

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24011

研究課題名(和文) 抗炎症作用を有する脂質メディエーターの肺移植領域への応用可能性

研究課題名(英文) Specialized pro-resolving lipid mediators in an experimental model of lung transplantation

研究代表者

田中 里奈 (Tanaka, Satona)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80847517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸から生成され抗炎症作用を有する脂質メディエーターの虚血再灌流肺障害への応用可能性を探索するため、ラットの肺門を一定時間遮断して換気血流を遮断したのちに遮断を解除、換気血流を再開し虚血再灌流肺障害を生じさせるラット肺門クランプモデルにおいて、抗炎症性脂質メディエーターの受容体の1つであるFPR2に作用するAspirin-triggered Resolvin D1と、Aspirin-triggered Lipoxin A4が、肺障害を軽減すること、抗炎症効果をもたらすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血状態におかれた肺に換気と血流が再開されることにより発症する虚血再灌流肺障害は、肺移植後においては早期の主要な死亡原因のみならず、移植肺の長期成績に影響する。その肺障害の要因は過度な炎症であることが報告されている。今回、申請者は、FPR2受容体に作用するAspirin-triggered Resolvin D1と、Aspirin-triggered Lipoxin A4が虚血再灌流肺障害肺障害に対して保護効果をもたらすことを明らかにした。本研究は、虚血再灌流肺障害における過度な炎症を抑制し臓器を保護するの新たな治療法の提案の基礎になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Specialized pro-resolving lipid mediators (SPMs), which are produced from Arachidonic acid, Docosahexaenoic acid, and Eicosapentaenoic acid in vivo to resolve inflammation, have been identified. To investigate the role of SPMs in pulmonary ischemia-reperfusion injury, we utilized a hilar clamp model in rat, where the blood supply and ventilation are intercepted by occluding left hilum and then reperfusion is resumed by releasing the occlusion to induce acute lung injury. In this experimental model of pulmonary ischemia-reperfusion injury, Aspirin-triggered Resolvin D1 and Aspirin-triggered Lipoxin A4 agonistic to FPR2 receptor attenuated acute lung injury with improved lung physiology and anti-inflammatory effect.

研究分野：肺移植

キーワード：虚血再灌流障害 肺移植 抗炎症性脂質メディエーター

## 1. 研究開始当初の背景

肺移植後の虚血再灌流肺障害(Ischemia-reperfusion injury; IRI)は、術後早期の主要な死亡要因である。したがって、IRIの予防・治療は、肺移植後の成績向上のために必須である。また、IRIは血栓塞栓後、心肺蘇生後などでも発症しうる急性肺障害である。一度発症すると、人工呼吸器や体外循環による呼吸循環のサポート、ステロイドや利尿剤の投与などの対処療法が行われるが、病態生理メカニズムに基づいた有効な治療薬はない。

IRIによる臓器障害は、障害された血管内皮から好中球が血管外に浸潤することで引き起こされる「炎症」により増悪することが知られている。肺移植においては、IRIによる過度の「炎症」は移植後のアロ免疫応答(移植片の拒絶反応)も惹起すると報告されている。また肺移植の臨床研究からは主にIRIによって引き起こされる術後早期の移植肺機能不全は慢性拒絶発症に影響すると報告されている。したがって、IRIの病態生理メカニズムに基づいた治療法の開発は、肺移植後早期の死亡率低下に寄与するだけでなく、その後の拒絶反応も抑制し、遠隔期の成績をも改善しうる。

今回、抗炎症作用を有する脂質メディエーターとして同定された Arachidonic Acid、Eicosapentaenoic Acid、Docosahexaenoic acid から生成される Specialized pro-resolving mediator (SPM) に着目した。SPMは、種々の疾患モデルで過度な炎症による臓器障害を抑制すると報告されている。またその作用は、主にGタンパク質共役型受容体を介することが明らかになってきた。肺移植領域においてその効果の検討はない。SPMのIRIに対する効果を検討し、SPMの移植領域における臨床応用の可能性について探索する。

## 2. 研究の目的

SPMの移植領域への応用可能性を探索する第1歩として、小動物IRIモデルにおいて upregulate されているSPMの受容体を明らかにし、その受容体に作用するSPMを投与してその効果を生理学的側面と、分子生物学的側面から検討することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

