

令和元年6月6日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10692

研究課題名(和文) 肺移植における気道上皮被覆液中の薬物濃度測定と免疫制御

研究課題名(英文) Analysis of epithelial lining fluid in a canine lung transplant model

研究代表者

岩崎 正之 (IWASAKI, Masayuki)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：90223388

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)：気管支鏡下マイクロサンプリング法(Bronchoscopic microsampling, BMS)は低侵襲的で安全な検査であり、肺移植後の連続的な気道上皮被覆液(Epithelial lining fluid, ELF)の採取に有用である。肺移植モデルにおいて虚血再灌流障害が生じるとともに、再灌流開始後にELF中のTNF- α とIL-6濃度の持続的な上昇を認め、IFN- γ 濃度は逆に低下した。一方、移植前の虚血後非再灌流肺でELF中のサイトカイン濃度の上昇を認めなかった。サイトカインプロファイルの変化は移植後に生じる肺障害に関連していると考えられ、病態の理解、把握、解明に役立つ可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺移植は慢性進行性肺疾患に対する最終的な治療法として確立された。国際的な肺移植5年生存率約50%と比べ、本邦での5年生存率は約70%と優秀である。しかしながら、他の固形臓器移植と比較するとその成績は劣っていると云わざるを得ない。その要因は移植後に生じる様々な肺障害にある。本研究ではイヌ肺移植モデルに気管支鏡下マイクロサンプリング法BMSを用いて気道上皮被覆液ELFを採取し、虚血再灌流傷害に関連すると考えられる炎症性サイトカインのELF中の経時的濃度測定を行った。ドナー肺に生じる変化や状態の把握にELFの解析が有用である可能性が示唆され、治療成績の向上に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Ischemia-reperfusion injury resulting in post-transplant lung dysfunction involves a complicated network of cytokines that has yet to be fully investigated. We analyzed temporal changes in cytokine levels in epithelial lining fluid (ELF) from the distal airways of a canine lung transplantation model. ELF was collected via bronchoscopic microsampling, a minimally-invasive technique allowing repeated sampling. Concentrations of TNF- α and IL-6 significantly increased immediately after the start of lung reperfusion in the transplant group relative to the sham group ($P < 0.005$ and $P < 0.05$, respectively); both were sustained through the 5 hours. IFN- γ levels were significantly reduced 3 h after reperfusion started ($P < 0.05$). We found time- and cytokine-dependent changes in TNF- α , IL-6, and IFN- γ in ELF from the lung transplantation model. These specific changes in the cytokine profile may relate to the mechanism underlying post-transplant lung dysfunction.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺移植 気管支鏡下マイクロサンプリング法 気道上皮被覆液 炎症性サイトカイン 虚血再灌流障害

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺移植は慢性進行性肺疾患患者に対する治療法として確立され、移植数は年々増加しているが、肺移植後の成績は他の臓器移植と比較して劣っている。移植後早期には虚血再灌流障害が生じやすい。また、肺は外界と交通しているため免疫機構が発達し急性及び慢性拒絶反応が起こりやすいのである。そのため、免疫抑制剤の使用が強化され感染症も合併しやすくなる。肺移植後に生じる様々な肺障害の病態には不明な点も多く、研究の発展が望まれている領域である。一般に肺の病態把握には気管支肺胞洗浄 (Broncho-alveolar lavage: BAL) や経気管支的肺生検 (Transbronchial lung biopsy: TBLB) が用いられている。しかし、これらの検査は侵襲が大きく、肺移植後の呼吸状態、循環動態が不安定な状態では施行できないことが多い。一方、気管支鏡下マイクロサンプリング法 (Bronchoscopic microsampling: BMS) は、BAL に代わる低侵襲な検査として開発された。気道上皮被覆液 (Epithelial lining fluid: ELF) の原液を複数回、連続的に採取することが可能である。BMS を肺移植に適応し、ELF を解析することによって、移植肺に生じる様々な肺障害の病態解明や診断、治療法の確立に役立つ可能性がある。

