

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10676

研究課題名(和文) 肺移植におけるドナー肺長時間保存法の確立ーより長時間作動PPCの模索ー

研究課題名(英文) Phosphorylation enhances recombinant heat shock protein 27 performs as pharmacological preconditioning to protect against lung ischemia reperfusion injury.

研究代表者

島本 亮 (SHIMAMOTO, AKIRA)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90324524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】心停止後臓器提供を可能にすべく、ドナー肺長時間保存法を確立する。特に、heat shock proteins(HSPs)を用いた長時間作動のpharmacological preconditioning (PPC)について模索する。【方法】HSP-27を前投与したマウスに肺虚血再灌流を負荷し肺障害及び細胞内シグナル活性を測定した。【結果】HSP-27投与で肺虚血再灌流障害は有意に抑制されたが、NF- $\kappa$ Bの有意な活性化を認めなかった。【考察】HSP-27を用いたPPCが確立された。NF- $\kappa$ Bの関与を必要とせずHSP-27の直接的作用か、間接的なapoptosis抑制作用かが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦で臓器移植法が施行されてから22年が経過し、脳死肺移植も年々増加傾向にあるが、日本独自の社会通念や宗教観に基づく脳死下臓器提供は欧米と比して依然少ない。一方、脳死下臓器提供が一般的な欧米においても、移植医療の普及に伴い、昨今では慢性的なドナー不足が問題となっている。その打開策として心停止後臓器提供(DCD)が挙げられるが、虚血再灌流障害が障壁となり肺では稀である。DCDを可能すべく、長時間作動のpharmacological preconditioningの確立は今後の移植医療のみならず救急領域や周術期臓器保護においても大いに寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Purpose: We hypothesized that exogenous heat shock proteins (HSPs) would provide pharmacological preconditioning (PPC). In the present study, we examined whether phosphorylated recombinant HSP27 (prHSP27), which recombinant HSP27 phosphorylated by MAPKAP kinase 2 in vitro, affected PPC to protect against lung ischemia-reperfusion (I/R) injury (LIRI). Methods: C57BL/6 mice received prHSP27(2.5 g/kg) or vehicle 30 minutes prior to 60 minutes of ischemia of their left lungs, followed by 180 minutes of reperfusion or ischemic preconditioning (IPC) with six cycles of 5 minutes ischemia and 5 minutes reperfusion prior to I/R. Results: Pretreatment of mice with prHSP27 resulted in the development of a significant smaller LIRI when compared with vehicle treated lungs. Conclusions: In this study, we demonstrated that prHSP27 migrates into lung tissue and maintains its activation. It suggests that prHSP27 may be a useful therapeutic agent to protect against LIRI as PPC.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺移植 心停止後臓器提供 薬剤性preconditioning現象 heat shock protein 臓器保存 虚血再灌流障害 細胞内シグナル伝達

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### ①【学術的背景】

1997年10月に臓器移植法が施行されてから18年が経過するが、国内で行われた脳死肺移植は心肺同時移植も含め236例(2014年12月現在)にしか過ぎない。その最大の理由は脳死ドナーの不足である。その背景には日本独自の社会通念や宗教観に基づく脳死下臓器提供(donation after brain death: DBD)にあると考えられている。一方、脳死下臓器提供が一般的な欧米においても、移植医療の普及に伴い、昨今では慢性的なドナー不足が問題となっているが、その打開策として、オランダや英国では心停止後臓器提供(donation after cardiac death: DCD)が導入されつつある。しかし、虚血再灌流障害のリスクの大きい肺ではDCDは非常に稀である。本邦においてもDCDは脳死ドナー不足の解決策の一つとなる可能性は大きく、「臓器灌流培養システム」等の研究が進行している。しかし、心停止直前のドナーに過大な侵襲を加えることのない摘出臓器の長時間保護法の確立(例えば、薬物投与のみ等)、とりわけpharmacological PC(PPC)の確立は今後の移植医療のみならず救急領域や周術期臓器保護の観点からも望まれるところである。

これまで肺虚血再灌流障害(LIRI)の発症機序におけるTLR4関与の解明を試みてきた。まず、TLR4 knock-out(KO)マウスを用いて肺虚血再灌流(LIR)モデル(60分虚血+180分再灌流)を作製したところ、リン酸化JNK、NF- $\kappa$ B、AP-1活性の抑制の結果、有意な肺障害の抑制が認められ、LIRI発症機序におけるTLR4の関与が示唆された(Shimamoto A, et al. Toll-like receptor 4 mediates lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 82:2017-23, 2006)。

