

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08864

研究課題名(和文) 肺移植術後の気道過敏性亢進に關与する非翻訳RNAとその標的分子種の同定

研究課題名(英文) Identification of untranslated RNAs and their target molecular species involved in airway hyperresponsiveness after lung transplantation.

研究代表者

花崎 元彦 (Hanazaki, Motohiko)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：60379790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞レベルで虚血状態を模倣するシステムとして低酸素条件下培養ヒト気管支平滑筋細胞を用い、非翻訳RNAs(ncRNAs)を含む各種遺伝子発現変動の網羅的解析を試みた。RNA-Seq解析の結果、通常酸素(21%)群と比較して低酸素(1%)群では全転写物の約1.6%に発現変動が認められ、RhoA mRNAとの相互作用が示唆されるmiR-659の有意な発現低下が認められた。一方、RhoA mRNA自体には発現変動が認められず喘息モデルと同様、マイクロRNAによる翻訳抑制機構の低下が虚血後の気道過敏性に關与している可能性が示唆された。その他興味深い遺伝子の発現変動も検出され今後の検討が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究の目的は肺移植術後に気道過敏性が亢進するメカニズムを解明することである。ラット肺虚血再灌流(IR)傷害モデルを用いてWestern blot法、リアルタイムRT-PCR法を行いmiR-133a-3pおよびそのターゲットであるRhoAタンパク質が気道過敏性亢進の機序であることを解明した。またこの機序は吸入麻酔薬セボフルランで抑制され、麻酔薬が肺移植術の気道過敏性亢進を抑制することを示唆した。DNAアレイによる網羅的解析により各種遺伝子の発現がダイナミックに変動しIR傷害がもたらされる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We used cultured human bronchial smooth muscle cells under hypoxic conditions as a system to mimic ischemic conditions at the cellular level, and performed a comprehensive analysis of gene expression changes, including untranslated RNAs (ncRNAs). The RNA-Seq analysis showed that the expression of miR-659 was significantly downregulated in the hypoxic (1%) group compared to the normoxic (21%) group, suggesting an interaction with RhoA mRNA. On the other hand, no expression changes were observed for RhoA mRNA itself, suggesting that, as in the asthma model, a decreased translational repression mechanism by microRNAs may be involved in airway hyperresponsiveness after ischemia. Other interesting gene expression changes were also detected, and future studies are expected.

研究分野：麻酔科学

キーワード：肺移植 肺 虚血再灌流傷害 マイクロRNA 麻酔薬 気道過敏性

1. 研究開始当初の背景

特発性間質性肺炎など、有効な治療法の無い進行性肺疾患に対する現在までの唯一の治療法は、肺移植術である。臓器移植法改正によりわが国における脳死ドナーからの臓器移植は飛躍的に増加しており、肺移植もその例外ではない。肺移植術後管理では、移植肺を良好に保ちながら呼吸管理を行うことが重要である。移植肺に特有の問題として、ドナーからの摘出時に本来の神経系が切断される(脱神経)ことがあげられる。これにより咳反射の消失や反射性調節呼吸への影響のほか気道の過敏性にも変化をきたす。研究代表者は岡山大学医学部在籍時、肺移植術後症例において、気道過敏性変化が見られ呼吸管理が困難となった症例を多く経験した。

