

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592063

研究課題名(和文)心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害の機序解明と抑制

研究課題名(英文) Mechanism and inhibition of ischemia reperfusion injury after lung transplantation from donation after cardiac death

研究代表者

岡崎 幹生 (OKAZAKI, MIKIO)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50467750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害におけるmolecular mechanismは不明な部分が多く、臨床応用のためにもその解明が必要である。本研究では同所性肺移植モデルを用いて、心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害のメカニズムおよび抗炎症作用の働きを解明することを目的とした。心停止ドナーからの肺移植では、ドナー肺の機能は再灌流後に著明に改善していた。また、これには抗炎症作用が重要な働きをしていることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although lung transplantation from donation after cardiac death (DCD), is limited by warm ischemic periods, the molecular mechanism of warm ischemia-reperfusion-injury (IRI) has not been well elucidated. The purpose of this study was to clarify the particular longitudinal mechanisms of molecular factors involved in warm IRI. This study indicates that anti-inflammatory pathways may play important roles in the graft recovery after lung transplantation from DCD.

研究分野：肺移植

キーワード：肺移植 虚血再灌流障害 心停止ドナー

1. 研究開始当初の背景

肺移植は終末期肺疾患の唯一の治療法であるが、ドナー不足は深刻な問題である。2010年の臓器移植法の改正により脳死ドナーは増加しているものの、ドナー不足の解消には至っていないのが実情である。脳死ドナーが多い海外諸国においてもドナー不足は深刻で、近年はその解決策として心停止ドナーからの肺移植が臨床で行われるようになった。本邦ではドナー不足がより深刻であるにもかかわらず、いまだ法整備が整っておらず、心停止ドナーからの肺移植は行われていない。本邦でもその臨床応用に向けて更なる研究による安全性の検証・実証が急務となっている。

心停止ドナーからの肺移植の研究は、大動物モデルを使用し、肺移植後の肺機能などについて評価したものが多く、その molecular mechanism にまで言及した基礎的研究はほとんどない。心停止ドナーからの肺移植でもっとも問題となるのは温虚血再灌流障害であるが、今まで温虚血再灌流障害にフォーカスをあてた研究も数少ない。さらに温虚血再灌流障害は冷虚血再灌流障害の程度が大きくなったものであるという認識をされてきたが(Warnecke et al. Thorac Cardiovasc Surg 2004)、われわれは両者にメカニズムの相違があるのではないかと仮定した。

われわれは、これまでに肺移植後の虚血再灌流障害 (Okazaki et al. Am J Transplant 2007 など) や免疫応答 (Okazaki et al. Am J Respir Cell Mol Biol 2007; Gelman et al. J Immunol 2008; Okazaki et al. Am J Transplant 2010 など) に関する研究をすすめてきた。また、心停止ドナーからの肺移植を臨床応用すべく、大動物モデルを用いた研究も行った。心停止ドナーにおけるドナー肺の保護に関する研究成果を報告し (Okazaki et al. J Heart Lung Transplant 2006 など) また最近では Ex vivo 回路を用いた心停止ドナー肺の評価・維持・保護などに関する研究をすすめてきた (Kakishita et al. Ann Thorac Surg 2010)。

2. 研究の目的

心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害における molecular mechanism は不明な部分が多く、臨床応用のためにもその解明が必要である。我々の研究成果では、心停止ドナーからの肺移植後の移植肺の機能改善に抗炎症作用が強く関与している可能性が示唆される。また、心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害は生体・脳死肺移植後の虚血再灌流障害とは異なった病態である可能性も示唆された。本研究では、心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害のメカニズムおよび抗炎症作用の働きを解明し、さらに心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害の抑制・予防することを目的とする。

3. 研究の方法

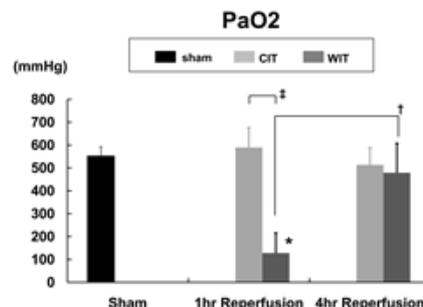
ラット同所性肺移植モデルを用いて、総虚血時間が4時間になるよう冷虚血肺 (生体ドナー群) と温虚血肺 (心停止ドナー群) を作製する。全身麻酔下にドナー肺を摘出し、冷虚血肺は4で、温虚血肺は28で保存する。レシピエントに全身麻酔を施行し、左開胸し、左肺を摘出する。その後、ドナー肺を総虚血時間が4時間になるように左片肺移植を施行する。肺移植から1時間後と4時間後に右肺門部をクランプして、左片肺の換気・血流にし、5分後に動脈血を採取し、動脈血ガスによる移植肺の機能を分析する。その後、移植肺は摘出し、-80で保存する。

グラフト肺内の炎症性サイトカイン、ケモカイン、MAPKsなどのmoleculeをPCR法、ウェスタンブロッティング法で解析する。また、気管支肺胞洗浄 (BAL) やグラフト肺から採取したリンパ球、マクロファージ、血管内皮細胞をフローサイトメトリー法で分析する。また病理組織学的に再灌流障害の程度 (H&E、免疫染色) やネクローシス・アポトーシス (Tunnel染色) の評価を行う。

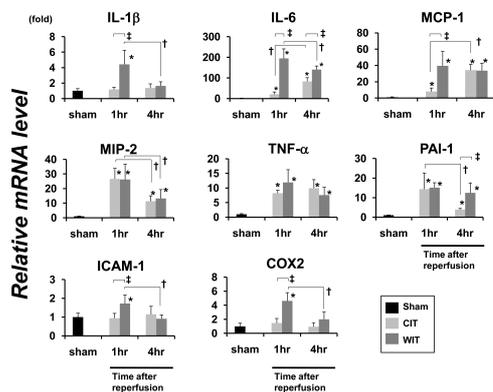
さらに、肺移植後のレシピエントの呼気一酸化炭素濃度を経時的にモニタリングし、呼気一酸化炭素濃度およびグラフト内の抗炎症物質との関係を分析する。

4. 研究成果

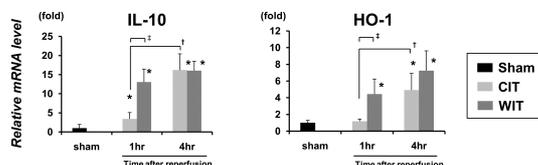
ラット同所性肺移植モデルを用いて、総虚血時間が4時間になるよう冷虚血肺 (生体ドナー: CIT群) と温虚血肺 (心停止ドナー: WIT群) を作製し、移植した。移植から1時間後に心停止ドナー群で有意に PaO₂ は低値だった (下図)。しかし、移植から4時間後には心停止ドナー群の肺機能は改善し、生体ドナー群と同等の良好な PaO₂ を呈した。心停止ドナー肺は、移植後にレシピエント体内で著明に肺機能が改善しており、このような現象は生体ドナー群ではみられにくい。肺移植後に速やかに虚血再灌流障害が抑制されており、抗炎症性サイトカインなどの抗炎症作用が重要な働きをしている可能性が示唆された。また、このメカニズムの解明は心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害に対する治療のターゲットの特定につながると考えられる。



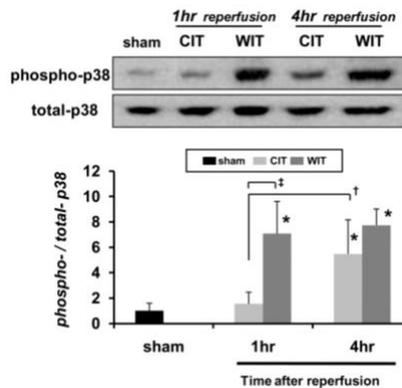
グラフト内のサイトカインの発現量を PCR 法で解析したところ、心停止ドナー群における IL-1, IL-6, MCP-1, MIP-2, TNF-, PAI-1, ICAM-1, COX2 などの炎症性サイトカインの発現は移植から 1 時間後には Sham 群より有意に高くなっていた (下図)。移植から 1 時間後の心停止ドナー群の IL-1, IL-6, MCP-1, ICAM-1, COX2 の発現は生体ドナー群と比較して、有意に高かったが、移植から 4 時間後には IL-6 以外のサイトカインの発現は両群に有意差を認めなかった。MIP-2 と TNF- の発現は移植から 1 時間後も 4 時間後も両群に差はみられなかった。PAI-1 の発現は移植から 1 時間後の発現は両群に差を認め一群が有意に低くなっていた。肺機能だけでなく、グラフト肺内のサイトカインの発現量や経時的発現パターンは生体ドナー群と心停止ドナー群で非常に異なっており、両者のメカニズムに相違があると考えられた。



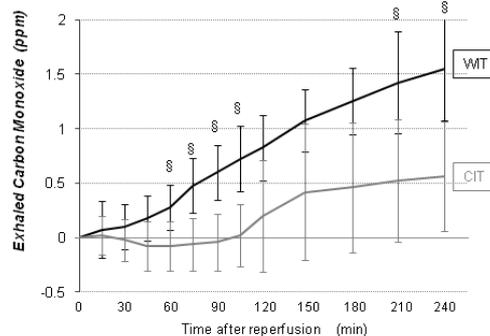
肺移植後のグラフト肺内の抗炎症性サイトカインなどの抗炎症物質 (IL-10, HO-1 など) MAPKs などを PCR 法、ウェスタンブロッティング法で解析したところ、生体ドナー群では移植から 1 時間後よりも 4 時間後に IL-10 や HO-1 の発現が有意に高くなっていた (下図)。心停止ドナー群では再灌流から 1 時間後には IL-10 や HO-1 が高発現しており、4 時間後も高発現を維持していた。



IL-10 は p38 MAPKs の活性化を通じて HO-1 の発現を誘導するとされる。p38 MAPKs をウェスタンブロッティング法で解析した。生体ドナー群では移植から 4 時間後のみ活性化していたが、心停止ドナー群では 1 時間後には生体ドナー群よりも有意に活性化しており、4 時間後も活性化を維持していた。



低用量一酸化炭素は肺移植後の虚血再灌流障害を抑制するとされるが (Kohmoto et al. Am J Transplant 2009)、今まで肺移植後の呼気一酸化炭素濃度を測定した実験の報告はなく、今回心停止ドナーおよび生体ドナーからの肺移植後のレシピエントの呼気一酸化炭素濃度を経時的にモニタリングし、呼気一酸化炭素濃度およびグラフト内の抗炎症物質との関係を分析した。脳死ドナー群では呼気一酸化炭素濃度は移植から 120 分ころから高値となり、その後も少しずつ上昇した。それに対して、心停止ドナー群では移植直後から呼気 CO 濃度の上昇がみられ、移植 60 分後から 105 分後まで、210 分後から 240 分後までの間は、脳死ドナー群と比較して有意に高値であった。



以上のように肺移植モデルを用いて、生体ドナーと心停止ドナーからの肺移植後の肺機能および molecular mechanism の相違について検討した。生体ドナーと心停止ドナーからの移植後の肺機能の変化は異なっていた。また、炎症性サイトカインの発現や変化にも相違があり、生体ドナーからの肺移植と心停止ドナーからの肺移植の間には molecular mechanism にも相違があると考えられた。特に心停止ドナー肺は移植後にレシピエント体内で著明に肺機能が改善しており、このような現象は生体ドナーからの肺移植ではみられにくく、新しい発見であった。心停止ドナーからの肺移植後に速やかに虚血再灌流障害が抑制されているため、抗炎症性サイト

カインなどの抗炎症作用が重要な働きをしている可能性が示唆された。IL-10、HO-1、p38 MAPKs などの抗炎症性物質を分析したところ、生体ドナー群と異なり、心停止ドナー群では移植から1時間後にはいずれも高発現しており、4時間後にも高発現を継続していた。また、呼気一酸化炭素濃度の推移も生体ドナー群と比較して、心停止ドナー群では速やかに上昇しており、両群に相違があった。心停止ドナー肺が移植後のレシピエント体内で肺機能が改善したのは、このIL-10、p38 MAPKs、HO-1を介した抗炎症作用が重要な働きをしていることを強く示唆する結果であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

岡崎幹生, 佐野由文, 坂尾伸彦, 湯汲俊悟, 重松久之, 泉谷裕則. 心停止ドナーにおける血管内皮細胞の破綻. 第49回日本移植学会総会 2013年9月5日~9月7日、国立京都国際会館(京都府京都市)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 幹生 (Okazaki, Mikio)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50467750

(2) 研究分担者

佐野 由文 (Sano, Yoshifumi)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：60322228

山根 正修 (Yamane, Masaomi)
岡山大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20432643

(3) 連携研究者

なし