

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592100

研究課題名(和文) 肺移植後急性肺損傷における血管内皮セレクチン機能の解析

研究課題名(英文) Involvement of E-selectin in reimplantation lung injury

研究代表者

後藤 太一郎 (Goto, Taichiro)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：80317148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺移植後の急性肺損傷は依然未解明の重篤な合併症である。ラット肺移植モデルを利用した今回の研究で、血清中可溶性E-selectinが肺損傷と相関を示し、血清マーカーとして有用であると考えられた。また、E-selectinノックアウトラットがdonorの肺移植では、肺損傷が有意に軽微であり、donor肺血管内皮におけるE-selectin発現が肺損傷の機序であると考えられた。血清中可溶性E-selectinも肺損傷と有意に相関し、グラフト肺の膜型E-selectinから遊離分解により産生されたと考えられた。また、血流逆転肺移植モデルでは特発性肺線維症に類似した線維化が確認された。

研究成果の概要(英文)：Reimplantation lung injury is a major complication after the lung transplantation and remains yet to be solved. In this study using rat transplantation model, soluble E-selectin was found to be correlated with the lung injury score, suggesting it to be a serum marker. In the chimeric rat transplantation models, lung transplantation using the E-selectin deficient rat as the donor, caused significantly less injury, suggesting that membranous E-selectin upregulation is the trigger of acute lung injury. Serum soluble E-selectin was increased only in case wildtype lung was utilized as the donor, which suggests, soluble E-selectin could be shed and released from the membranous E-selectin. In our new lung transplantation models, which converted the blood flow from pulmonary vein to pulmonary artery, pulmonary fibrosis resembling the interstitial pulmonary fibrosis might appear mainly in the peripheral lungs.

研究分野：肺移植

キーワード：肺移植 急性肺損傷 セレクチン 好中球 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

肺移植は重症呼吸不全疾患に対する唯一の根本的治療である。しかし、近年の肺移植医療の進歩にも拘わらず、肺移植後急性期グラフト不全 (reimplantation syndrome) は、依然、術後の重篤な合併症である。現在、これら、移植後の重篤な病態に関して、不明の点が多く、有効な治療法は確立しておらず、その解決は急務である。また、急性期肺障害と急性期拒絶反応との鑑別が画像所見や臨床所見では困難なことも多く、有効な肺損傷血清マーカーもないため、治療を更に困難にしている。

E-selectin は LPS などの刺激に反応し、血管内皮上に特異的に発現する蛋白であり、主として、好中球の接着に関与する。近年、この接着分子が、炎症に伴う肺への好中球集積に重要な役割を果たしていることが分かってきた。しかし、肺移植後急性肺損傷における E-selectin の関与については、現在まで検証されていない。

本研究では、ラット肺移植モデルを用いて、急性肺損傷における白血球接着分子 E-selectin の関与を検討した。次いで、血清中可溶性 E-selectin の測定を行い、急性肺損傷の血清マーカーとしての有用性を検討した。

2. 研究の目的

研究者らは、ラット肺移植モデルを用いて、移植後急性肺損傷のメカニズムにつき実験を行い、遊離型 TNF α や肺胞上皮接着分子 E-cadherin が急性肺損傷に関わっていることを発表してきた (Am J Respir Crit Care Med. 2004, Eur J Cardiothorac Surg. 2010)。また、近年、*E. coli* 肺炎モデルにおいて、E-selectin deficient mice を使用し、E-selectin の肺損傷への関与についても研究してきた。その結果、*E. coli* 肺炎モデルに

において、血管内皮上 E-selectin 発現強度と好中球集積、肺損傷との間に有意な相関を認めた。また、肺損傷の機序として、血管内皮上に発現する E-selectin (membranous E-selectin) のみならず、血清中の可溶性 E-selectin (soluble E-selectin) を介した機序も重要であることを解明した。

それらをふまえ、この研究期間に以下の点を明らかにしたいと考えた。

(1) 近交系 Lewis ラットの同所性左肺移植モデルを用いて、移植後のグラフト肺血管内皮における E-selectin 発現強度をフローサイトメトリーで定量化する。

