

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09303

研究課題名(和文) ネクロプトーシスを標的とした肺移植後虚血再灌流肺傷害に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment strategy against ischemia reperfusion lung injury after lung transplantation via the inhibition of necroptosis.

研究代表者

狩野 孝 (Kanou, Takashi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70528455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞死、特に新規細胞死として知られるネクロプトーシスを標的とした、肺移植後虚血再灌流肺傷害に対する新規治療法の開発を目標に研究を進めた。ラット肺移植モデルを確立し、複数の薬剤候補をテストしたところ、カルパイン阻害薬であるALLNが長時間虚血に伴う虚血再灌流肺傷害を顕著に抑制することを見出した。病理学的、生化学的解析をおこない、ネクロプトーシスの活性経路を抑制することで上記の効果を発現したと考えられた。解析に関しては順調に進んでおり、今後の学会活動や論文発表にむけて準備を進めている段階である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺移植実施症例数は年々増加しており、また移植を必要とする患者数も増加の一途である。一方、肺移植後の治療成績は他の臓器移植と比較して、いまだ不良である。特に急性期合併症に対する対策の確立が急務である。今回、カルパイン阻害薬を臓器の灌流保存液に添加することで肺移植後の虚血再灌流肺傷害を立証しえた。この結果にもとづき、細胞死を標的とした肺移植後の急性期合併症の予防法を確立することが本研究の学術的社会的意義と考える。

研究成果の概要(英文)：Our research was conducted with the goal of developing a new treatment for ischemia-reperfusion lung injury after lung transplantation, targeting cell death, especially necroptosis. After establishing a rat lung transplantation model and testing multiple drug candidates, it was found that the calpain inhibitor ALLN significantly suppressed ischemia-reperfusion lung injury associated with long-term ischemia and necroptosis. Pathological and biochemical analyzes were performed, and it was considered that the above effects were exhibited by suppressing the signal pathway of necroptosis. The analyses are proceeding smoothly, and we are in the process of preparing for future academic activities and thesis presentation.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺移植

1. 研究開始当初の背景

肺移植は終末期肺疾患に対する外科治療として本邦でも確立された治療法であるが、その治療成績は他の臓器移植と比較してまだまだ不良であり、その改善が急務である。虚血・再灌流肺傷害は肺移植術後急性期の死亡原因第 1 位である Primary Graft Dysfunction (PGD)の発症に大きく関わることが知られているが、有効な制御法は確立されていないのが現状である。

先行研究から虚血・再灌流肺傷害の病態に細胞死が深くかかわることが証明されており、細胞死を標的としたグラフト機能改善の新規戦略が期待される。申請者は細胞死の一つであるネクロプトーシス (Necroptosis) にかかわる経路の一つである RIPK-1 (Receptor Interacting Protein Kinase 1) の活性化をその阻害薬であるネクロスタチン (Nec-1) で抑制することで、肺移植後の虚血・再灌流肺傷害が軽減することを示してきたが、実地診療への応用までに課題が残っている。本研究では、細胞死とくにネクロプトーシスの制御による肺移植後の虚血・再灌流肺傷害に対する新規治療法の開発を目標とする。

2. 研究の目的

近年、ネクロプトーシスの制御に関する研究は急速にすすんでおり、上記の Nec-1 のみならずネクロプトーシス経路に対する新規阻害薬が複数報告されている。本研究の目的は、ネクロプトーシス経路のうちどの分子を阻害することで最も効果的な肺移植後虚血・再灌流肺傷害に対する治療となりうるかラット肺移植モデルを用いて比較検証することである。

RIPK-1 のシグナル伝達の下流である RIPK-3 に対する阻害薬による vivo 実験の報告はこれまで散見され、RIPK-1 と同様に治療の標的として注目を集める分子である。近年、細胞内の蛋白質分解酵素の一つであるカルパインの抑制が、RIPK-3 の活性を抑制し Necroptosis の改善につながると報告されていることに注目した。その阻害薬である ALLN を用いて、肺移植後の虚血再灌流肺傷害の治療に応用可能かどうかを調べることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

今回、ラット肺移植モデルでカルパイン阻害薬 (ALLN) による肺移植後虚血再灌流肺傷害の改善効果を検討した。雄 Lewis ラット (体重 250-350g) を用い、傷害群/治療群を各々 8 例ずつに分けた。ドナー側は全身麻酔下にヘパリン化、肺動脈カニューレーション後、臓器保存液 (ET-Kyoto 液 20ml) で灌流し、心肺ブロック摘出後、臓器保存液内 (20ml) で 15 時間 4 保存した。その後、左肺を分離、レシピエント側に左肺移植を行い 2 時間再灌流後に各種解析をおこなった。治療群は臓器保存液内に ALLN10mg/kg を、傷害群は溶媒のみを含有した。シャム群は 5 例行い、全身麻酔 + 開胸処置を行うのみとした。評価項目は生理学的所見 (血液ガス分析, 湿乾重比), 病理学的所見、シグナル伝達経路、炎症性サイトカイン量を選択した。