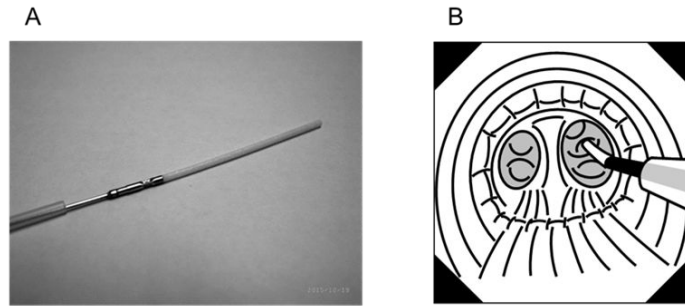


図1. 経気管支マイクロサンプリング法 (BMS)

2. 研究の目的

イヌ肺移植モデルにおいて移植後再灌流肺に BMS を適応し、ELF を連続的に採取し、虚血再灌流障害に関与すると思われる数種の炎症性サイトカインを測定、解析し、プロファイルの経時的变化を明らかにした。また、BAL 液、血漿中のサイトカインも測定し、比較検討を行った。炎症性サイトカインは Tumor necrosis factor (TNF)- α 、Interleukin(IL)-1 β 、Interleukin(IL)-6、Interferon(IFN)- γ を選択した。虚血後非再灌流肺においても BMS による ELF の採取と BAL 液の採取を行い、保存の前後で炎症性サイトカインの測定、解析を行った。

3. 研究の方法

雄性ビーグル犬(10-12 kg)を用いたイヌ同種左肺移植モデルで実験を行った。無作為に移植群(ドナー4匹、レシピエント4匹)とシャム手術群(2匹)に振り分けた。ドナー手術では4の臓器保存液を肺動脈から注入して肺を灌流した後、心肺を一塊として摘出した。ドナー肺の保存時間は12時間の4冷保存後、6時間の20温保存し、計18時間とした。レシピエント手術は生理学的指標を測定するため、スワンガンツカテーテルと動脈カテーテルを挿入留置する。レシピエント左肺摘出後、ドナー左肺を移植し、血流を再開させた。シャム群は肺門周囲の剥離のみを行った。再灌流開始後は1時間ごとに5時間後まで、BMSによるELFの採取と採血を行った。生理学的指標(血圧、脈拍、平均肺動脈圧、最高気道内圧)の記録と、動脈血液ガス分析により移植肺の機能評価も行った。5時間後、レシピエントを安楽死させ、肺を摘出してBAL液を採取した。摘出したドナー右肺を用いて、18時間の保存の前後で、BMSによるELF採取とBAL液の回収を行い、ELF、BAL液、血漿中のサイトカイン濃度はELISAで測定した。18時間保存後のドナー肺と、5時間再灌流後の移植肺で、TNF- α とIL-6の抗体を用いて免疫組織学的検討を行った。