肺移植後の気道過敏性変化に関する報告はいくつか散見されるが、そのほとんどは症例報告もしくは retrospective な考察である。その一つに喘息の既往があるドナーから、既往のないレシピエントへの肺移植後にレシピエントが喘息を発症した報告があり(Lancet 341, 1369-1371, 1993)、研究代表者も同様の症例を経験した。これらは、ドナー肺という「局所」において一度獲得された気道過敏性がレシピエントに移植後も維持されていることを示し、非常に興味深い。また、喘息既往の有無に関わらず肺移植術後患者ではメタコリン、ヒスタミンに対する気道過敏性が亢進しているとの報告もある(Am Rev Respir Dis. 139, 1038-1041, 1989)。さらに Liakakos らは、肺移植後の患者において脱神経に伴う気道過敏性亢進は存在するものの気道の炎症とは関連しないと報告している(Thorax 52, 551-556, 1997)。このように肺移植術後の気道過敏性亢進メカニズムは、脱神経や炎症だけでなく、移植肺という局所にも特有の機構の存在が示唆され、これらが複合した結果であると考えられる。研究代表者と研究分担者は従来より気道平滑筋収縮機構に関する研究を行ってきた結果、抗原反復吸入により気道過敏性が亢進したラットの気管支平滑筋を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存しない収縮機構が存在すること(Ca^{2+} 感受性の亢進)(Br J Pharmacol. 127, 597-600, 1999)、イヌ気管支平滑筋の Ca^{2+} 感受性亢進機序が、G 蛋白質を介したミオシン軽鎖(MLC)ホスファターゼ抑制による MLC リン酸化レベルの増加であること、さらにこの作用を吸入麻酔薬が著明に抑制すること、などを証明した(Anesthesiology 92, 133-139, 2000 など)。近年は、低分子量 GTP 結合蛋白質 RhoA と Rho-kinase (Rho 関連性キナーゼ; ROCK)からなる RhoA-ROCK 系が平滑筋の Ca^{2+} 感受性亢進に大きく関与するとされるが、気道平滑筋においても RhoA-ROCK 系による Ca^{2+} 感受性亢進機構が存在すること、ROCK の選択的阻害薬 Y-27632 がこの Ca^{2+} 感受性亢進を抑制することを証明した(Eur J Pharmacol. 427, 77-82, 2001 など)。さらに、この ROCK 阻害薬をプロポフォール、イソフルランと併用することで各々の麻酔薬の気管支拡張作用が著明に増強され、周術期においても ROCK 阻害薬の有用性が期待されることを示した(Anesth Analg. 106, 1765-1771, 2008 など)。一方、この RhoA-ROCK 系は単に平滑筋収縮時の Ca^{2+} 感受性を亢進させるだけでなく、興味深いことに、冠動脈虚血再灌流傷害モデルにおいても RhoA-ROCK 系が活性化されていることが示され、ROCK 阻害薬がその予防および治療に有用性を持つことが示唆された(J Am Coll Cardiol. 45, 599-607, 2005)。虚血再灌流傷害は肺移植術後呼吸管理における最大の問題の一つであり、この冠動脈虚血再灌流モデルと同様に、RhoA-ROCK 系の活性化が気道抵抗の上昇や気道過敏性上昇の一因となっていることが予想される。さらに、平成 24~26 年度交付の基盤研究(C)(課題番号 24592366)にて肺虚血再灌流傷害モデルラットにおいて気管支平滑筋過敏性および RhoA タンパク質の発現増加を証明するとともに、平成 27~29 年度交付の基盤研究(C)(課題番号 15K10550)にて同モデル動物の肺および気管支平滑筋において microRNA 発現がダイナミックに変動している可能性を示唆した。そこで本研究計画では、「肺虚血再灌流傷害時に、どのようなメカニズムで RhoA-ROCK 系亢進が惹起されるのか?」という学術的「問い」に答えを出すことを試みる。

2. 研究の目的

研究代表者は岡山大学医学部在籍時、肺移植術後症例において、気道過敏性変化が見られ呼吸管理が困難となった症例を多く経験した。移植肺は脱神経という特異な状態にあるが、それだけでなく局所において何らかの生物学的変化が生じていることが強く示唆される。本研究計画では、今後の肺移植医療の安全性を高めることを目的として、肺移植術後の気道過敏性亢進メカニズムを解明するとともにその制御法を確立する。

3. 研究の方法

(1) ラット肺虚血再灌流モデルによるサンプル採取および調製

Wistar 雄性ラットをペントバルビタールで麻酔、気管切開、人工呼吸のもと開胸し左肺門部をクランプして 30 分間の虚血状態とし、後にクランプ開放により再灌流とした。再灌流時間は 30 分から 3 時間まで、条件を変化させながら肺および他臓器の状態をチェックした。採取した左肺よりタンパク質サンプルあるいは total RNA サンプル調製用として、最適条件にて保存した。

(2) ヒト気管支平滑筋細胞を用いた研究

細胞レベルで虚血状態を模倣するシステムとして、低酸素状態で培養を行ったヒト気管支平滑筋細胞 (human bronchial smooth muscle cells: hBSCMs) を用い、non-coding RNAs(ncRNAs)

を含む各種遺伝子発現変動の網羅的解析を試みた。

4. 研究成果

(1) ラット肺虚血再灌流モデルによるサンプル採取および調製

再灌流時間について、肺組織の肉眼的な観察を行いながらラットの全身状態(循環動態、動脈血液ガス分析による酸素化能)が保たれるための至適時間を決定する作業を繰り返した。最も長い3時間は循環動態や酸素化能の著しい悪化を来することが多く主に30分、1時間を用いてサンプル採取した。

