

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791311

研究課題名（和文） 肺移植後の再還流障害と急性拒絶反応の病態解明の試み

研究課題名（英文） Peculiar mechanisms of reperfusion injury and acute rejection after lung transplantation

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）：

通常の異系でのマウス肺移植モデルでは5日以内に移植肺は強く拒絶された。移植肺内ではEgr-1の強い発現を認めた。また肺障害に関与する他の炎症メディエーター（IL-1 β , MCP-1, and PAI-1）の発現レベルも最大であった。Egr-1を除去すると肺移植後5日目での急性拒絶程度はごく軽度に抑制することが示された。また炎症メディエーターの発現もより低い結果であった。これらの結果よりEgr-1を除去、抑制することは肺移植後の拒絶反応の治療の新しい方法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Severe acute rejection was observed in allografts from WT mice at 5 days after transplantation. Only minimal rejection was seen in the lung graft from Egr-1-null donor mice at 5 days after transplantation. Strong upregulation of Egr-1 mRNA transcripts was observed at day 1, which then decreased during the next 5 days. The mRNA of Egr-1 target mediators (IL-1 β , MCP-1, and PAI-1) reached maximal levels at day 5. Egr-1-null allografts exhibited significantly lower expressions of IL-1 β and MCP-1 mRNA ($p < 0.05$). Our study showed that deletion of Egr-1 in lung allografts ameliorates severe acute rejection with the reduction of expression levels of chemical mediators, implying a new possible strategy for treating acute pulmonary allograft rejection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：呼吸器外科

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, 急性拒絶, Egr-1, 虚血再還流障害

1. 研究開始当初の背景

肺移植は進行する重症肺疾患に対する唯一の救命手段である。わが国では当大学による1998年10月に本邦初の生体肺移植の成功例以来、日本全体で100例の肺移植が施行された

(2009年9月現在。岡山大では68例)。通常、5年生存率は50%とされ現在のところ日本全体で全生存率約70%であるが、岡山大では最高9年の経過観察期間で48例(84.2%)が生存中である。しかし肺移植医療そのものは他の臓器

移植に比して拒絶や感染症などの合併症が多く、世界的な標準成績は5年生存率が50%程度である。肺移植後の虚血再灌流障害（IRI）は高い頻度で生じ肺移植後の成績を悪化させる重要な合併症である。さらにIRIは拒絶反応にも強く関与すると報告されている。したがって肺移植の成績向上のためにはIRIの抑制、拒絶反応の回避が大きな役割を果たす1。このため世界的に肺移植研究を行っている施設はIRIのメカニズムの解明や新しい治療法を長年にわたって注目してきた。申請者はラット肺移植モデルを用いて、世界で初めてマイクロアレイ解析を用いて8800個に及ぶ移植肺内遺伝子発現の経時的变化の解析を行った4（上図）。サイトカインの他に凝固因子、接着因子、急性反応分子など様々な遺伝子の発現レベルは再灌流後に著明な上昇を認めた。さらに同様のモデルで追加した研究（平成18年度科研費、若手スタートアップ）では、これらの因子はIRIの程度によって移植肺内では特にEgr-1の発現レベルが異なり、また発現量の経時的变化のパターンに違いがあることが明らかとなった。続いてMAPKと、虚血再灌流生涯の違いを検討した結果、これまで知られていなかったMAPKと移植肺機能障害との関連性を示唆する結果を得た。その中で特筆すべき結果は、Egr-1とその関連因子はそれぞれが移植肺機能により発現レベル、経時的变化も異なった。これらの結果により、Egr-1の肺移植後IRIにおける重要性が示唆された。現在、Egr-1ノックアウトマウスを用いた肺移植実験を行っているが（平成20年度 若手研究B）、重症虚血再灌流障害モデルでもEgr-1をノックアウトすることにより移植肺機能を良好に維持できる結果を得た。Egr-1はIRIの強い制御を通じて拒絶反応にも強く関与する可能性が高い。実際、気管移植モデルでその可能性を示唆するdataが発表されている。しかしな

