

令和 7 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2020～2024

課題番号：20KK0203

研究課題名（和文）心停止ドナーからの肺移植後虚血再灌流障害のトランスレーショナルリサーチと治療応用

研究課題名（英文）Translational research of ischemia reperfusion injury after lung transplantation from donation after circulatory death

研究代表者

岡崎 幹生（Okazaki, Mikio）

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：50467750

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,400,000円

研究成果の概要（和文）：本邦ではまだ使用できない心停止ドナー（DCD）肺は、温虚血による再灌流障害（IRI）により移植肺機能不全に陥りやすく、その病態や治療標的を明らかにする必要がある。スペインPuerta de Hielo大学病院で採取したDCDおよび脳死ドナー（DBD）肺移植後の臨床検体に対して網羅的遺伝子解析を実施した。両者の遺伝子発現パターンは全く異なっており、炎症関連遺伝子がDBD肺で、DNA損傷・修復に関連した遺伝子がDCD肺で顕著に発現していた。治療標的となりうる遺伝子としてNR4A1を見出し、マウス肺移植モデルで検証し、DCDのNR4A1をノックアウトするとIRI抑制効果があることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はマウス肺移植モデルを用いて、未だに不明な部分の多いDCD肺に対する基礎研究を行ってきたが、次の段階としてスペインPuerta de Hielo大学病院と国際共同研究を行った。DCDおよびDBD肺移植後の臨床検体に対して網羅的遺伝子解析を実施し、両者の遺伝子発現パターンは全く異なっていることを明らかにした。これによって、DCD肺移植後のIRIに対しては、DBD肺移植とは異なった治療法が必要であることが示唆された。今回検証したNR4A1以外にもDCD肺移植後のIRIに対する治療標的候補となる遺伝子を多数同定できており、今後のDCD肺移植後のIRIに特化した治療開発に繋げていく。

研究成果の概要（英文）：In Japan, lungs from donors after cardiac death (DCD) are not yet in clinical use, as they are prone to graft dysfunction due to ischemia-reperfusion injury (IRI) caused by warm ischemia. It is therefore essential to elucidate their pathophysiology and identify potential therapeutic targets. We conducted a comprehensive gene expression analysis on clinical lung transplant samples from both DCD and brain-dead donors (DBD), collected at Puerta de Hierro University Hospital in Spain. The gene expression profiles were clearly distinct: inflammation-related genes were highly expressed in DBD lungs, whereas genes associated with DNA damage and repair were prominently expressed in DCD lungs. Among these, we identified NR4A1 as a potential therapeutic target. Using a mouse lung transplant model, we demonstrated that knockout of NR4A1 in DCD lungs suppressed IRI.

研究分野：肺移植

キーワード：肺移植 虚血再灌流障害 心停止ドナー 脳死ドナー NR4A1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦では、深刻なドナー不足のため、脳死肺移植の待機患者の約 1/3 は待機期間中に亡くなってしまっているのが実情である。脳死ドナー (DBD) 不足解消のため、心停止ドナー (DCD) からの肺移植の臨床応用が急務となっている。その承認のためには、倫理的問題だけでなく、DCD からの肺移植における虚血再灌流障害を抑制・予防することが重要である。

(2) ドナー肺を摘出し、移植する前に体外循環で評価・治療を行う体外肺灌流 (ex vivo lung perfusion: EVLP) という方法があるが、この EVLP の研究が DCD からの肺移植の研究の主体になっていた。しかし、DCD からの肺移植後の虚血再灌流障害の分子メカニズム的を絞った基礎研究は少なく、いまだ説明されていないことが多い。また、DCD からの肺移植後の臨床検体を次世代シーケンサーで解析した報告もなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、DCD からの肺移植後の虚血再灌流障害の分子メカニズムをマウスモデルおよびヒト検体を用いて解明し、その治療薬を開発することを目的とした。マウスモデルの結果を切り口として、申請者らの共同研究先であり、DCD からの肺移植で先進的施設であるスペインの Puerta de Hiello 大学病院との共同研究により、ヒト DCD からの肺移植後の虚血再灌流障害の抑制・予防法の確立を目指した。

