

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790931

研究課題名 (和文) 再生医療的アプローチによる肺移植後虚血再還流障害の予防

研究課題名 (英文) Prevention of ischemia-reperfusion injury after lung transplant by approach of regenerative medicine

研究代表者

金田 浩由紀 (KANEDA HIROYUKI)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：20411522

研究成果の概要：肺移植後の虚血再還流障害のメカニズムを解明するために、ラットを用いて虚血再還流障害での肺の変化を検討した。より簡便で確実な方法として肺動静脈クランプ法を確立した。虚血時間と再還流後の時間を変化させた群を作成し、虚血再還流では、虚血後の時間経過と共にアポトーシスがより多く誘導されることが明らかとなった。マーカーを用いて幹細胞様細胞の免疫組織学的検索を行ったが、アポトーシス誘導との相関は明らかでなかった。より特異的なマーカーの検討が必要である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	800,000	0	800,000
平成20年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	240,000	1,840,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：移植外科学

## 1. 研究開始当初の背景

肺移植は現在、終末期肺疾患に対する有効な治療方法として世界的に確立されてきている。しかし、移植後早期に見られる急性肺障害は、虚血再還流障害によると考えられているが、約10%に認められる重篤な移植片不全を一旦きたすと、回復は困難であり、致死

的である。臓器移植後の虚血再還流障害は、現在まで発生機序が明らかでなく、臨床的要因からは予測困難であるとの報告がされてきた。われわれの研究では、肺移植片の移植前の状態が、移植後の移植片の虚血再還流障害にかかわっていることが、サイトカインの測定により明らかとなった (Kaneda H. Am J Transplant. 2006)。しかし、そのメカニズ

ムに関しては依然不明である。

臓器移植において、移植片の虚血再還流により細胞のアポトーシスが誘導され、移植片不全との関連が示唆されてきた。肺移植においては移植片中の最大 30%の肺胞上皮細胞が虚血再還流後にアポトーシスとなり、肺移植片の機能と相関している (Fisher S. Ann Thorac Surg. 2000)。アポトーシスの機能的役割は、移植後の虚血再還流障害、拒絶反応と係わると推測されるが、依然明らかではない。従来、アポトーシスはネクローシスに比較し、炎症を惹起しないことから化学伝達物質を放出しないと考えられていたが、最近ではアポトーシスを起こした細胞がその除去過程において自己の食食を惹起する細胞誘導物質を放出することが明らかになってきた (Lauber K. Cell. 2003)。これは、その後のさらなる細胞の遊走を示唆するものと考えられる。

一方、骨髄中の幹細胞が、肺を含む様々な臓器に分化、増殖することが示されてきている (Krause. Cell. 2001)。また、臓器移植後の患者の血液中にドナーの細胞が存在する血液キメラを形成し、これが移植片の免疫学的寛容の機序に関与すると報告されてきた。逆にドナー移植片の組織中にレシピエントの細胞が見られる組織キメラの現象が認識され、最近多く報告されてきた。レシピエント由来の組織幹細胞または造血幹細胞が移植片の障害部位へ遊走し分化、増殖すること (Quaini F. N Engl J Med. 2002)、さらにこれが移植片の拒絶反応と関係することが示唆されてきている (Wu GD. Transplantation. 2003)。しかし、こういう多分化能を持つ幹細胞がどのように誘導され、どのように移動するのかについては未だ全く分かっていない。

そこで、われわれは移植片中のアポトーシスに陥った細胞が何らかの誘導物質を放出し、これによりドナー由来骨髄幹細胞が誘導、遊走され、これが虚血再還流障害に関わると仮定した。組織幹細胞が誘導され、移植片中の障害部位に生着し、その後の更なる移植片障害を促進すると仮説している。

## 2. 研究の目的

本研究では、臓器移植時の虚血再還流障害が、移植片に再還流後に見られるアポトーシスを誘導された細胞がさらに誘導物質を放出することにより幹細胞が誘導、遊走され移植片を障害すると仮説し、これを証明することにより虚血再還流障害の発症メカニズムの解明を目指した。

