

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592366

研究課題名(和文)肺移植術後の気道過敏性亢進メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanism of airway hyperresponsiveness after lung transplantation

研究代表者

花崎 元彦 (HANAZAKI, MOTOHIKO)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60379790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺移植術後に気道過敏性亢進をきたし呼吸管理に難渋することがある。移植肺に気道過敏性亢進を生じさせる因子の中から周術期使用薬剤の影響を調べた。スガマデクスは筋弛緩薬ロクロニウムを拮抗するがその際に形成される包接体はラット気道平滑筋に有意な収縮を生じなかった。また肺移植ではドナーから摘出した肺が移植後に虚血再灌流傷害をきたすが、気道過敏性亢進時に見られる低分子量蛋白RhoAやCPI-17が虚血再灌流傷害時にも増加することを確認した。以上より肺移植術後の気道過敏性亢進メカニズムは薬剤の作用よりも虚血再灌流傷害、とくに蛋白質レベルでの変化が大きく関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that an airway hyperresponsiveness (AHR) was observed in the non-asthmatic recipients who received lung transplantation. The mechanism of AHR after lung transplantation is unclear, and various factors seem to be involved in. Sugammadex was expected to be useful for anesthetic management of patients with bronchial asthma. However, several cases of bronchospasm after administration of sugammadex were reported. We examined the effects of rocuronium-sugammadex clathrate on rat airway smooth muscle (ASM) contraction, and the clathrate had no effect on the function of ASM. Next, lung ischemia-reperfusion (I-R) injury is the main problem in management of patients after lung transplantation surgery. We examined whether small G-protein RhoA and CPI-17 are involved in lung I-R injury in rats, because they have been shown to have a key role in airway hyper responsiveness. In this study, up-regulations of RhoA and CPI-17 were shown in rat lung ischemia-reperfusion injury.

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

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増加している。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、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。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。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。

これらの背景より、研究代表者と研究分担者(星薬科大学・千葉義彦)は、平成 21~23 年度に交付を受けた基盤研究(C)(課題番号 21592011)により、肺移植術後の気道過敏性亢進に影響をおよぼす様々な因子についての検討を行った。肺移植術の術後に投与される免疫抑制剤は血管平滑筋を収縮させるが、気道平滑筋への作用は解明されていないため、(1)正常ラット摘出気管支平滑筋の等尺性張力に及ぼすシクロスポリン、タクロリムスの影響、(2)シクロスポリン、タクロリムスを連日慢性投与したラットの摘出気管支平滑筋収縮反応性の変化、を調べた。その結果、いずれも気管支平滑筋の収縮を惹起、もしくは増強させることはなく、免疫抑制剤が気道過敏性亢進に寄与しないことを証明した。

平滑筋収縮機構において従来はアゴニスト刺激で細胞膜の Ca^{2+} チャネルが開放し細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することがその主な機序と考えられた。しかし近年、細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存しない収縮機構(Ca^{2+} 感受性調節機構: Ca^{2+} sensitization)の存在が確認され

た。これは平滑筋異常収縮を機序とする病態に深く関連し、喘息や COPD における気道過敏性亢進もその例外ではない。

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)、イヌ気管平滑筋の 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。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。さらに、この ROCK 阻害薬をプロポフォル、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。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(文献 12)。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。以上の背景より、肺移植術後の気道過敏性亢進にはこの RhoA-ROCK 系による Ca^{2+} 感受性亢進機構が重要な役割を果たしている可能性があり、選択的 ROCK 阻害薬が気道過敏性亢進を抑制することにより肺移植術後の呼吸管理をより安全に行う新たなアプローチになるものと考え、本研究計画の着想に至った。

2. 研究の目的

研究代表者らはこれまでに、肺移植術の術後管理において気道過敏性亢進による気道抵抗上昇により呼吸管理に難渋する症例を多数経験した。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

ラット気管支における等尺性張力に、スガマデクス・ロクロニウム包接体が与える影響

肺移植術後の気道過敏性亢進メカニズムには多くの要素が関与する。肺移植術以外に周術期使用薬剤の影響も考えられる。スガマデクスは包接という新しい機序をもつ新しい筋弛緩薬拮抗剤で、喘息患者にも安全に使用可能とされるが機序不明の気管支痙攣の報告が散見される。我々はラット気管支平滑筋において、スガマデクス単独では収縮を発生、もしくは増強させる作用がないことを示した。しかしスガマデクスと筋弛緩薬ロクロニウムによる包接体は全く新しい化合物であり、これが気管支痙攣の原因となる可能性もある。今回、スガマデクス・ロクロニウム包接体がラット気管支平滑筋収縮に与える作用を調べた。

雄性 Wistar 系ラットの左主気管支輪状切片を作成し Krebs-Henseleit 液を含むオーガンバスに設置した。安定静止張力 (1g) を得た後に以下のプロトコルで等尺性張力を測定した。

- (1) 包接体 (0.01 μ M-1mM) を累積投与した (n=6)。
- (2) 2 標本を用い、アセチルコリン (ACh) (30 μ M) による収縮に対して一方に包接体 (10、100 μ M)、他方に溶媒を与えた (n=6)。
- (3) 2 標本を用い、一方に包接体 (10 μ M)、他方に溶媒を与えた。その後 ACh (0.1 μ M-1mM) を累積投与した (n=6)。

肺虚血再灌流傷害における RhoA-ROCK、CPI-17 の関与

肺移植術後管理において最も大きな問題は虚血再灌流傷害である。さらに肺移植術後管理において、気道過敏性亢進を示して呼吸管理に難渋する症例も散見されるが、これらはいずれも機序不明である。

近年、低分子量 G 蛋白 RhoA とその下流のシグナル分子 Rho-kinase (ROCK) が腎や心の虚血再灌流傷害に関与することが示された。

また気道過敏性亢進については、我々が以前より RhoA-ROCK 系や内因性のミオシン軽鎖ホスファターゼ阻害蛋白質 CPI-17 が気道平滑筋収縮に重要な役割を果たしていることを示してきた。

今回、ラット肺虚血再灌流傷害への RhoA、

CPI-17 の関与について調べた。

雄性 Wistar ラット (6 週齢) を 2 群 (対照群、虚血再灌流 (I-R) 群) に分けた。

セボフルランで麻酔し、動静脈路確保および気管切開を行った後、人工呼吸下に胸骨正中切開を行った。人工呼吸の設定は一回換気量 10mL/kg、呼吸回数 60~70 回/分、FiO₂ = 1.0 (クランプ中) および 0.6 (両肺換気中)。

左肺門部をクランプし 1 時間虚血、その後クランプを解除 (再灌流) し、1 時間後に左肺を全摘出した (n=6)。

対照群は開胸のみ行い、クランプおよび解除は行わず 2 時間後に左肺を全摘出した (n=5)。

凍結保存した肺標本を用いて Western blot 法を行い、RhoA および CPI-17 の発現レベルを調べた。

4. 研究成果

ラット気管支における等尺性張力に、スガマデクス・ロクロニウム包接体が与える影響

- (1) 包接体単独ではいずれの濃度でもラット気管支の有意な収縮は見られなかった。
 - (2) 包接体は、ACh によって発生したラット気管支の収縮に対して有意な影響を与えなかった。
 - (3) 包接体は、ラット気管支における ACh の濃度反応曲線に対して有意な影響を与えなかった。
- (1)~(3)の結果より、包接体がラット気管支平滑筋細胞の収縮を発生、増強することはないことが示唆された。

肺虚血再灌流傷害における RhoA-ROCK、CPI-17 の関与

対照群と比較し、I-R 群で RhoA、CPI-17 ともに発現レベルが有意に増加していた。

ラット肺虚血再灌流傷害時に RhoA-ROCK 系および CPI-17 を介するシグナル伝達が亢進している可能性が示された。

また RhoA および CPI-17 は平滑筋収縮時の Ca²⁺ sensitizers であることから、これらシグナル分子の発現増加が肺移植術後の

気道過敏性発現に関与している可能性が示唆された。

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 4 件)

1. 片山浩, 福田直樹, 片山大輔, 落合陽子, 花崎元彦: AKI 重症患者における腎機能代替療法 (Renal replacement therapy: RRT). ICU と CCU (査読無). 2015; 39(1):45-52
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020362926>

2. 高岡宗徳, 繁光薫, 山辻知樹, 落合陽子, 花崎元彦, 片山浩, 山根弘路, 猶本良夫: 食道癌術後合併症に伴う血小板減少症に対し, ステロイド投与が奏功した症例. ICU と CCU (査読有). 2014; 38: 10: 710-712
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020250135>

3. 片山浩, 松三絢弥, 落合陽子, 花崎元彦. High flow CHDF, High volume CHF. VIII 章 急性血液浄化; 最近の話題. 救急・集中治療 (査読無) 2014; 26: 3・4: 530-536.
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020362926>

4. Yoshioka, N., Hanazaki, M., Fujita, Y., Nakatsuka, H., Katayama, H. and Chiba, Y. Effect of sugammadex on bronchial smooth muscle function in rats. J Smooth Muscle Res (査読有). 2012, 48: 59-64.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsmr/48/2_3/48_59/_pdf

〔学会発表〕(計 25 件)

1. 千葉義彦, 鈴木薫平, 三好亮麻, 酒井寛泰, 花崎元彦, 片山浩. マウス抗原誘発過敏性鼻粘膜組織における miRNA 発現変動に及ぼす高メチル供与食餌の影響. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 27 日 兵庫医療大学 (兵庫県神戸市)

2. 千葉義彦, 齊藤有紀, 清田佳奈, 酒井寛泰, 花崎元彦, 片山浩. マウス抗原誘発鼻粘膜炎症に及ぼす高メチル供与食餌の影響. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 27 日 兵庫医療大学 (兵庫県神戸市)

3. 千葉義彦, 東陽子, 團野駿太, 川田明, 酒井寛泰, 花崎元彦, 片山浩. マウスにおけるアレルギー性気道炎症発現に及ぼす高メチル供与食餌の影響. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 27 日 兵庫医療大学 (兵庫県神戸市)

4. 千葉義彦, 小早川智帆, 田上元, 多田沙織, 酒井寛泰, 花崎元彦, 片山浩. マウスにおけるアレルギー性気道炎症発現に及ぼす親世代抗原曝露の影響. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 27 日 兵庫医療大学 (兵庫県神戸市)

5. 千葉義彦, 高橋理子, 和田真理奈, 酒井寛泰, 花崎元彦, 片山浩. マウス抗原誘発過敏性気管支平滑筋における miRNA 発現変動に

及ぼす高メチル供与食餌の影響. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 26 日 神戸学院大学 (兵庫県神戸市)

6. 千葉義彦, 野口佳奈子, 須藤怜奈, 森下智紀, 酒井寛泰, 花崎元彦, 片山浩. 培養ヒト気管支平滑筋細胞の RhoA 発現レベルに及ぼす interleukin-33 の影響. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 26 日 神戸学院大学 (兵庫県神戸市)

7. 千葉義彦, 飯田尊寛, 須藤航, 太田康介, 酒井寛泰, 花崎元彦, 片山浩. マウス抗原誘発過敏性気管支平滑筋における RhoA 発現変動に及ぼす高メチル供与食餌の影響. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 26 日 神戸学院大学 (兵庫県神戸市)

8. 福田直樹, 片山大輔, 花崎元彦, 落合陽子, 片山浩. 診断確定に 5 回の造影 CT 検査が必要であった多発性動脈解離の症例. 第 42 回日本集中治療医学会学術集会. 2015 年 2 月 9 日 ホテルグランパシフィック LE DAIBA (東京都港区)

9. 福田直樹, 片山大輔, 落合陽子, 花崎元彦, 片山浩. 双胎間輸血症候群に対する胎児鏡下レーザー凝固術におけるデクスメトミジンによる鎮静. 日本臨床麻酔学会第 34 回大会. 2014 年 11 月 1 日 グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール (東京都港区)

10. Hanazaki M., Katayama H, Nakatsuka H, Fujita Y, Chiba Y. Up-regulations of RhoA and CPI-17 in lungs with ischemia-reperfusion injury in rats. ASA2014 Annual Meeting. 2014 年 10 月 13 日 ニューオーリンズ (アメリカ合衆国)

11. 花崎元彦, 片山浩. 肺虚血再灌流傷害の新規制御法の確立. 川崎医科大学学術集会. 2014 年 8 月 2 日 川崎医科大学 (岡山県倉敷市)

12. 千葉義彦, 須藤航, 清水一樹, 須藤怜奈, 田上元, 團野駿太, 中原孝史, 加藤靖菜, 安藤桂子, 松本麻友美, 酒井寛泰, 成田年, 花崎元彦, 片山浩. アレルギー性気管支喘息時の気管支平滑筋 RhoA 発現に及ぼす TSLP の役割. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 3 月 30 日 熊本大学黒髪キャンパスエリア (熊本県熊本市)

13. 千葉義彦, 須藤怜奈, 清水一樹, 須藤航, 田上元, 團野駿太, 中原孝史, 加藤靖菜, 安藤桂子, 松本麻友美, 酒井寛泰, 成田年, 花崎元彦, 片山浩. 培養ヒト気管支平滑筋細胞における RhoA 発現に対する LIGHT の効果. 日本薬学会第 134 年会 2014 年 3 月 30 日 熊

本大学黒髪キャンパスエリア（熊本県熊本市）

14. 千葉義彦、中原孝史、清水一樹、須藤怜奈、須藤航、田上元、團野駿太、加藤靖菜、安藤桂子、松本麻友美、酒井寛泰、成田年、花崎元彦、片山浩．アレルギー性気管支喘息時の気管支平滑筋 TLR4 up-regulation における miR-140-5p の役割．日本薬学会第 134 年会．2014 年 3 月 30 日 熊本大学黒髪キャンパスエリア（熊本県熊本市）

15. 千葉義彦、田上元、清水一樹、須藤怜奈、須藤航、團野駿太、中原孝史、加藤靖菜、安藤桂子、松本麻友美、酒井寛泰、成田年、花崎元彦、片山浩．アレルギー性気管支喘息時の気管支平滑筋過敏性発現における interleukin-17 の役割．日本薬学会第 134 年会．2014 年 3 月 30 日 熊本大学黒髪キャンパスエリア（熊本県熊本市）

16. 千葉義彦、田上元、清水一樹、須藤怜奈、須藤航、團野駿太、中原孝史、松本麻友美、加藤靖菜、安藤桂子、酒井寛泰、成田年、花崎元彦、片山浩．培養ヒト気管支平滑筋細胞における interleukin-17A による RhoA タンパク質発現の増加．第 8 7 回日本薬理学会年会．2014 年 3 月 21 日 仙台国際センター（宮城県仙台市）

17. Hanazaki M, Yoshioka N, Fujita Y, Nakatsuka H, Katayama H, Chiba Y. Effect of rocuronium-sugammadex clathrate on rat airway smooth muscle contraction. ASA2013 Annual Meeting. 2013 年 10 月 12 日 サンフランシスコ（アメリカ合衆国）

18. 田村悠希、花崎元彦、松三絢弥、落合陽子、片山浩．頸髄損傷患者に対する胸腺癌摘出術の麻酔経験．日本麻酔科学会 中国・四国支部第 50 回学術集会．2013 年 9 月 1 4 日 サポートホール高松（香川県高松市）

19. 花崎元彦、片山浩、吉岡直紀．肺移植術後の気道過敏性亢進メカニズムの解明．川崎医科大学学術集会．2013 年 8 月 3 日 川崎医科大学（岡山県倉敷市）

20. 花崎元彦．開胸手術の麻酔 up-to-date（招請講演）．日本麻酔科学会第 60 回学術集会．2013 年 5 月 23 日 さっぽろ芸文館（北海道札幌市）

21. 千葉義彦、加藤靖菜、安藤桂子、松本麻友美、清水一樹、須藤怜奈、須藤航、田上元、團野駿太、中原孝史、花崎元彦、片山浩、酒井寛泰、成田年．アレルギー性気管支喘息時の気管支平滑筋 RhoA up-regulation における miR-140-3p の役割．日本薬学会 第 1 3 3 年会．2013 年 3 月 30 日 パシフィコ横浜（神

奈川県横浜市）

22. 千葉義彦、松本麻友美、加藤靖菜、安藤桂子、清水一樹、須藤怜奈、須藤航、田上元、團野駿太、中原孝史、花崎元彦、片山浩、酒井寛泰、成田年．アレルギー性気管支喘息時の気管支平滑筋細胞において miR-140-3p down-regulation が CD38 up-regulation をもたらす．第 8 6 回日本薬理学会年会．2013 年 3 月 21 日 福岡国際会議場（福岡県福岡市）

23. 片山浩、松三絢弥、落合陽子、花崎元彦．Acute Kidney Injury(AKI)と集中治療（教育講演）．第 40 回日本集中治療医学会学術集会．2013 年 3 月 2 日 浅間温泉文化センター（長野県松本市）

24. Hanazaki M, Yoshioka N, Fujita Y, Nakatsuka H, Chiba Y. Effect of sugammadex on rat airway smooth muscle contraction. ASA 2012 Annual Meeting. 2012 年 10 月 15 日 ワシントン DC（アメリカ合衆国）

25. 吉岡直紀、花崎元彦、片山浩、中塚秀輝、藤田喜久、千葉義彦．スガマデクスが気道平滑筋収縮に及ぼす影響．日本麻酔科学会第 59 回学術集会 2012 年 6 月 8 日 神戸国際展示場（兵庫県神戸市）

〔図書〕(計 4 件)

1. 花崎元彦．メディカル・サイエンス・インターナショナル 2014 年．LiSA．縦隔腫瘍～最大の難関は麻酔導入時 綿密な麻酔計画のもと、step-by-step で気管挿管まで．pp682-686

2. 花崎元彦．総合医学社 2014 年．人工呼吸器と集中ケア Q&A-ベッドサイドからの質問 286．肺手術後の人工呼吸法と集中ケア．pp163-169

3. 花崎元彦、片山浩：総合医学社 2013 年．集中治療専門医テキスト（電子版）．Acte kidney injury(AKI)腎傷害患者における薬物投与、薬効力学的アプローチ．pp1543 - 548

4. 片山浩、花崎元彦、落合陽子、土井ゆみ子：日本臨床社 2012 年．別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ NO.18 腎臓症候群（第 2 版）下～その他の腎臓疾患を含めて～．術後急性腎不全．pp125-130

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://kweb-res.kawasaki-m.ac.jp/kwmhp/KgApp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花崎 元彦 (HANAZAKI MOTOHIKO)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60379790

(2) 研究分担者

千葉 義彦 (CHIBA YOSHIHIKO)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00287848

(3) 連携研究者

()

研究者番号：