

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09306

研究課題名(和文) 抗炎症関連分子Spred2に着目したマウスモデルによる移植肺機能温存法の開発

研究課題名(英文) Development of transplanted lung function-preserving method using a mouse model focusing on the anti-inflammatory related molecule Spred2

研究代表者

山根 正修 (Yamane, Masaomi)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：20432643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Spred2 ノックアウトマウスとSpred2遺伝子過剰発現マウスを用いて開胸、クランプモデルによる肺障害実験を行った。それぞれRT-PCR、H-E染色による組織像、動脈ガス分析を施行し予備実験として評価したが差は認められなかった。抗マウスSPRED2抗体を用いて発現量をウェスタンブロッティング法にて確認したが予備実験では差が認められなかった。Spred2トランスジェニックマウス、骨髄由来細胞特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトマウスではSpred2の蛋白およびmRNAレベルでの過剰発現を確認することができず、肺門クランプモデルを用いた実験で虚血再灌流障害に有意な差を見いだせなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでSpred2と移植後急性肺障害との関係を明らかにすべく報告してきた。今回はコンディショナルノックアウトマウスを開発し急性肺障害、さらには急性拒絶との関連を試みた。しかしながらトランスジェニックマウス、コンディショナルノックアウトマウスによる実験系では有意な差を見出すことはできず、急性肺障害とMAPキナーゼ系との関与についてさらなる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：A lung injury experiment using a thoracotomy and clamp model was also performed using Spred2 knockout mice and transgenic mice that are Spred2 gene overexpressing mice. Histological images by RT-PCR and H-E staining and arterial gas analysis were performed and evaluated as preliminary experiments, but no difference was observed. Furthermore, the expression level was confirmed by Western blotting using an anti-mouse SPRED2 antibody, but no difference was observed in the preliminary experiment. Overexpression of Spred2 at protein and mRNA levels could not be confirmed in Spred2 transgenic mice and conditional knockout mice specifically deficient in bone marrow-derived cells, compared with wild-type in experiments using a hilar clamp model. No significant difference was found in ischemia-reperfusion injury.

研究分野：肺移植、急性肺障害

キーワード：急性肺障害 肺移植 移植免疫 急性拒絶

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺移植後は虚血再灌流障害やその後に生じる急性期、慢性期の拒絶反応などにより他の臓器移植に比して移植臓器機能障害が高率に生じ極めて予後不良である。当施設は本邦でも有数な肺移植施設であり良好な成績を維持している。我々はこれまでにラットやマウスによる肺移植モデルを用いて肺移植後虚血再灌流障害において炎症性サイトカインや転写因子、MAPキナーゼや好中球が関与することを示してきた。近年分離された Spred2 (Sprouty-related/Ena/VASP homology 1-domain-containing protein-2) 分子は Ras 依存性に ERK (Extracellular stimulus-activated kinase) 経路を阻害する。

### 2. 研究の目的

我々はマウス肺虚血再灌流モデルを用いて、Spred2 遺伝子の欠損により ERK 経路が活性化し肺障害が重症化することを発見した。さらにドナーが正常肺でも Spred2 遺伝子が欠損したレシピエントでは肺移植後の障害が強いことがわかった。これらの研究の経緯により本研究の目的は、移植後肺機能障害における Spred2 の機能を解明することにより、移植肺機能温存法を開発することである。

### 3. 研究の方法

Spred2 遺伝子過剰発現マウスを用いる

急性肺障害 (虚血再灌流モデル)、異系移植 (慢性拒絶である BOS、Bronchiolitis Obliterans Syndrome モデルの異所性および同所性気管移植) を作成する。現在まで Spred2<sup>flx</sup> マウス、Spred2 過剰発現マウスの開発は終了しており、組織特異的 Spred2 欠損マウスを開発中である。

組織特異的 (マクロファージ、好中球、T 細胞) に Spred2 遺伝子をノックアウトしたマウスを用いる

現在、血球細胞あるいは肺胞上皮細胞など、組織特異的な Spred2 ノックアウトマウスの開発を続けている。まずは、これら hematopoietic cell をターゲットとし、マクロファージ、好中球あるいは CD4 T 細胞特異的 Spred2 遺伝子欠損マウスでの解析を開始する。虚血再灌流障害、急性拒絶反応に重要な役割を果たすマクロファージ、好中球、CD4 T 細胞の Spred2 遺伝子を欠損させたマウスを急性肺障害 (虚血再灌流モデル)、異系移植 (気管移植モデル) に用いる。これらの免疫に関与する血球細胞における ERK 経路が急性肺障害、移植免疫反応に関与するかどうかを検討する。

