

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592087

研究課題名(和文)肺虚血再灌流障害の発症機序—薬剤によるIPC現象の確立—

研究課題名(英文)Pharmacological preconditioning of lung with monophosphoryl lipid A: A role of MyD88-independent signaling pathway.

研究代表者

島本 亮 (SHIMAMOTO, AKIRA)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90324524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】Toll-like receptor 4 agonistであるmonophosphoryl lipid A(MPL)を用いた選択的MyD88非依存経路活性によるpharmacological preconditioning(PPC)の可能性について検討した。【方法】MPLを前投与したC57BL/6Jマウスに肺虚血再灌流(LIRI)を負荷し肺障害及び細胞内シグナル活性を測定した。【結果】MPL投与でLIRIは有意に抑制され、ischemic preconditioningと同等であった。【結語】MPLを用いた選択的MyD88非依存経路の活性によるPPCの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we evaluate the effect of monophosphoryl lipid A (MPL), an agonist of Toll-like receptor 4 (TLR4), on lung ischemia-reperfusion injury (LIRI), especially whether MPL affect pharmacological preconditioning (PPC) through a MyD88-independent signaling to protect against LIRI. C57BL/6 mice received MPL prior to 60 minutes of ischemia of their left lungs, followed by 180 minutes of reperfusion. Response to injury was quantified by tissue MPO activity, vascular permeability, and BAL expression. Lung homogenates were also analyzed for activation of MyD88, TRIF, and NF- κ B. Pretreatment with MPL resulted in the development of a significant smaller LIRI. Instead of MyD88 activation, a strong activation of TRIF, leads to NF- κ B activation in MyD88-independent signaling, is showing before LIRI same as ischemic preconditioning. We conclude that an activation of TRIF, which are associate proteins of TLR4, would regulate a role of NF- κ B to preserve lung function.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：外科 移植・再生医療 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでマウス心筋虚血再灌流モデルにて肺虚血再灌流障害(LIRI)の発症機序における Toll-like receptor 4 (TLR4)の関与を明らかにしてきた。TLR4 mutant マウス (C3H/HeJ)及び TLR4 antagonist (eritoran)を用いた検討ではリン酸化 JNK、NF- κ B、AP-1 活性の抑制の結果、有意な梗塞範囲の縮小を認めた(Chong AJ, Shimamoto A, Hampton CR, et al. Toll-like receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart. J Thorac Cardiovasc Surg 128(2):170-9,2004, Shimamoto A, Chong AJ, Yada M, et al. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. Circulation 114[1 Suppl]:I210-4,2006)。一方、TLR4/ Toll-like receptor 2 (TLR2)/MyD88 knock-out (KO)マウスを用いた検討において「30 分間虚血+120 分間再灌流」ではいずれの KO マウスでも wild type(WT)マウス (C57BL/6)と比較して有意な梗塞範囲の縮小を認める一方で、「60 分間虚血+120 分間再灌流」では MyD88 KO マウスのみ WT マウスと比較して有意な梗塞範囲の縮小を認めたが、この結果について具体的考察を行うことが出来なかった。しかし、TLR4/TLR2 からのシグナル伝達経路として既知の MyD88 を経由し NF- κ B に到る経路(MyD88-dependent signaling, Figure 1)に加え、MyD88 を経由せずに NF- κ B に到る経路(MyD88-independent signaling, Figure 2)が発見されたことで(Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. Semin Immunol;16:3-9,2004)、このシグナル伝達経路の相違が NF- κ B の cytoprotective /cytodestructive 作用の振り分けに関与しているのではないかと仮定した。

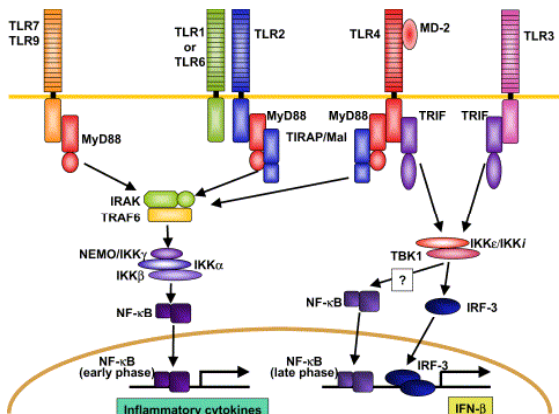


Fig 1. TLR-mediated MyD88-dependent signaling

そこで、これら心筋虚血再灌流障害の研究の成果を応用し、LIRI の発症機序における TLR4 を介した細胞内シグナル伝達経路の解明を試みた。まず、TLR4 KO マウスを用いて LIRI モデル(60 分虚血+180 分再灌流)を作製したところ、リン酸化 JNK、NF- κ B、AP-1 活性の抑制の結果、有意な肺障害の抑制が認められ、虚血再灌流障害の発症機序における TLR4 の関与が示唆された(Shimamoto A,

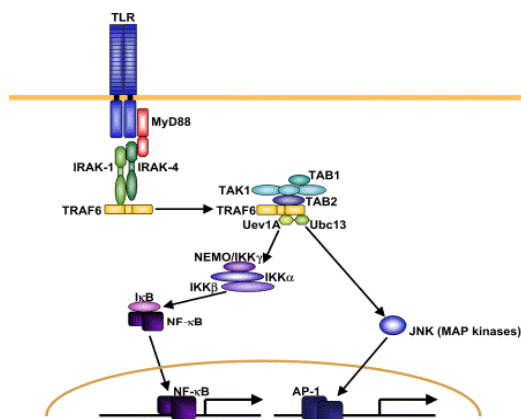


Fig 2. TLR-mediated MyD88-independent signaling

Pohlman TH, Shomura S, et al. Toll-like receptor 4 mediates lung ischemia-reperfusion injury. Ann Thorac Surg 82:2017-23, 2006)。さらに、WT マウス及び TLR4/MyD88/TRIF 各 KO マウスを用いて「60 分間虚血+180 分間再灌流」の LIRI モデル、「5 分間虚血+5 分間再灌流+5 分間虚血+5 分間再灌流+5 分間虚血+5 分間再灌流+5 分間虚血+5 分間再灌流+5 分間虚血+30 分間再灌流+60 分間虚血+180 分間再灌流」の IPC+LIRI モデルにて肺障害(PI、MPO 活性)及び NF- κ B 活性を測定した。TLR4 KO 及び MyD88 KO では WT と比べ LIRI は有意に抑制され (PI: $P < .001$, MPO 活性: $P < .002$), NF- κ B 活性も有意に抑制された($P < .001$)。IPC+LIRI において WT 及び MyD88 KO では LIRI は有意に抑制されるも、TLR4 KO 及び TRIF KO では LIRI の抑制を認めなかった。TLR4 を介した細胞内シグナル伝達において MyD88 依存経路が LIRI を、MyD88 非依存経路が IPC を誘導することが示された。TLR4 から NF- κ B に至るシグナル伝達経路の相違が NF- κ B の相反する作用の振り分けに関与していることが示唆された(Shimamoto A, Yajima Y, Shomura S, et al. MyD88-independent signaling pathway is involved with lung ischemic preconditioning. J Heart Lung Transplant 29(2):S127-S128, 2010)。

本研究課題ではこれまでの研究成果を基に、薬剤にて MyD88-independent signaling を選択的に活性化する pharmacological な PC(PPC)の可能性を検討する。MyD88-independent signaling を選択的に活性化する薬剤としては、TLR4 agonist の内、LPS 及び DNA adjuvant に着目した。LPS、特に低容量投与は、以前からも IPC 惹起の可能性が示唆されていた(Merry HE, Wolf PS, Fitzsullivan E, et al. Lipopolysaccharide pre-conditioning is protective in lung ischemia-reperfusion injury. J Heart Lung Transplant 29(4):471-8, 2010)。また DNA adjuvant の monophosphoryl lipid A(MPL, Figure 3)は LPS の非毒性構造異性体である(Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, et al. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. Science

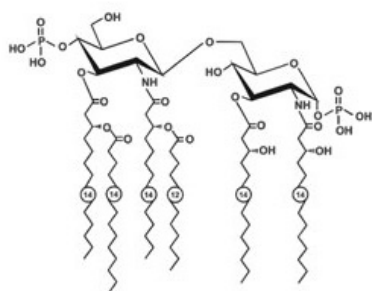


Fig 3. Monophosphoryl lipid A

LIRI は肺移植の現場では極めて重大な問題で、先日もドナー肺が摘出されレシピエントに移植されるまでに6時間を要した症例で重篤なLIRIが発症した。また、今後予想されるドナー不足に対応するべく心停止後摘出ドナー肺の臨床応用においても乗り越えなければならないハードルの1つである。これらの問題解決に対してPPCの確立は急務である。

2. 研究の目的

肺移植におけるドナー肺長期保存を可能にするべく、LIRIの発症機序におけるTLR4の役割を明らかにする。特に、TLR4からNF- κ Bに至るシグナル伝達経路の相違(MyD88依存経路/MyD88非依存経路)によるNF- κ Bのcytoprotective/cytodestructive作用の振り分けを利用したPPCの可能性について検討する。

- ① 低容量LPSでMyD88非依存経路を選択的に活性化が可能かどうか、引いてはPPCが可能かどうかをTLR4以下の細胞内シグナル伝達機構、転写因子、及びmRNA発現を系統的に評価する。また、PPCが作動してあれば至適投与量ほどの程度なのか、副作用はないのかどうかについても検討を加える。
- ② LPSの非毒化構造異性体であるMPLを用いた選択的MyD88非依存経路活性によるLIRIの抑制効果を評価し、PPCの可能性について検討を行う。

3. 研究の方法

《実験①》

C57BL/6Jマウスに複数濃度のMPLを投与しTLR4及びその修飾蛋白(MyD88及びTRIF)発現をWestern-blot法にて測定した。対照として「5分間虚血+5分間再灌流+5分間虚血+5分間再灌流+5分間虚血+5分間再灌流+5分間虚血+5分間再灌流+5分間虚血+5分間再灌流+5分間虚血+30分間再灌流」のIPCモデルを用い、MPLの「至適投与量の確定」に加え、「MyD88非依存経路(TRIF経路)が選択的に活性化されているかどうか」を評価した。

《実験②》

MPLの至適前投与時間を確定するために、C57BL/6JマウスにMPL(500 μ g/kg)及び生食を投与しMyD88/TRIF/NF- κ B活性の経時変化を測定した。対照として「5分間虚血+5分間再灌流+5分間虚血+5分間再灌流+5分間虚血+5分間再灌流+5分間虚血+5分間再灌流+5分間虚血+30分間再灌流」のIPCモデルを用いた(IPC群)。

《実験③》

MPL(500 μ g/kg)及び生食を前投与したC57BL/6Jマウスに24時間後「60分間虚血+180分間再灌流」のLIRIを負荷し(投与群/非投与群)、肺障害(肺胞洗浄液[BALF]中の細胞数、MPO活性、permeability index[PI])を評価した。対照として「5分間虚血+5分間再灌流+5分間虚血+5分間再灌流+5分間虚血+5分間再灌流+5分間虚血+5分間再灌流+5分間虚血+5分間再灌流+5分間虚血+30分間再灌流+60分間虚血+180分間再灌流」のIPC+LIRIモデルを用いた(IPC群)。

4. 研究成果

《実験①》

MPL投与にてTRIFの有意な発現を認めるもMyD88の有意な発現は認めなかった。経時的なTRIF発現はMPL投与後24時間で最高値となり、またMPL500 μ g/kg投与群が他の投与量群と比較し最も高値となった。その発現量はconventionalなIPCとほぼ同等であった。以上より、MPL投与(至適投与量: 500 μ g/kg)24時間にてIPCとほぼ同等な選択的MyD88非依存経路の活性化を認めた。

《実験②》

MPL投与群では非投与群と比べ投与24時間においてTRIF及びNF- κ Bの有意な活性化を認めた($P < .05$)。これらの結果はIPC群とほぼ同等であった。以上より、MPLの至適前投与時間をLIRI負荷前24時間とした。

《実験③》

MPL投与群では非投与群と比べLIRIは有意に抑制された(BALF中の細胞数: $P < .05$ [Figure 4]、MPO活性: $P < .01$ [Figure 5]、PI: $P < .05$ [Figure 6])。同時にMPL投与群では非投与群と比べLIRI負荷直前でTRIF及びNF- κ Bの有意な活性化を認めた($P < .05$ [Figure 7])。これらの結果はIPC群とほぼ同等であった。以上より、MPLを用いた選択的MyD88非依存経路(TRIF経路)の活性によるPPCが確立された。また、MPLによるPPCはlate phase PCの可能性が示唆された。

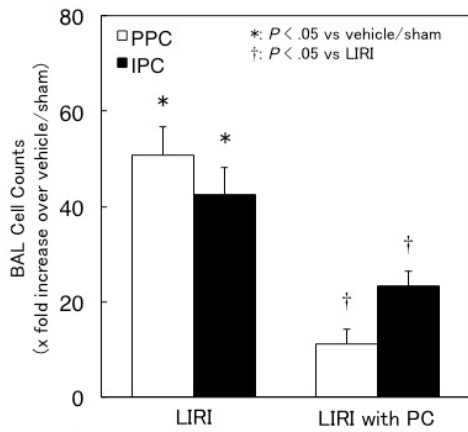


Fig 4. BAL Cell Counts after LIRI with PC

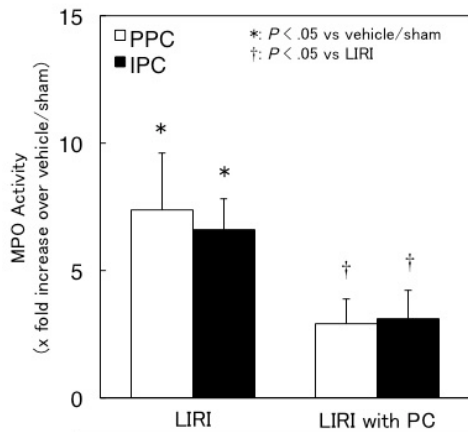


Fig 5. MPO Activation after LIRI with PC

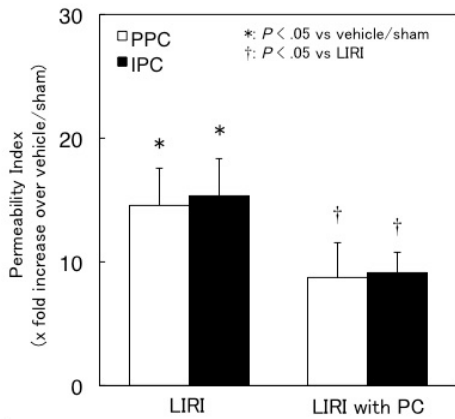


Fig 6. Lung Vascular Permeability after LIRI with PC

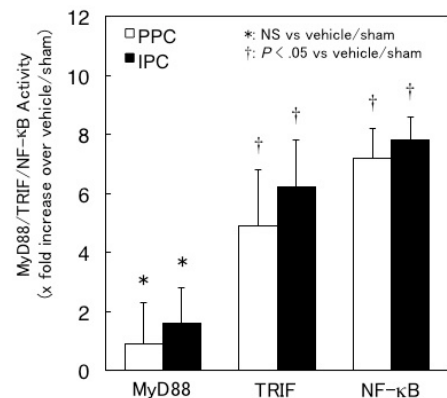


Fig 7. MyD88/TRIF/NF-κB Activation after LIRI with PC

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)

1. Shimamoto A, Takao M, Shimpo H. Role of Heat Shock Proteins in Pharmacological Preconditioning for Lung Ischemia Reperfusion Injury. J Heart Lung Transplant 2016;35(4):S158.(査読あり)
2. Shimamoto A, Fujii H, Tomita M, Yajima Y, Takao M, Shimpo H. Pharmacological Preconditioning of Lung with Monophosphoryl Lipid A: A Role of MyD88-Independent Signaling Pathway. J Heart Lung Transplant 2012; 31(4):S84.(査読あり)

[学会発表] (計 4件)

1. Role of Heat Shock Proteins in Pharmacological Preconditioning for Lung Ischemia Reperfusion Injury. Shimamoto A, Takao M, Shimpo H. 36th Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society of Heart and Lung Transplantation (平成 28 年 4 月 27 日、ワシントン DC・アメリカ合衆国)
2. 肺虚血再灌流障害における TLR4 の働きに関する研究～薬剤による preconditioning 現象の確立にむけて～ 島本 亮、藤井弘敦、冨田雅之、谷島義章、高尾仁二、新保秀人 第 113 回日本外科学会定期学術集会(平成 25 年 4 月 11 日、福岡国際センター[福岡県・福岡市])
3. HSP-70 is required for late-phase protection induced by pharmacological preconditioning of lung with monophosphoryl lipid A through MyD88-independent signaling pathway. 島本 亮、天白宏典、高尾仁二、新保秀人 第 65 回日本胸部外科学会定期学術集会(平成 24 年 10 月 18 日、福岡国際センター[福岡県・福岡市])
4. Pharmacological Preconditioning of Lung with Monophosphoryl Lipid A: A Role of MyD88-Independent Signaling Pathway. Shimamoto A, Fujii H, Tomita M, Yajima Y, Takao M, Shimpo H. 32nd Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society of Heart and Lung Transplantation (平成 24 年 4 月 20 日、プラハ・チェコ共和国)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島本 亮 (SHIMAMOTO AKIRA)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90324524

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

新保秀人 (SHIMPO HIDETO)
三重大学・医学系研究科・教授
研究者番号：70179076

高尾仁二 (TAKAO MOTOSHI)
三重大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30263007

富田雅之 (TOMITA MASAYUKI)
三重大学・医学部附属病院・臨床工学技士
研究者番号：90774860

松尾映里 (MATSUO ERI)
三重大学・医学系研究科・特定事業技術補佐
員
研究者番号：40751665