

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03744

研究課題名(和文) 高齢ドナーからの肺移植成績は何故不良なのか—機序の解明と治療介入戦略の確立

研究課題名(英文) Why is prognosis of lung transplant recipient from elderly donors poor? Elucidation of mechanisms and establishment of therapeutic intervention strategy-

研究代表者

岡田 克典 (Okada, Yoshinori)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：90323104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺移植においてドナー不足は大きな問題であり、高齢者ドナーからの肺の使用はこの解決策の一つである。しかし、65歳以上のドナーからの肺移植成績は不良である。高齢者ドナーからの肺移植片の移植後早期の分子発現を調べるために、若年および高齢マウスの左肺に1時間の虚血とその後の再灌流の負荷を与えた。再灌流後1時間、1日、3日目に左肺を採取し、湿乾重量比測定、組織学的解析、RNAシーケンスを含む分子生物学的解析を行なった。高齢マウスにおける肺水腫は、若年マウスよりも高度であった。高齢マウス肺では若年マウス肺に比べて炎症に関連する遺伝子の発現亢進と細胞修復に関連する遺伝子の発現低下が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、高齢肺では若年肺に比べて虚血・再灌流負荷に伴う肺水腫が高度になることが明らかになり、これには炎症の重症化と細胞修復の遅延が関与している可能性が明らかになった。このことは、高齢ドナーからの肺移植をより安全にするためには、炎症を抑制するための介入、さらに細胞修復を促進するための介入が有効であることを示唆している。今後、このような介入の効果を検討していくことで、高齢ドナー肺を用いた移植成績の向上が期待でき、これによって高齢ドナー肺を現在よりも積極的に移植に用いることができるようになるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Donor shortage is a major problem in lung transplantation (LTx) and the use of lungs from elderly donors is one of the possible solutions in a rapidly aging population. However, the utilization of organs from donors > 65 years has remains infrequent and may be related to poor outcome. To investigate the molecular events in grafts from elderly donors early after LTx, the left lung of young and old mice was subjected to 1 hour of ischemia and subsequent reperfusion. The left lung was collected at 1 hour, 1 day, and 3 days after reperfusion and submitted to wet to dry weight ratio measurement, histological analysis, and molecular biological analysis including RNA-sequence. The lung in old mice exhibited more severe and prolonged pulmonary edema than in young mice after ischemia-reperfusion, which was accompanied by upregulation of the genes associated with inflammation and impaired expression of genes related to cell repair.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺移植 虚血・再灌流傷害 高齢ドナー RNAシーケンス 肺水腫

1. 研究開始当初の背景

世界および本邦における肺移植実施数は年々増加傾向にあるが、肺移植希望者数に対して臓器提供数が相対的に少ないこと、すなわちドナー不足が大きな問題となっている。脳死下の臓器提供数が世界各国に比べ少ない本邦においてはこの問題は特に深刻である。

欧米では、55歳以上のドナーは、いわゆる extended criteria donor とされ、移植に用いない施設が多いが、ドナー不足を背景に高齢ドナー肺を用いる割合は次第に増加している。しかし、これまでの検討では、高齢ドナーから提供を受けた肺移植レシピエントの生存率は不良であるとの報告が多い。2000年からの10年間に UNOS database に登録された10666件の肺移植例の解析で、提供された肺のドナーの年齢層が高齢になる程レシピエントの生存率は低下し、65歳以上のドナーから肺を提供されたレシピエントの術後1年および3年死亡のオッズ比は、それぞれ2.8、2.4となることが報告された (GJ, et al. J Heart Lung Transplant. 2013; 32: 760-8.)。本邦の検討でも、50歳以上のドナーから肺の提供を受けたレシピエントでは、49歳以下のドナーからの提供と比べ有意に生存率が低いことが示されている (公益社団法人日本臓器移植ネットワーク 臓器提供・移植データブック 2017)。

これらの報告から、高齢ドナーから提供を受けた肺移植レシピエントにおいては、若年ドナーからの提供と比べて生存率は低くなり、その原因として高齢肺では虚血・再灌流ストレスへの耐性が低下している、またはこれらのストレスによって生じた組織傷害からの回復機能が低下していることが推測される。しかし、このような問題を加齢生物学的な観点から捉え、高齢肺で移植後に特徴的に生ずる分子生物学的動態を検討した報告はほとんどなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高齢ドナーから提供された肺が、虚血・再灌流ストレスにさらされた際に発現が亢進または減弱する分子をスクリーニングし、高齢肺に特徴的な分子生物学的動態を明らかにすることである。この目的のために、マウス虚血・再灌流傷害モデルを用いて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 動物モデル

雄性 C57BL/6J マウスを人工呼吸器に接続後、左開胸して左肺動脈、左肺静脈および左主気管支を60分遮断し、虚血・再灌流傷害を誘発した。マウスを再灌流後1時間、1日、3日、28日で犠牲死せしめ、左肺を摘出し、以下の検索を行った。実験群として、生後8~12週のマウス (幼若群)、22~24ヶ月マウス (老年群) を設けた。

(2) 虚血・再灌流傷害の評価

虚血・再灌流に伴う急性期 (1時間、1日、3日) 肺傷害を評価するために、肺湿乾重量比を計測した。また、組織学的に、肺胞内浮腫、血管周囲浮腫について病理学的なスコアリングを行った。肺胞内浮腫の程度は、病理切片における所見の割合により0-4の5段階にスコア化した (0 = 所見なし、1 = 1-25%に所見あり、2 = 26-50%に所見あり、3 = 51-75%に所見あり、4 = 76-100%に所見あり)。血管周囲浮腫の評価には、肺動脈と血管周囲浮腫の面積の比 (edema ratio) を測定した。肺動脈は面積が大きいものから順に3-5つ選択し、面積比の平均値を算出した。病理組織は病理医を含む3名で観察し、各群 N = 6 で評価した。

(3) 虚血・再灌流傷害に伴う分子発現の網羅的解析

摘出した左肺を RNA-sequence 解析へ供した。若年マウス肺と高齢マウス肺とで虚血・再灌流後に発現が大きく異なる分子を選択し、RT-qPCR ならびにイムノブロット解析で、mRNA と蛋白の発現状況を確認した。

4. 研究成果

(1) 虚血・再灌流後の肺水腫の生理学的・組織学的評価

肺水腫の生理学的評価として湿乾重量比を検討した。若年マウスと比較して高齢マウスでは虚血・再灌流1時間後の湿乾重量比が有意に高かった。若年マウスは1日後には湿乾重量比が sham と同じレベルまで低下している一方で、高齢マウスでは湿乾重量比が高いままであった。3日後には両群ともに sham に近い値まで低下していた。

肺胞内浮腫のスコアは、1時間後と3日後では両群間で差はみられなかったが、1日後では、若年マウスと比較して高齢マウスで有意差には至らないもののスコアが高い傾向がみられた。血管周囲浮腫 (edema ratio) は、高齢マウスでは若年マウスと比べて1日後に有意に edema ratio が高かった。以上より、若年マウスと比較して高齢マウスでは肺水腫がより重症化し、回復まで時間を要することが明らかになった。

(2) RNA-seq 解析による高齢マウス特異的な遺伝子発現パターンの同定

Multi-dimensional scaling (MDS) では、sham 群、1hr 群、1d 群が区別され、その中で若年マウスと高齢マウスは異なる集団として区別された。若年マウスと高齢マウスそれぞれについて、

sham 群を基準として 1hr 群、1d 群での発現変動遺伝子 (differentially expressed genes: DEGs) を同定し、エンリッチメント解析を行った。さらに、1hr と 1d のそれぞれの時点での DEGs について、若年マウスと高齢マウスで共通しているもの、若年マウス特異的なもの、高齢マウス特異的なものの 3 つに分類し、それぞれの DEGs 特徴について詳細に検討した。

再灌流後 1 時間では、高齢マウスと若年マウスに共通して発現が増加した遺伝子群として、パスウェイ解析では TNF- α signaling via NF- κ B や IL-6/ JAK/ STAT3 signaling などの炎症関連に加えて apoptosis なども抽出された。高齢マウスで特異的に発現が増加した遺伝子群として、炎症反応や好中球に関連するものが同定された。その一方、若年マウスで特異的に発現が増加した遺伝子群として、myogenesis など間葉系細胞に関連するものも抽出された。以上の結果から、両者に共通して炎症促進に働く遺伝子群の発現が亢進し、細胞傷害によるアポトーシスが起きていることが明らかになった。特に高齢マウスでは炎症関連の遺伝子発現亢進が著明であった。

次に再灌流後 1 日では、高齢マウスと若年マウスに共通して発現が増加した遺伝子群として、サイトカインやケモカイン、好中球の活性化に関する項目に加えて、細胞外基質関連が抽出された。パスウェイ解析では、1hr 群と同様に炎症反応が抽出された一方、上皮間葉転換や血管新生、細胞増殖に関する項目が抽出された。高齢マウスで特異的に発現が亢進した遺伝子群は、好中球の遊走やサイトカイン、ケモカインなど、1 時間後と同様に炎症に関連するものが多く同定された。その一方、若年マウスで特異的に発現が増加した遺伝子群は高齢マウスとは大きく異なり、DNA やリボソームの合成や複製、細胞周期や細胞分裂、DNA 修復に関与するものが抽出された。以上の結果から、高齢マウスでは炎症関連の遺伝子発現の亢進が継続している一方、若年マウスでは組織修復が行われていることが示唆された。

(3) RT-PCT とイムノブロットィング

肺組織を用いた RT-PCR で、炎症に関連する遺伝子発現を検討した。若年マウスと比較して高齢マウスでは control 群、1hr 群、1d 群において *Tnfa* や *I11b*、*I16* などの炎症性サイトカインの遺伝子発現が亢進していた。また、JAK/ STAT3 経路についてイムノブロットィングを行ったところ、再灌流後 1 時間、1 日ともに STAT3 のリン酸化が亢進しており、特に高齢マウスでその傾向が顕著であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 早坂一希、鈴木大和、春藤裕樹、渡邊龍秋、渡辺有為、平間崇、大石久、新井川弘道、野田雅史、岡田克典
2. 発表標題 肺虚血再灌流傷害に対する高齢マウス特異的応答の探索.
3. 学会等名 第39回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 虚血再灌流傷害抑制	発明者 岡田克典、早坂一希、赤池孝章、本橋ほづみ	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-136606	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	松田 安史 (Matusda Yasushi) (00455833)	藤田医科大学・医学部・准教授 (33916)	
研究分担者	藤野 直也 (Fujino Naoya) (10633670)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	大河内 眞也 (Ohkouchi Shinya) (40375035)	東北大学・事業支援機構・講師 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	大石 久 (Oishi Hisashi) (60451580)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	野田 雅史 (Noda Masafumi) (70400356)	東北大学・加齢医学研究所・准教授 (11301)	
研究分担者	兼平 雅彦 (Kanehira Masahiko) (90374941)	山梨大学・大学院総合研究部・准教授 (13501)	
研究分担者	早坂 一希 (Hayasaka Kazuki) (40964739)	東北大学・加齢医学研究所・分野研究員 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関