それぞれ遺伝子改変したマウスにて肺移植モデルによる研究を行う

マウス肺移植モデルを用いて、Spred2 を有する正常な移植肺でも Spred2 を欠損したレシピエントでは再灌流障害が惹起された。組織特異的 Spred2 ノックアウトマウスをドナー肺、あるいはレシピエントに用いることにより、Spred2 が急性肺障害、急性拒絶に関与するのかわりに深く移植後肺機能障害との関連性を検討し機能を解明する。

研究の進行状況に応じて肺胞上皮特異的に Spred2 遺伝子欠損したマウスの開発を検討する予定である。

また標的細胞へ投入可能な Spred2 タンパクの開発を進めている。本研究が進み結果を詳細に分析することによって最適な Spred2 タンパクの投与経路、方法の検討を詳細に行うことができ、将来的には動物への投与と実験を見据え、さらには臨床応用への発展性を探る。

### 4. 研究成果

マウスの基本的な取り扱いを定着させ、遺伝子タイプの同定のため RT-PCR 手技を実施した。本研究の急性肺障害 (虚血再灌流モデル) モデル作成のためワイルドタイプマウスを用いて実験手技を安定させた。全身麻酔を導入し開胸後にクリップを用いて肺門部をクランプし、その後に再灌流を行い障害肺モデルの作成を行った。障害の程度は H-E 染色による病理組織による評価を行った。

#### 【ノックアウト、トランスジェニックマウスによる予備実験】

手技の安定の評価のため動脈血ガス分析の測定、作成した障害肺を行った。次に Spred2 (Sprouty-related EVH1-domain-containing protein) ノックアウトマウスと Spred2 遺伝子過剰発現マウスであるトランスジェニックマウスを用いて同様に開胸、クランプモデルによる肺障害実験を行った。それぞれ RT-PCR、H-E 染色による組織像、動脈ガス分析を施行し予備実験として評価した。Spred2 抗体が入手された後にウェスタンブロットングを施行、トランスジェニックマウスにおける Spred2 タンパクの発現の確認を行った。また組織特異的 Spred2 欠損マウスを開発により実験可能な状況となった。

Spred2 遺伝子過剰発現マウスにおいて H-E 染色、動脈血酸素分圧測定では差は認められなかった。このことは抗マウス SPRED2 抗体を用いて発現量をウェスタンブロットング法にて確認したが予備実験では差が認められなかった。

この研究では肺門部クランプモデルによる虚血再灌流障害、肺移植モデルを用いたより臨床的な虚血再灌流障害と急性拒絶、気管移植モデルを用いた慢性拒絶、のそれぞれ特徴的なモデルを用いることを計画した。前述のように肺門クランプおよび肺移植モデルを用いた虚血再灌流障害の研究は終了した。次に新しく開発されたマウス、細胞・組織特異的に Spred2 をノックアウトしたコンディショナルノックアウトマウス (CD4T 細胞特異的、マクロファージ特異的、好中球特異的にノックアウトしたマウス)、逆に過剰発現させたトランスジェニックマウスを開発し、さらに詳細な肺障害と拒絶反応における MAP キナーゼ経路のメカニズムを探り新たな治療法に結び付け、肺移植後の新しい肺機能温存法の開発を目指すことを目的とした。Spred2 を過剰発現するように遺伝子改変したマウス (以下、Spred2 トランスジェニックマウス) を用いた虚血再灌流傷害の評価を行った。Spred2 トランスジェニックマウスでは、Spred2 の蛋白レベルおよび mRNA レベルでの過剰発現を確認することができず、また肺門クランプモデルを用いた実験で野生型と比較して虚血再灌流障害に有意な差を見いだせなかった。Spred2 を骨髄由来細胞特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトマウス (Spred2 LysMCre マウス) でも同様の実験を行ったが、野生型と比較して虚血再灌流障害における明らかな差を見出すことができなかった。肺虚血再灌流には骨髄由来細胞だけではなく、他細胞も含めた Spred2 の関与が示唆された。いずれの遺伝子改変マウスでも血液酸素ガス分圧や病理組織検査において差は認められず、実験動物の遺伝子改変が不十分な可能性があり、Spred2 タンパクの出現に十分な差が表れなかった可能性がある。また生体内に投与可能な Spred2 タンパク製剤の開発が実験期間内ではその有用性が評価ができなかったが引き続き、遺伝子改変マウスによる解析とタンパク製剤の開発を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	豊岡 伸一  (Toyooka Shinichi)  (30397880)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授   (15301)	
研究分担者	松川 昭博  (Matsukawa Akihiro)  (90264283)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授   (15301)	

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