

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462128

研究課題名(和文)心停止ドナーからの肺移植における血管内皮細胞の破綻とその抑制

研究課題名(英文) Endothelial dysfunction after lung transplantation with donation after cardiac death donors

研究代表者

岡崎 幹生 (Okazaki, Mikio)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50467750

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)：マウスモデルを用いて、心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害の分子メカニズム、主に血管内皮細胞の働きを解明し、さらに心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害の抑制・予防することを目的とした。心停止ドナー肺の血管内皮細胞は再灌流前の温虚血時にすでに破綻していると考えられ、ドナー肺における血管内皮細胞障害の抑制が治療の鍵となると考えられた。それを検証するために、血管内皮細胞間の接着を強固にすると報告のあるR-spondin 3を用いたところ、虚血再灌流障害を抑制した。温虚血前に血管内皮細胞間の接着を強固にすることが、温虚血後の再灌流障害の抑制に寄与することがわかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate molecular mechanism of ischemia reperfusion injury after lung transplantation with donation after cardiac death donors and to reduce lung transplantation with donation after cardiac death donors by using mouse model. Endothelial cells of donor lung were destroyed during ischemia period, and the inhibition of endothelial dysfunction is thought to be important on the reduction of ischemia reperfusion injury. R-spondin 3 which has been reported to tighten of endothelial cell junctions reduced lung warm ischemia reperfusion injury. Tightening of endothelial cell junctions was considered to contribute on the inhibition of lung warm ischemia reperfusion injury.

研究分野：肺移植

キーワード：肺移植 虚血再灌流障害 心停止ドナー

## 1. 研究開始当初の背景

肺移植は終末期肺疾患の唯一の治療法であるが、ドナー不足は深刻な問題である。2010年の臓器移植法の改正により脳死ドナーは増加しているものの、ドナー不足の解消には至っていないのが実情である。脳死ドナーが多い海外諸国においてもドナー不足は深刻で、近年はその解決策として心停止ドナーからの肺移植が臨床で行われるようになった。本邦ではドナー不足がより深刻であるにもかかわらず、いまだ法整備が整っておらず、心停止ドナーからの肺移植は行われていない。本邦でもその臨床応用に向けて更なる研究による安全性の検証・実証が急務となっている。心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害における molecular mechanism は不明な部分が多く、臨床応用のためにもその解明が必要である。

申請者はこれまでに肺移植後の虚血再灌流障害 (Okazaki et al. A mouse model of orthotopic vascularized aerated lung transplantation. *Am J Transplant* 2007 など) や免疫応答 (Okazaki et al. Maintenance of airway epithelium in acutely rejected orthotopic vascularized mouse lung transplants. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; Gelman et al. CD4+ T lymphocytes are not necessary for the acute rejection of vascularized mouse lung transplants. *J Immunol* 2008; Okazaki et al. CCR2 Regulates Monocyte Recruitment As Well As CD4+ Th1 Allorecognition After Lung Transplantation. *Am J Transplant* 2010 など) に関する研究をすすめてきた。また、心停止ドナーからの肺移植を臨床応用すべく、大動物モデルを用いた研究 (Okazaki et al. *J Heart Lung Transplant* 2006 など) Ex vivo 回路を用いた心停止ドナー肺の評価・維持・保護などに関する研究をすすめてきた (Kakishita et al. *Ann Thorac Surg* 2010)。その後、ラットの肺移植モデルを用いて、心停止ドナー肺が移植後にレシピエント体内で著明に肺機能が改善するという新たな発見があった (Yamamoto et al. *Transpl Immunol* 2012)。これには抗炎症性サイトカインなどの抗炎症作用が重要な働きをしていることも示唆された。さらに、肺機能だけでなく、グラフト内のサイトカインの発現量や経時的発現パターンは両群で非常に異なっており、冷虚血再灌流障害と温虚血再灌流障害の分子メカニズムに相違があると考えられた。