次に、TLR4からのシグナル伝達経路として既知のMyD88を經由しNF- $\kappa$ Bに到る経路(MyD88依存経路)に加え、MyD88を經由せずにTRIFを介してNF- $\kappa$ Bに到る経路(MyD88非依存経路)が発見されたこと(Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*;16:3-9,2004)、このシグナル伝達経路の相違がNF- $\kappa$ Bのcytoprotective/cytodestructive作用の振り分けに関与しているのではないかと仮定し、wild type(WT)マウス及びTLR4/MyD88/TRIF各KOマウスを用いて「60分間虚血+180分間再灌流」のLIRモデル、「5分間虚血+5分間再灌流+5分間虚血+5分間再灌流+5分間虚血+30分間再灌流+60分間虚血+180分間再灌流」のischemic preconditioning(IPC)+LIRモデルにて肺障害(PI、MPO活性)及びNF- $\kappa$ B活性を測定した。その結果、I/RモデルではTLR4 KO及びMyD88 KOではWTと比べLIRIは有意に抑制され(PI:  $P<.001$ , MPO活性:  $P<.002$ )、NF- $\kappa$ B活性も有意に抑制された( $P<.001$ )。またIPC+LIRモデルにおいてはWT及びMyD88 KOではLIRIは有意に抑制されるも、TLR4 KO及びTRIF KOではLIRIの抑制を認めなかった。したがって、TLR4を介した細胞内シグナル伝達においてMyD88依存経路がLIRIを、MyD88非依存経路がIPCを誘導することが示された(Shimamoto A, et al. MyD88-independent signaling pathway is involved with lung ischemic preconditioning. *J Heart Lung Transplant* 29(2):S127-8, 2010)。

さらに、臨床的にIPCを利用するために必須な、薬剤にてMyD88非依存経路を選択的に活性化するPPCの可能性を検討した。MyD88非依存経路を選択的に活性化する薬剤として、TLR4 agonistの内、LPS(特に低容量投与)は以前からもPC惹起の可能性が示唆されていた(Merry HE, et al. Lipopolysaccharide pre-conditioning is protective in lung ischemia-reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant* 29(4):471-8, 2010)、我々はLPSの非毒化構造異性体であるDNA adjuvantのmonophosphoryl lipid A(MPL)に着目した(Mata-Haro V, et al. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science* 316(5831):1628-32, 2007)。MPL(500  $\mu$ g/kg)及び生食を前投与したC57BL/6Jマウスに「60分間虚血+180分間再灌流」のLIRを负荷し(投与群/非投与群)、肺障害(PI、MPO活性)及びMyD88/TRIF/NF- $\kappa$ B活性を測定した。対照として「5分間虚血+5分間再灌流+5分間虚血+5分間再灌流+5分間虚血+30分間再灌流+60分間虚血+180分間再灌流」のIPC+LIRモデルを用いた(IPC群)。その結果、MPL投与群では非投与群と比べLIRIは有意に抑制された(PI:  $P<.05$ , MPO活性:  $P<.01$ )。同時にMPL投与群では非投与群と比べLIR负荷直前でTRIF及びNF- $\kappa$ Bの有意な活性化を認めた( $P<.05$ )。これらの結果はIPC群とほぼ同等であり、MPLを用いた選択的MyD88非依存経路の活性化によるPPCの可能性が示唆された(Shimamoto A, et al. Pharmacological preconditioning of lung with monophosphoryl lipid A: A role of MyD88-independent signaling pathway. *J Heart Lung Transplant* 31(4):S84, 2012)。しかし、経時的なTRIF発現はMPL投与後24時間で最高値であり、MPLによるPPCにおいては、その24時間前投与が必要であった(late-phase PC)。我々の以前の検討において、IPCではcytoprotective作用を有するheat shock proteins(e.g. HSP-27, HSP-70)の発現が重要であるが、その分子量の差が生産時間の差を生み、引いては発現時間の相違を生じる、つまりearly-phase PCにはHSP-27が、late-phase PCにはHSP-70が関与することを示唆した(Hampton CR, Shimamoto A, et al. HSP70.1 and -70.3 are required for late-phase protection induced by ischemic preconditioning of mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H866-74, 2003)。