(2) WT(donor) \rightarrow WT(recipient), E-sel-KO \rightarrow WT, WT \rightarrow E-sel-KO, E-sel-KO \rightarrow E-sel-KO (WT: wild-type rat, E-sel-KO, E-selectin deficient rat) の4通りの肺移植を実施し、グラフト肺の肺損傷を測定し、比較検討する。Membranous E-selectin、血清中 soluble E-selectin と肺損傷との相関を検討する。

(3) 上記(2)の肺移植モデルにおいて、抗 E-selectin 抗体を投与し、肺損傷抑制効果を検証する。

(4) 血流逆転肺移植モデルを用いて、急性期 E-selectin 発現の検討や慢性期の組織学的検討などを行い、血流逆転に伴う病態を検証する。

3. 研究の方法

(1) 肺移植モデルでの肺損傷評価、E-selectin 定量化

近交系 Lewis ラットを donor, recipient 双方に使用し、同所性左肺移植を行う。ドナー肺は 4°C の肺保存液に 6 時間、浸漬保存後、移植に供する。再灌流 4 時間後にラットを犠牲死させ、グラフト肺の肺損傷の評価を行う。6 時間の ischemia、および 4 時間

reperfusion からなる ischemia-reperfusion lung injury のモデルである。再灌流開始から 3 時間後に ^{125}I -Bovine serum albumin 37kBq を permeability tracer として、sacrifice 10 分前に ^{51}Cr 標識自家赤血球 10kBq を肺血液トレーサーとして、尾静脈より静注する。これらトレーサーを利用して、グラフト肺の肺胞隔壁透過性の指標を算出する。この方法は、研究者らが以前発表した方法であり、肺損傷を最も定量的にかつ正確に評価できる方法である (Am J Respir Crit Care Med. 2004)。

フローサイトメトリーによる血管内皮上の E-selectin 発現の評価は以下の通りである。摘出したグラフト肺より single cell suspension を作成する。方法として、scissors による mechanical digestion と collagenase などによる chemical digestion を併用する。次いで、single cell suspension に、蛍光標識された CD45、CD105、E-selectin 抗体を加え、細胞染色を行う。研究者らの以前の研究により、CD45 negative, CD105 positive の細胞集団がフローサイトメトリーで同定され、これら細胞集団はすべて VE-cadherin positive であり、血管内皮細胞群であることが確認されている。本実験での cell suspension においても、CD45 negative, CD105 positive の population にゲートをかけて、この中で、E-selectin positive の cell population がどの程度存在するかを定量的に評価する。組織学的にも、肺損傷を評価し、さらに、肺に集積した好中球数を計測する。

WT(donor)→WT(recipient), E-sel-KO→WT, WT→E-sel-KO, E-sel-KO→E-sel-KO の 4 通りの肺移植を実施し、前述の肺損傷評価、E-selectin 定量を行う。

Membranous E-selectin 発現、血中 soluble E-selectin と肺損傷との相関を検討し、肺内集積好中球数などのデータをもとに、肺損傷

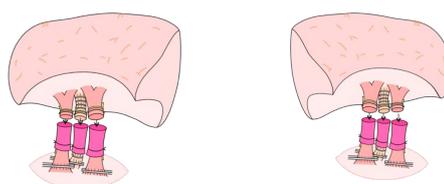
に關与する機序を検証する。

(2) 移植後急性肺損傷の抑制試験

(1)で得た知見をもとに、中和抗体をレシピエントに静注し、E-selectin を特異的に阻害し、肺移植後急性肺障害が抑制されるかを検討する。

(3) 逆行性肺移植モデルの病態生理解明

研究者らは、simplified cuff technique を開発し、さらにその応用として、血流逆転肺移植モデルを作成した (図 1)。このモデルでは、近交系 Lewis ラットの左肺を同所性に肺移植する際、レシピエントの肺動脈とグラフト肺の肺静脈を吻合、recipient の肺静脈とグラフト肺の肺動脈を吻合する。このモデルを利用し、前述の(1)と同様の検証を行い、急性期の E-selectin 発現の検討を行う。慢性期には、ラットを犠牲死させ、組織学的検討などを行い、病態を解明する。次いで、同モデルで、左肺の血流を正常化すべく、左肺を頭尾方向に再逆転させる手術 (血流再逆転手術、図 2) を行い、病態改善が得られるかを長期的に検証する。