最終的には、移植後虚血再還流障害に対して、その発症メカニズムを解明し、その発症

予防を目的とする。移植医療ではドナー不足は深刻な問題であり、得られるドナー臓器を少しでも有効利用する医療とする為には早期に見られる移植片不全を予防し、再びドナーを必要とする状況を回避することは重要なことである。

## 3. 研究の方法

(平成 19 年度)

肺虚血還流の動物実験モデルとしてラット肺移植モデルの作成を行ったが、肺移植術中の肺動脈、肺静脈の縫合はカフ法を用いても確実ではなく、不確実性が実験結果に影響を与えることを危惧した。動物実験モデルのより簡便で確実な方法として LEW ラットを用いた肺動静脈クランプ法を確立した。これではラットを左開胸し、肺門部を剥離後に肺動脈、肺静脈をそれぞれマイクロクリップを用いて別々にクランプした。

実験では LEW ラットを用いて 4 群に分け以下のプロトコールとした。

実験(1) : 1 時間虚血後に再還流しその後 30 分で犠牲死させ肺標本を採取

実験(2) : 1 時間虚血後に再還流しその後 1 時間で犠牲死させ肺標本を採取

実験(3) : 1 時間虚血後に再還流しその後 2 時間で犠牲死させ肺標本を採取

実験(4) : 1 時間虚血後に再還流しその後 24 時間で犠牲死させ肺標本を採取

摘出肺標本に TUNEL 染色を行い、1000 視野中のアポトーシスを起した細胞の割合を観察した。染色結果と再還流時間との関係を検討した。

(平成 20 年度)

前年度に確立した、肺動静脈クランプ法による肺虚血モデルを用いた。1 時間虚血後に再還流しその後 1 時間で犠牲死させ肺標本を採取、1 時間虚血後に再還流しその後 2 時間で犠牲死させ肺標本を採取、1 時間虚血後に再還流しその後 24 時間で犠牲死させ肺標本を採取、の 3 群で比較した。

摘出肺標本中のアポトーシスが誘導された細胞の頻度を TUNEL 染色により評価した。また、Annexin I の発現を real-time PCR にて評価した。

幹細胞様細胞の摘出肺標本中の割合を評価するため免疫組織学的検索を行った。マーカーとして c-kit、SP-C、CCA を用いて染色した。

実験途中で、研究結果より特異的な呼吸器の組織幹細胞とそのマーカーを検索する必要がある。この目的に気管切離後の人工気管移植による組織再生を観察すべくモデルを作成した。気管支・肺胞の障害後の再生能

力の評価を行う必要があると考えた。人工気管として、polyglycolic acid (PGA)によるシートを用いて筒状に自作したものを気管と置換し、その再生を観察した。それぞれの群の切除した気管に合わせた長さを作成し、ラット気管と端端吻合し、移植を行った。

LEW ラットまたはSD ラットを用いて、気管軟骨の(1)3 リング切除、(2)2 リング切除、の2群にて検討を行った。

#### 4. 研究成果

動物実験モデルのより簡便で確実な方法としてLEW ラットを用いた肺動静脈クランプ法を確立した。

In vivo で虚血再還流を行った肺を摘出して、摘出肺標本にTUNEL染色を行い、1000視野中のアポトーシスを起した細胞の割合 (Labeling index) を観察した。方法で記載した群では、最終的な結果 (平均 Labeling index) は、(1) : 1.45%、(2) : 1.7%、(3) : 2.85%、(4) : 13.5%であった。