## 2. 研究の目的

DCDを可能にすべく、肺移植におけるドナー肺長時間保存法を確立する。

これまでの研究成果をさらに発展させるべく、IPC及びPPCにおけるHSPs(HSP-27, -70, and -90, etc)の発現を検討する。特に、HSPsはendogenousではなくexogenousで作用発現の報告も散見するので(Kim HP, et al. Heat shock protein-70 mediates the cytoprotective effect of carbon monoxide: involvement of p38 $\beta$  MAPK and heat shock factor-1. *J Immunol* 175:2622-29, 2005)、HSPsを用いたPPCの可能性、さらに分子量の異なるHSPsを複合的に補充することで長時間作用のPPCの可

能性が考えられる。

- (1) IPC/PPC における HSPs の発現を再検討し、発現した HSPs の分子量の相違が異なる PC(early/late phase)を誘導するのかどうかを検討する。
- (2) 各 HSPs を用いて PPC が可能かどうかを、至適投与量や HSPs 誘導転写因子(HSFs)、副作用等にも加味して検討する。
- (3) 分子量の異なる HSPs を複合的に投与し、より長時間作動の PPC の可能性についても模索する。

### 3. 研究の方法

《実験①》C57BL/6J マウスに MPL(500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )を投与の PPC モデルを作製、対照として「5 分間虚血+5 分間再灌流+5 分間虚血+5 分間再灌流+5 分間虚血+30 分間再灌流」の IPC モデルを作製し、経時的に①HSPs(HSP-27, -70)の測定(Western-blot 法)、②MyD88/TRIF/NF- $\kappa\text{B}$  活性の測定(EMSA 法及び Western-blot 法)を行い、各 HSPs の発現を経時的かつ定量的に(最大値と最大時を)検討する。

《実験②》《実験①》で各 HSPs の発現量が最大となった時間に「60 分間虚血+180 分間再灌流」の LIR を負荷する PPC+LIR モデル及び IPC+LIR モデルをそれぞれ作製し、①肺障害の測定(permeability index[PI]、肺胞洗浄液[BALF]中の細胞数、MPO 活性)、②MAPKs(p38, JNK, ERK)活性の測定(Western-blot 法)、③転写因子(NF- $\kappa\text{B}$ , AP-1)活性の測定(EMSA 法)、④炎症性メディエーター(cytokine, chemokine, 接着分子等)発現の測定(BALF にて ELISA 法)、⑤アポトーシス及び関連タンパク質/遺伝子(caspase3, Akt/PI3K 等)発現の測定(TUNEL 染色法、Western-blot 法、酵素活性法、及び RT-PCR 法)を行い、「PC が作動しているかどうか」、「発現した HSPs の分子量の相違が異なる PC(early/late phase)を誘導するのかどうか」を、TLR4 以下の細胞内シグナル伝達機構、転写因子、及び mRNA 発現と共に系統的に評価する。

《実験③》《実験①》で得られた各 HSPs の発現量に基づき、C57BL/6J マウスに複数濃度の各 HSPs を exogenous に投与し、再度経時的に①HSPs の測定、②HSFs の測定、③MyD88/TRIF/NF- $\kappa\text{B}$  活性の測定を行い、各 HSPs を用いた PPC の「至適投与量の確定」を評価する。加えて犠牲死したマウスを病理解剖し、副作用等についても検討を加える。

《実験④》C57BL/6J マウスに各 HSPs (至適投与量は《実験③》で確定)を前投与し、LIR モデル、対照として IPC+LIR モデルを作製し、①肺障害の測定、②MAPKs 活性の測定、③転写因子活性の測定、④炎症性メディエーター発現の測定、⑤アポトーシス及び関連タンパク質/遺伝子発現の測定を行い、「HSPs を用いた PPC が作動しているのかどうか」を、TLR4 以下の細胞内シグナル伝達機構、転写因子、及び mRNA 発現と共に系統的に評価する。

《実験⑤》C57BL/6J マウスに各 HSPs (至適投与量は《実験③》で確定)を複数同時に前投与し、LIR モデル、対照として IPC+LIR モデルを作製し、①肺障害の測定、②MAPKs 活性の測定、③転写因子活性の測定、④炎症性メディエーター発現の測定、⑤アポトーシス及び関連タンパク質/遺伝子発現の測定を行い、「より長時間の PPC 作動しているのかどうか」を、TLR4 以下の細胞内シグナル伝達機構、転写因子、及び mRNA 発現と共に系統的に評価する。

#### (1) マウス LIR モデル

7~14 週齢、20~25g の雄 C57BL/6J マウスを全身麻酔(ペントバルビツール 100mg/kg、腹腔内投与)・人工呼吸器管理下(1 回換気量=0.75mL、分時換気回数=120 回/分、酸素濃度=60%)に第 5 肋間開胸、ヘパリン(5 単位)投与後 5 分に気管支、動脈、静脈を含む左の肺門部を、脳動脈瘤用血管クリップにて tightening & releasing することで血流遮断・遮断解除を行い LIR 及び IPC モデルを作製する。