## 2. 研究の目的

今までのわれわれの研究成果では、心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害は、生体および脳死肺移植後の虚血再灌流障害と

は異なった病態であることが示唆された。すなわち、生体・脳死肺移植との相違点を含め、心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害の機序を解明する必要があると考えられた。虚血再灌流障害でもっとも問題となるのは肺での血管透過性の亢進であり、血管内皮細胞の働きは、虚血再灌流障害の機序解明に重要である。本研究では、マウスモデルを用いて、心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害の分子メカニズム、主に血管内皮細胞の働きを解明し、さらに心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害の抑制・予防することを目的とした。

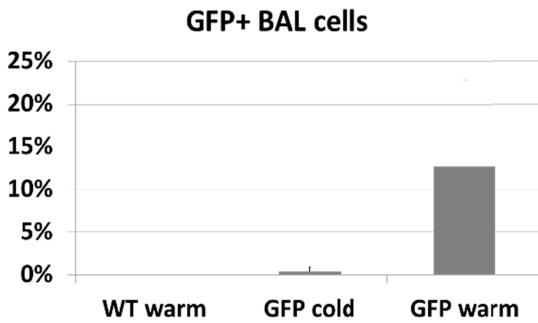
## 3. 研究の方法

まず、動物モデルとして、血管内皮細胞を GFP で標識した Vegfr-1 GFP マウスを用いた。ドナーマウスを失血死させ、室温で保存する心停止ドナー群と、4 で保存する生体ドナー群を作成した。3 時間保存後に気管支肺胞洗浄を行い、フローサイトメトリー、ELISA、PCR、病理学的評価 (HE 染色、免疫染色) を行った。

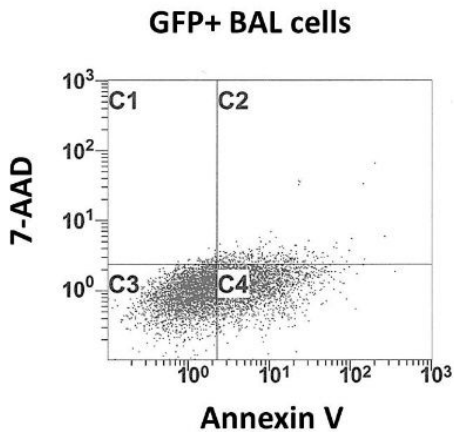
次にマウス虚血再灌流障害モデルを用いて、R-spondin 3 による虚血再灌流障害抑制効果を検証した。分泌タンパク質 R-spondin ファミリーは Wnt シグナル伝達経路を活性化し、発生過程の多くの現象や疾患の発症に関与していることが知られており、近年大変注目され、多くの新たな発見が報告されている。R-spondin ファミリーの一つ、R-spondin 3 は血管の発生に大きく関与する (Kazanskaya, et al. *Development*. 2013)。また、R-spondin 3 は血管内皮細胞間の接着を強固にすることにより小腸の虚血再灌流障害を抑制すると報告された (Kannan, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013)。血管内皮細胞間の接着を強固にすることは in vitro でも証明されており、DCD に R-spondin 3 を投与することにより、血管内皮細胞の破綻を抑制し、ドナー肺の保護および IRI の抑制に寄与すると予想される。虚血 30 分前に R-spondin 3 を投与し、左肺門部を 1 時間クランプし、再灌流から 2 時間後に肺を摘出する群 (I/R+R-Spo 群) と、虚血 30 分前に生食を投与し、左肺門部を 1 時間クランプし、再灌流から 2 時間後に肺を摘出する群 (I/R 群) 開胸のみ施行し、2 時間後に肺を摘出する Sham 群を作製した。1 時間の虚血後に再灌流を行い、再灌流から 2 時間後に肺を摘出した。炎症性サイトカイン、ケモカイン、MAPKs などの molecule を PCR 法、ウェスタンブロッティング法で解析した。病理組織学的にも肺障害・血管内皮細胞障害 (H&E、免疫染色、蛍光顕微鏡) や細胞死 (Tunnel 染色) の評価を行った。

