

令和 6 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：2020～2023

課題番号：20K09164

研究課題名(和文)肺虚血再灌流障害におけるS100A8/A9の役割の解明と新しい治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the role of S100A8/A9 in pulmonary ischemia-reperfusion injury and development of new therapeutic strategies

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：網羅的遺伝子解析や病理組織学的解析などによって、好中球由来のS100A8/A9が肺虚血再灌流障害における炎症反応に中心的な役割を果たしていることが明らかになった。臨床肺移植では、肺移植後の血漿S100A8/A9が高値であると、予後が不良で、慢性拒絶反応も発症しやすいことが明らかになった。さらに、マウス虚血再灌流障害モデルに対する抗S100A8/A9中和抗体によるS100A8/A9の機能阻害は、肺組織における好中球浸潤、炎症分子の発現、アポトーシスを減少させることにより、肺虚血再灌流障害を改善した。この抗体は、臨床肺移植における肺虚血再灌流障害の予防および軽減のための薬剤となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網羅的遺伝子解析や病理組織学的解析などによって、好中球由来のS100A8/A9が肺虚血再灌流障害における炎症反応に中心的な役割を果たしていることが明らかになった。また、臨床肺移植では、肺移植後の血漿S100A8/A9が予後バイオマーカーであることも明らかになった。さらに、マウス肺移植モデルで抗S100A8/A9中和抗体によるS100A8/A9の機能阻害が肺虚血再灌流障害を抑制することを明らかにした。S100A8/A9を標的としたこの抗体が、臨床肺移植における肺虚血再灌流障害の予防および軽減のための薬剤として開発できれば、大きな社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：The combination of RNA sequencing and histological investigations revealed that neutrophil-derived S100A8/A9 plays a central role in inflammatory reactions in lung IR injury. In clinical lung transplantation, high plasma S100A8/A9 levels after lung transplantation were found to be associated with poor prognosis and poor CLAD-free survival. Furthermore, the functional blockage of S100A8/A9 by anti-S100A8/A9 mAb ameliorated lung IR injury by reducing neutrophil infiltration, inflammatory molecule expression, and apoptosis in the lung tissue. This antibody could be developed as a potential agent for the prevention and reduction of IR injury in clinical lung transplantation.

研究分野：肺移植

キーワード：肺移植 虚血再灌流障害 S100A8 S100A9 抗S100A8/A9中和抗体

## 1. 研究開始当初の背景

1998年に申請者が所属する岡山大学において日本初の肺移植が成功し、日本における臨床肺移植がスタートした。岡山大学をはじめ日本の肺移植の治療成績は比較的良好であるが、世界における肺移植後の5年生存率は約50%であり、他の臓器移植より治療成績は不良であるのが現状である。その主因は急性期の移植肺機能不全と慢性期の拒絶反応である。一時的な虚血と血液の再灌流により炎症が生じる肺虚血再灌流障害は、肺移植後急性期の移植肺機能不全を引き起こすだけでなく、遠隔期の慢性拒絶反応のリスクファクターでもあり、虚血再灌流障害を制御することが肺移植後の治療成績の向上に必要不可欠である。虚血再灌流障害は虚血の時間、温度などにより障害の程度は異なるが、再灌流後に血管内皮細胞や気道上皮細胞の障害をきたし、移植肺機能不全に進展すると考えられている。障害を引き起こす機序として、酸化ストレス、サイトカインなどの各種ケミカルメディエータ産生による障害などの機序が考えられているが、未だ虚血再灌流障害に対する決定的な治療法はなく、基礎研究による肺虚血再灌流障害の分子メカニズムの解明や新規治療薬の開発が急務である。

肺虚血再灌流障害は、多種多様なシグナルが連鎖的に増幅される多段階炎症反応である。そこで申請者らは、創薬標的となる肺虚血再灌流障害イニシエーター分子を同定するため、マウス肺虚血再灌流障害モデルを用いて経時的かつ網羅的遺伝子発現解析を実施した。再灌流後時間経過に伴って発現変動する遺伝子数が指数関数的に増加していたが、その中でも、再灌流から30分後において最も過剰産生される遺伝子として S100A8/A9 を発見した。S100A8/A9 は他の遺伝子同様に経時的発現亢進していたが、その発現上昇のタイミングは最も早期であった。パスウェイ解析 IPA ソフトウェアを用いた詳細な解析の結果、S100A8/A9 は肺虚血再灌流障害によって誘導される多くのシグナル伝達の上流に位置していたことから、肺虚血再灌流障害依存的な炎症反応において S100A8/A9 は中心的な役割を果たすことが示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、肺虚血再灌流障害における S100A8/A9 の役割を明らかにし、申請者らが開発した S100A8/A9 を標的とした中和抗体を用いて、肺虚血再灌流障害の抑制効果を検証し、臨床応用に向けた Proof of Concept を確立することを目的とした。

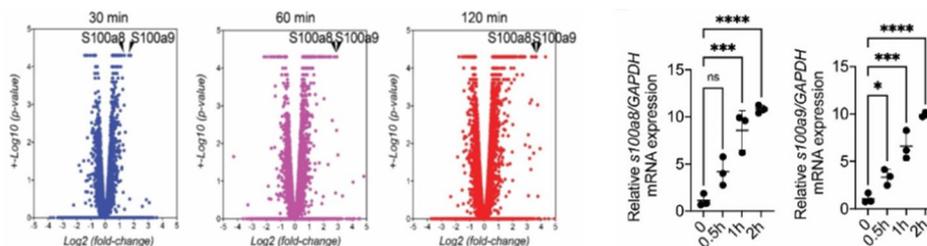
## 3. 研究の方法

マウス肺虚血再灌流障害モデルを用いた。左肺を30分間の虚血後に再灌流し、再灌流から30、60、120分後に摘出した左肺の mRNA を次世代シーケンサーによって網羅解析した。またマウス肺虚血再灌流障害モデルに対して、抗 S100A8/A9 中和抗体を投与し、その効果を検証した。抗体投与群と非投与群と比較し、血液ガス、PCR、ウエスタンブロッティング、H&E 染色、免疫染色、Tunel 染色で評価した。

臨床肺移植では、60人の肺移植後0、1、2、3日目の血漿を採取し、血漿 S100A8/A9 レベルを測定し、全生存期間および慢性肺移植片機能不全 (CLAD) に及ぼす影響を評価した。単変量および多変量 Cox 回帰分析を用いて、S100A8/A9 値と全生存期間および CLAD 発症との関連を評価した。

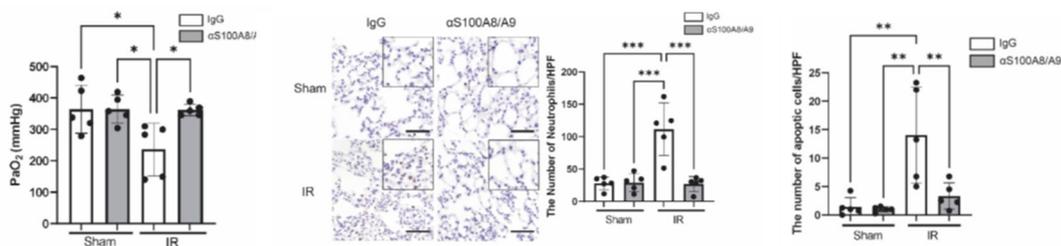
## 4. 研究成果

- (1) マウス肺虚血再灌流障害モデルに対する網羅的遺伝子解析では、S100A8 と S100A9 は、虚血再灌流障害初期から最も過剰産生される遺伝子であった。また、S100A8 と S100A9 の mRNA レベルは虚血再灌流障害の経過とともに発現上昇していた。

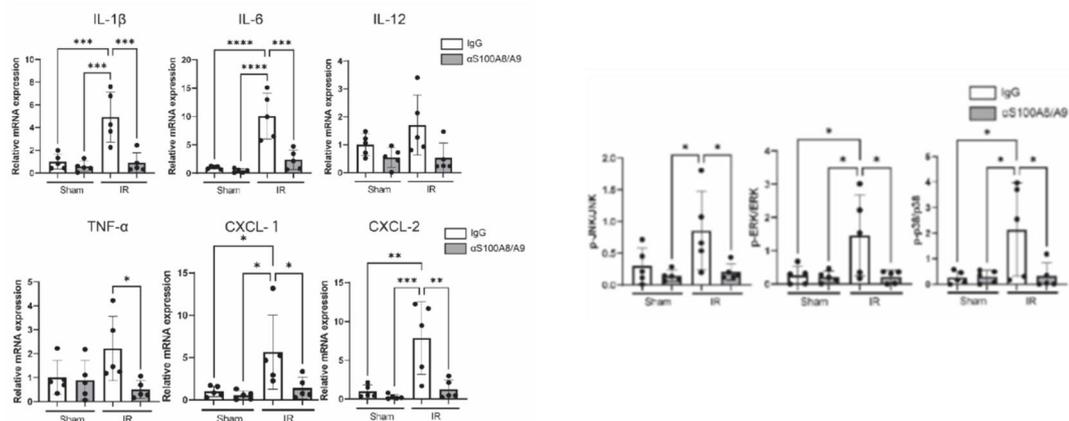


- (2) マウス肺虚血再灌流障害モデルに対して、抗 S100A8/A9 中和抗体または IgG を投与し、比較・検証した。抗 S100A8/A9 中和抗体群では、Control 群と比較して、有意に PaO2 が改善し

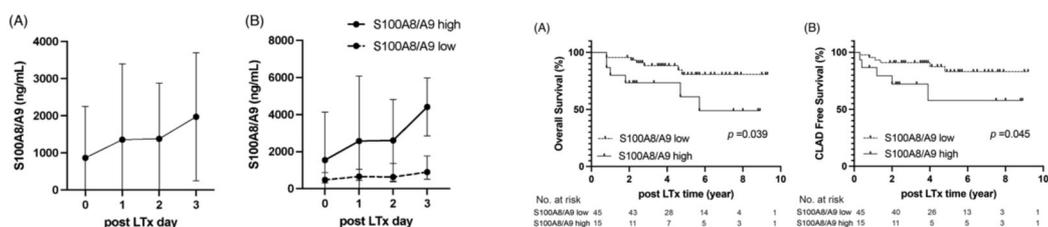
ていた。病理組織学的にも S100A8/A9 中和抗体群では、Control 群と比較して、虚血再灌流障害に伴う好中球浸潤が有意に抑制されていた。また TUNEL 染色では、S100A8/A9 中和抗体群では、Control 群と比較して有意にアポトーシスが抑制されていた。



(3) PCR では炎症性サイトカインが抗 S100A8/A9 中和抗体によって有意に抑制されていた。また、ウェスタンブロッティングでは、JNK、ERK、p38 などの MAPK も抗 S100A8/A9 中和抗体によって有意に抑制されていた。



(4) 臨床肺移植後の 1, 2, 3 日目に血漿を採取し、血漿中の S100A8/A9 レベルを ELISA で測定した。S100A8/A9 値は肺移植後 3 日まで時間依存的に上昇した。S100A8/A9 高値群と低値群に分け、全生存期間および慢性肺移植片機能不全 (CLAD) 発症までの期間に及ぼす影響を評価した。虚血時間は S100A8/A9 高値群で S100A8/A9 低値群より有意に長かった ( $p = 0.017$ )。S100A8/A9 が高値 ( $>2844\text{ng/mL}$ ) の患者は、低値の患者よりも Kaplan-Meier 生存解析において有意に予後が悪く ( $p = 0.031$ ) CLAD 発症までの期間が有意に短かった ( $p = 0.045$ )。さらに多変量 Cox 回帰分析では、S100A8/A9 の高値が OS 不良 (ハザード比[HR]: 3.7; 95%信頼区間[CI]: 1.2-12;  $p = 0.028$ ) および CLAD 発症 (HR: 4.1; 95%CI: 1.1-15;  $p = 0.03$ ) の決定因子であることが示された。急性期移植肺機能不全のグレードが低い (0-2) 患者では、S100A8/A9 の高値も予後不良因子であった。



(5) 網羅的遺伝子解析や病理組織学的解析などによって、好中球由来の S100A8/A9 が肺虚血再灌流障害における炎症反応に中心的な役割を果たしていることが明らかになった。また、臨床肺移植では、肺移植後の血漿 S100A8/A9 が高値であると、予後が不良で、慢性拒絶反応も発症しやすいことが明らかになった。さらに、マウス肺虚血再灌流障害モデルに対する抗 S100A8/A9 中和抗体による S100A8/A9 の機能阻害は、肺組織における好中球浸潤、炎症分子の発現、アポトーシスを減少させることにより、肺虚血再灌流障害を改善した。この抗体は、臨床肺移植における肺虚血再灌流障害の予防および軽減のための薬剤として開発される可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakata Kentaro, Okazaki Mikio, Sakaue Tomohisa, Kinoshita Rie, Komoda Yuhei, Shimizu Dai, Yamamoto Haruchika, Tanaka Shin, Suzawa Ken, Shien Kazuhiko, Miyoshi Kentaroh, Yamamoto Hiromasa, Ohara Toshiaki, Sugimoto Seiichiro, Yamane Masaomi, Matsukawa Akihiro, Sakaguchi Masakiyo, Toyooka Shinichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Functional Blockage of S100A8/A9 Ameliorates Ischemia Reperfusion Injury in the Lung	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 673 ~ 673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bioengineering9110673	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 該当する

1. 著者名 Shimizu Dai, Okazaki Mikio, Sugimoto Seiichiro, Kinoshita Rie, Nakata Kentaro, Tanaka Shin, Hashimoto Kohei, Miyoshi Kentaroh, Yamane Masaomi, Matsukawa Akihiro, Sakaguchi Masakiyo, Toyooka Shinichi	4. 巻 629
2. 論文標題 Inhibiting S100A8/A9 attenuates airway obstruction in a mouse model of heterotopic tracheal transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 86 ~ 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.08.087	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 該当する

1. 著者名 Nakata Kentaro, Okazaki Mikio, Kawana Shinichi, Kubo Yujiro, Shimizu Dai, Tanaka Shin, Hashimoto Kohei, Suzawa Ken, Shien Kazuhiko, Miyoshi Kentaroh, Yamamoto Hiromasa, Sugimoto Seiichiro, Toyooka Shinichi	4. 巻 37
2. 論文標題 S100A8/A9 as a prognostic biomarker in lung transplantation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical Transplantation	6. 最初と最後の頁 15006 ~ 15006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ctr.15006	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kentaro Nakata
2. 発表標題 Anti-S100A8/A9 Neutralizing Monoclonal Antibody Ameliorates Lung Injury Induced by Lung Ischemia Reperfusion Injury
3. 学会等名 ISHLT2022 42nd Annual Meeting & Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2022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	大谷 真二  (Shinji Otani)  (10770779)	愛媛大学・医学部附属病院・准教授   (16301)	
研究分担者	山根 正修  (Yamane Masaomi)  (20432643)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授   (15201)	
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	豊岡 伸一  (Shinichi Toyooka)  (30397880)	岡山大学・医歯薬学域・教授   (15301)	
研究分担者	山本 寛斉  (Yamamoto Hiromasa)  (40467733)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授   (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	木下 理恵  (Kinoshita Rie)  (40518297)	岡山大学・医歯薬学域・助教    (15301)	
研究分担者	杉本 誠一郎  (Seiichiro Sugimoto)  (40570148)	岡山大学・大学病院・准教授    (15301)	
研究分担者	阪口 政清  (Sakaguchi Masakiyo)  (70379840)	岡山大学・医歯薬学域・教授    (15301)	

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			
米国	デューク大学			
カナダ	トロント大学			