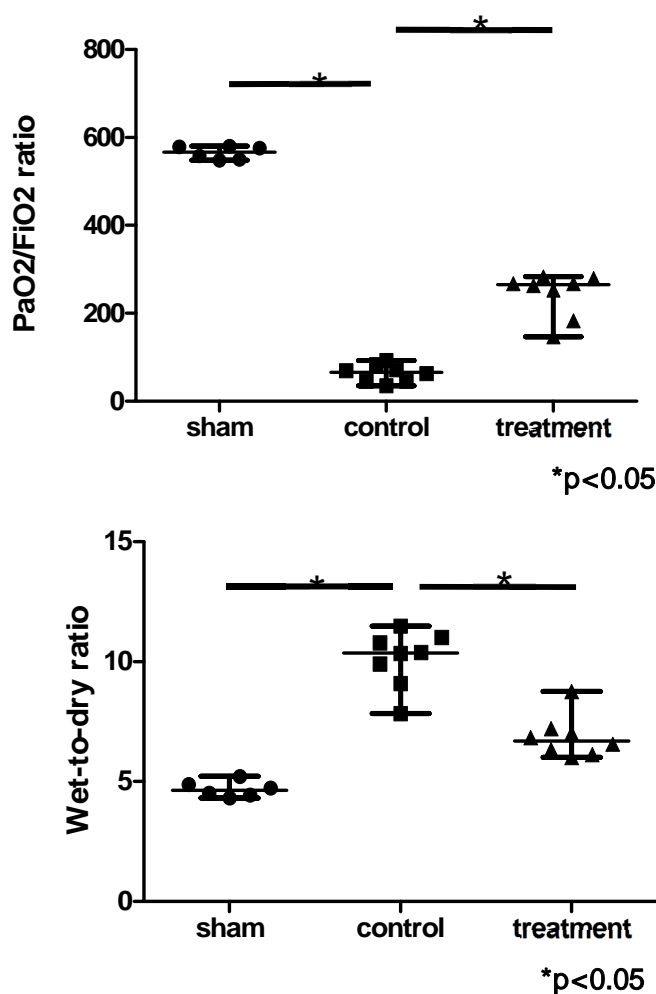
4. 研究成果

【結果】図 1 に示すように。肺生理学的機能に関して治療群は傷害群に比べ、動脈血酸素分圧 (中央値 265 mmHg vs 65.5 mmHg, $p < 0.0001$) が有意に高く、二酸化炭素分圧

は有意に低下しており（中央値 42.35 mmHg vs 53.1 mmHg, $p=0.0004$ ）グラフト肺におけるガス交換能の著明な改善を認めた。肺水腫の指標となる湿乾重比も治療群で有意な改善を認めており（中央値 6.70 vs 10.36, $p<0.0001$ ）肺水腫の抑制に寄与していた。病理所見では、気道内出血（HE 染色）、肺胞もしくは間質内の好中球浸潤（MPO 染色）において治療群で改善を認めた。また肺組織でのウェスタンブロットでの解析にて、治療群における necroptosis 経路の抑制を認めており、期待した薬理作用によりグラフト肺における細胞死が抑制されたことが示唆された。

これらの結果から、ALLN を臓器保存液に含有させることで、抗 necroptosis 作用を介し、肺移植後虚血再灌流肺傷害を軽減しグラフト機能の改善につながることを示唆された。今後はこの研究成果をもとに、さらなる条件検討ならびに、臨床応用へフィードバックを目指した大動物実験を立案したい。

図1 カルパイン阻害薬による虚血再灌流肺傷害への治療効果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松井優紀
2. 発表標題 カルパイン阻害薬による肺移植後虚血再灌流肺傷害の抑制効果の検討
3. 学会等名 第39回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 狩野孝
2. 発表標題 肺移植後虚血再灌流肺傷害の克服を目指したトランスレーショナルリサーチ
3. 学会等名 第39回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2022年

〔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	南 正人 (minami masato) (10240847)	大阪大学・医学部附属病院・特任教授（常勤） (14401)	
研究分担者	大瀬 尚子 (ose naoko) (10570559)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	舟木 壮一郎 (funaki soichiro) (50464251)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	新谷 康 (shintani yasushi) (90572983)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	

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