#### 4. 研究成果 結果

血管内皮細胞を GFP で標識した Vegfr-1 GFP マウスを用いて、実験を行った。ドナーマウスを失血死させ、室温で保存する心停止ドナー群(GFP warm 群)と、4℃で保存する生体ドナー群(GFP cold 群)を作成した。心停止から3時間保存後に気管支肺胞洗浄を行い、フローサイトメトリーで分析したところ、GFP warm 群の Vegfr-1 GFP マウスからは多くの GFP 陽性細胞が回収されていた。



また、フローサイトメトリーで、Annexin V と 7-AAD を用いて、アポトーシスについても検討したところ、GFP warm 群は GFP cold 群と比較して、アポトーシスが増加していた。

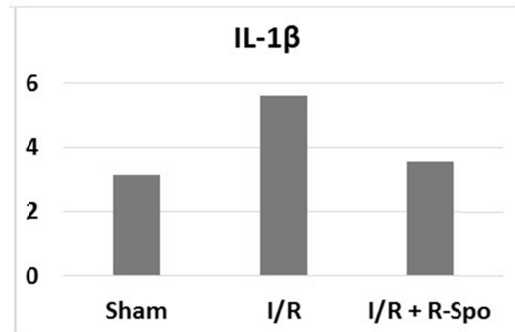
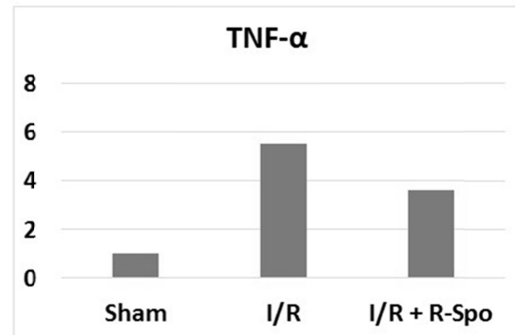


これらの結果は、破綻した血管内皮細胞が気道内から回収されるという新たな発見であり、血管内皮細胞は再灌流前の温虚血時にすでに破綻していると考えられた。さらに破綻した血管内皮細胞が肺胞内でも悪影響を及ぼしている可能性も示唆される。この実験か

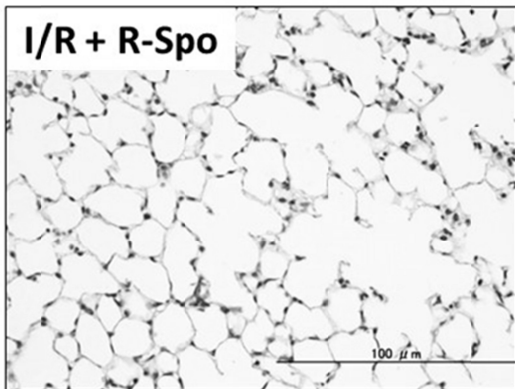
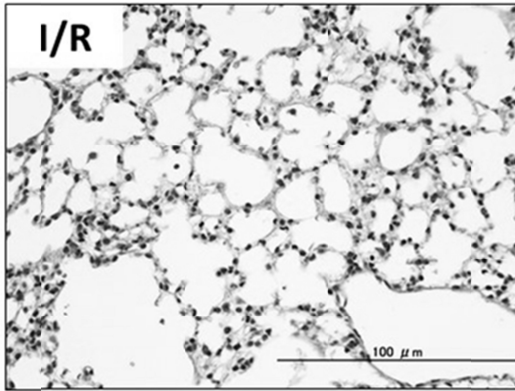
らは心停止ドナーからの肺移植後の虚血最灌流障害において血管内皮細胞の破綻が大きな要因であり、ドナー肺における血管内皮細胞障害の抑制が治療の鍵となると考えられた。