小動物IRIモデルとして、ラットの左肺門部をクランプ、90分間左肺の換気血流を遮断し、その後換気血流を再開して再灌流とし、急性肺障害を発症させるラット左肺門クランプモデルを用いた。

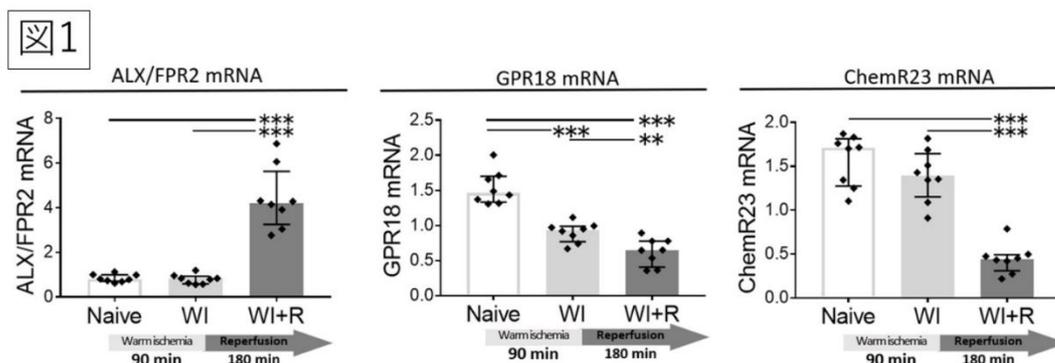
このラット肺門クランプモデルにおいて、90分間温虚血後の左肺、90分間温虚血・180分再灌流後の左肺を採取し、手術操作を行わない肺組織をコントロールとして、RT-PCR法と免疫染色による、SPMの受容体発現の検討を行った。

さらに、90分温虚血後・再灌流前に注目したSPMsもしくはその溶媒(Vehicle)を投与し、180分間の再灌流後に、小動物用の呼吸機能測定機器(flexiVent)を用いて左肺の生理学的データを測定した。再灌流後の左肺を採取し、免疫染色や病理組織学的検討、組織ライセートを用いたELISA法によるサイトカインの測定を行った。

また、SPMの作用を肺移植モデルで検討するため、マウスの心肺ブロックを臓器保存液で還流後に採取、左右の肺に分離して左肺を同所性に移植し再灌流を行うマウス肺移植モデルの確立を目指した。

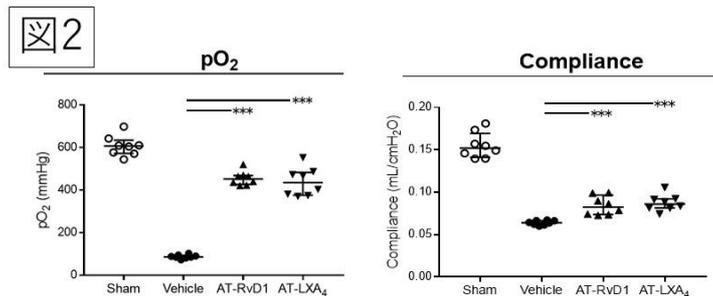
## 4. 研究成果

ラット左肺門クランプモデルにおいて、手術操作を行わない左肺(naive)、90分間温虚血後の左肺(WI)、180分間再灌流後(WI+R)の左肺を用いて、SPM受容体(FPR2、GPR18、ChemR23の発現検討)を行った。この3つの受容体のうち、FPR2のmRNA発現のみが、180分間再灌流後に上昇していた(図1)。また、免疫染色によっても、再灌流後には気道上皮に加え、肺内に浸潤する炎症細胞にFPR2が発現していることが確認された。

