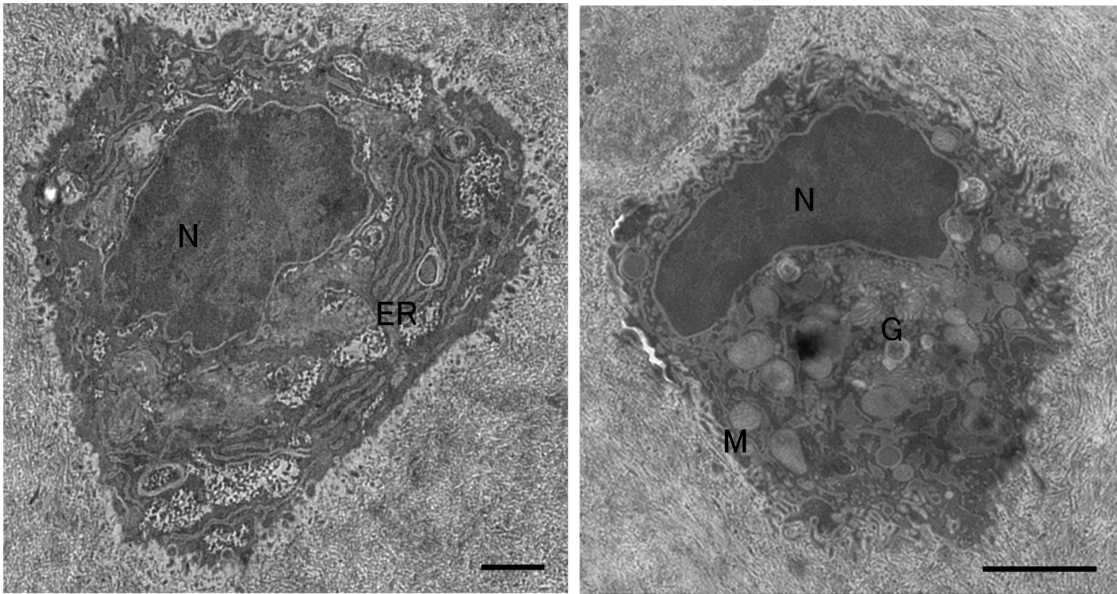


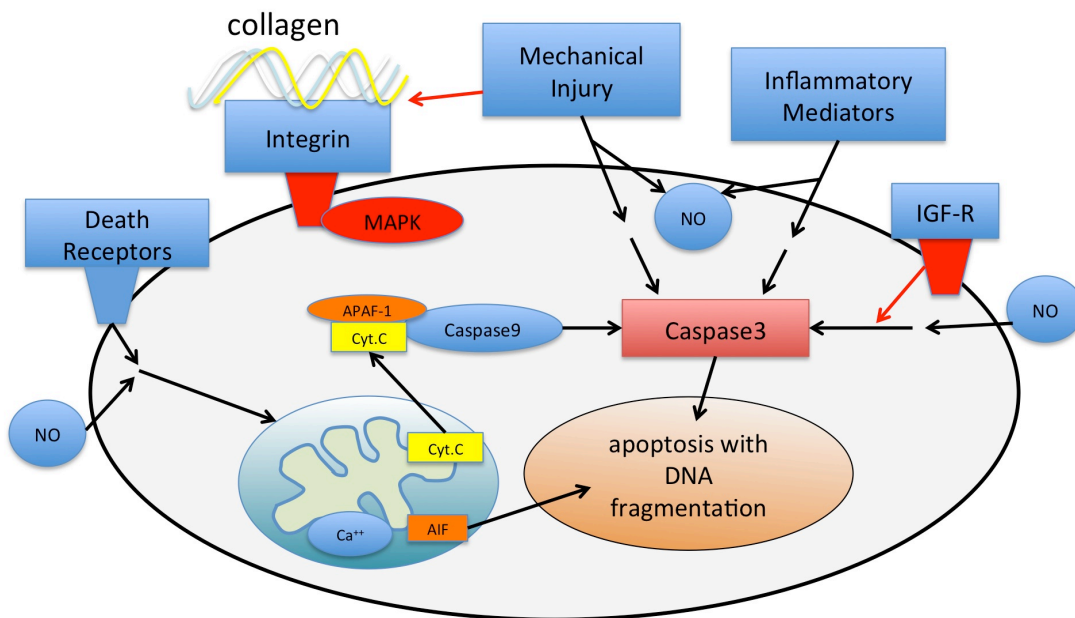
Atlas of ORTHOPAEDIC PATHOLOGY with Clinical and Radiologic Correlations P.G.Bullough 著より引用



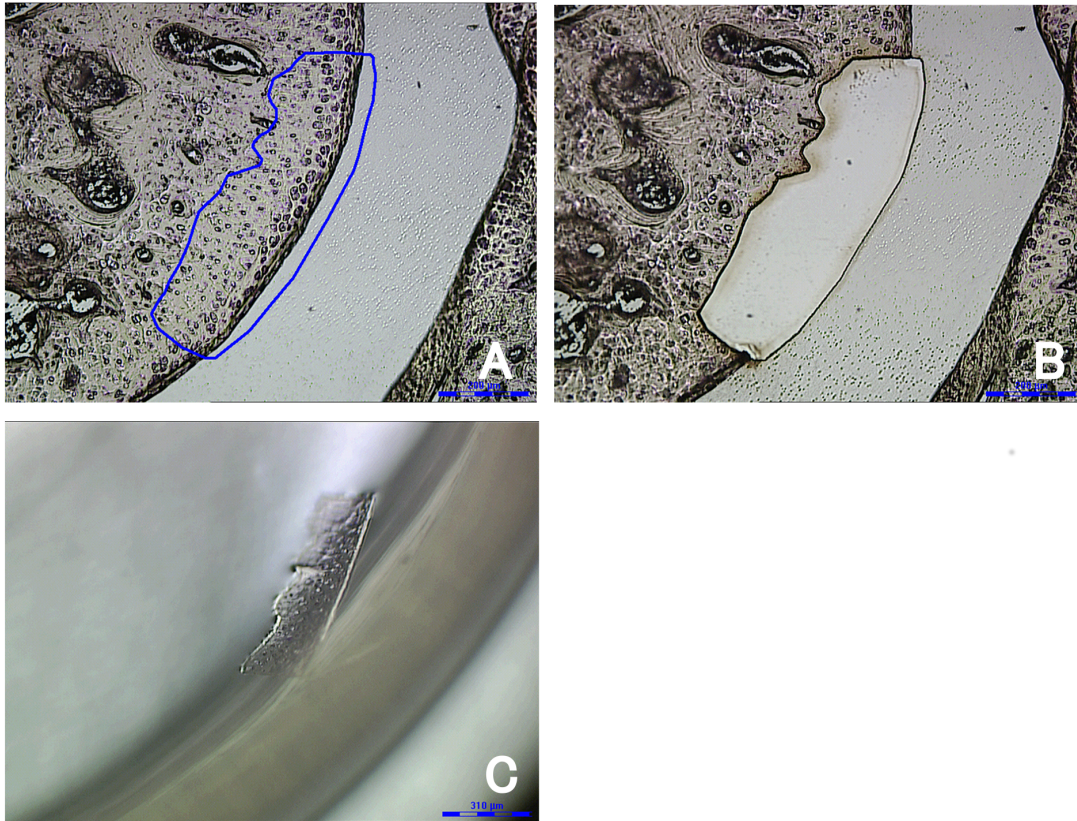








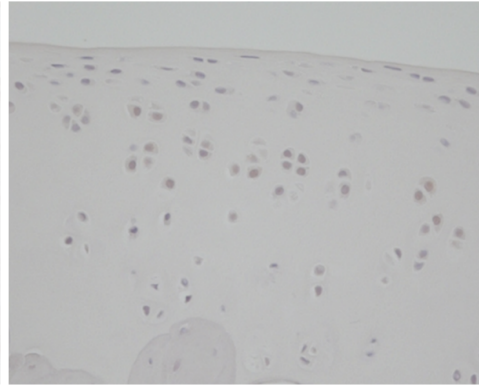
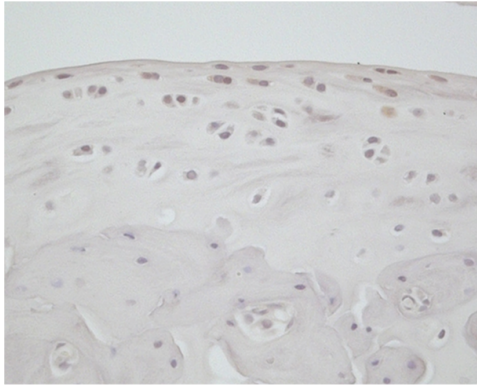
Kim HT, et al :Chondrocyte apoptosis :
Clin Orthop Relat Res. : 2008 Aug;466(8) より引用



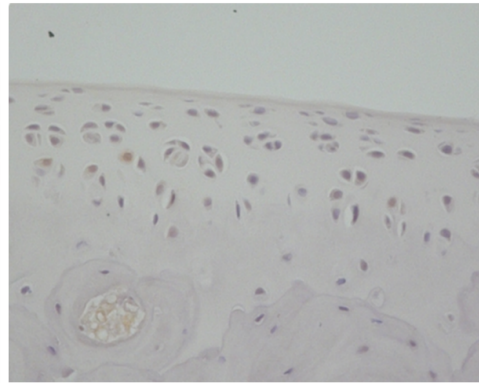
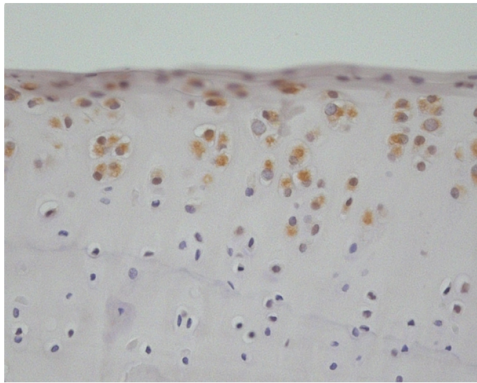
Allo Group