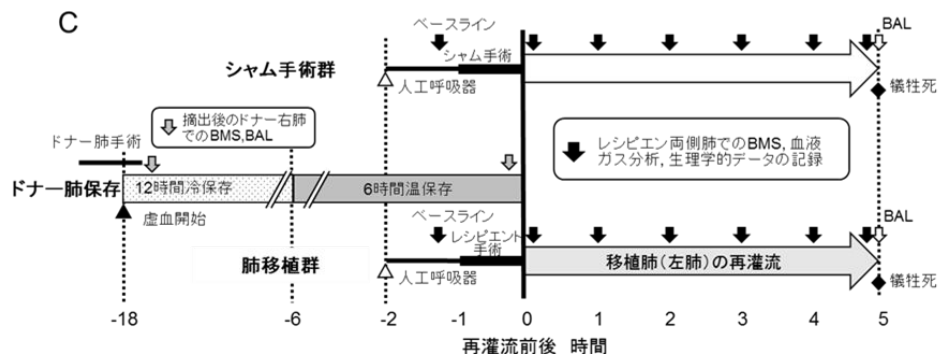


図2. 実験プロトコール

4. 研究成果

移植群では再灌流開始後に収縮期血圧は低下、心拍数は増加し、群間で有意差を認めたと、連続的 BMS の間はいずれも安定していた。平均肺動脈圧と最高気道内圧も安定していた。PEEP 5.0 cm H₂O、FiO₂ 1.0 の条件で PaO₂ は移植群では 3~5 時間後で 200mmHg 以下と有意に低下した。PaO₂ と pH は群間で有意差を認めた。ELF の採取量は 1 回あたり 6.0 ± 4.9 (mean ± SD) □l であった。移植肺ではシャム群と比較して有意に採取量が多かった。ELF 中の TNF- α 濃度は、シャム群では多くが測定限界以下であったのに対し、移植群では再灌流開始後から上昇し、5 時間後まで有意な上昇を認めた (反復測定分散分析 $P < 0.05$)。ELF 中 IL-6 濃度は、再灌流 1 時間後から 5 時間後までにおいてシャム群と比較して有意な上昇を認めた (反復測定分散分析 $P < 0.05$)。ELF 中 IFN- γ 濃度は再灌流 3 時間後から 5 時間後において、移植群で低下し、シャム群と有意差を認めた (反復測定分散分析 $P < 0.05$)。ELF 中 IL-1 濃度は移植群で有意な変化はなく、シャム群とも有意差を認めなかった。再灌流開始直後から 5 時間後までに採取した血漿中サイトカイン濃度はいずれも ELF 中濃度の 100 分の 1 以下で、有意な変化を認めず、シャム群との比較でも有意差を認めなかった。再灌流開始 5 時間後に採取した BAL 液中のサイトカイン濃度はいずれも ELF 中濃度の 100 分の 1 以下で、群間で有意差を認めなかった。移植しない虚血後非再灌流肺において採取した ELF 中の TNF- α 、IL-6、IFN- γ で虚血前と比較し有意な変化は認められなかった。IL-1 のみ虚血後に有意な低下を認めた。免疫組織学的検討では、再灌流開始 5 時間後の移植肺において、TNF- α 発現を血管内皮細胞と肺胞マクロファージに認め、IL-6 発現を肺胞マクロファージとリンパ球に認めた。