#### 結果

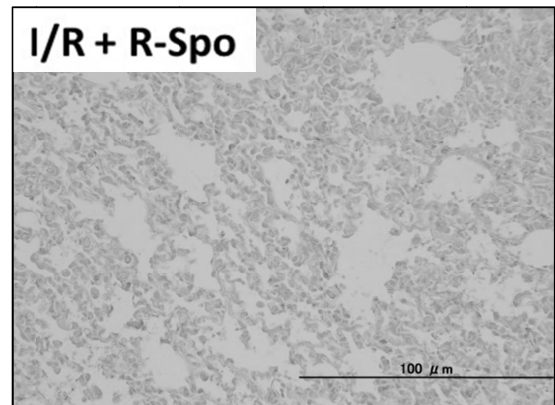
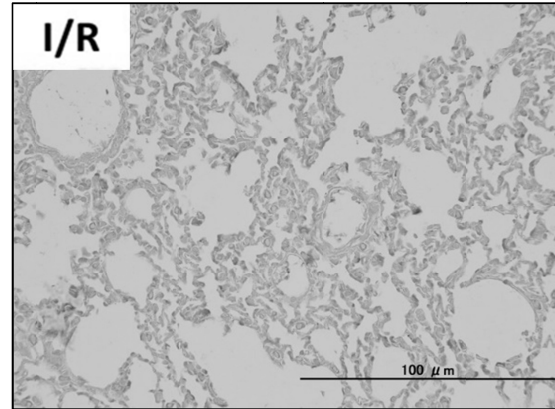
マウス虚血再灌流障害モデルを用いて、虚血30分前に R-spondin 3 を投与する群 (I/R+R-Spo 群) 生食を投与する群 (I/R 群)、Sham 群を作製し、I/R 群と I/R+R-Spo 群では、左肺門部を1時間クランプし、再灌流から2時間後に左肺を摘出し、分析した。Sham 群は開胸のみを行い、2時間後に左肺を摘出した。I/R+R-Spo 群では、I/R 群と比較すると、TNF- $\alpha$  や IL-1 などの炎症性サイトカインが抑制されており、虚血再灌流障害が抑制されていた。



病理組織学的には、I/R 群は炎症細胞の浸潤が著明だったが、I/R + R-Spo 群ではその炎症細胞の浸潤が抑制されていた (HE 染色、次図)。



ることがわかった。



また、Tunnel 染色では、I/R 群でアポトーシスが増加していたが、I/R + R-Spo 群ではアポトーシスが抑制されていた（TUNNEL 染色、下図）。R-spondin 3 の投与によって虚血再灌流障害によるアポトーシスが抑制されるという結果であった。

これらの結果から、R-spondin 3 による血管内皮細胞間の接着を強固にする作用が、虚血再灌流障害に有効である可能性が示唆された。

本研究では、マウスモデルを用いて、心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害の分子メカニズム、主に血管内皮細胞の働きを解明し、さらに心停止ドナーからの肺移植後の虚血再灌流障害の抑制・予防することを目的としていたが、心停止ドナー肺の血管内皮細胞は再灌流前の温虚血時にすでに破綻していると考えられた。また、心停止ドナーからの肺移植後の虚血最灌流障害において血管内皮細胞の破綻が大きな要因であり、ドナー肺における血管内皮細胞障害の抑制が治療の鍵となると考えられた

それを証明するために、R-spondin 3 による虚血再灌流障害抑制効果を検証した。R-spondin 3 は血管内皮細胞間の接着を強固にすることにより小腸の虚血再灌流障害を抑制すると報告されたが、肺の虚血再灌流障害も抑制すると考えられた。やはり、温虚血前に血管内皮細胞間の接着を強固にすることが、温虚血後の再灌流障害の抑制に寄与す

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

岡崎 幹生 (Okazaki, Mikio)  
愛媛大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：50467750

### (2) 研究分担者

佐野 由文 (Sano, Yoshifumi)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：60322228

( )  
..

研究者番号：

( )  
..

研究者番号：

( )  
..

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )