

学位論文の要旨

所 属	三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻 病態解明医学講座 腫瘍集学治療学分野	氏 名	植 村 剛
主論文の題名 Transfection of nuclear factor-kappaB decoy oligodeoxynucleotide protects against ischemia/reperfusion injury in a rat epigastric flap model			
主論文の要旨 【目的】 腫瘍切除後や外傷による組織欠損に対して、皮弁などの組織移植術は患肢機能を温存しうる重要な手技であるが、皮弁壊死は熟練した術者でも生じる深刻な問題である。その原因の一つに皮弁を挙上した際の虚血、血管吻合後の再灌流によるさらなる障害、いわゆる虚血再灌流(I/R)障害が関与しているが、これは遊離皮弁の際、避けることはできない障害である。そのメカニズムは炎症性変化や酸化ストレスなどが複雑に相互作用し壊死に陥るが、一方、その分子レベルでのメカニズムはシンプルで、上流にはNFκBが存在し、NFκBが活性化することにより皮弁壊死に関与する遺伝子を発現する。そこで、本研究ではNFκBの転写活性の抑制にNFκB認識配列を有する合成二重鎖DNA (NFκB decoy oligodeoxynucleotide: NFκB decoy ODN) 用い、皮弁壊死抑制効果を検討した。本研究では①駆血皮弁内への動脈注射によるNFκB decoy ODN導入の検討、②NFκB decoy ODN投与による皮弁の生存率の検討、③NFκB decoy ODN投与による炎症性サイトカイン、酸化ストレスマーカーの組織学的・生化学的検討を行った。 【方法】 9週齢のSDラットで左下腹壁動脈を茎とした10×6cmの拡大鼠径皮弁を用い、茎部を3時間駆血することで、I/R障害による部分壊死モデルを作成した。薬剤は駆血下の皮弁内に右下腹壁動脈より投与した。再灌流後24時間で皮弁近位部の組織を採取し、生存率は5日目で評価した。実験グループはdecoy投与群(D群、5mg/ml、0.39mM、200μl)、コントロールの一重鎖DNA群(S群、10mg/ml、0.78mM、200μl)、薬剤非投与群(N群)の3群間で比較検討した。まずNFκB decoy ODNの導入効率をFITC標識されたdecoyを投与し検討を行った。再灌流後24時間で皮弁の4カ所から組織を採取し、蛍光免疫染色にて評価した。皮弁の生存率は肉眼的所見をデジタル画像で保存し、皮弁全体における生存部の面積を画像解析ソフトにて算出した。組織学的検討では8mmのパンチを用い全層採取した組織をHE染色し、筋損傷率を算出し、1視野あたりの多核白血球数をカウントした。皮筋におけるiNOS発現を免疫組織学的に検討した。炎症性サイトカインであるTNF-α、IL-1β、IL-6をreal time PCRにて評価した。			

【結果】

①FITC標識されたdecoyはすべての部位で確認でき皮弁全体に導入されていた。さらに蛍光二重免疫染色では核内への導入も確認できた。②生存率はD群57.9%で、S群31.1%、N群31.7%と比較して有意に高かった。さらにD群では2例で完全に生着した。また、筋損傷率もD群21.0%、S群46.4%、N群47.3%と有意に抑制された。特にD群においては筋線維の構造も保たれていた。③多核白血球浸潤はD群7.0個、S群14.0個、N群12.4個と有意に抑制された。Real time PCRでは有意差は認めなかったが、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6のいずれにおいてもD群では抑制されている傾向を認めた。iNOS発現はD群7.0%、S群13.0%、N群13.4%と有意に抑制された。

【考察】

NF κ B decoy ODNの問題の一つに標的組織への導入困難が挙げられる。Decoy単体での静脈内投与では速やかに血中から消失したとの報告もあり標的組織または標的細胞への導入が課題である。本研究ではdecoy単体で投与したが、薬剤は皮弁全体に認め、さらに核内にも導入されていることを示した。過去に冠動脈内でカテーテルを用いて、直接血管を圧迫する投与方法で導入が可能であったと報告しており、本研究でも駆血皮弁内への動脈注射が血管内圧を上昇させ、効率的に導入できたと考えられた。動脈内投与は手技も簡便であり臨床応用も可能であると考えた。

5日目の皮弁生存率が有意に改善したことより、NF κ Bの分子レベルでの活性化を抑制することが皮弁壊死に対する新しい治療戦略となり得る可能性が示唆された。これまでにNF κ Bは再灌流後24時間で活性化されることが報告されている。本研究において肉眼的に壊死の認めない再灌流後24時間で、組織学的に有意に損傷が抑制されていたことを示した。本結果より再灌流後早期のNF κ Bの活性化を抑制したことが皮弁壊死を抑制したことが示唆された。

さらに我々はI/R障害早期にNF κ Bが関与する炎症性変化と酸化ストレスについて検証をしたところ再灌流後24時間での炎症細胞浸潤は有意に抑制され、炎症性サイトカインは抑制傾向を認め、さらにはiNOS発現も有意に抑制されたことを示した。以上よりI/R障害による筋損傷が炎症性サイトカインを発現、または活性化させ、炎症細胞浸潤を誘発し、それらがさらなる炎症性サイトカインを産生すると考えられた。またNF κ BとiNOSとの関連も報告されており、NF κ B decoy ODNの投与が直接的、間接的にこれらの経路を阻害することで皮弁壊死進行の抑制を可能にしたと考えた。

【結語】

NF κ B decoy ODNがI/R障害による皮弁壊死進行を抑制することが明らかとなった。今後、再建手術における治療戦略の一つとなる可能性が示唆された。