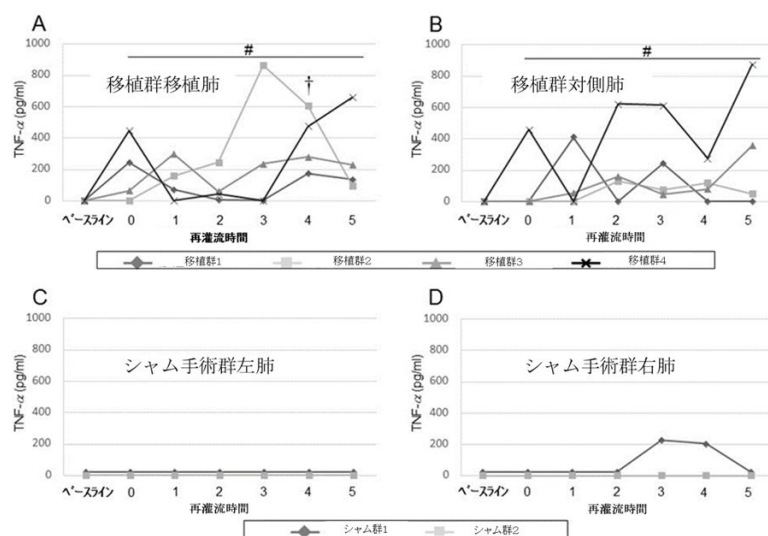


図 3. イヌ肺移植モデルにける気道上皮被覆液中 (ELF) 中 Tumor Necrosis Factor (TNF)-濃度

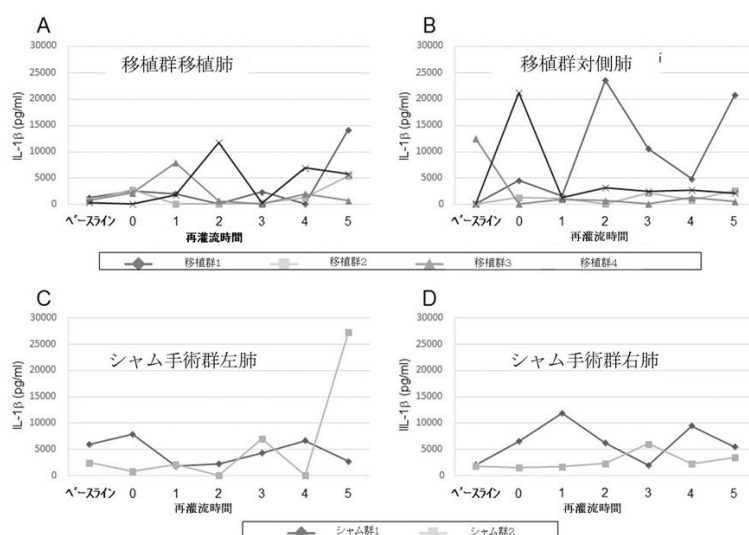


図 4. イヌ肺移植モデルにける気道上皮被覆液中 (ELF) 中 interleukin (IL)-1 濃度

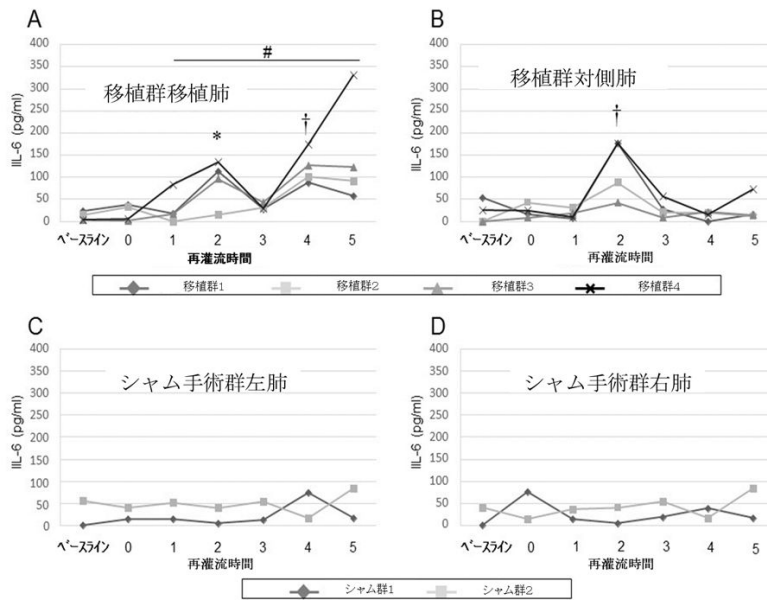


図5. イヌ肺移植モデルにおける気道上皮被覆液中 (ELF) 中 interleukin (IL)-6 濃度

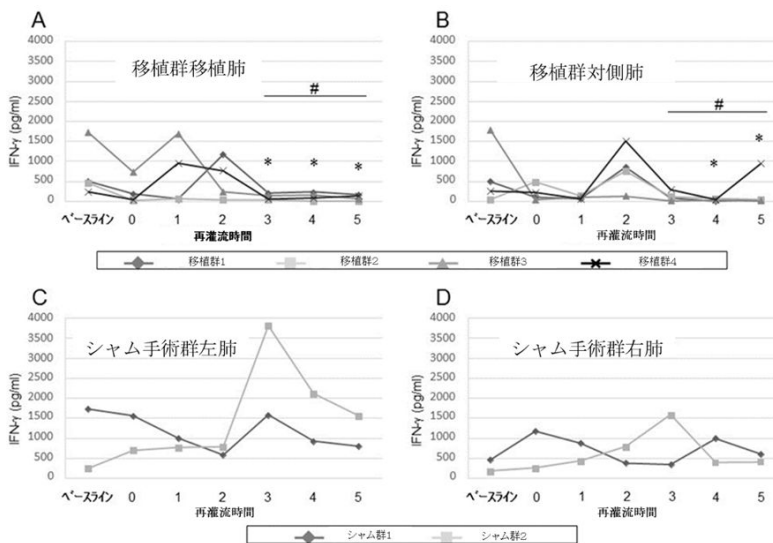


図6. イヌ肺移植モデルにおける気道上皮被覆液中 (ELF) 中 interferon (IFN)- γ 濃度

様々な炎症性サイトカインが肺移植後の虚血再灌流障害の発症のメカニズムに関与していると考えられているが、個々のサイトカインに関する詳細な検討は不十分であった。従来の方法、BAL や TBLB では検体の連続的採取が困難であることが、その一因となっている。本研究では、虚血再灌流障害を生じたと考えられるイヌ肺移植モデルにおいて、動物を犠牲死させることなく、かつ再灌流後 5 時間にわたり明らかな有害事象を生じることなく、BMS による ELF の連続的採取が可能で、4 つの炎症性サイトカイン濃度の経時的变化の解析を行うことが出来た。その経時的变化はサイトカインごとに異なり、TNF- α と IL-6 は再灌流開始 5 時間まで ELF 中濃度が上昇していたが、IFN- γ 濃度は再灌流 3 時間以降に低下していた。これらのサイトカインプロファイルの変化が、移植肺に生じる虚血再灌流障害発症のメカニズムに関与している可能性がある。一方、血漿中のサイトカイン濃度は低く、ダイナミックな変化は検出できなかった。障害を生じている局所で採取された検体でのサイトカイン解析の方が、虚血再灌流障害の病態の把握に適していると考えられた。BMS を用いた ELF の採取とサイトカイン濃度の測定は、保存 (虚血) 中のドナー肺に適応することが可能である。虚血中のドナー肺では ELF 中のサイトカイン濃度の上昇は認められなかったことから、サイトカインは再灌流開始後に急速に放出されると考えられた。再灌流開始 5 時間後の移植肺において、免疫組織学的に肺胞マクロファージやリンパ球に TNF- α と IL-6 の発現が確認でき、これらの細胞から放出されたサイトカイン

が末梢気道に流出したと考えられた。

肺移植モデルでBMSによって採取したELF中の4つの炎症性サイトカインプロファイルの経時的変化を明らかにした。虚血再灌流障害に伴い、再灌流開始後早期にELF中のTNF- α とIL-6の持続的な上昇を認めただ一方で、IFN- γ 濃度は低下していた。ELF中のサイトカイン濃度変化の解析は肺の病態の理解、把握、解明に有用である可能性があると思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

Wada A, Kohno M, Oiwa K, Hashimoto R, Koizumi T, Nakamura Y, Nakagawa T, Masuda R, Kaga K, Iwazaki M. Temporal Changes of Inflammatory Cytokine Profiles in Epithelial Lining Fluid in a Canine Lung Transplant Model. Tokai J Exp Clin Med. 2017;42(4):165-175. 査読有