### 3. 研究の方法

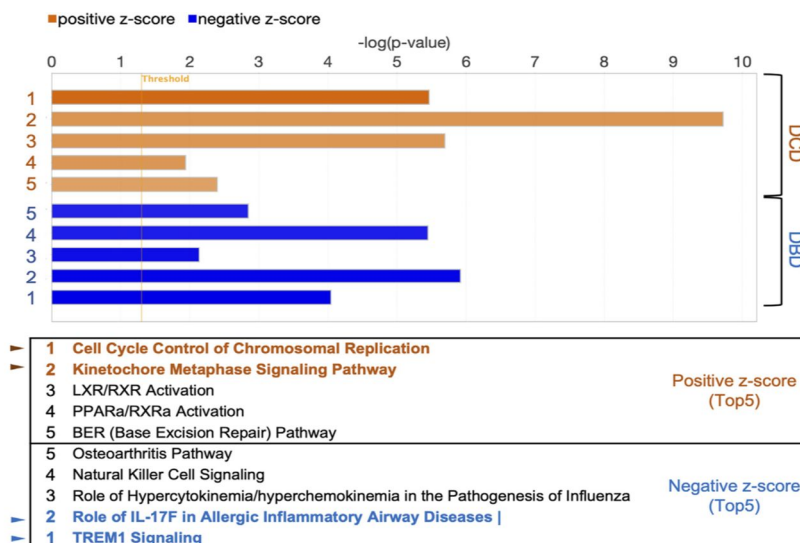
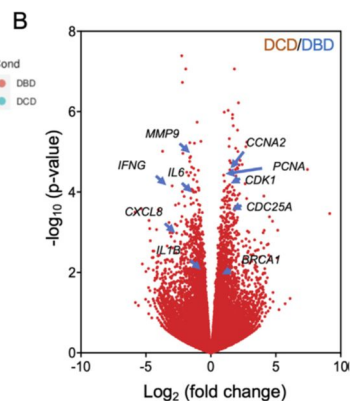
(1) 共同研究機関であるスペインの Puerta de Hiello 大学病院で DBD と DCD からの肺移植の臨床検体を採取した。移植後の肺サンプルから RNA の抽出を行い、次世代シーケンサーによる網羅解析を行った。さらに免疫染色も行った。

(2) 遺伝子解析の結果から、DCD からの肺移植後の虚血再灌流障害に対する治療標的として Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1 (Nr4a1) に着目した。NR4A1 ノックアウトマウスを用いたマウス DCD 肺移植モデルで、虚血再灌流障害抑制効果を検証した。

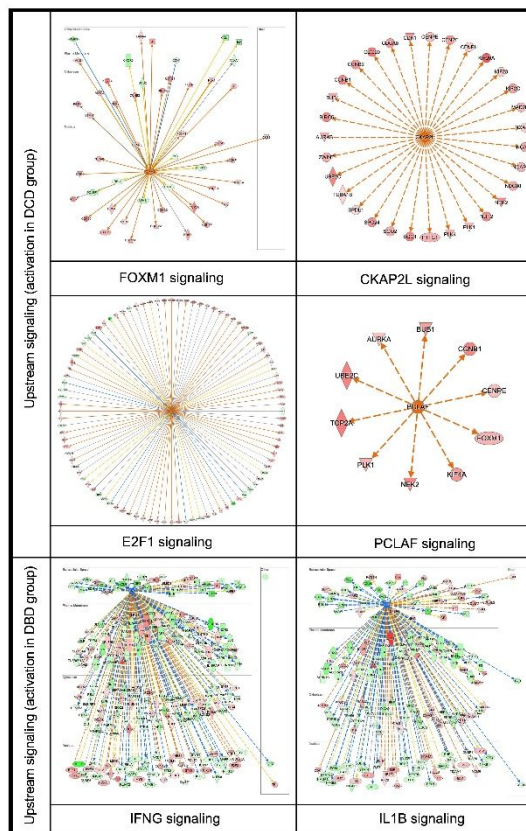
### 4. 研究成果

(1) DCD と DBD からの肺移植後の臨床検体に対する遺伝子網羅解析の結果、PCNA, CCNA2, CDC25A, CDK1, BRCA などの細胞周期や DNA 損傷・DNA 修復に関連した遺伝子が DCD 肺で高い発現を示した。それに対して、DBD 肺では MMP9, IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, CXCL-8 などの炎症関連遺伝子の発現が顕著だった (右図)。