通常 (Normal) 血管吻合 (Vessel anastomosis) 血流逆転 (Blood flow reversal) 血管吻合 (Vessel anastomosis)

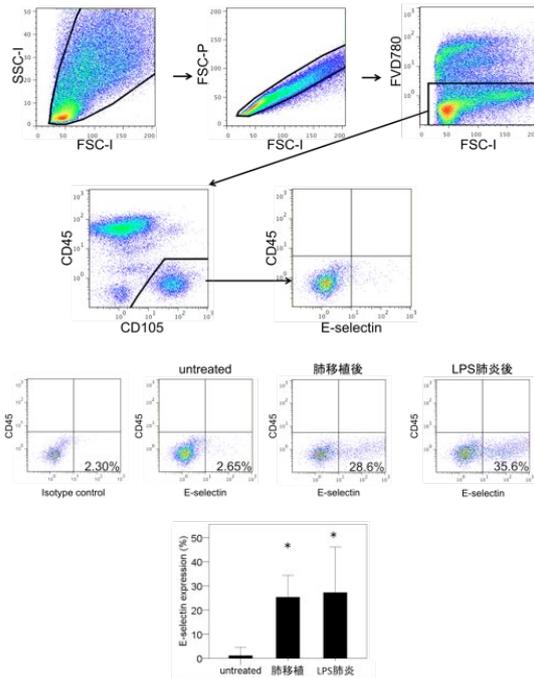
図 1 血流逆転ラット肺移植モデル



図 2 血流再逆転手術: 血流逆転モデルから、肺を摘出し、頭尾方向を 180 度変換したのち、再吻合

4. 研究成果

(1) 今回の実験では、近交系 Lewis ラットの同所性左肺移植モデルを用いて、移植後の急性肺損傷を評価し、グラフト肺血管内皮における E-selectin 発現をフローサイトメトリーで定量化した。結果、E-selectin の発現は移植後 4 時間の時点で約 20% の血管内皮細胞に認められた。

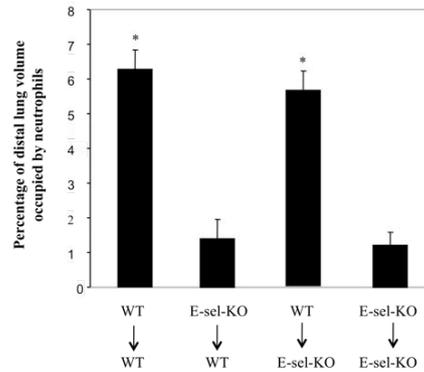
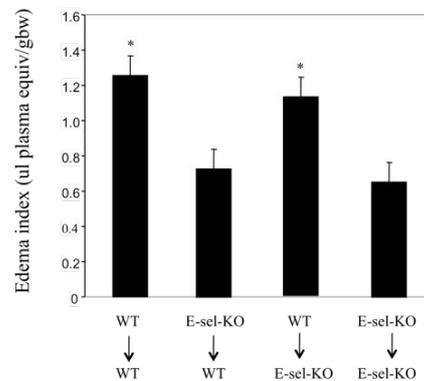
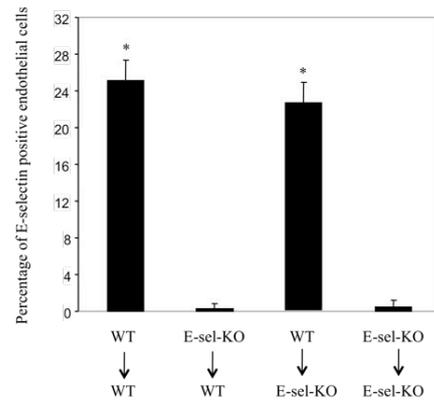


他モデルでの検証と比較したところ、LPS 肺炎 4 時間後に匹敵する E-selectin 発現量と考えられた。

血清中可溶性 E-selectin を測定したところ、それらは肺損傷と相関を示し ($p < 0.05$)、急性肺損傷の血清マーカーとして有用であると考えられた。