Iso Group

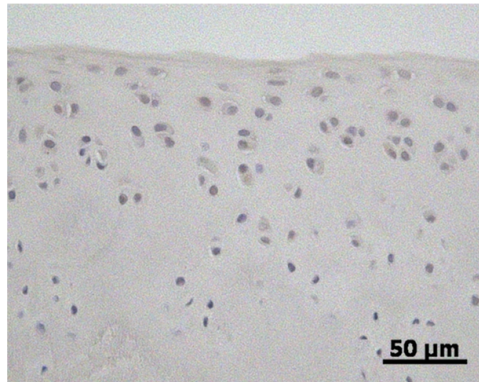
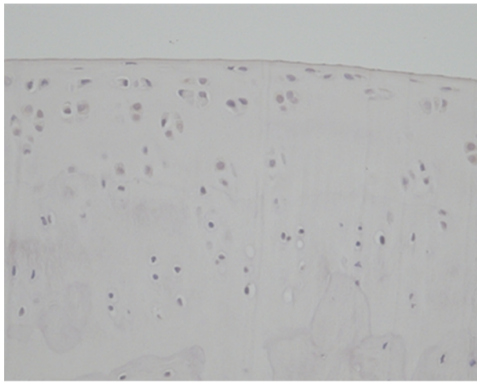
0POD

