

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790988

研究課題名（和文） マウス肺移植モデルを用いた虚血再還流障害おける基礎的研究

研究課題名（英文） basic research for ischemia reperfusion injury following lung transplantation using a mouse orthotropic lung transplant model

研究代表者

山根 正修（YAMANE MASAOMI）

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：20432643

研究成果の概要（和文）：

肺移植後の虚血再還流障害は移植後成績に大きく関与している。冷虚血、温虚血による移植肺障害の分子レベルでの違いを明らかにし、その中でも特に炎症に深く関与していると考えられている転写因子 Egr-1 (early growth response gene-1) に着目した。マウスを用いた左片肺移植モデルを用いた。ドナーより摘出した肺を長時間の虚血後に移植すると、再灌流障害により肺機能は著しく悪化する。しかし Egr-1 がノックアウトされた肺は摘出後に長時間保存した後もレシピエントに移植後も良好に機能した。IL-1B、MIP-2、IL-6 などの炎症性サイトカインの発現の抑制を認めた。またレシピエント側の Egr-1 をノックアウトのみでは移植肺（ドナー側）のノックアウトに比して肺障害は抑制されなかった。本研究では移植肺内での Egr-1 を抑制することにより炎症性サイトカインが抑えられ、長時間保存後の再灌流障害を抑制される可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Ischemia-reperfusion injury still remains main life-threatening complication following lung transplantation. It has been obscured that how warm ischemia affects on pulmonary graft injury as compared with classical cold preservation, when lungs are retrieved from non-heart beating donors. To clarify the differences between warm and cold preserved lungs in molecular mechanisms, PCR and western-blotting assays were performed to see the changes in expression levels of transcription factors, the downstream target genes, and phosphorylations of MAP kinases. We also employed Egr-1 knock out mouse to look at the effects of Egr-1 on graft functions and inflammatory gene expressions. When Egr-1 in the pulmonary grafts was deleted, lungs functioned obviously better than grafts from wild type mouse with Egr-1 expression. Up-regulation of inflammatory cytokines expression was not observed in Egr-1 KO grafts. These results suggest a novel possible approach to avoid pulmonary graft function from severe ischemia-reperfusion injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：肺移植

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：肺移植、Egr-1、サイトカイン、虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

- (1) 肺移植において現在本邦では、脳死ドナーの供給が大幅に遅れており、待機患者の死亡率が70%と非常に高い。移植医療はレシピエントにとってはわずかな望みとなっている状態である。このため、当施設では脳死ドナーの代替法として親族の肺を一部提供して移植する生体肺移植を本邦で初めて施行、以来60例以上の肺移植を行ってきた。世界的にも非常に良好な成績であり注目されてきた。
- (2) 次にドナーとして考えられている心停止後の肺提供の研究を行ってきた。これは脳死判定や法的手続きが不要なため多くの供給が見込まれており、海外では数例の臨床報告例がある。
- (3) しかし肺移植そのものは多臓器移植に比して虚血再還流、拒絶や感染による移植片機能障害により生存率が不良である。
- (4) 心停止後ドナーと心拍動ドナーの移植肺機能（肺障害）の違いを分子レベルでの検証が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

- (1) 心停止後ドナー（温虚血）と心拍動ドナー（冷虚血）からの移植肺機能の違い。
 - ① それぞれの移植肺での炎症性サイトカインの発現の違い。
 - ② 代表的なMAPカインース（ERK、JNK、P38）の活性化の違い。
 - ③ 転写因子の発現の違い。
- (2) 転写因子ノックアウトによる移植肺機能の違い。
- (3) 本研究では、特に肺障害に強く関係するとされる転写因子のEgr-1の影響を確認する研究である。本研究から得られた結果により、心停止ドナー肺の評価法、肺障害のメカニズムの解明が期待される。

3. 研究の方法

- (1) 心停止後ラット肺移植モデル
 - ① 心停止後0、30、または180分後に移植肺を摘出し冷保存。
 - ② どの肺も240分後に移植、再還流す

る。60分後に移植肺機能の評価をし、臓器を摘出、分析する。

(2) 移植臓器の分子レベルの検討：摘出した肺を冷凍保存し、分析時に mRNA、タンパクの抽出を行い、半定量的 PCR、ウエスタンブロッティングにて測定した。

- ① 転写因子 (ATF3, Egr1) の発現
- ② 炎症性サイトカイン mRNA
- ③ MAPK (ERK, JNK, P38) の活性化

(3) Egr-1 ノックアウトマウスを用いた肺移植実験

- ① マウスの肺移植モデルの確立
- ② Egr-1 ノックアウトによる移植肺機能障害の抑制効果
- ③ 炎症性サイトカイン発現の抑制効果
- ④ 移植肺内の免疫細胞のポピュレーションの変化をフローサイトメトリーにて検証。

4. 研究成果

(1) 心停止後ラット肺移植モデル

心停止後 0、30、または 180 分後に移植肺は温虚血が長いほど肺障害が強かった。

(2) 移植臓器の分子レベルの検討

- ① 転写因子 (ATF3, Egr1) の発現

転写因子はいずれも 60 分後に最も発現が高くその後漸減する。温虚血が長い群で有意な高発現が認められた。

- ② 炎症性サイトカイン mRNA

温虚血による肺障害が強い群で高発現が認められた。

- ③ MAPK (ERK, JNK, P38) の活性化

再還流後に P38 の活性化は認められたが虚血時間の差による違いは認められなかった。

ERK、特に JNK では長い温虚血による障害肺で強い活性を認めた。

(3) Egr-1 ノックアウトマウスを用いた肺移

植実験

- ① マウスの肺移植モデルの確立

ラットに比して 10/1 程度の大きさであるが約半年を経て安定した手技が確立された。

- ② Egr-1 ノックアウトによる移植肺機能障害の抑制効果

ドナー、レシピエントともに Egr-1 をノックアウトすることにより、長時間虚血後の強い移植肺障害を抑制することに成功した。これはレシピエントのみのノックアウトは不十分であり、移植肺のみのノックアウトでも効果は認められた。

- ③ 炎症性サイトカイン発現の抑制効果

ドナー、レシピエントともに Egr-1 をノックアウトすることにより有意なサイトカインの発現抑制を認めた。

- ④ 移植肺内の免疫細胞のポピュレーションの変化をフローサイトメトリーにて検証。

炎症細胞新順の抑制効果を認めた。

(4) 今後の展望

温虚血と冷虚血による肺障害の分子メカニズム機能に違いがある可能性が示唆された。今後、死体からの臓器提供、移植医療を行うためにはその詳細な検討が必要と思われる。また中でも Egr-1 の選択的抑制により移植肺障害を回避できることが証明された。臨床応用に向けて新しい対策方法の一つとなる可能性がある。さらに拒絶反応を抑制できる可能性もあり、その証明をするための実験を引き続き行う予定である。

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)

〔学会発表〕（計 2 件）

1. 山本澄治、山根正修、心停止ドナー肺移植後虚血再灌流障害からの回復における抗炎症性因子の重要性、第 45 回日本移植学会総会、2009 年 9 月 17 日、東京
2. 山本澄治、山根正修、Egr-1 ノックアウトマウスを用いた肺移植後再灌流障害、第 45 回日本移植学会総会、2009 年 9 月 17 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山根 正修 (YAMANE MASAOMI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：20432643