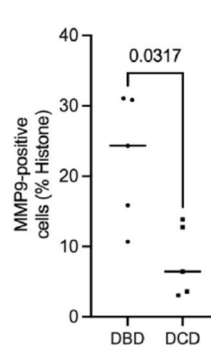
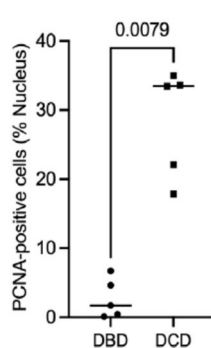
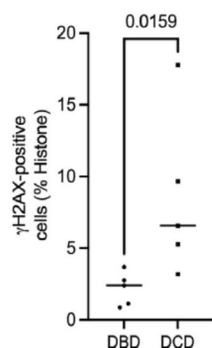
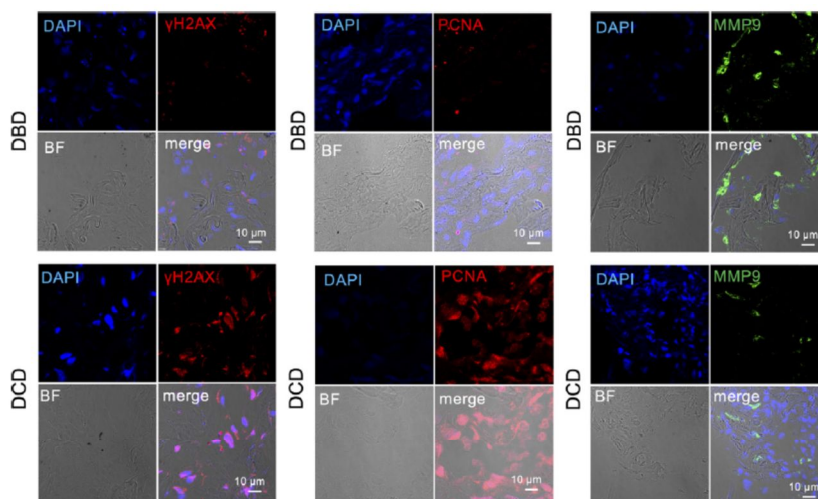
(2) Canonical Pathway Analysis では、DCD 肺の遺伝子群は「Cell Cycle Control of Chromosomal Replication」や「Kinetochore Metaphase Signaling pathways」に関連した遺伝子と強い相関を示した。それに対して、DBD 肺は「TREM1 signaling」や「role of IL-17F in allergic inflammatory airway diseases」と強い相関を示した (下図)。



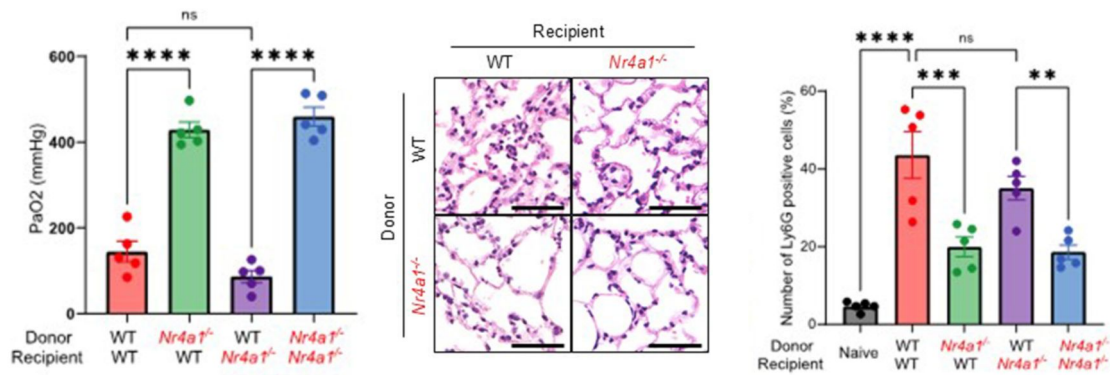
(3) IPA (Ingenuity®Pathway Analysis) を用いたさらなる上流解析により、RNA シーケンスデータのクラスタリングが明らかになり、FOXM1、CKAP2L、E2F1、PCLAF が DCD 肺で活性化される上流シグナルであることが同定された(右図)。これらのシグナルは DNA 損傷と複製に密接に関係している。



