

令和元年6月10日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19980

研究課題名(和文) Spred2が肺移植の虚血再灌流障害に与える影響についての検討

研究課題名(英文) SPRED-2 is necessary to protect against lung graft injury after mouse lung transplantation

研究代表者

大谷 真二 (SHINJI, OTANI)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：10770779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの肺移植モデルを用いて、シグナル伝達(Mitogen-activated protein kinases: MAPK系)に着目し、それを抑制する遺伝子(Sprouty-related EVH1-domain-containing protein: SPRED 2)のないマウスを用いた実験系において移植肺に起こりうる障害(急性虚血再灌流傷害)の影響を調べた。その結果、レシピエントにおけるMAPK経路の活性化も単独因子として肺の虚血再灌流障害に寄与する可能性や、逆にMAPK経路が抑制される前治療が虚血再灌流障害を改善する可能性も考慮された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により虚血再灌流障害のメカニズムを解明してそれを抑制することが出来れば、実臨床における肺移植成績を向上させることができ、大変有益であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our study was aimed at examining the role of the Sprouty-related EVH1-domain-containing (SPRED) 2 in Ischemia-reperfusion injury (IRI) in mice that received orthotopic lung transplantation. We suggest that focused treatments suppressing the activity of the MAPK/ERK pathway in transplantation recipients could be effective for the prevention of lung IRI.

研究分野：肺移植

キーワード：肺移植 SPRED2 虚血再灌流障害 MAPK/ERK経路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

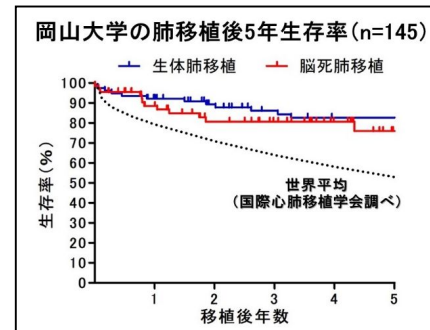
## 1. 研究開始当初の背景

### 研究の学術的背景

#### 1. 本邦の肺移植医療と当施設の成績 (図1)

肺移植は進行する重症肺疾患に対する唯一の救命手段である。当施設においては1998年で国内第一例目となる肺移植が行った後、145例という国内最多の総症例数を重ねている。手術成績は世界トップレベルであり、平成22年以降は移植成功率100%を続けている。

図1: 当施設の肺移植成績



#### 2. 肺移植後成績に悪影響を与える虚血再灌流障害

しかし、肺はその他の臓器と比べ拒絶や感染症などの合併症が多く、世界的な標準成績は5年生存率が50%程度である。肺移植後の虚血再灌流障害は高い頻度で生じ、肺移植後急性期の主な死因である移植片機能不全の主因であるだけでなく、グラフト肺の拒絶反応にも強く関与するため (Otani S, et al. Transpl Immunol. 2014), 肺移植後長期の成績も悪化させる重要な合併症である。そこで、虚血再灌流障害を抑制することは肺移植の成績向上に大きく寄与することが期待されるため、世界的に肺移植の研究を行っている施設は虚血再灌流障害のメカニズムの解明に長年尽力している。申請者はこれまでも肺移植における虚血再灌流傷害に関わる実験を行ってきた (Otani S, et al. Eur J Cardiothorac Surg. 2011) (Harada M, Otani S, et al. Gen Thorac Cardiovasc Surg. 2015) (Kakishita T, Otani S, et al. Ann Thorac Surg 2011)。

#### 3. 虚血再灌流障害の抑制が本邦の移植医療に寄与する可能性

一方、臨床では世界的にドナー不足は深刻な問題であり (Otani S, et al. J Heart Lung Transplant. 2013), 脳死・生体ドナーに加えた新たな供給源として心臓死肺移植を行う施設が増加してきた。本邦ではまだ実現に向けてワーキンググループが動いている段階ではあるが、将来的には各国と同様に心臓死肺移植が行われることが予想される。その心臓死肺移植においては虚血時間が正確に評価できないことがあるため、脳死肺移植と比較して、虚血再灌流障害は移植成績に関わる、より重要な要素となる可能性が高い。(Otani S, et al. Eur J Cardiothorac Surg. 2011) (Miyoshi K, Otani S, et al. J Heart Lung Transplant. 2011) 著者らは将来的な臨床での導入を見据えて心臓死肺移植の研究を進めているが (大谷ら, 医のあゆみ. 2015), 本研究により虚血再灌流障害のメカニズムを解明してそれを抑制することが出来れば、現在の肺移植成績を向上させるだけでなく、将来本邦でも導入されるであろう心臓死肺移植においても大変有益であると考えられる。

#### 4. 本研究の着想に至った経緯

当施設では20年にわたり大動物、小動物を用いて呼吸・肺移植の研究を行っている。また、マウス肺移植は当教室員が2007年に留学先の米国で開発した新しい技術であり、世界でもまだ行っている施設は少ない。当施設ではマウスの肺移植研究を継続的に行っており、移植肺内での各遺伝子発現レベルおよびその発現量の継時的パターンの違いを検討してきた。そのうちの1つの研究において温虚血後の再灌流障害で検討した結果、申請者らは、これまで知られていなかった Mitogen-activated protein kinases (MAPK) 系と移植肺機

能障害との関連性を示唆する結果を得た。(図2)(Yamamoto S, Otani S, et al. Transpl Immunol. 2012)

図2：MAPK系と移植肺機能障害との関連

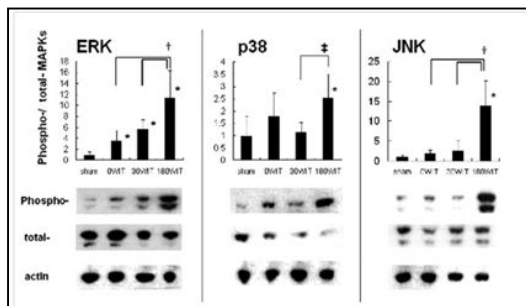
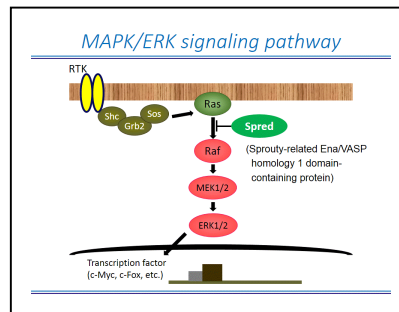


図3：MAPK系と Spred2



以上を踏まえて、MAPKを抑制する Sprouty-related EVH1-domain-containing protein(Spred)2(図3)のノックアウトマウスを用いた実験で虚血再灌流障害と移植肺機能との関連性を明らかにすることを目的とする研究を行うに至った。

申請者らによる予備実験によると、MAPKが活性化している Spred2 ノックアウトマウスにおいて温虚血による別の実験モデル(肺門クランプモデル)で好中球浸潤を伴う再灌流障害が起こりやすいことを確認している(Okada M, Otani S, et al. J Heart Lung Transplant. S138. 2013)。

## 2. 研究の目的

本研究はマウス肺移植モデルで、移植後の虚血再灌流障害・急性拒絶反応に伴うメカニズムの解明を目的とする。特に移植肺の急性期虚血再灌流障害に影響すると予想される Mitogen-activated protein kinases (MAPK) 系のシグナル伝達に着目し、MAPKを抑制する Sprouty-related EVH1-domain-containing protein(Spred)2 のノックアウトマウスをドナー/レシピエントそれぞれで用いた実験系において肺傷害への影響を調べる。

## 3. 研究の方法

適切な虚血時間をおいたグラフト肺を移植して急性期肺障害が評価できるモデルの確立が重要である。次にノックアウトマウスを用いた肺移植を行う。Spred2をレシピエントでノックアウトする群とドナーでノックアウトする群それぞれの虚血再灌流障害の重症度を評価、検証する。移植肺機能としては血液ガス分析を行う。ドナーは全身のヘパリン化後に脱血し肺動脈より LPDG 液により肺を還流させ後に摘出する。虚血時間を置いたのち、左肺を同所性に移植する。移植、再灌流後 24 時間で大動脈より採血し血液ガス分析を行った後に犠牲死させる。摘出した移植肺の虚血再灌流障害の重症度は血液ガス分析、H-E 染色にて評価する。摘出した移植肺はホルマリン固定保存、さらに 2~3mm に細切したものを液体窒素にて凍結し-80 度で保存する。移植肺から RNA を抽出し、PCR を行い、サイトカイン、凝固因子、接着因子などに属する主要因子 [MCP-1(CCL2), MIP-2 (CXCL2), IL-1, TNF, IL-6, PAI-1, ICAM-1, COX-2, IL-10, and  $\beta$ -actin など] の mRNA レベルをそれぞれ測定する。また ELISA, 免疫染色を用いてそのタンパクレベルの発現を確認する。さらに生標本を用いてフローサイトメトリーを行い細胞成分の分布 (anti-CD4, anti-CD8, anti-CD11b, anti-CD11c, and anti-Gr-1 antibodies など) を分析する

## 4. 研究成果

2点の有意義な結果と考察を得ることができた。まず1点は、もともとマウスの肺門クランプモデルにおいてSPRED2-/-がWild Typeより増悪する結果を得ていたが、同様の結果を肺移植モデルにおいても得ることができたということである。これによりより実臨床に近いモデルにおいての検討が可能であることと、肺門クランプモデルと異なりドナー、レシピエントに自由にWild TypeとKnock outを適用する汎用性の高いデザイン設定が可能であることが示唆された。2点目にレシピエントだけをSPRED2-/-にした肺移植においても虚血再灌流障害の増悪を認める結果を得たことである。虚血再灌流障害のメカニズムとMAPK経路の活性化速度を考慮するとドナー側の因子が虚血再灌流障害に反映されやすいと考えやすいが、この結果からレシピエントにおけるMAPK経路の活性化も単独因子として肺の虚血再灌流障害に寄与する可能性が示唆された。これにより、レシピエントの炎症の潜在性が肺移植の危険因子となりうる可能性が考慮され、逆にMAPK経路が抑制される前治療が虚血再灌流障害を改善する可能性も考慮された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

K. Hashimoto, S. Sugimoto, T. Kurosaki, S. Otani, M. Yamane, S. Toyooka, T. Oto, SPRED-2 is necessary to protect against lung graft injury after mouse lung transplantation, The International Society for Heart and Lung Transplantation (国際学会 2018年)

〔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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：橋本好平

ローマ字氏名：Kohei Hashimoto

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。