

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10790

研究課題名(和文) R-Spondin 3による心停止後ドナー肺の虚血再灌流障害の抑制と機序解明

研究課題名(英文) Inhibition of lung ischemia reperfusion injury by R-Spondin 3

研究代表者

岡崎 幹生 (Okazaki, Mikio)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：50467750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウスモデルを用いて、温虚血再灌流障害のメカニズム、主に血管内皮細胞の働きを解明し、さらに温虚血再灌流障害の抑制・予防することを目的とした。心停止ドナー肺を分析したところ、血管内皮細胞の破綻は顕著で、心停止後ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害の大きな要因と考えられた。また、マウス温虚血再灌流障害モデルにおいて、血管内皮細胞の障害を抑える目的でR-spondin-3を投与したところ、温虚血再灌流障害は抑制されていた。R-spondin 3は心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害の抑制につながる可能性があり、将来的にその臨床応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺移植は終末期肺疾患の唯一の治療法であるが、ドナー不足は深刻である。そのため、本邦でも心停止ドナーからの肺移植の臨床応用に向け、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。本研究では、マウスモデルを用いて、温虚血再灌流障害のメカニズム、主に血管内皮細胞の働きを解明し、さらに温虚血再灌流障害の抑制・予防することを目的とした。マウス温虚血再灌流障害モデルにおいて、血管内皮細胞の障害を抑える目的でR-spondin-3を投与したところ、温虚血再灌流障害は抑制されていた。R-spondin 3は心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害の抑制につながる可能性があり、臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the mechanism of warm ischemia-reperfusion injury, mainly the function of vascular endothelial cells, using a mouse model, and furthermore to inhibit and prevent warm ischemia-reperfusion injury. Analysis of circulatory death donor lungs revealed a significant disruption of vascular endothelial cells, which was considered to be a major factor in ischemia-reperfusion injury after lung transplantation from donation after circulatory death. In a mouse model of warm ischemia-reperfusion injury, administration of R-spondin-3 to suppress vascular endothelial cell damage suppressed warm ischemia-reperfusion injury, suggesting that R-spondin-3 may lead to suppression of ischemia-reperfusion injury after lung transplantation from circulatory death donors and its clinical application of R-spondin-3 in the future.

研究分野：肺移植

キーワード：肺移植 虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

(1) 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。

(2) 申請者らも含め、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)、申請者らは両者にメカニズムの相違があることを指摘した(Yamamoto et al. Transpl Immunol. 2012)。

(3) 分泌タンパク質 R-spondin ファミリーは Wnt シグナル伝達経路を活性化し、発生過程の多くの現象や疾患の発症に関与していることが知られており、近年大変注目され、多くの新たな発見が報告されている。R-spondin ファミリーの一つ、R-spondin 3 は血管の発生に大きく関与する(Kazanskaya, et al. Development. 2013)。また、R-spondin 3 は血管内皮細胞間の接着を強固にすることにより小腸の虚血再灌流障害を抑制すると報告された(Kannan, et al. Proc Natl Acad Sci U S A.2013)。血管内皮細胞間の接着を強固にすることは in vitro でも証明されており、DCD に R-spondin 3 を投与することにより、血管内皮細胞の破綻を抑制し、ドナー肺の保護および IRI の抑制に寄与すると予想される。

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ことが示唆された。本研究では、マウスモデルを用いて、温虚血再灌流障害のメカニズム、主に血管内皮細胞の働きを解明し、さらに温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

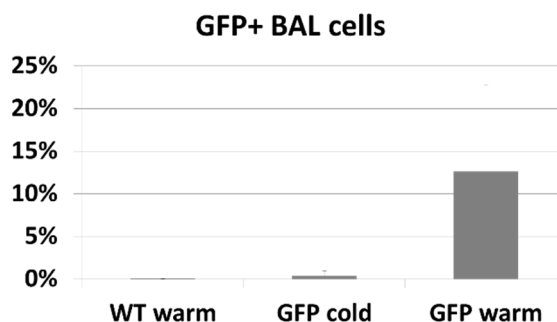
(1) 心停止ドナーからの肺移植における虚血再灌流障害のメカニズムの解明の推進を目的として、血管内皮細胞を GFP で標識した Vegfr-1 GFP マウスを用いて、実験を行った。Vegfr-1 GFP ドナーマウスを失血死させ、4℃ で保存する生体ドナー群と室温で保存する心停止ドナー群を作製した。コントロールとして、野生型マウスを室温で保存したドナー群も作成した。3時間の保存後に気管切開を行い、気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、フローサイトメトリー法で分析した。

(2) マウス虚血再灌流障害モデルを用いて、炎症性サイトカインを分析し、R-spondin 3 の効果を検証した。Sham 群、I/R 群、術前 30 分前に R-spondin 3 を投与した I/R + R-Spo 群の 3 群を作製した。いずれの群も腹腔内に麻酔薬を投与後に吸入麻酔を含む人工呼吸管理とした。Sham 群は 2 時間の人工呼吸管理のみ行った。I/R 群と I/R + R-Spo 群では、人工呼吸管理後に左肺門部を 30 分間クランプし、再灌流・再換気から 2 時間後に肺を摘出し、PCR で評価した。

