

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462123

研究課題名(和文) ヒストン関連血管内皮障害に着目した移植後肺機能不全の機序解明

研究課題名(英文) Mechanisms of histone-induced lung reperfusion injury after lung transplantation

研究代表者

安樂 真樹 (Anraku, Masaki)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：70598557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：外因性ヒストンを直接静脈投与することで、肺障害を生じる動物モデルを今回確立した。ヒストン関連肺障害を生じたドナー肺を摘出し、同系ラットに移植し、移植後肺障害、とくに血管内皮障害、微小循環障害の観点から検討した。ヒストン関連肺障害に関しては炎症マーカー(CXCL-1など)や低酸素障害マーカー(HIF-1,2など)で評価した。ヒストン投与後、移植早期の段階で(1時間程度)非常に強い組織障害と血管抵抗増大が起こっていることを観察し得た。微小循環改善に重要な因子であるトロンボモジュリンを投与したところ抗炎症効果より線溶系活性により働くことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Histone is one of intra-nucleoous proteins that could act as so-called danger signal that leads to tissue inflammation and subsequent tissue injury. Massive histone release into the blood stream can be observed when critical tissue damage(eg, brain stroke, SAH, trauma, and so on) occurs. In this project, we had investigated the histone-induced lung injury in the setting of lung transplantation. Significant lung graft damages after lung transplantation with histone-pretreated lung graft in a rat transplant model was observed. Recombinant thronbomodulin was found to have anti-hypoxic lung injury effects, but minimal effects as anti-inlammatory reagent.

研究分野：肺移植

キーワード：ドナー肺障害 ヒストン障害 移植 虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

臓器移植法改正により、2010年7月17日から本人の臓器提供の意思が不明な場合にも、家族の承諾があれば臓器提供が可能となった。法改正以後、臓器提供者(ドナー)数および臓器移植件数は増加している。肺は脳死下臓器提供に至るまでのプロセスで様々な障害やストレスを受けることから、移植に不適当と判断され実際に使用できず、結果としてドナーまたドナーご家族の貴重な意思を生かせない可能性が他の臓器に比べ高いことが知られている。

肺移植後の移植肺不全(primary graft dysfunction, PGD)は肺移植の術後成績に大きな意義を占めているが、移植ドナー肺はすでに種々の障害にさらされておりそれらの障害が虚血、再灌流のプロセスを経ることで臓器機能障害を引き起こす。

ドナー肺の受ける障害を時相別で考えると、ドナーより摘出する前、肺摘出・体外保存中、肺移植再灌流後、の大きく3つに分けられる。3時相のうち、のドナー肺摘出後の虚血肺組織障害をいかに軽減できるかは移植術後の予後を考える上で重要であり、申請者らは虚血後再灌流障害ラットモデルを用いて研究してきた(平山、安樂ら J Heart Lung Transplant. 2009;28:1180-4)。また移植前ドナー肺のガス交換能(血液ガス結果)や肺摘出時の実際の触診による臓器能評価は完全ではなく、血液ガスや触診上良好でも移植後に移植肺不全を来す症例を経験することから申請者らは先の と の時相で起こりうるドナー肺障害のメカニズムを、遺伝子発現プロファイルを詳細に調べ、特定の遺伝子発現が移植後の移植肺不全と関連することを報告してきた(安樂ら Am J Transplant. 2008;8:2140-8)。

近年核内物質の一つであるヒストンが血中に遊離、循環することで臓器障害、特に肺組織に障害を与えることが明らかになって

きた(Abrams ST et al., Am J Respir Crit Care Med 2013;187:160-9)。血中ヒストンは濃度依存性に血管内皮を傷害するが、興味深いことに血中へのヒストン放出は脳血管障害でも生じることが報告され始めており(Shein NA et al., Mol Med 2011;17:448-56)、脳死に至る過程で血中ヒストン濃度が上昇することを示唆している。

また重篤な脳血管障害後の肺水腫(neurogenic lung edema)の原因に、炎症性サイトカインの血中放出が挙げられる。好中球はヒストンに暴露されるとヒストンの濃度依存性に炎症性サイトカインであるinterleukin-6 (IL-6)を放出することが確かめられている(次ページ図、Abrams ST et al., Am J Respir Crit Care Med 2013;187:160-9)。

2. 研究の目的

肺移植後の移植肺不全(primary graft dysfunction, PGD)は肺移植の術後成績に大きな意義を占めているが、移植ドナー肺はすでに種々の障害にさらされておりそれらの障害が虚血、再灌流のプロセスを経ることで臓器機能障害を引き起こす。本研究では脳死ドナー肺がさらされる種々の障害の一つと考えられる核内物質(ヒストン)関連肺血管内皮障害の意義とその機序を明らかにするのが目的である。またドナー肺摘出術周術期における肺血管内皮障害の軽減が、移植後肺機能に関連するかを問う。

3. 研究の方法

本研究では脳死ドナー肺がさらされる種々の障害の一つと考えられる核内物質(ヒストン)関連肺血管内皮障害の意義とその機序を明らかにするため一連の実験を行った。またドナー肺摘出術周術期における肺血管内皮障害の軽減が、移植後肺機能に関連するかも検討した。

ドナー肺の受ける障害を時相別で考えると、ドナーより摘出する前、肺摘出・体外保存中、肺移植再灌流後、の大きく3つ

に分けられる。

3 時相のうち、 のドナー肺摘出後の虚血肺組織障害をいかに軽減できるかは移植術後の予後を考える上で重要であり、今回虚血後再灌流障害ラットモデルを用いて検討を行った。また臨床的には移植前ドナー肺のガス交換能（血液ガス結果）や肺摘出時の実際の触診による臓器能評価は完全ではなく、血液ガスや触診上良好でも移植後に移植肺不全を来す症例を経験する。