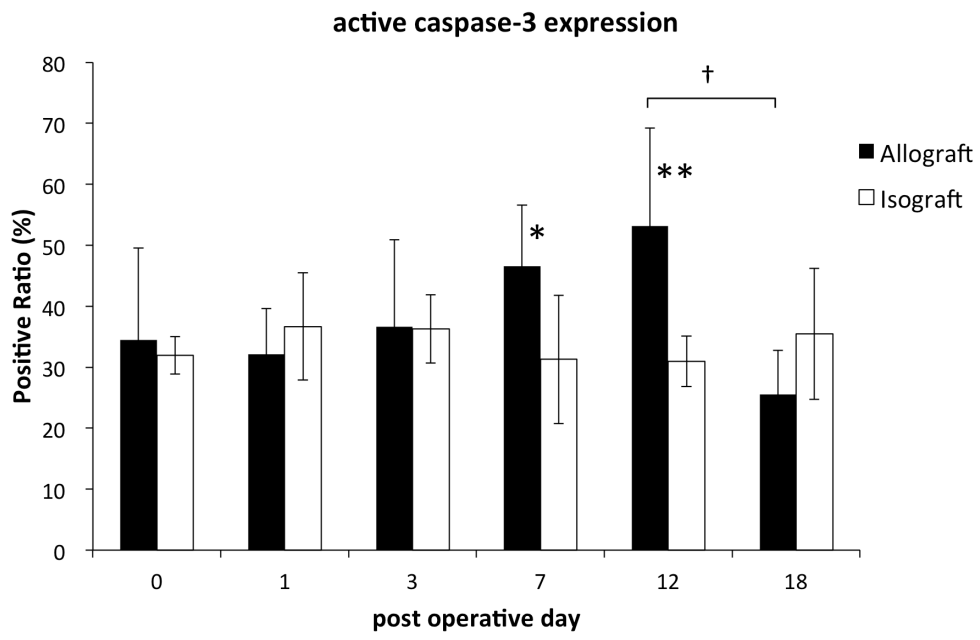


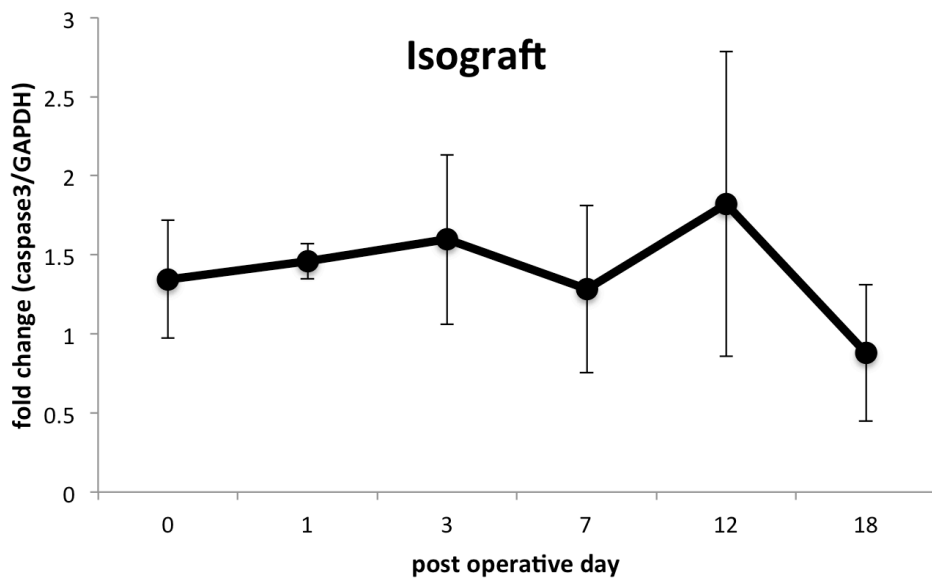
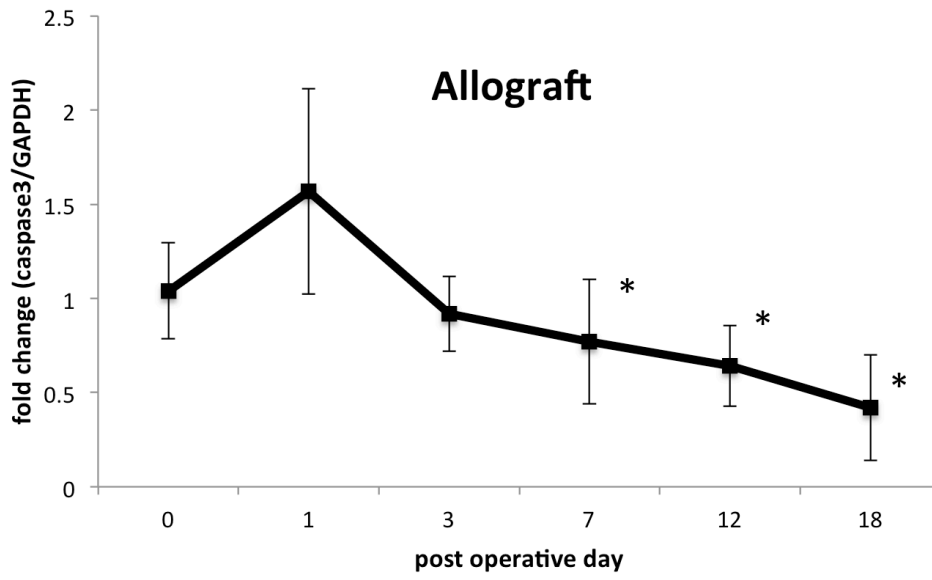
12POD