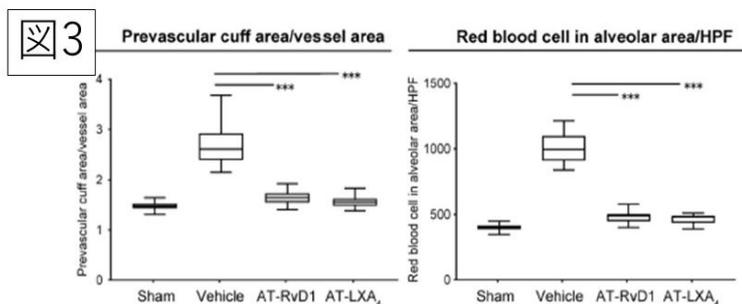


そこで、FPR2 受容体に作用する SPM は、IRI において保護効果を有するという仮説をたてた。FPR2 受容体にアゴニスト作用をもつ SPM である、Resolvin D1 と Lipoxin A<sub>4</sub> に注目した。これらは分解を受けやすい脂質メディエーターであるため、より安定したアスピリン誘導体である Aspirin-triggered (AT) resolvin D1(AT-RvD1)と AT-lipoxin A<sub>4</sub>(AT-LXA<sub>4</sub>)を用いた。AT-RvD1、AT-LXA<sub>4</sub> もしくは Vehicle を、ラット肺門クランプモデルにおいて 90 分間温虚血後・再灌流前に静脈内投与し、180 分間の再灌流を行った。Sham 群は開胸のみを行った。

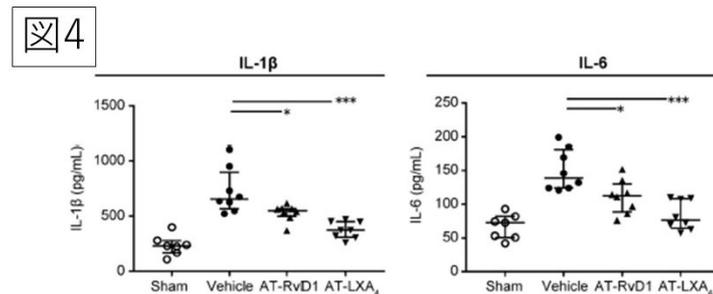
AT-RvD1 投与群、AT-LXA<sub>4</sub> 投与群では、Vehicle 投与群とくらべ、動脈血酸素分圧、動肺コンプライアンスの改善がみられた(図 2)。このパラメーターの他にも、最大気道内圧、平均気道内圧などの種々の肺生理データの改善が得られた。



左肺組織の検討により、血管周囲の浸出液の減少(Perivascular fluid cuff area)、肺内出血所見(Red blood cells in alveolar area)の改善がみられた(図 3)。また、Myeloperoxidase 染色により好中球を染色し血管外好中球をカウントすると、肺内に浸潤する好中球数の有意な減少がみられた。



肺組織ライセートを用いて ELISA 法を行うと、炎症性サイトカインの代表である IL-1、IL-6 の有意な減少がみられた(図 4)。  
(\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ )



これらの結果から、FPR2 受容体に作用する SPM(AT-RvD1、AT-LXA<sub>4</sub>)は、IRI においても抗炎症作用を発揮し、肺障害に対する保護効果を有すると考えられた。

SPM の投与や、SPM 受容体に対する介入は IRI を改善させる有効な治療法の確立につながる可能性が示唆された。これらの知見を肺移植モデルで validation するため、マウス肺移植モデルを当科でも確立し、実験条件の最適化を行っている。さらに、臨床肺移植において、肺炎合併などドナー肺グラフトの「過度な炎症状態」がその後の移植肺機能や経過に影響するかを臨床研究として検証している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中里奈、山田義人、豊 洋次郎、大角明宏、中島大輔、濱路政嗣、陳（芳川）豊史、伊達洋至
2. 発表標題 肺炎を合併したドナー肺の移植成績
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中里奈、Daniel Kreisel
2. 発表標題 免疫寛容を誘導したマウス移植肺における三次リンパ組織形成の制御機構
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中里奈、Daniel Kreisel
2. 発表標題 Recipient Monocytes Activated by Endobronchial Bacterial Lipopeptide Prevent Tolerance Induction after Lung Transplantation via Toll-like receptor 2 Signaling
3. 学会等名 第72回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中里奈、伊達洋至、Wenjun Li、Daniel Kreisel
2. 発表標題 肺移植の免疫寛容における制御性T細胞
3. 学会等名 第56回日本移植学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中里奈、豊 洋次郎、山田義人、大角明宏、中島大輔、濱路政嗣、伊達洋至
2. 発表標題 肺移植における高齢ドナー・高齢レシピエントの移植成績
3. 学会等名 第56回日本移植学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾田博美、田中里奈、横山雄平、池田政樹、徳野純子、上田聡司、栢分秀直、豊洋次郎、山田義人、大角明宏、濱路政嗣、中島大輔、伊達洋至
2. 発表標題 肺の虚血再灌流障害に対するALX/FPR2を介したResolvin D1およびLipoxin A4の効果
3. 学会等名 第56回日本移植学会総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------