(2) ヒト気管支平滑筋細胞を用いた研究

次世代シーケンサーを用いたRNA-Seq解析の結果、通常酸素下(21%)で培養した群と比較して、低酸素(1%)で培養したhBSMCsでは全転写物のおよそ1.6%の遺伝子に発現増加あるいは発現減少を認めEnriched terms解析の結果、培養細胞レベルでの低酸素状態に対する応答を確認した。ラット虚血再灌流誘発気道過敏性モデルでRhoAやROCKのタンパク質発現の増加を証明しているが、低酸素hBSMCモデルではこれらの遺伝子について少なくともmRNAレベルでの発現変動は認めず、RhoAやROCKの転写レベルでの変化はないことが示唆された。また低酸素hBSMCで機能未知のlncRNAやmiRNAなどのncRNAsの発現変動が検出され、これらncRNAsを介するRhoAあるいはROCK翻訳抑制の変化が気道過敏性亢進メカニズムに関与する可能性が示唆された。RhoA/ROCK系とは別の機序を示唆するcoding-RNAsの発現変動も認められた。

また通常酸素下(21%)で培養した群と比較して、低酸素(1%)で培養したhBSMCsではHIF-1タンパク質発現増加を認めた。さらに種々のエンリッチメント解析の結果“response to hypoxia(Gene Ontology解析)や“HIF-1 signaling pathway”(KEGG Pathway解析)が有意にエンリッチされたことから、低酸素状態が確認できた。RNA-Seq解析データを元に転写産物発現量の比較を行ったところ、RhoA mRNA発現に有意な変化は認められなかった。したがって、肺虚血再灌流モデルにおけるRhoAタンパク質発現増加は、その転写促進ではなく翻訳促進が関与している可能性が示唆された。事実、RNAhybrid解析によりRhoA mRNAの3'-非翻訳領域との強い結合性が示唆されたmiR-659の発現が1%-O₂群において有意に減少しており、喘息モデルと同様、miRNAによる翻訳抑制が低酸素により解除されRhoAタンパク質発現増加につながる可能性が示唆された。一方、RhoA下流の機能分子であるROCK1およびROCK2のmRNA発現増加も明らかになった。したがって、虚血再灌流時にもたらされる低酸素状態が、気管支平滑筋における収縮関連タンパク質発現増加をもたらし、過剰な気管支平滑筋収縮すなわち気道過敏性を引き起こす可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chiba Yoshihiko, Okumura Kaori, Tamaki Sayuri, Yasuhara Yurika, Suto Wataru, Hanazaki Motohiko, Sakai Hiroyasu	4. 巻 289
2. 論文標題 Increased Gene expression of CCL2/CCR2 axis in bronchial smooth muscles of allergen-challenged mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respiratory Physiology & Neurobiology	6. 最初と最後の頁 103669 ~ 103669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resp.2021.103669	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chiba Yoshihiko, Matsumoto Mayumi, Hanazaki Motohiko, Sakai Hiroyasu	4. 巻 21
2. 論文標題 Downregulation of miR-140-3p Contributes to Upregulation of CD38 Protein in Bronchial Smooth Muscle Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7982 ~ 7982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21217982	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Chiba Yoshihiko, Ando Yusuke, Fujii Shigeki, Miyakawa Yui, Suto Wataru, Kamei Junzo, Sakai Hiroyasu, Hanazaki Motohiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Downregulation of miR-140-3p Is a Cause of Upregulation of RhoA Protein in Bronchial Smooth Muscle of Murine Experimental Asthma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 138 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2020-0292LE	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chiba Yoshihiko, Ando Yusuke, Kato Yasuna, Hanazaki Motohiko, Sakai Hiroyasu	4. 巻 1
2. 論文標題 Down-regulation of miR-140-3p is a cause of the interleukin-13-induced up-regulation of RhoA protein in bronchial smooth muscle cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Small GTPases	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21541248.2021.1872318	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 月永晶人、花崎元彦、倉橋清泰	4. 巻 32
2. 論文標題 声門上気道確保器具	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 救急・集中治療 呼吸管理2020 - 21 ガイドライン, スタンダード, 論点そして私見	6. 最初と最後の頁 118-124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 花崎元彦	4. 巻 26
2. 論文標題 マスク換気から始める気道管理. 上気道閉塞はなぜ起こる? 呼吸停止の原因を知る	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 LiSA	6. 最初と最後の頁 334 - 338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.3101201352	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 居積晃希, 有山淳, 正木英世, 坂本誠史, 花崎元彦	4. 巻 43
2. 論文標題 ホルミウムレーザー前立腺核出術で前立腺被膜穿孔を生じ, 緊急気管挿管を要した1症例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床麻酔	6. 最初と最後の頁 1517-1519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 花崎元彦	4. 巻 40
2. 論文標題 気管支喘息【術前・術後ケアのための「基礎疾患・既往症の知識」まとめシート】	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ナーシング40巻3号 Page32-35(2020.02)	6. 最初と最後の頁 32-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 花崎元彦	4. 巻 25
2. 論文標題 使用に伴う合併症と限界 チューブの特性をよく知り,丁寧な扱いと細心の注意を 徹底分析シリーズ ダブルルーメンチューブ	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 LiSA	6. 最初と最後の頁 552-556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.3101200939	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chiba Yoshihiko, Yamane Yamato, Sato Tsubasa, Suto Wataru, Hanazaki Motohiko, Sakai Hiroyasu	4. 巻 200
2. 論文標題 Hyperresponsiveness to Extracellular Acidification-Mediated Contraction in Isolated Bronchial Smooth Muscles of Murine Experimental Asthma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Lung	6. 最初と最後の頁 591 ~ 599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00408-022-00558-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 花崎 元彦	4. 巻 46
2. 論文標題 安全な麻酔の先、より良い麻酔の時代に 多職種による術前外来の取り組み 麻酔科医の立場から	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床麻酔 46(5) 687-689 2022年5月	6. 最初と最後の頁 687-689
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 竹村夏季、馬場靖子、福山由理佳、花崎元彦、倉橋清泰
2. 発表標題 重度の慢性閉塞性肺疾患を伴う患者の人工内耳植込み術を浅頸神経叢ブロックと鎮静で管理した一例
3. 学会等名 日本区域麻酔学会 第7回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 花崎元彦
2. 発表標題 呼吸器外科の麻酔～最近の話題
3. 学会等名 東京麻酔専門医会リフレッシュコースセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原実来、伊藤 愛、須藤 航、花崎元彦、片山 浩、酒井寛泰、千葉義彦
2. 発表標題 アレルギー性喘息時の過敏性気管支平滑筋におけるレニン-アンジオテンシン系の変化
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉永百合香、安藤祐介、山下道生、竹ノ谷文子、酒井寛泰、亀井淳三、花崎元彦、千葉義彦
2. 発表標題 マウス気管支平滑筋組織における抗原あるいはinterleukin-13刺激時の遺伝子発現変動の比較
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井茂基、安藤祐介、宮川結衣、奥輝明、亀井淳三、酒井寛泰、花崎元彦、千葉義彦
2. 発表標題 気道過敏性時の気管支平滑筋RhoA発現増加におけるnon-coding RNAsの 関与
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本誠史、正木英代、有山淳、花崎元彦、白石尚基、倉橋清泰
2. 発表標題 長時間の下肢血行再建と足趾切断手術を末梢神経ブロック主体に麻酔管理した1例
3. 学会等名 日本区域麻酔学会 第5回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 花崎元彦
2. 発表標題 症例2: 開口障害を有する患者における分離肺換気 PBLD呼吸 分離肺換気に難渋した症例
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第65回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須藤 航、甲斐 友規、花崎 元彦、片山 浩、酒井 寛泰、千葉 義彦
2. 発表標題 PGD2 は Rho-kinase 活性化を介して気管支平滑筋 Ca ²⁺ sensitization を引き起こす
3. 学会等名 第60回 日本平滑筋学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井 茂基、安達 幸佳、須藤 航、花崎 元彦、片山 浩、酒井 寛泰、千葉 義彦
2. 発表標題 気管支平滑筋における MALAT1 を介する RhoA 発現調節および喘息時のその変化
3. 学会等名 第60回 日本平滑筋学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 正木 英世、花崎 元彦、有山 淳、坂本 誠史、平野 博史、正木 英二
2. 発表標題 術野での吸引操作が原因と考えられた片側性肺水腫の一例
3. 学会等名 日本麻酔科学会 関東甲信越・東京支部第58回合同学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 兼子 絢華、有山 淳、花崎 元彦、正木 英世、坂本 誠史、平野 博史
2. 発表標題 大動脈弁置換術後に心室間短絡を認めた一症例
3. 学会等名 日本麻酔科学会 関東甲信越・東京支部第58回合同学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮川 結衣、安藤 祐介、藤井 茂基、須藤 航、亀井 淳三、酒井 寛泰、花崎 元彦、千葉 義彦
2. 発表標題 アレルギー性喘息時の気管支平滑筋過敏性形成における miR-140-3p の役割
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 愛、藤原 実来、須藤 航、花崎 元彦、片山 浩、酒井 寛泰、千葉 義彦
2. 発表標題 アレルギー性喘息モデルマウスの気管支平滑筋における renin-angiotensin system pathway の変化
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢形 真奈美, 土山 実紗規, 須藤 航, 花崎 元彦, 片山 浩, 酒井 寛泰, 千葉 義彦
2. 発表標題 喘息マウスの摘出気管支平滑筋収縮反応性に及ぼす cyclooxygenase 阻害薬の効果
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019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
研究分担者	千葉 義彦 (Chiba Yoshihiko) (00287848)	星薬科大学・薬学部・教授 (32676)	
研究分担者	倉橋 清泰 (Kurahashi Kiyoyasu) (50234539)	国際医療福祉大学・医学部・主任教授 (32206)	

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