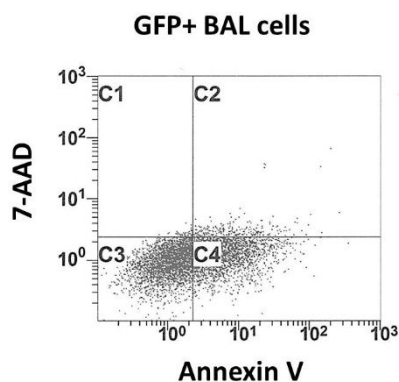
(3) マウス虚血再灌流障害モデルを用いて、R-spondin 3 の効果を病理組織学的に評価した。Sham 群、I/R 群、術前 30 分前に R-spondin 3 を投与した I/R + R-Spo 群の 3 群を作製した。Sham 群は 2 時間の人工呼吸管理のみ行った。I/R 群と I/R + R-Spo 群では、左肺門部を 30 分間クランプし、再灌流・再換気から 2 時間後に肺を摘出し、病理組織学的に評価した。

4. 研究成果

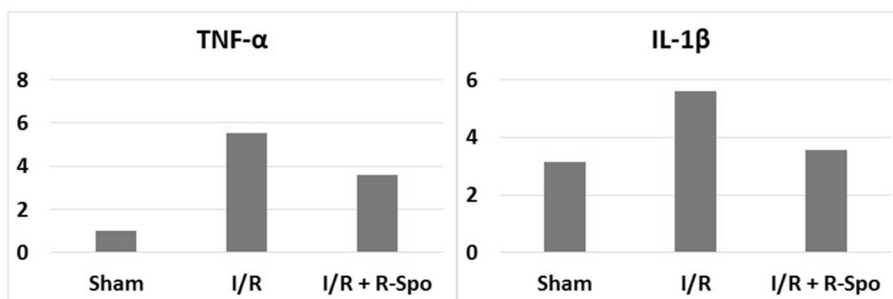
(1) マウス虚血再灌流障害モデルにおいて、野生型マウス心停止ドナー群 (WT warm) や Vegfr-1 GFP マウス生体ドナー群の BAL からはほとんど GFP 陽性細胞を回収できなかった。しかし、GFP 陽性 Vegfr-1 GFP マウス心停止ドナー群 (GFP warm) からは多くの GFP 陽性細胞が回収された。(右図)。



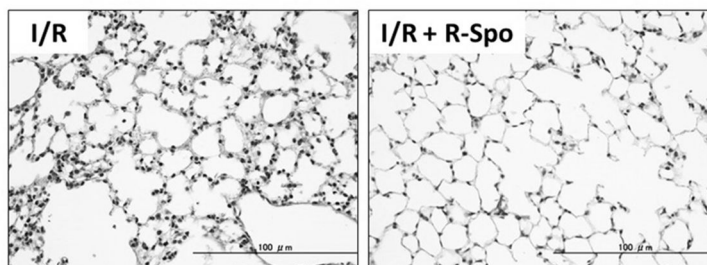
さらに、GFP 陽性細胞を Annexin V と 7-AAD を用いて検証したところ、アポトーシスも増加していた(右下図)。破綻した血管内皮細胞が気道内から回収されるという新たな発見であり、血管内皮細胞は再灌流前の温虚血時にすでに破綻していると考えられた。さらに破綻した血管内皮細胞が肺胞内でも悪影響を及ぼしている可能性も示唆された。この実験からは心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害において血管内皮細胞の破綻が大きな要因であり、ドナー肺における血管内皮細胞障害の抑制が治療の鍵となると考えられた。



(2) マウス虚血再灌流障害モデルで、Sham 群、I/R 群、術前 30 分前に R-spondin 3 を投与した I/R + R-Spo 群の 3 群を作製したが、下図左のように TNF- α は Sham 群と比較して I/R 群で高値となったが、R-spondin 3 を投与した I/R + R-Spo 群では TNF- α は抑制されていた。IL-1 β も同様に Sham 群と比較して I/R 群で高値となったが、R-spondin 3 を投与した I/R + R-Spo 群で抑制されていた。



(3) 病理病理組織学的にも、マウス虚血再灌流障害モデルでも R-spondin 3 の効果を検証したところ、図のように、I/R 群と比較すると、I/R + R-Spo 群では炎症細胞の浸潤が抑制されていた。Tunnel 染色でも、R-spondin 3 の投与によって I/R によるアポトーシスが抑制されるという結果であった。



(4) 本研究では、心停止ドナー肺において血管内皮細胞の破綻は顕著で、心停止後ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害の大きな要因と考えられ、今後の温虚血再灌流障害の研究に大きな影響を与える可能性がある。また、マウス虚血再灌流障害モデルにおいて、血管内皮細胞の障害を抑える目的で使用した R-spondin-3 によって、虚血再灌流障害は抑制されていた。R-spondin 3 は心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害の抑制につながる可能性があり、将来的にその臨床応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	坂上 倫久 (Sakaue Tomohisa) (20709266)	愛媛大学・医学系研究科・講師(特定教員) (16301)	
研究分担者	中岡 裕智 (Nakaoka Hiroto) (30795464)	愛媛大学・医学部・技術員 (16301)	
研究分担者	佐野 由文 (Sano Yoshifumi) (60322228)	愛媛大学・医学系研究科・准教授 (16301)	

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