

氏 名（本籍） 菅 原 崇 史

学 位 の 種 類 博 士（医 学）

学 位 記 番 号 医 博 第 2 2 0 9 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 7 年 3 月 2 5 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科
（博士課程）医科学専攻

学 位 論 文 題 目 ラット肺移植後虚血再灌流傷害に関与する遺伝子
群の探索と，Heat shock protein 70 の動態，役
割ならびに制御に関する研究

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教 授 近 藤 丘 教 授 佐 々 木 毅

教 授 大 内 憲 明

論文内容要旨

移植成績を左右する肺移植後虚血再灌流傷害の発生機序は複雑多岐であるため、その制御には分子機構の詳細な把握と実効性のある抑制法の開発が重要である。本研究では初めに、ラット同系左肺移植モデルを用いて保存せずに肺移植した群と12時間保存後に肺移植した群の2群を作製し、cDNA マイクロアレイ法を用いて虚血再灌流傷害に関与する遺伝子を探索した。

その結果、12時間保存後移植肺では、無保存移植肺に比較して高度な肺水腫、低酸素血症ならびにアポトーシス細胞の出現を特徴とする虚血再灌流傷害と、探索した1300遺伝子中25遺伝子において有意な発現の差が認められた。すなわち、12時間保存後移植肺では、25遺伝子のうち炎症性サイトカイン Tumor necrosis factor (TNF) と Interleukin 6 (IL-6)、慢性炎症に関与する細胞内シグナル蛋白 Phosphodiesterase 4B (PDE-4B) の遺伝子を含めた9遺伝子の発現が、無保存移植肺に比較して2倍以上高かったのに対し、ストレス応答蛋白 Heat shock protein 70 (Hsp 70) や炎症性サイトカイン Interleukin 10 (IL-10) さらには抗アポトーシス蛋白 inhibitor of apoptosis protein 1 と A20 の遺伝子を含めた16遺伝子の発現が2倍以上低かった。

次に、虚血再灌流傷害の進展には炎症やアポトーシスが深く関与することから、12時間保存後移植肺において遺伝子発現が高かった9遺伝子の中で、炎症促進作用をもつ TNF と IL-6、さらには、遺伝子発現が低かった16遺伝子の中で、抗炎症作用をもつ IL-10 と抗アポトーシス作用をもつ Hsp 70 に着目し、それらの動態を ELISA 法またはウェスタンブロッティング法にて検討した。

その結果、12時間保存後移植肺の TNF、IL-6 の蛋白発現は、無保存移植肺と統計学的に有意な差は認められなかったのに対し、12時間保存後移植肺の IL-10 と Hsp 70 の蛋白発現は、無保存移植肺に比較して有意に低かった。また、この Hsp 70 蛋白発現の低下は、移植前の12時間保存後肺においても認められた。

Hsp 70 は、虚血再灌流ストレスに対する強力な細胞保護作用や抗アポトーシス作用をもつことから、12時間保存後肺におけるこの Hsp 70 蛋白発現の低下が移植後の肺傷害の進展やアポトーシスの招来にどのようにかわるのかについて、従来の熱曝露法や遺伝子導入法とは異なる Hsp 70 誘導法を用いて検討した。

その結果、Hsp 70 誘導剤 Geranyl geranyl acetone (以下、GGA) の経口または灌流液投与は、12時間保存後肺ならびにその移植後肺で認められた Hsp 70 の mRNA や蛋白発現の低下を抑制しただけでなく、移植後の高度な肺水腫と低酸素血症の招来さらにはアポトーシスの発生を軽減したことから、12時間保存後肺でみられた Hsp 70 蛋白発現の低下が肺移植後虚血再灌流傷害やアポトーシスの招来において重要な役割を演じていることが明らかとなった。また、Hsp 70 誘

導剤である GGA は、12 時間保存後移植肺でみられたような虚血再灌流傷害やアポトーシスを軽減または抑制する新しい治療薬の一つになりうる可能性が示唆された。

審査結果の要旨

脳死肺移植後急性期の重篤な合併症の一つである虚血再灌流傷害の進展には、虚血再灌流によって誘発される炎症反応が重要な役割を果たしているが、その詳細は複雑多岐であるため、その制御には分子機構の詳細な把握と実効性のある抑制法の開発が急務と考えられる。本論文は、虚血再灌流によって誘発される炎症反応に関与する遺伝子群を cDNA マイクロアレイ法を用いてスクリーニングすること、また、その中で強力な細胞保護作用や抗アポトーシス作用を有する Heat shock protein 70 (Hsp 70) に注目し、その制御が虚血再灌流傷害の進展を抑制するかどうか検討したものである。

ラット同系同所性左肺移植モデルを用いて保存時間の有無によって非虚血再灌流傷害群と虚血再灌流傷害群を作成し、再灌流 1 時間後に摘出した各移植肺について cDNA マイクロアレイ法を用いてそれらの遺伝子発現を比較検討した。その結果、TNF や IL-6 などの炎症促進に関与する遺伝子の発現が、虚血再灌流傷害群において高く、抗炎症作用や抗アポトーシス作用を有する IL-10 や Hsp 70 の遺伝子発現が低いことが見出された。次に、著者が注目した Hsp 70 については、移植肺における mRNA ならびに蛋白質の発現を定量 RT-PCR 法やウエスタンブロット法にて定量化し、さらには免疫染色法を用いて発現部位を同定化した。その結果、虚血再灌流傷害群では、mRNA 同様、蛋白質のレベルにおいても肺胞隔壁を構築する細胞に於いてその発現が低かった。そこで著者は、この Hsp 70 の発現の低下が肺移植後の虚血再灌流傷害の進展に関わることを裏付けるとともに早期の臨床応用を目指して、Hsp 70 誘導剤 Geranyl geranyl acetone (GGA) を投与した群を作成した。その結果、GGA の経口または経灌流液投与群では、GGA 非投与群で認められた Hsp 70 の蛋白発現の低下ならびに移植後の肺水腫やアポトーシスの発生が抑制された。

以上、本論文は肺移植後虚血再灌流傷害の進展に Hsp 70 が深く関与することを遺伝子群の探索により初めて明らかにしたものであり、さらにその結果をもとに Hsp 70 誘導剤 GGA による虚血再灌流傷害の制御が肺移植モデルにおいて可能であることを実証したものである。この結果は今後の肺移植後成績の向上にきわめてインパクトのあるものであり、学位授与に値する研究成果と思われる。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。