がら肺移植は他の臓器とは免疫反応が大きく異なり強い拒絶反応が常に臨床では問題となる。

2. 研究の目的

Egr-1の関与はレシピエントよりドナー、ドナーよりレシピエント+ドナー双方により強く影響することを示した。拒絶モデルでは同様の実験を行うことにより、Egr-1の関与をより明確にし、実際の臨床においてIRIと拒絶の制御のストラテジーを示す結果が期待される。本研究は当教室員が世界で始めて開発した、最先端の動物実験モデルであるマウス肺移植を用いて、移植後の急性拒絶反応に伴うメカニズムの解明を目的とする。特に移植肺の急性期虚血再灌流障害に影響すると予想されるEgr-1、MAPK系に着目した。そのEgr-1と、さらにMAPKを抑制するspred2のそれぞれのノックアウトマウスを用いて、虚血再灌流障害と急性拒絶モデルを用いてそれぞれの移植肺機能、拒絶反応との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では虚血再灌流に強く影響すると考えられるEgr-1の拒絶反応への影響を検討する。Egr-1ノックアウトマウスを用いることによりEgr-1が作用しない状態で異系肺移植を行う。1週間程度で移植肺は強く拒絶されることが予想されるが、Egr-1をノックアウトすることにより虚血再灌流障害が抑制され、急性拒絶をコントロールする働きの有無について同様の遺伝子発現パターンを比較検討する。まずマウス肺移植での急性拒絶モデルの確立を目指す。マウス肺移植技術は当教室員が米国で開発した比較的新しい技術であり、急性期の拒絶が評価できるモデルの確立が重要である。次にノックアウトマウスを用いた肺移植を行う。Egr-1をレシピエントでノックアウトする

群とドナーでノックアウトする群それぞれの拒絶反応を評価、検証する。移植肺機能としては血液ガス分析を行う。

ドナーは全身のヘパリン化後に脱血し肺動脈よりLPDG液により肺を還流させ後に摘出する。左肺を同所性に移植する。移植後1～7日目に肺静脈より採血し血液ガス分析を行った後に犠死させる。

摘出した移植肺の拒絶の重症度はH-E染色にて評価する。摘出した移植肺はホルマリン固定保存、さらに2～3mmに細切したものを液体窒素にて凍結し-80度で保存する。移植肺からRNAを抽出し、PCRを行い、サイトカイン、凝固因子、接着因子などに属する主要因子のmRNAレベルをそれぞれ測定する。またELISA、免疫染色を用いてそのタンパクレベルの発現を確認する。さらに生標本を用いてフローサイトメトリーを行い細胞成分の分布を分析する。さらにSpred2ノックアウトマウスについては同系移植モデルを用いる。同様にPCR、フローサイトメトリーを用いて虚血再還流障害への影響を検証する。

4. 研究成果

まず通常の異系でのマウス肺移植モデルでは5日以内に移植肺は強く拒絶された。移植肺内ではEgr-1の強い発現を認めた。また肺障害に関与する他の炎症メディエーター (IL-1 β , MCP-1, and PAI-1) の発現レベルも最大であった。Egr-1を除去すると肺移植後5日目での急性拒絶程度はごく軽度に抑制することが示された。また炎症メディエーターの発現もより低い結果であった。これらの結果よりEgr-1を除去、抑制することは肺移植後の拒絶反応の治療の新しい方法となる可能性が示唆された。

次に、虚血再灌流障害を来たす主因の1つが好中球であることを示した。

Spred2 KOマウス温虚血再灌流モデル実験

- 呼吸機能が有意な悪化し、肺が著明に浮腫変化、炎症細胞浸潤を認めた。また肺内の好中球が有意な増加を示した。

Spred2の抑制でERKが亢進し、骨髄での好中球分化が促進されているが、MAPK/ERKの亢進が好中球の肺への遊走を促進し、虚血再灌流障害を誘導している可能性が示唆された。

MAPK/ERK経路の活性化により、虚血再灌流障害の重症化を認めた。

MAPK/ERK経路の活性化は、好中球の増加や肺への遊走を促進し、虚血再灌流障害を誘導している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

①Waki N, Yamane M, Yamamoto S, 他. EGR1—A NOVEL TARGET FOR AMELIORATING ACUTE ALLOGRAFT REJECTION IN AN EXPERIMENTAL LUNG-TRANSPLANT MODEL. 査読有, Eur J Cardiothorac Surg. 2012 Mar;41(3):669-75.

②Yamamoto S, Okazaki M, Yamane M, 他. Peculiar mechanisms of graft recovery through anti-inflammatory responses after rat lung transplantation from donation after cardiac death. 査読有, Transpl Immunol. 2012 ;26(2-3):133-9. Epub 2011 Nov 13.

③Yamamoto S, Yamane M, Yoshida O, 他. Activations of mitogen-activated protein kinases and regulation of their downstream molecules after rat lung transplantation from donors after cardiac death. 査読有, Transplant Proc. 2011 Dec;43(10):3628-33.

[学会発表] (計1件)

①虚血再灌流肺障害にはMAPK/ERK経路の活性化が関与する。岡田真典, 山根正修, 伊賀徳周, 他. 日本肺および心肺移植研究会, 2012年1月29日, 仙台。

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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者