今回の実験では先の と の時相で起こりうるドナー肺障害のメカニズムを、遺伝子発現（炎症マーカーとして CXCL-1、低酸素障害マーカーとして HIF-1alpha など）を調べ、ヒストン関連肺障害と、その虚血再灌流障害に与える影響、さらにはトロンボモジュリンによる抗ヒストン障害についても検討した。

4 . 研究成果

移植肺コンプライアンス測定方法の確立：

ラット肺移植モデルにおける移植後のより正確なガス交換能の評価方法および、静的肺コンプライアンスの新たな測定方法も本研究で確立した。

具体的には Left hemi-clamshell 切開下でラット同所性左肺移植を行った。レシピエントとグラフトの吻合は分節状に切離されたドナーの大動脈を用いて肺動脈、肺静脈、気管支の吻合を行った。移植後に右主気管支を確保した上、開胸下に recipient を 4 時間管理した。右主気管支を選択的にクランプし、人工呼吸器とともに閉鎖回路に接続されたシリンジより移植肺に 0.5cc ずつ送気した。気道内圧の変化を測定することで静的肺コンプライアンスが求められた ($C[st] = \frac{V}{P}$, $C[st]$: 静的コンプライアンス, V : 送気された air の変化量、 P : 気道内圧の変化量)。また移植後のガス交換能は肺静脈吻合に用いられた分節状の大動脈より静脈血の血液ガス分析を行い、反対側の非移植肺

との差異を評価できるモデルとして使用した。レシピエントは開胸下で概ね 4 時間生存することを確認できた。

トロンボモジュリンによる線溶系賦活化による微小循環改善の検討：

虚血再灌流障害 (ischemia-reperfusion injury) の程度は、先行するヒストン関連血管内皮障害に影響されるという仮説に立って移植後の移植肺機能を検討した。今回はリコンビナントのトロンボモジュリンを使用し、移植後再灌流障害の軽減 (血管内皮障害の軽減) 移植後の臓器機能改善の効果を調べた。ラット (ドナー) へ calf thymus ヒストン 20mg/kg (もしくは PBS) を尾静脈から静注し、30 分後/1 日後/1 週間後にリコモジュリン 1mg/kg (もしくは PBS) を尾静脈から静注し、ヒストン障害由来と考えられる微小循環障害、凝固促進状態に対しての効果を検討した。全身麻酔投与の後に、ETK 液で臓器灌流を行い、血漿・肺組織を採取した。結果: 各々 n=4-5 で評価した。対照は PBS 投与 30 分後に PBS を投与した群とした。まず、RNA から cDNA を合成し、RT-PCR で GAPDH の発現量を house-keeping gene として、CXCL1、TNF、HIF-1 α 、HIF-2 α 、SOD1 の発現を検討した。

特に、ヒストン投与 30 分後にリコモジュリンを投与した群に関しては、ヒストン投与 30 分後に PBS を投与した群と比較して、CXCL1 や TNF の発現は少ない傾向にあった。また、ヒストン投与から 1 週間を超えてリコモジュリンを投与した群は、同時期に PBS を投与した群との間には一定の傾向は見られなかった。

また、HE 染色で凍結切片の組織像も評価したが、ヒストン投与後に PBS 投与群は 30 分や 1 日後でも好中球浸潤などが見られていたのに対して、リコモジュリンを投与した群では好中球浸潤は改善していた。RT-PCR と同様に、1 週間で検討したものでは、組織像でも明らかな差異は見られなかった。

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 2 件)

Yanagiya M, Sato M, Kawashima S, Kuwano H, Nagayama K, Nitadori J, Anraku M, Nakajima J. Flat Chest of Pleuroparenchymal Fibroelastosis Reversed by Lung Transplantation. Ann Thorac Surg 査読あり、2016 Oct;102(4):e347-9.

肺移植後の長期成績 Long-term outcome after lung transplantation: An update
安樂真樹、中島淳
医学のあゆみ、査読なし、255 巻 8 号 2015 年 p833-836

〔学会発表〕(計 3 件)

Murayama T, Anraku M, Circulating histone-induced lung injury: A novel model of damaged lungs from brain-dead donors, International Society for Heart and Lung Transplantation Annual Meeting, 2015 年 4 月 15 日, Nice, France

村山智紀、安樂真樹 ラット肺移植における新たな移植肺の急性期評価項目、第 31 回日本肺および心肺移植研究会、2015 年 1 月 31 日、東京大学山上会館(東京都文京区)

村山智紀、安樂真樹 肺移植後 primary graft dysfunction モデルに用いるヒストン障害ドナー肺の作成、第 50 回日本移植学会総会、2014 年 9 月 10 日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

〔図書〕(計 1 件)

Masaki Anraku and Shaf Keshavjee
McGraw-Hill Education
Care of Multi-Organ Donor
Principle of Critical Care 4th Ed.
2015, 1317 pages (p1108-1115)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://cts.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安樂 真樹 (ANRAKU, Masaki)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：70598557

(2) 研究分担者

長山 和弘 (NAGAYAMA, Kazuhiro)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00647935

似鳥 純一 (NITADORI, Jun-ichi)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40424486

村川 知弘 (MURAKAWA, Tomohiro)
東京大学・医学部附属病院・登録研究員
研究者番号：50359626

垣見 和宏 (KAKIMI, Kazuhiro)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：80273358

中島 淳 (NAKAJIMA, Jun)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：90188954

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()