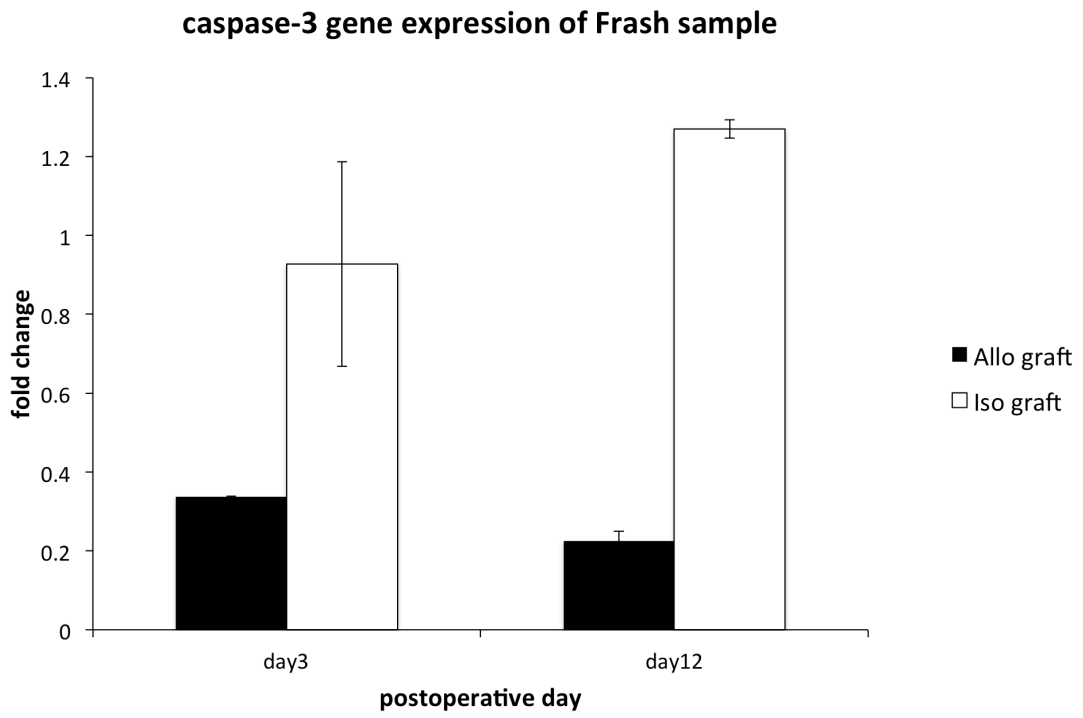


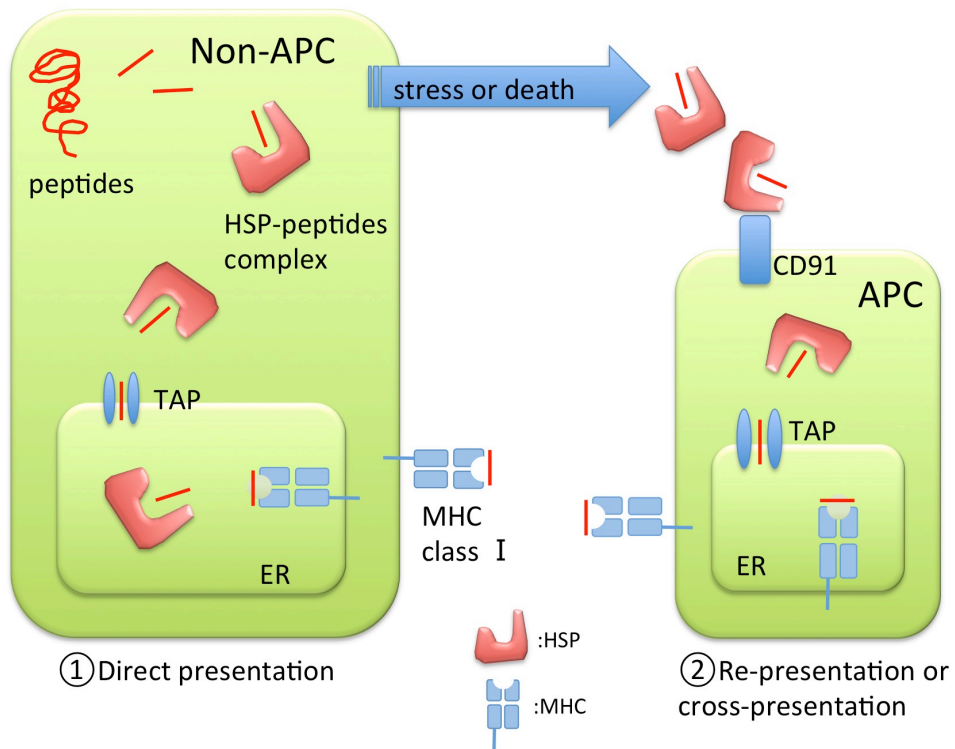
18POD



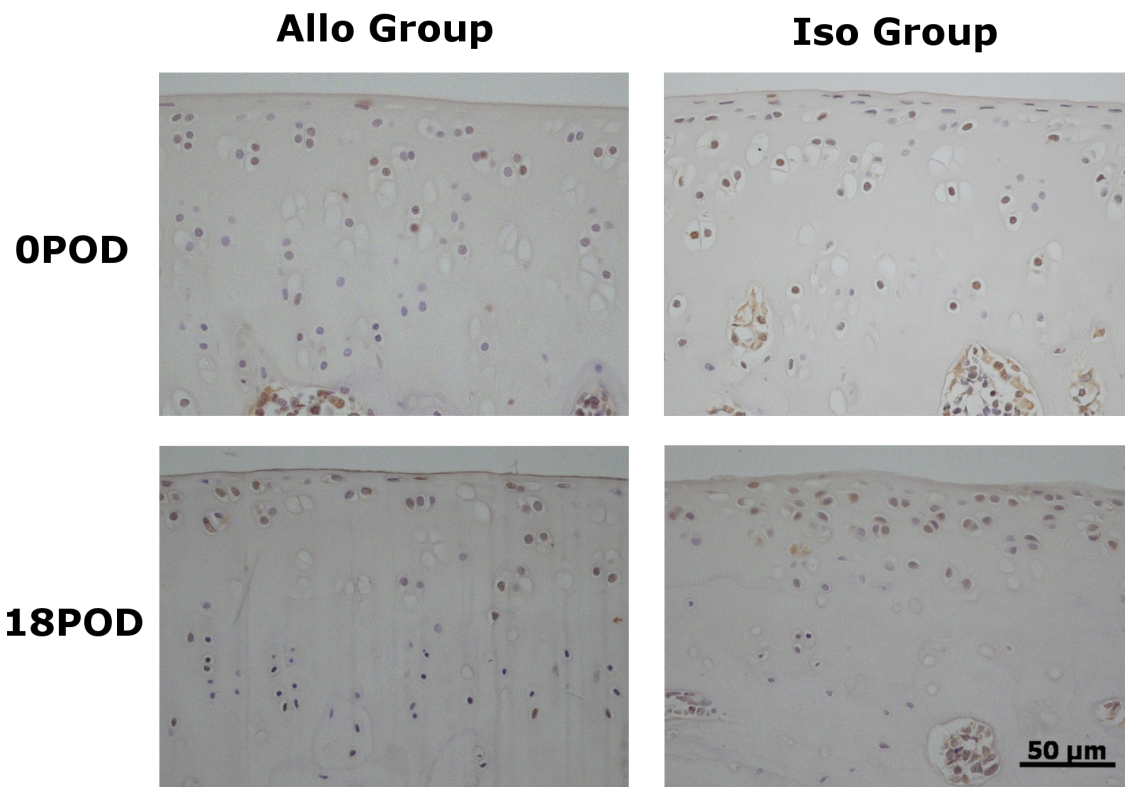


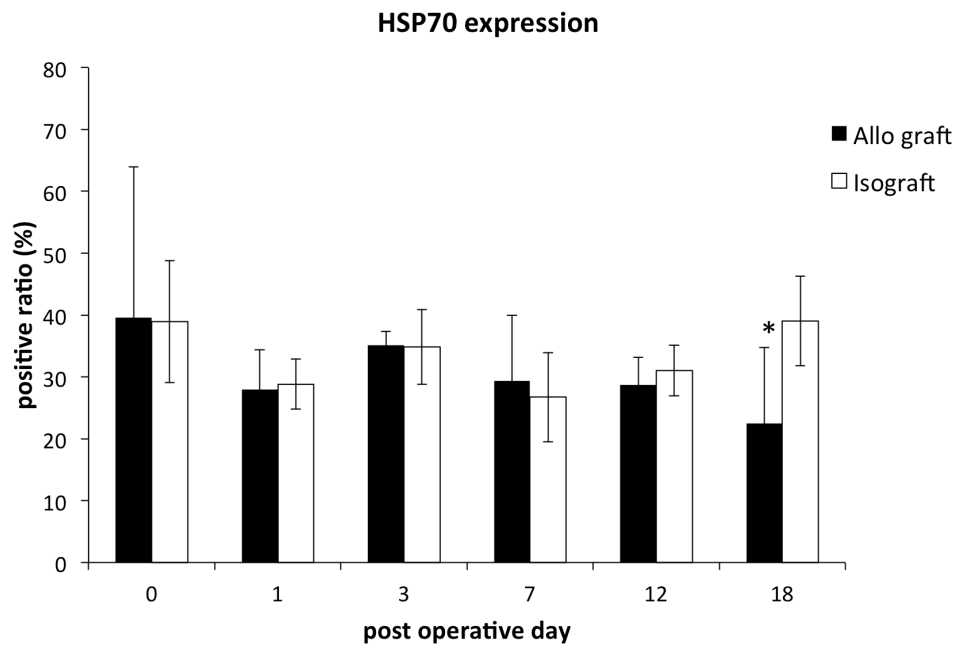


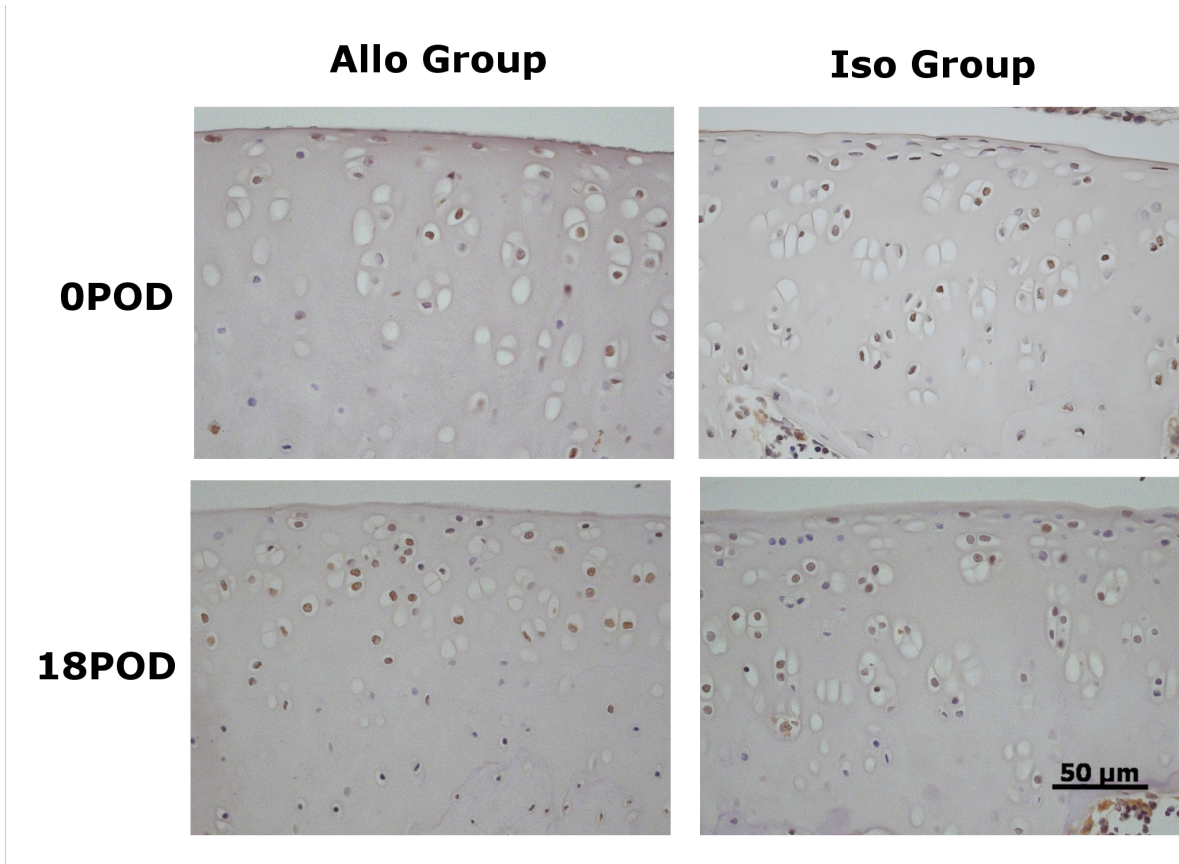