Oiwa K, Kohno M, Hashimoto R, Nakagawa T, Masuda R, Nishiumi N, Kaga K, Iwazaki M. Serial Epithelial Lining Fluid Collection Using Bronchoscopic Microsampling in a Canine Lung Transplantation Model. Tokai J Exp Clin Med. 2016;41(4):218-226. 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

和田 篤史, 小野沢 博登, 壺井 貴朗, 生駒 陽一郎, 渡邊 創, 中野 隆之, 大岩 加奈, 河野 光智, 増田 良太, 岩崎 正之. イヌ肺移植モデルにおける気道上皮被覆液中炎症性サイトカインプロファイルの経時的変化の検討. 第35回日本呼吸器外科学会総会, 2018年

大岩加奈, 橋本 諒, 壺井 貴明, 矢ヶ崎 秀彦, 松崎 智彦, 濱本 篤, 中川 知己, 河野 光智, 増田 良太, 岩崎 正之. 肺移植モデル経気管支マイクロサンプリング法による虚血後再灌流肺と非再灌流肺のTNF- α 濃度の比較. 第34回日本呼吸器外科学会総会, 2017年

Ryo Hashimoto, Mitsutomo Kohno, Kana Oiwa, Tomoki Nakagawa, Ryota Masuda, Masayuki Iwazaki. Analysis of cytokines in epithelial lining fluid serially collected using bronchoscopic microsampling technique in a canine lung transplant model. 25th European Conference on General Thoracic Surgery, Innsbruck, Austria, 28-31 May 2017.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：河野 光智

ローマ字氏名：KOHNO, Mitsutomo

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：10276272

研究分担者氏名：増田 良太

ローマ字氏名：MASUDA, Ryota

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：10408057

研究分担者氏名：中川 知己

ローマ字氏名：NAKAGAWA, Tomoki

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：30439707

研究分担者氏名：大岩 加奈

ローマ字氏名：OIWA, Kana

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：30548045

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。