#### (2) permeability index(PI)

虚血再灌流に伴う肺血管内皮障害の指標として肺血管透過性を PI として測定する。再灌流 5 分前にラジオアイソトープ( $^{125}\text{I}$ )で指標した 1%ウシ胎児血清(50 $\mu\text{L}$ )を静脈内投与し、再灌流 180 分に両肺の放射線量を測定、同時に下大静脈より 1mL 静脈血を採取し放射線量を測定し、以下の計算式にて PI を算出する。

$$\text{PI} = \frac{\text{左肺の放射線量(cpm)}}{\text{静脈血(1mL)中の放射線量(cpm)}}$$

#### (3) 気管支肺胞洗浄

右主気管支を遮断(結紮)後、左主気管支に挿管チューブ先端を留置し、生理食塩水 300 $\mu\text{L}$ にて左肺を洗浄、回収液を BALF とする。BALF は 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1500 g、8 分間の冷却遠心にて細胞成分及び上清を分離し、細胞成分は視算分類、上清は炎症性メディエーターの定量測定に用いる。炎症性メディエーターの定量測定は 96 穴プレートを用いたサンドイッチ ELISA 法を用いる。

#### (4) MPO 活性の測定

摘出肺の一部を hexadecyltrimethylammonium bromide を含む組織破砕液にてホモゲナイズし、上清に o-dianisidine dihydrochloride を含む基質液を加え吸光度( $\Delta\text{OD}_{460 \text{ nm}}$ /分)を測定する。

- (5) MAPKs 活性、TLR4 及びその修飾蛋白発現、及び HSPs 発現の測定  
摘出肺の一部を脱リン酸化保護成分を含んだ組織破砕液にてホモゲナイズし、細胞質タンパク質を抽出する。抽出した細胞質タンパク質 20 $\mu$ g を 15%SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、PVDF 膜に転写する。この膜にリン酸化・非リン酸化特異抗体を用いて免疫反応を行う。免疫反応は化学発光にて濃度計測(NIH Image 1.62)を行い、活性化(リン酸化)MAPKs と総 MAPKs との比率にて示す(Western-blot 法)。
- (6) HSFs を含む転写因子活性の測定  
摘出肺の一部をホモゲナイズし、核酸タンパク質を抽出する。抽出した核タンパク質 10 $\mu$ g を  $^{32}$ P で標識した NF- $\kappa$ B、AP-1、さらに各 HSFs と相補的な 2 本鎖オリゴヌクレオチド(5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3'及び 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGAA-3')を反応させる。6%変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、濃度計測は NIH Image 1.62 にて活性を測定する(EMSA 法)。
- (7) アポトーシス及び関連タンパク質/遺伝子発現の測定  
摘出肺の一部から組織切片を作製し、TUNEL 染色を施行。顕微鏡下に核が濃染したものを TUNEL 陽性細胞とし、全細胞数における陽性細胞数を測定する。また、アポトーシス関連タンパク質/遺伝子(caspase3、Akt/PI3K 等)は、caspase3、Akt/PI3K は前述の Western-blot 法にて、またその他測定項目によっては酵素活性法や RT-PCR 法を用いて測定する。

#### 4. 研究成果

##### 《実験①》及び《実験②》

MPL 及び生食を前投与した C57BL/6J マウスに 24 時間後「60 分間虚血+180 分間再灌流」の肺虚血再灌流障害(LIRI)を負荷し(投与群/非投与群)、肺障害(permeability index、肺胞洗浄液中の細胞数、MPO 活性)に加え、MyD88/TRIF/NF- $\kappa$ B 活性及び HSP-27/-70 発現を評価した。対照として「5 分間虚血+5 分間再灌流+5 分間虚血+5 分間再灌流+5 分間虚血+30 分間再灌流+60 分間虚血+180 分間再灌流」の IPC+LIRI モデルを用いた(IPC 群)。その結果、MPL 投与群では非投与群と比べ LIRI は有意に抑制された。これらの結果は IPC 群とほぼ同等であった。また、MPL 投与群及び IPC 群では非投与群と比較し LIRI 直前で TRIF/NF- $\kappa$ B の有意な活性化を認めた。さらに、LIRI 直前において MPL 投与群で HSP-70、IPC 群で HSP-27 の有意な発現を認めた。以上より、HSP-27 は early phase PC に、HSP-70 は late phase PC に関与することが示唆された。

##### 《実験③》及び《実験④》

C57BL/6J マウスに複数濃度(0-10mg/kg)の recombinant mouse HSP-27/HSP-70 を経静脈的に投与し、再度経時的に①HSP-27/HSP-70 の測定、②MyD88/TRIF/NF- $\kappa$ B 活性の測定を行い、HSP-27 及び HSP-70 を用いた PPC の「至適投与量の確定」を評価した。加えて犠牲死したマウスを病理解剖し、副作用等についても検討を加えた。その結果、当初至適投与量は HSP-27 で 2.5mg/kg、HSP-70 で 5mg/kg を想定していたが、検討した全ての濃度において肺組織レベルでの HSP-27/HSP-70 及び MyD88/TRIF/NF- $\kappa$ B 活性の変化を認めなかった。経過中に死亡したマウスは認めず、また犠牲死したマウスの剖検所見で異常を認めなかった。以上より、マウス体内で、投与した recombinant mouse HSP-27/HSP-70 が全く作用していない可能性を認めた。その原因として①recombinant mouse HSP-27/HSP-70 の調整に問題があった(調整段階で失活等)、②投与量の不足、③経静脈的投与では組織移行困難、等が挙げられた。

そこで、予め MAPKAP kinase-2 でリン酸化を誘導した rHSP27/rHSP70(prHSP27/prHSP70)を精製・調整し経静脈的投与したところマウスへの組織移行が確認された。

引き続き、prHSP-27(2.5mg/kg)及び生食を前投与した C57BL/6J マウスに 30 分後「60 分間虚血+180 分間再灌流」の肺虚血再灌流(I/R)を負荷し(投与群/非投与群)、肺虚血再灌流障害(LIRI; permeability index、肺胞洗浄液中の細胞数、MPO 活性)に加え MyD88/TRIF/NF- $\kappa$ B 活性及び HSP-27 発現を評価した。対照として「5 分間虚血+5 分間再灌流+5 分間虚血+5 分間再灌流+5 分間虚血+30 分間再灌流+60 分間虚血+180 分間再灌流」の ischemic PC(IPC)+I/R モデルを用いた(IPC 群)。その結果、prHSP-27 投与群では非投与群と比べ LIRI は有意に抑制された。これらの結果は IPC 群とほぼ同等であった。また、prHSP-27 投与群では I/R 直前に HSP-27 の有意な発現を認めるも MyD88/TRIF/NF- $\kappa$ B の有意な活性化を認めなかった。以上より、HSP-27 を用いた PPC が確立された。HSP-27 は予め *in vivo* でのリン酸化誘導が必要であった。細胞保護作用において NF- $\kappa$ B の関与を必須とせず HSP-27 による直接的作用か、間接的な apoptosis 抑制作用かのいずれかの可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimamoto A., Matsuo E., Kaneda S., Ito A., Takao M.	4. 巻 39
2. 論文標題 Phosphorylation Enhances Recombinant Heat Shock Protein 27 Performs as Pharmacological Preconditioning to Protect against Lung Ischemia Reperfusion Injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Heart and Lung Transplantation	6. 最初と最後の頁 S475 ~ S475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.healun.2020.01.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 A. Shimamoto, M. Takao, H. Shimpo	4. 巻 35
2. 論文標題 Role of Heat Shock Proteins in Pharmacological Preconditioning for Lung Ischemia Reperfusion Injury	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 The Journal of Heart and Lung Transplantation	6. 最初と最後の頁 S185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2016.01.515">http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2016.01.515</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akira Shimamoto
2. 発表標題 Role of heat shock proteins in pharmacological preconditioning for lung ischemia reperfusion injury.
3. 学会等名 The 36th Annual Meeting and Scientific Sessions of the ISHLT (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 島本 亮
2. 発表標題 肺虚血再灌流障害における内皮細胞機能に及ぼす微小環境の力学的性質の影響に関する研究
3. 学会等名 第72回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	松尾 映里 (Matsuo Eri)  (40751665)	三重大学・医学系研究科・特定事業技術補佐員  (14101)	
連携研究者	富田 雅之 (Tomita Masayuki)  (90774860)	三重大学・医学部附属病院・臨床工学技士  (14101)	
連携研究者	後藤 健宏 (Goto Takehiro)  (80774877)	三重大学・医学部附属病院・臨床工学技士  (14101)	
連携研究者	真栄城 亮 (MAESHIRO RYO)  (90647124)	三重大学・医学系研究科・助教  (14101)	