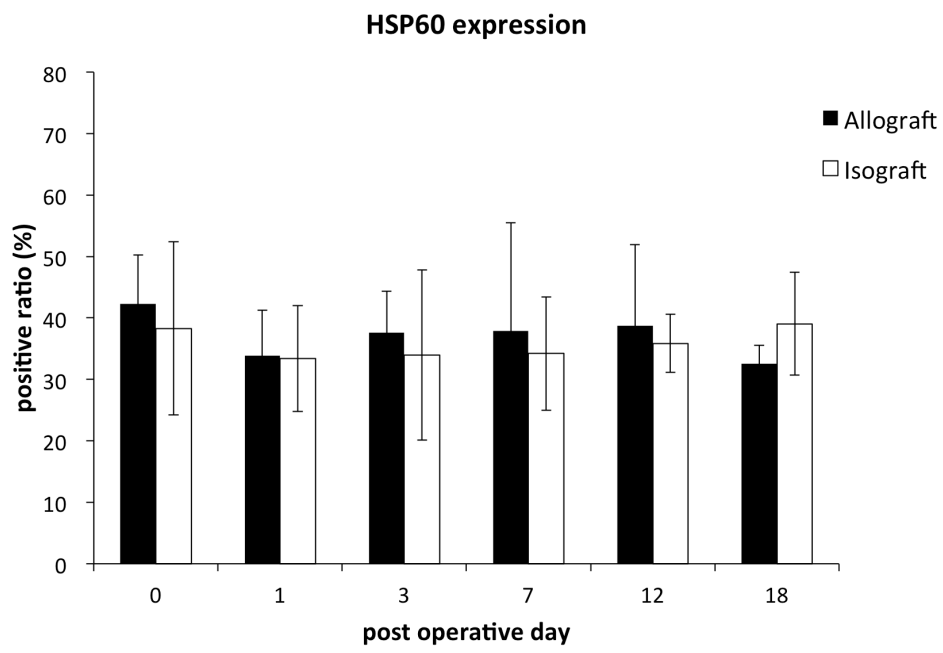


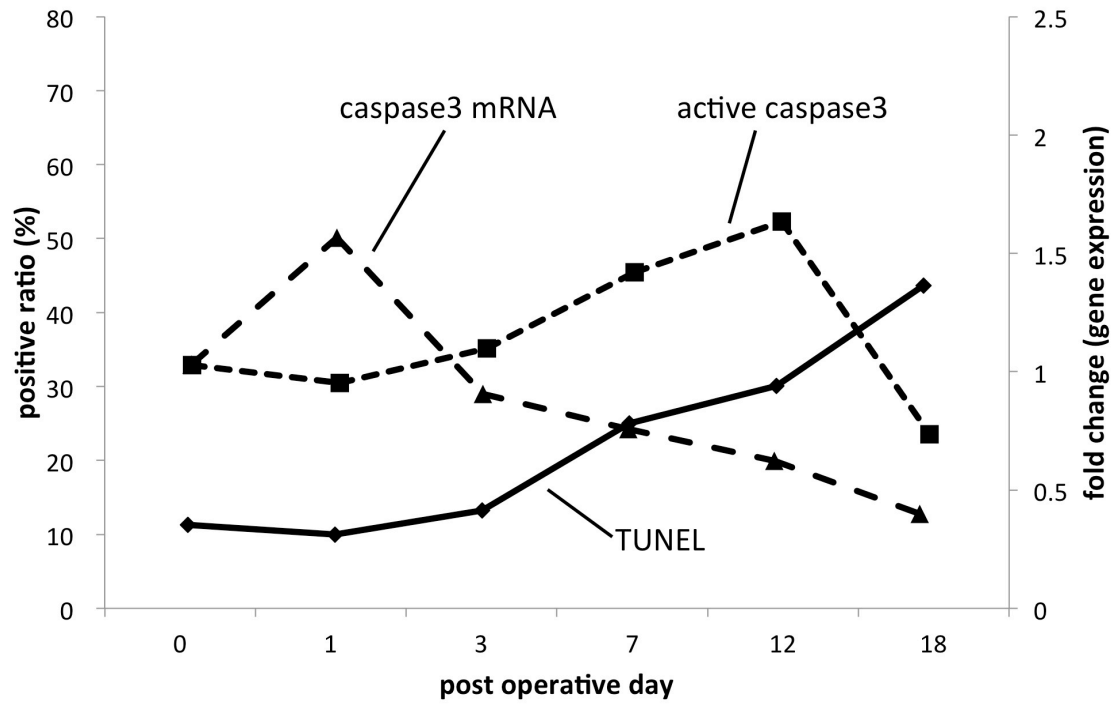
Li Z, Menoret A, and Srivastava P: Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol*, 2002より引用











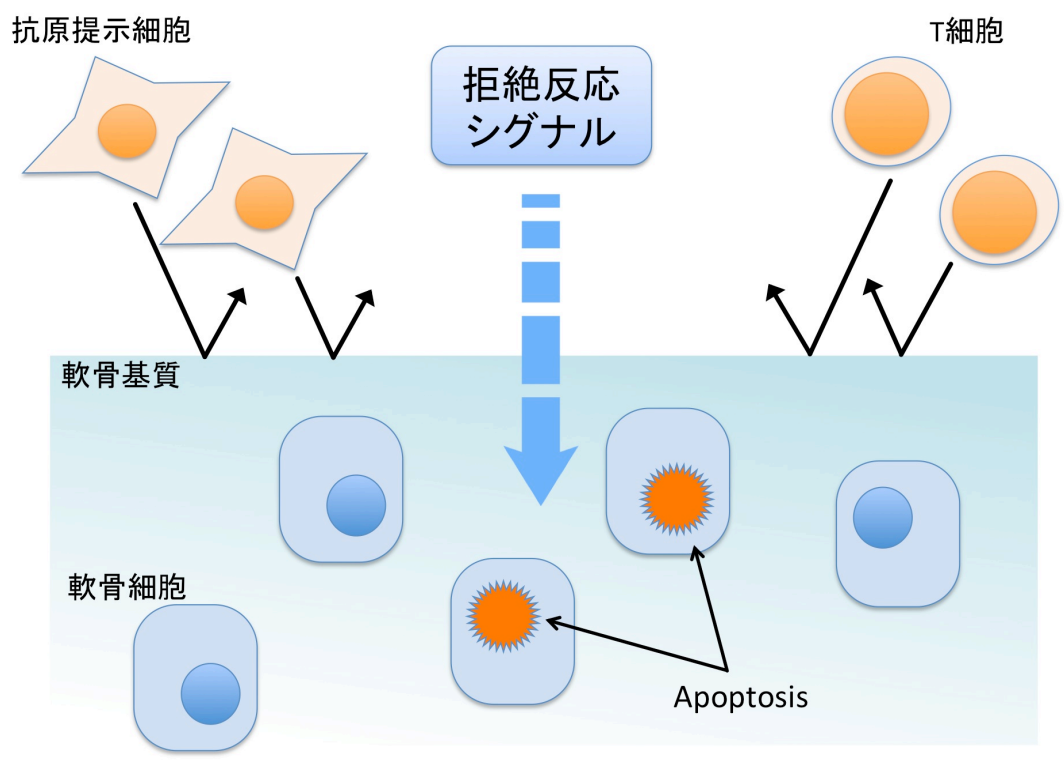


Table 1. Histological Changes of H&E Stain

	post operative day(n=5)					
	0	1	3	7	12	18
degeneration of architecture	-	-	-	-	-	-
cellular infiltration	-	-	-	-	-	-
condense nuclei	-	-	-	-	-	3

表 2

Primer name		Sequense	Size (bp)
caspase-3	sense	CCATGTGTGAACTTGGTTGG	86bp
	anti-sense	AAATGCTGGTGGATCGTAGC	
GAPDH	sense	GCTGGTCATCAACGGGAAA	105bp
	anti-sense	ACGCCAGTAGACTCCACGACA	