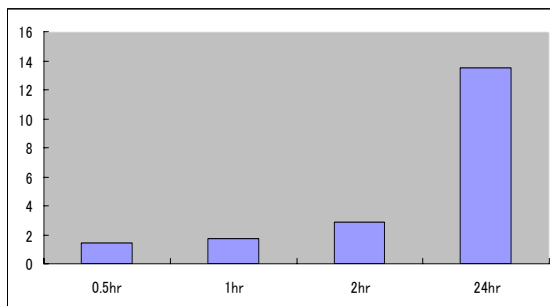


表1 1時間虚血再還流後0.5時間、1時間、2時間、24時間での平均Labeling index

代表的な免疫組織染色像を示す。

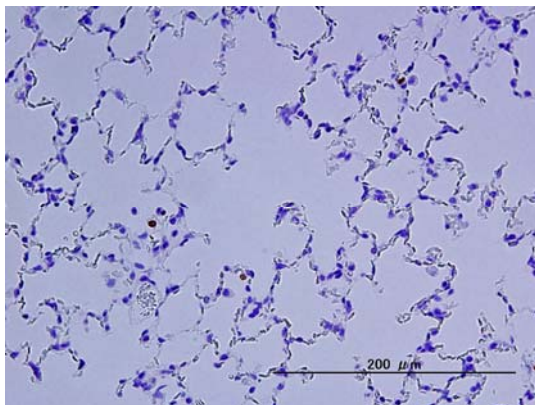


図1 実験(3) : 1時間虚血後に再還流しその後2時間で犠牲死させ肺標本を採取

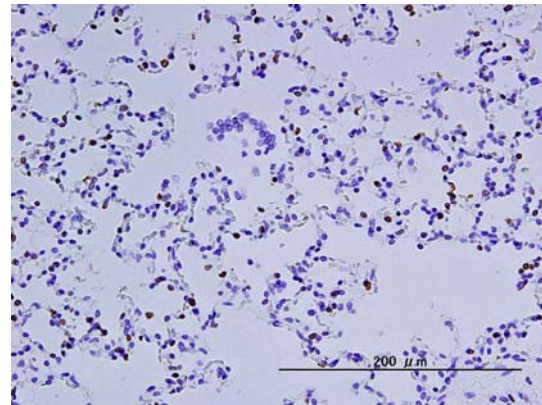


図2 実験(4) : 1時間虚血後に再還流しその後24時間で犠牲死させ肺標本を採取 : TUNEL染色された細胞がアポトーシスが誘導されていることを示す。

以上の検討では、虚血再還流による肺障害によりアポトーシスが誘導され、表1で示されるように、その細胞数は虚血後の時間経過と共に増加することが分かった。

また、Annexin Iの発現をreal-time PCRにて評価した。しかし、発現量と再還流からの時間経過に相関を認めなかった。この結果の方法論的な原因として、至適なPCRが行えなかった可能性が考えられ、今後の検討を要した。

虚血再還流障害により、骨髄幹細胞が誘導されると仮説し、その検討を行うため幹細胞様細胞の摘出肺標本中の割合を評価した。このため免疫組織学的検索を行った。マーカーとしてc-kit、SP-C、CCAを用いて染色した。

検討したマーカーでは細胞数と再還流後時間との相関を認めなかった。これは、組織幹細胞を特異的に染色できていない可能性があった。その後の予備実験の追加では、予想された肺障害の再生、修復に関しての所見は十分には得られず、再還流からの時間やTUNEL染色結果との明らかな相関関係は得られなかった。

より特異的な呼吸器の組織幹細胞とそのマーカーを検索する必要がある。この目的のために気管切離後の人工気管移植による組織再生を観察すべくモデルを作成する予備的な実験を追加した。

LEW ラットまたはSD ラットを用いて、気管軟骨の(1)3 リング切除、(2)2 リング切除、の2群にて検討した。(1)3 リング切除群では、

全例翌日までに死亡した。このモデルでは長期に生存させ、気管再生を観察することは困難であった。(2)2リング切除群では、平均10日の生存であった。しかし、このモデルでも、移植された人工気管での再生された細胞やそのマーカーを観察し、検討するには不十分であった。ラットに移植された生体吸収性の人工気管は、生体吸収される過程でラットの自己の気管組織に置換されることが予想されたが、このモデルの確立にはその他の補助的な方法が必要であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0件)

[学会発表] (計 0件)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金田 浩由紀 (KANEDA HIROYUKI)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：20411522

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし