

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462120

研究課題名(和文) 肺移植後虚血再灌流肺障害予防戦略における抗酸化転写因子 Nrf2 の役割の解明

研究課題名(英文) Role of antioxidative transcription factor Nrf2 in strategies to protect against ischemia-reperfusion injury after lung transplantation

研究代表者

星川 康 (Hoshikawa, Yasushi)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：90333814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラット左肺移植モデルを用いて実験を行なった。Nrf2欠損(KO)ラットをドナーとした場合、野生型(WT)ラットドナーに比し肺水腫が強く、肺コンプライアンスと酸素化は不良であった。Nrf2活性化剤 oltiprazのレシピエントラットへの前投与により、WTからの左肺グラフトにおけるNrf2標的遺伝子NQO1とGCLMの発現亢進、TUNEL陽性アポトーシス細胞の減少を伴い、肺酸素化の改善を認めた。以上により、肺移植後虚血・再灌流肺障害においてNrf2が抑制的な役割を演ずることを明らかとし、薬物によるNrf2活性化が肺移植後虚血・再灌流肺障害による酸素化能の低下を抑制する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：To test whether Nrf2 protects lungs from ischemia-reperfusion injury after lung transplantation (LTx), wild-type (WT) rats underwent left LTx from Nrf2 knockout (KO) or WT rats, and pulmonary injury and edema were compared. Lung grafts from Nrf2 KO rats showed more pulmonary edema, reduced lung compliance, and less oxygenation when compared with grafts from WT rats. Pretreatment of the recipient rats with Nrf2 activator oltipraz attenuated ischemia-reperfusion-induced lung edema in the grafts from WT rats, but not in the grafts from Nrf2 KO rats. Oltipraz also induced enhanced expression of Nrf2 target genes, NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM) and reduced number of TUNEL positive cells in the grafts from WT rats. These results indicate that Nrf2 plays a role in protection against ischemia-reperfusion injury and that Nrf2 activators have a therapeutic potency for the prevention of primary graft dysfunction after LTx.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：Nrf2活性化剤 Nrf2標的遺伝子 アポトーシス 肺酸素化能 Nrf2欠損ラット 肺水腫

1. 研究開始当初の背景

肺移植は、終末期肺疾患に対する mainstay である。International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT)の報告によると2010年現在世界では年間3,500例以上の肺移植が施行されている。本邦でも1998年10月から2013年9月までの間に184例の脳死肺移植が行われた。

肺移植後1ヶ月における死亡率は約10%にのぼる(本邦では約4%)。その原因として最も多いのが虚血再灌流肺障害に基づくグラフト機能不全である。この病態は非特異的肺胞障害・肺水腫・低酸素血症を特徴とするが、近年の肺保存・手術・術後管理技術の進歩によっても回避できていない。その重症度は、胸部X線に淡い浸潤影のみを呈するものから急性呼吸促進症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) に至るものまで多岐にわたる。重症の虚血再灌流肺障害は急性期死因として重要であるばかりか、慢性拒絶反応のリスク増大をきたし得る。従って、その病態生理を解明し予防法・治療法を確立することは急務である。

一般にARDSは強い治療抵抗性を示すが、その基礎疾患の中で虚血再灌流肺障害は前処置が可能な数少ないものの一つである。すなわち冷却保存及び再灌流中の肺組織における種々の変化の注意深い観察とこれに基づいた戦略により、虚血再灌流肺障害の回避あるいはその重症度軽減が可能と考えられる。肺移植後グラフト機能不全は、ドナーが脳死に至る過程で招来されるサイトカインストーム、長期人工呼吸管理による圧障害や無気肺、痰貯留や不顕性誤嚥による肺炎などにより肺障害が潜在する状況で、数時間の虚血とひきつづく再灌流(低酸素/再酸素化、冷却/再加温)がなされるために、種々のサイトカイン、好中球エラスターゼや活性酸素種が大量に産生され、極めて程度の強い肺障害・肺水腫が惹起されて発症すると考えられている。とりわけ活性酸素種の大量産生は本病態の主因の一つと考えられてきたが、現行の肺移植における虚血再灌流肺障害予防策の中に直接的に活性酸素種を制御するものは使用されていない。

Nrf2は抗酸化剤応答配列に結合して生体防御酵素、抗酸化酵素遺伝子群の発現を広範にかつ強力に誘導することにより酸化ストレスに対抗する転写因子である。

我々は、低酸素曝露ラット肺 (Hoshikawa Y, J Appl Physiol. 2001) やマウス肺 (Eba S, Hoshikawa Y, AJRCMB 2013) に酸化ストレスが蓄積していることを明らかにしたが、同時に、通常は酸化ストレスにより誘導される Nrf2 標的遺伝子 NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) や Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) 発現がむしろ低酸素曝露マウス肺で低下していることを示した(図2, Eba S,

Hoshikawa Y, AJRCMB 2013)。ヒト肺においても通常肺血管壁で強発現している NQO1 や GCLC シグナルが、酸化ストレスが蓄積しているはずの慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者肺血管でほとんどみられないことを示し、低酸素やタバコ煙曝露といった特殊なストレス下では肺における Nrf2 システム機能不全とでもいふべき事象が惹起される可能性を示した (Eba S, Hoshikawa Y, AJRCMB 2013)。さらに我々は、Nrf2 活性化剤である oltipraz の経口投与が低酸素曝露によるマウス肺血管リモデリングの進展を抑制することを示した (Eba S, Hoshikawa Y, AJRCMB 2013)。以上のことから、虚血再灌流により強い酸化ストレスが惹起される移植肺においても Nrf2 システムの機能不全が生じており、さらに薬物による Nrf2 活性化は虚血再灌流障害を抑制する可能性があるとの仮説をたてた。

2. 研究の目的

本研究は、強力な抗酸化転写因子 Nuclear factor E2 p45-related factor 2 (以下 Nrf2) が、肺移植後虚血再灌流肺障害の病態生理に深く関与し、有力な治療ターゲットであることを証明しようとするものである。以下の課題を明らかにする。

(1) Nrf2 活性のない *Nrf2*^{-/-}ラットドナー肺は野生型ラットドナー肺より重症の肺移植後虚血再灌流障害を発症するのか？

(2) 野生型ラット肺移植後虚血再灌流肺障害は Nrf2 活性化により制御されるか？

3. 研究の方法

(1) SDラットに oltipraz (500 mg/kg) あるいは vehicle をゾンデを用いて胃内投与し、24時間後に他のSDラットをレシピエントとして左肺移植を行った。再灌流24時間後に心肺ブロックを摘出し、アルブミン希釈液を左気道内に注入し、2時間後に回収して肺胞水分クリアランスを測定した。同様に、SDラットに oltipraz (500 mg/kg) あるいは vehicle をゾンデを用いて胃内投与し、24時間後に肺を low-potassium dextran glucose solution で灌流し、4°Cで6時間保存した。他のSDラットをレシピエントとして左肺移植を行い、再灌流24時間後に心肺ブロックを摘出した。左肺グラフトの肺胞水分クリアランスを測定し、肺障害・肺水腫の程度を組織学的に解析した。同様の実験を、レシピエントラット対して oltipraz (500mg/kg) あるいは vehicle を肺移植術6時間前に胃内投与して行った。

(2) 野生型 F344/NSlc ラットをドナー、レシピエントとして、レシピエントラットに肺移植術6時間前に oltipraz (500mg/kg) あるいは vehicle を胃内投与して左肺移植を行った(ドナー肺は low-potassium dextran glucose solution で灌流後、6時間冷保存)。再灌流2時間後と24時間後に、Nrf2 標的遺伝子 NQO1、glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM) の肺組織内発現

を定量 RT-PCR で評価、血中酸化度 dROMs・抗酸化力 BAP を Free Carriro Duo フリーラジカル解析装置で測定、肺組織内アポトーシス細胞を TUNEL 染色で評価、肺湿乾重量比、コンプライアンス、酸素化の指標の PaO₂/FiO₂ (P/F) ratio を測定、さらに組織学的解析も行った。

(3) 東北大学医化学分野 山本雅之博士より供与された Nrf2 ヘテロ (WT/+1) ラット (F344/NSlc background) を自家繁殖させ、Littermate の Nrf2 欠損ラット (1+/1+) と野生型ラット (WT/WT) をドナー、WT ラットをレシピエントとして左肺移植を行い、肺組織 Nrf2 標的遺伝子発現解析、肺湿乾重量比、コンプライアンス、P/F ratio 測定、肺の組織学的解析を行った。

(4) Nrf2 欠損ラットをドナー、WT ラットをレシピエントとして左肺移植を行い、レシピエントラットに対する oltipraz 投与の効果を検討した。

4. 研究成果

ラット左片肺移植モデルを用い、肺移植後虚血・再灌流肺障害と肺胞水分クリアランスにおける Nrf2 の役割を検討した。

(1) まず、肺移植 2 4 時間後の肺胞水分クリアランスの変化と Nrf2 活性化剤 oltipraz の効果を検討した。Vehicle 投与 WT ラットをドナーとした場合は、肺胞水分クリアランスは移植前値に比し約 45% の低下を認め、oltipraz 500mg/kg 胃内投与後 2 4 時間のラットをドナーとした場合は、その低下を認めなかった。本実験ではドナー肺の灌流・冷保存を施行しなかったため、より臨床肺移植に近いドナー肺灌流・6 時間冷保存を行ったところ、移植 2 4 時間後にはむしろ肺胞水分クリアランスの上昇を認めた。肺病理組織所見は、散在性に炎症細胞浸潤、肺胞出血、肺胞壁肥厚、perivascular cuffing などの肺障害・肺水腫所見を認め、肺コンプライアンスは対照ラットに比し有意に低値となった。摘出 2 4 時間前にドナーラットに oltipraz 500mg/kg を胃内投与しても肺組織所見、肺コンプライアンスの改善を認めなかった。一方レシピエントラットに、肺移植術 6 時間前に oltipraz 500mg/kg を胃内投与すると、肺コンプライアンスの明らかな低下抑制と肺病理組織所見の改善傾向を認めた。

(2) ドナー、レシピエントの両者を WT ラットとした際には、6 時間冷保存、移植後 2 時間の左肺グラフトにおける Nrf2 標的遺伝子 (NQO1 と GCLM) の発現が有意に亢進した、肺移植後 24 時間が経過すると NQO1、GCLM いずれも、移植前の遺伝子発現レベルまで復することも明らかとなった。レシピエントラットに、肺移植術 6 時間前に oltipraz 500mg/kg を胃内投与すると、移植後 24 時間の左肺グラフトにおける NQO1 と GCLM の発現亢進、血中酸化度の低下、血中抗酸化力の亢進、肺組

織における TUNEL 陽性アポトーシス細胞の減少を伴い、肺酸素化の改善を認めた。(3) Nrf2 欠損 (KO) ラットをドナーとして左肺移植を行うと、WT をドナーとした場合に比し、移植後 24 時間の左肺グラフトにおける NQO1 遺伝子発現が低値で、組織学的により程度の強い好中球浸潤と肺水腫を認め、肺湿乾重量比がより高値で、肺コンプライアンスと酸素化はより不良であった。

(4) Nrf2 欠損 (KO) ラットをドナーとした際のレシピエントラットへの肺移植術 6 時間前の oltipraz 500mg/kg 胃内投与の効果を検討したところ、WT ラットをドナーとした際にみられた oltipraz の効果は全く得られなかった。

以上より、肺移植後虚血・再灌流肺障害において Nrf2 が抑制的な役割を演ずることが明らかとなり、薬物による Nrf2 活性化により肺移植後虚血・再灌流肺障害による酸素化能の低下は抑制され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 1 件)

星川 康、肺移植後虚血・再灌流肺障害予防戦略における抗酸化転写因子 Nrf2 の役割の解明、Organ Biology 査読無、Vol.24 No.2、2017. In press

〔学会発表〕(計 5 件)

星川 康、肺移植後虚血・再灌流肺障害予防戦略における抗酸化転写因子 Nrf2 の役割の解明、第 43 回日本臓器保存生物医学会、2016 年 10 月 26 日、東京薬科大学 (東京都八王子市)

星川 康、石橋直也、三好健太郎、南正人、陳 豊史、白石武史、千田雅之、宮崎拓郎、芦刈淳太郎、秋場美紀、渡邊龍秋、新井川弘道、松田安史、野田雅史、伊達洋至、古川博之、近藤 丘、岡田克典、本邦脳死肺移植 173 例の primary graft dysfunction 危険因子解析、第 42 回日本臓器保存生物医学会、2015 年 11 月 14 日、いわて県民情報交流センター (岩手県盛岡市)

星川 康、石橋直也、三好健太郎、南正人、陳 豊史、白石武史、千田雅之、宮崎拓郎、芦刈淳太郎、秋場美紀、渡邊龍秋、新井川弘道、松田安史、野田雅史、伊達洋至、古川博之、近藤 丘、岡田克典、本邦脳死肺移植 173 例における primary graft dysfunction 発症の危険因子解析、第 51 回日本移植学会総会、2015 年 10 月 2 日、ホテル日航熊本 (熊本県熊本市)

研究者番号： 90323104

三友英紀、野田雅史、渡邊龍秋、野津田泰嗣、松田安史、新井川弘道、桜田 晃、星川 康、遠藤千顕、岡田克典、近藤 丘、肺移植急性拒絶反応が肺胞水分クリアランスに及ぼす影響、日本肺および心肺移植研究会、2015年1月31日、東京大学(東京都文京区)

(3)研究協力者
東郷 威男 (TOGO, Takeo)
東北大学・加齢医学研究所・大学院生

三友英紀、野田雅史、野津田泰嗣、松田安史、新井川弘道、前田寿美子、佐渡 哲、桜田 晃、星川 康、遠藤千顕、岡田克典、近藤 丘、肺移植急性拒絶反応における肺胞上皮を介した水分輸送能の推移、第50回日本移植学会総会、2014年9月12日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

〔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

星川 康 (HOSHIKAWA, Yasushi)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号： 90333814

(2)研究分担者

松田 安史 (MATSUDA, Yasushi)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号： 00455833

野田 雅史 (NODA, Masafumi)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号： 70400356

岡田 克典 (OKADA, Yoshinori)
東北大学・加齢医学研究所・教授