(2) WT(donor) → WT(recipient), E-sel-KO → WT, WT → E-sel-KO, E-sel-KO → E-sel-KO (WT: wild-type rat, E-sel-KO: E-selectin deficient rat) の 4 通りの肺移植を実施し、グラフト肺の肺損傷を比較検討した。その結果、E-sel-KO が donor の肺移植では、肺損

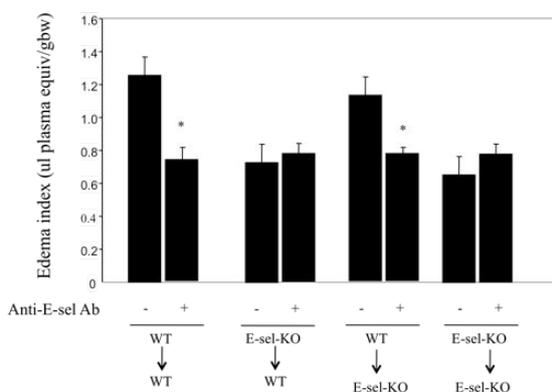
傷が有意に軽微であり、donor 肺血管内皮における E-selectin 発現が重要であると考えられた。



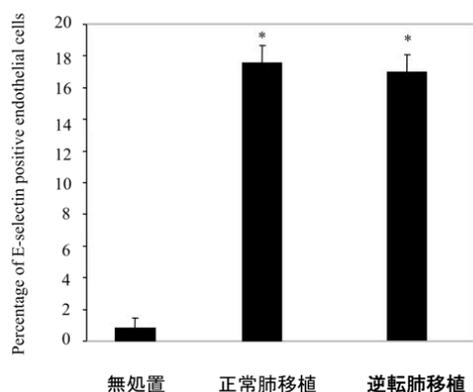
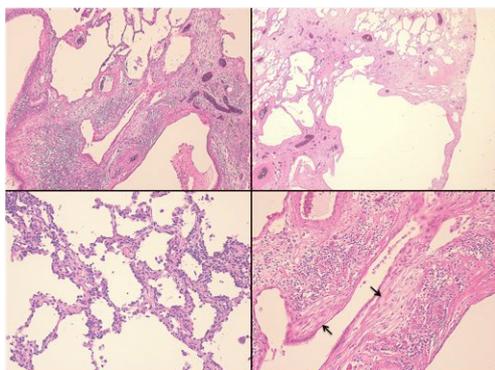
また、血清中可溶性 E-selectin も肺損傷と有意に相関し ($p < 0.05$)、グラフト肺の膜型 E-selectin から遊離分解により産生されたと考えられた。

(3) WT(donor) → WT(recipient)、WT → E-sel-KO の肺移植モデルにおいて、抗 E-selectin 抗体を投与したところ、肺損傷は有意に抑制された。一方、E-sel-KO → WT、

E-sel-KO→E-sel-KO の肺移植モデルでは、肺損傷が抑制されず、前述の結果が支持された。



(4) 血流逆転肺移植モデルを計 40 匹作成し、1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後、12 ヶ月後での組織学的評価を行った。今回、末梢肺を中心に IPF に類似した fibrosis が観察されており、新たな fibrosis モデルが開発されたと言える。急性期 E-selectin の発現についても検討したが、通常の肺移植モデルと有意差を認めなかった。また、血流の再逆転手術に伴う fibrosis の改善が得られなかった。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

なし

[学会発表] (計 0 件)

なし

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 太一郎 (Goto, Taichiro)

慶應義塾大学 医学部・共同研究員

研究者番号：80317148

(2) 研究分担者

大塚 崇 (Ohtsuka, Takashi)

慶應義塾大学 医学部・講師

研究者番号：40306717

奥井 将之 (Okui, Masayuki)

慶應義塾大学 医学部・助教

研究者番号：30594494

高橋 祐介 (Takahashi, Yusuke)

帝京大学 医学部・助教

研究者番号：00445214

安楽 真樹 (Anraku, Masaki)

東京大学 医学部附属病院・助教

研究者番号：70598557

(3) 連携研究者

なし