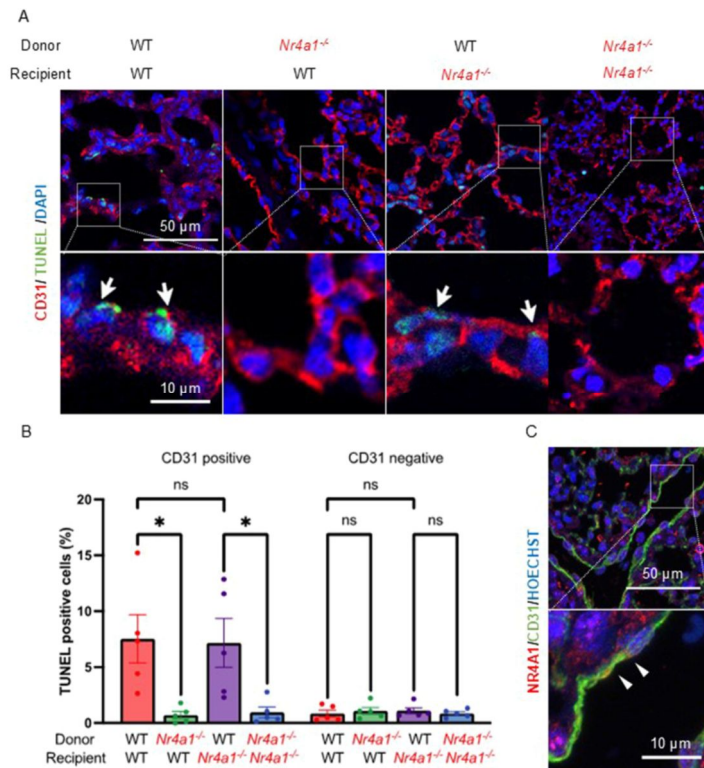
(4) H2AX 抗体を用いた免疫組織学的解析により、DNA 損傷をタンパク質レベルで定量化したところ、DCD 肺では DBD 肺に比べて H2AX 陽性核が有意に多かった(下図)。移植肺の DNA 複製レベルを評価するため、免疫蛍光法で PCNA 発現量を定量化した。DCD 肺では DBD 肺よりも有意に多くの PCNA 陽性細胞が認められ(下図)、DNA 複製が増加していることが示された。それに対し、炎症関連遺伝子である MMP9 の免疫染色では、DBD 肺で DCD 肺より有意に多くの MMP 陽性細胞が認められた。



(5) NR4A1 ノックアウトマウスを用いたマウス DCD 肺移植モデルでの虚血再灌流障害抑制効果の検証。移植から4時間後のPaO<sub>2</sub>を測定したところ、ドナーにNR4A1 ノックアウトマウスを用いると、有意にPaO<sub>2</sub>は改善した(左下図)。また、HE染色でも同様にNR4A1 ノックアウトマウスドナーで炎症細胞浸潤が有意に抑制されていた(下図)。好中球の免疫染色を行ったところ、NR4A1 ノックアウトマウスドナーで好中球浸潤が有意に抑制されていた(右下図)。



(6) CD31 と TUNEL の共染色によって、NR4A1 ノックアウトドナーでは血管内皮細胞のアポトーシスが有意に抑制されていた(下図)。ドナーのNR4A1 をノックアウトすると、ドナーの血管内皮細胞のアポトーシスが抑制され、虚血再灌流障害の抑制に繋がったと考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kawana Shinichi, Okazaki Mikio, Sakaue Tomohisa, Hashimoto Kohei, Nakata Kentaro, Choshi Haruki, Tanaka Shin, Miyoshi Kentaroh, Ohtani Shinji, Ohara Toshiaki, Sugimoto Seiichiro, Matsukawa Akihiro, Toyooka Shinichi	4. 巻 44
2. 論文標題 Loss of Nr4a1 ameliorates endothelial cell injury and vascular leakage in lung transplantation from circulatory-death donor	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 The Journal of Heart and Lung Transplantation	6. 最初と最後の頁 249 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.healun.2024.09.028	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Okazaki Mikio, Sakaue Tomohisa, Tanaka Shin, Kubo Yujiro, Hayashi Tatsuya, Ramil Elvira, Sanchez-Lopez Antonio J., Coronado Maria Jose, Hoyos Lucas, Romero Alejandra, Toyooka Shinichi, Gomez-de-Antonio David	4. 巻 0
2. 論文標題 Histological Features and Gene Expression Profiling in Lung Transplantation From Donation After Circulatory Death	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 Archivos de Bronconeumologia	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.arbres.2024.12.015	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Nakata Kentaro, Okazaki Mikio, Sakaue Tomohisa, Kinoshita Rie, Komoda Yuhei, Shimizu Dai, Yamamoto Haruchika, Tanaka Shin, Suzawa Ken, Shien Kazuhiko, Miyoshi Kentaroh, Yamamoto Hiromasa, Ohara Toshiaki, Sugimoto Seiichiro, Yamane Masaomi, Matsukawa Akihiro, Sakaguchi Masakiyo, Toyooka Shinichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Functional Blockage of S100A8/A9 Ameliorates Ischemia Reperfusion Injury in the Lung	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 673 ~ 673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bioengineering9110673	査読の有無 有
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 該当する

〔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	坂上 倫久  (Sakaue Tomohisa)  (20709266)	愛媛大学・医学系研究科・講師(特定教員)   (16301)	
研究分担者	豊岡 伸一  (Toyooka Shinichi)  (30397880)	岡山大学・医歯薬学域・教授   (15301)	
研究分担者	塩谷 俊雄  (Shiotani Toshio)  (90851246)	岡山大学・医学部・客員研究員   (15301)	
研究分担者	田中 真  (Tanaka Shin)  (20831308)	岡山大学・大学病院・助教   (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
---------	---------