

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10528

研究課題名(和文) 肺移植後虚血・再灌流肺障害とNrf2 高危険ドナー肺抽出と介入法開発を目指して

研究課題名(英文) Nrf2 plays a role in ischemia-reperfusion lung injury after lung transplantation

研究代表者

星川 康 (Hoshikawa, Yasushi)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：90333814

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)：Nrf2 は多くの抗酸化酵素を活性化する重要な転写因子である。ラット同系左片肺移植モデルを用いて、肺移植後早期死亡原因として最多の虚血・再灌流肺障害におけるNrf2の役割を検討した。グラフト肺におけるNrf2欠損は、肺移植後の肺組織Nrf2 標的遺伝子発現低下、炎症性サイトカイン遺伝子発現亢進、肺胞壁構成細胞のアポトーシスを惹起し、肺障害からの回復を遅らせること、レシピエントラットに対するNrf2活性化剤の前投与は、グラフト肺組織中Nrf2 標的遺伝子発現亢進、血中抗酸化力上昇、肺胞壁構成細胞のアポトーシス抑制を招来させ、肺障害からの回復を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

強力な抗酸化ストレス転写因子Nrf2は、呼吸器領域においては癌化や慢性閉塞性肺疾患、急性肺障害に関する研究が進んでおり、さらに我々の先行研究において肺高血圧病態や肺移植動物モデルでの虚血・再灌流肺障害における役割の一端を明らかにした。

本研究では、グラフト肺組織におけるNrf2欠損が、肺移植後早期死因として重要な虚血・再灌流肺障害からの回復の遅れを招来し、薬剤を用いたNrf2活性化が回復を促進させることを明らかにした。肺移植後急性期成績を改善させる新たな戦略を提示した。

研究成果の概要(英文)：Nrf2 is a key transcription factor that activates many antioxidant enzymes. Overproduction of oxidative stress in the lung grafts is thought to be responsible for ischemia-reperfusion lung injury, the most major cause of early death after lung transplantation. We tested the role of Nrf2 in ischemia-reperfusion injury after lung transplantation by utilizing orthotopic rat left lung transplantation model. Nrf2 knockout in the lung grafts caused down-regulated Nrf2 target genes, up-regulated proinflammatory cytokine genes, enhanced apoptosis of alveolar wall cells in the graft lungs, and delayed recovery from ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. Pre-treatment of recipient rats with a Nrf2 activator induced up-regulated Nrf2 target genes in the grafts, augmented blood biological antioxidant potential, reduced apoptosis of alveolar wall cells, and enhanced recovery from ischemia-reperfusion injury after lung transplantation.

研究分野：呼吸器外科学、肺移植

キーワード：Nrf2欠損ラット Nrf2標的遺伝子 炎症性サイトカイン遺伝子 アポトーシス Nrf2活性化剤 血中抗酸化力

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺移植は、終末期肺疾患に対する有効な治療法として確立されているが、術後 30 日以内死亡率は欧米では 10%、本邦では 4%にのぼる。その原因として最も多いのが虚血・再灌流肺障害に基づくグラフト機能不全である。この病態は非特異的肺胞障害、肺水腫、低酸素血症を特徴とするが、近年の肺保存・手術・術後管理技術の進歩によっても回避できていない。その重症度は、胸部 X 線上淡い浸潤影のみを呈するものから acute respiratory distress syndrome (ARDS) に至るものまで多岐にわたる。重症の虚血・再灌流肺障害は急性期死因として重要であるばかりか、慢性拒絶反応のリスク増大をきたす。従って、その病態生理を解明し予防法・治療法を確立することは急務とされる。

一般に ARDS は強い治療抵抗性を示すが、その基礎疾患の中で虚血・再灌流肺障害は前処置が可能な数少ないものの一つである。すなわち冷却保存及び再灌流中の肺組織における種々の変化の注意深い観察とこれに基づいた戦略により、虚血・再灌流肺障害の回避あるいは重症度軽減が可能と考えられる。肺移植後グラフト機能不全は、ドナーが脳死に至る過程で招来されるサイトカインストーム、長期人工呼吸管理による圧障害や無気肺、痰貯留や不顕性誤嚥による肺炎などにより肺障害が潜在する状況で、数時間の虚血とひきつづく再灌流(低酸素・再酸素化、冷却・再加温)がなされるために、種々のサイトカイン、好中球エラストラーゼや活性酸素種が大量に産生され、極めて程度の強い肺障害、肺水腫が惹起されて発症すると考えられている。とりわけ活性酸素種の大量産生は本病態の主因の 1 つと考えられてきたが、現行の肺移植における虚血・再灌流肺障害予防策の中に直接的に活性酸素種を制御するものは使用されていない。

Nrf2 は抗酸化剤応答配列に結合して生体防御酵素、抗酸化酵素遺伝子群の発現を広範にかつ強力に誘導することにより酸化ストレスに対抗する転写因子である (図 1)。

申請者らは、低酸素曝露ラット肺 (Hoshikawa Y, J Appl physiol. 2001) やマウス肺 (Eba S, Hoshikawa Y, AJRCMB 2013) に酸化ストレスが蓄積していることを明らかにしたが、同時に、通常は酸化ストレスにより誘導される Nrf2 標的遺伝子 NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) や glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) 発現がむしろ低酸素曝露マウス肺で低下していることを示した。ヒト肺においても通常肺血管壁で強発現している NQO1 や GCLC が、酸化ストレスが蓄積しているはずの慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者肺血管でほとんどみられないことを示し、低酸素やタバコ煙曝露といった特殊なストレス下では肺における Nrf2 システム機能不全とでもいふべき事象が惹起される可能性を示した (Eba S, Hoshikawa Y, AJRCMB 2013)。一方、ヒト Nrf2 遺伝子の調節領域には 3 つの single nucleotide polymorphism (SNP) と 1 つの triplet repeat polymorphism が報告されており (Yamamoto T, BBRC 2004)、このうち-617C>A SNP は、著明な Nrf2 タンパクの発現レベル低下をきたし、急性肺障害の有意な危険因子となることが明らかにされている (Marzec JM, FASEB J 2007)。

以上のことから、虚血再灌流により強い酸化ストレスが惹起される移植肺においても Nrf2 システムの機能不全が招来されており、あるいは Nrf2 調節領域の SNP により Nrf2 発現量が著明に低下しており、これらが重症の虚血・再灌流肺障害の危険因子となるとの仮説を立てた。さらに薬物による Nrf2 活性化あるいは Nrf2 発現低下を補うような強力な抗酸化剤投与により虚血・再灌流肺障害を抑制することができると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、強力な抗酸化転写因子 Nrf2のドナー肺における発現低下（欠損）が、肺移植後虚血・再灌流肺障害発症の危険因子であることを明らかにし、ドナー肺への新たな介入法を開発しようとするものである。以下の課題を明らかにする。

(1) Nrf2活性のない *Nrf2*欠損ラットドナー肺は野生型ラットドナー肺より重症の肺移植後虚血再灌流障害を発症するのか？

(2) レシピエントラットへのNrf2活性化剤前投与により肺移植後虚血再灌流障害は予防できるのか？

3 . 研究の方法

(1)Nrf2 ヘテロ (wild-type, WT/+1) ラット(F344/NSlc background) を自家繁殖させた。ラット同系左片肺移植モデルにおいて、同腹兄弟の *Nrf2* 欠損 (knockout, KO) ラット (1+1+) と野生型 (wild-type, WT) ラット (WT/WT) をドナー、WT ラットをレシピエントとして左肺移植を行った(ドナー肺は low-potassium dextran glucose solution で灌流後、6時間冷保存)、再灌流 2 時間および 24 時間後のグラフト肺 wet to dry weight ratio (W/D)、コンプライアンス、肺酸素化 (PaO₂/FiO₂ ratio [P/F ratio]、alveolar-arterial oxygen gradient [AaDO₂]) 評価、肺の病理組織学的解析、肺組織 Nrf2 標的遺伝子 (NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 [NQO1]、glutamate-cysteine ligase modifier subunit [GCLM]、hemeoxygenase-1 [HO-1]) と proinflammatory cytokine (interleukin-6 [IL-6]、interleukin-1β [IL-1β]、tumor necrosis factor α [TNFα]) 遺伝子の発現解析を行った。

(2) WT F344/NSlc ラットをドナー、レシピエントとして、レシピエントラットに肺移植術 6 時間前に oltipraz (500mg/kg) あるいは vehicle を胃内投与して左肺移植を行い、上記 (1) と同様の解析を行った。加えて、下大静脈より採取した血液サンプルを用いて血中抗酸化力 (biological antioxidant potential : BAP) と血中酸化度 (reactive oxygen metabolites-derived compounds : dROMs) を測定した。

4 . 研究成果

(1) *Nrf2* KO ラットをドナーとして左片肺移植した群 (KO 群) と WT ラットをドナーとした群 (WT 群) と比較した結果、KO 群では WT 群に比し、移植 2 時間後の移植肺コンプライアンスは有意に不良となり、PaO₂/FiO₂ ratio (P/F ratio)、alveolar-arterial oxygen gradient (AaDO₂) も不良となる傾向があった。移植 24 時間後には、WT 群におけるグラフト肺 wet to dry weight ratio (W/D)、肺コンプライアンス、P/F ratio、AaDO₂ は改善傾向を示すものの、KO 群では改善が遅れる傾向があり、W/D、肺コンプライアンス、P/F ratio、AaDO₂ はいずれも WT 群に比し KO 群で有意に不良であった。肺移植 2 時間後のグラフト肺の病理組織学的所見 (肺胞壁肥厚、出血、肺水腫、好中球浸潤、perivascular cuffing) は *Nrf2* KO により明らかな影響を受けなかったが、移植 24 時間後までのそれらの回復は WT 群に比し KO 群で遅れ、肺水腫および好中球浸潤は、WT 群に比し KO 群で有意にその程度が強いことが確認された。*Nrf2* KO は、肺移植 24 時間後の肺組織 Nrf2 標的遺伝子 NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) 発現を有意に低下させ、肺移植 2 時間後の proinflammatory cytokine (interleukin-6 [IL-6]、interleukin-1β [IL-1β]、tumor necrosis factor α [TNFα]) 遺伝子と 24 時間後の TNFα 遺伝子発現を有意に亢進させ、肺胞壁アポトーシス細胞割合を増加させたが、酸化ストレス蓄積には影響を及ぼさないことを明らかにした。

(2) レシピエントラットへの oltipraz 前投与 (移植 6 時間前 500mg/kg 胃内投与) は、肺移植 2 時間後の WT グラフト肺組織中炎症性サイトカイン遺伝子、interleukin-6 (IL-6)、interleukin-1 β (IL-1 β) 発現亢進を抑制する傾向を示し、肺移植 24 時間後の Nrf2 核染色陽性肺胞壁構成細胞割合 (Nrf2 活性化による Nrf2 タンパクの核移行の 1 指標) を上昇させる傾向を示し、グラフト肺組織中 Nrf2 標的遺伝子、NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1)、glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM)、hemeoxygenase-1 (HO-1) の有意な発現亢進を招来させた。また、8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 免疫染色で評価した肺胞壁酸化ストレス蓄積を軽減させる傾向を示し、肺胞壁における TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 陽性アポトーシス細胞割合を減少させた。グラフトの肺水腫の指標である wet to dry weight ratio (W/D)、病理組織学的所見には明らかな効果を及ぼさなかったが、移植 24 時間後の肺酸素化の指標である P/F ratio、AaDO₂ を有意に改善させ、肺コンプライアンスを改善させる傾向を示した。

移植 2 および 24 時間後に下大静脈より採取した血液サンプルを用いて血中抗酸化力 (biological antioxidant potential : BAP) と血中酸化度 (reactive oxygen metabolites-derived compounds : dROMs) を測定した結果、oltipraz 前投与は、移植 2 時間後の血中抗酸化力、酸化度には影響を及ぼさないが、移植 24 時間後の血中抗酸化力を上昇させ、酸化度を低下させることを明らかにした。

以上より、Nrf2 活性化剤 oltipraz のレシピエントラットに対する前投与により、肺移植後 2 時間の呼吸不全の重症度は改善されないが、24 時間後には、グラフト肺 Nrf2 標的遺伝子発現亢進、血中抗酸化度上昇、血中酸化度低下、肺胞壁構成細胞のアポトーシス抑制が招来され、肺酸素化が改善されることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 星川 康	4. 巻 24(2)
2. 論文標題 肺移植後虚血・再灌流肺障害予防戦略における抗酸化転写因子Nrf2の役割の解明	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Organ Biology	6. 最初と最後の頁 147-150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.11378/organbio.24.147	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 星川 康、芳川豊史
2. 発表標題 拡大基準ドナーに関するコンセンサス 肺
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Togo, Y. Hoshikawa, M. Noda, H. Yabuki, H. Mitomo, T. Watanabe, J. Funahashi, Y. Okada
2. 発表標題 Nrf2 Promotes Recovery From Ischemia-Reperfusion Injury After Lung Transplantation
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東郷 威男、星川 康、田口 恵子、矢吹 皓、三友 英紀、渡邊 龍秋、松田 安史、大石 久、佐渡 哲、野田 雅史、舟橋 淳一、山本 雅之、岡田 克典
2. 発表標題 肺移植後虚血再灌流肺障害におけるNrf2活性化の効果
3. 学会等名 第54回日本移植学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 郷威男、星川康、田口恵子、矢吹皓、三友英紀、渡邊龍秋、野田雅史、松田安史、大石久、佐渡哲、船橋淳一、山本雅之、岡田克典
2. 発表標題 肺移植後虚血再灌流肺障害における抗酸化ストレス転写因子Nrf2の役割の検討
3. 学会等名 第34回日本肺および心肺移植研究会
4. 発表年 2018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
研究分担者	須田 隆 (Suda Takashi) (00340232)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
研究分担者	松田 安史 (Matsuda Yasushi) (00455833)	藤田医科大学・医学部・准教授 (33916)	
研究分担者	栃井 大輔 (Tochii Daisuke) (10793416)	藤田医科大学・医学部・助教 (33916)	
研究分担者	栃井 祥子 (Tochii Sachiko) (50793428)	藤田医科大学・医学部・講師 (33916)	
研究分担者	千田 雅之 (Chida Masayuki) (70333812)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	野田 雅史 (Noda Masafumi) (70400356)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究 分担者	岡田 克典 (Okada Yoshinori) (90323104)	東北大学・加齢医学研究所・教授 (11301)	
研究 協力者	東郷 威男 (Togo Takeo)	東北大学・加齢医学研究所	