



Title	Protective Effect of Calpain Inhibition During Cold Ischemia on Ischemia-reperfusion Injury After Lung Transplantation
Author(s)	松井, 優紀
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/92063
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	松井 優紀
論文題名 Title	Protective Effect of Calpain Inhibition During Cold Ischemia on Ischemia-reperfusion Injury After Lung Transplantation (肺移植後虚血再灌流傷害に対する冷虚血中のカルパイン阻害の保護効果)
論文内容の要旨 〔目 的(Purpose)〕 肺移植は、末期呼吸器疾患に対する外科的治療法であるが、5年生存率は他の固形臓器移植と比して低く、その死因には移植肺機能不全 (PGD: Primary graft dysfunction) と慢性拒絶反応が挙げられる。中でも急性期にはPGDの関与が大きく、そのPGDの一因となる重要なイベントに虚血再灌流 (IR: Ischemia-reperfusion) 肺損傷があるが、そのIR肺損傷には細胞死として近年提唱された制御型necrosis (regulated necrosis) の一種であるnecroptosisが関与していると報告されている。calpain阻害薬であるN-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal (ALLN) は細胞実験でnecroptosis (calpain-signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3)-receptor-interacting protein kinase (RIPK) pathway) を抑制し、さらにapoptosis (caspase-3 pathway) にも関与することが報告されており、そのことから我々はcalpainの阻害が生体内でもnecroptosisを抑制することにより、肺移植後のグラフト機能を改善すると仮定した。その効果を検証するために、実際の臨床肺移植を模したラット左肺移植モデルを選択した。本研究では、ALLNを用いてこの仮説を検証し、シグナル伝達経路とグラフト機能の双方への影響を検討することを目的とした。 〔方 法(Methods)〕 雄のLewisラット (250-350g) を3群に分けた。Control群 (n=8) は肺動脈カニューレション後のフラッシュ、臓器保存をET-Kyoto液で行い、治療群 (n=8) ではそれにcalpain阻害薬であるALLN (10mg/kg) を含有した。総合の虚血時間は15時間で、カフテクニックを用いて、各々同所左肺移植を行い、再灌流2時間後に検体採取および犠牲死を行った。Sham群 (n=4) には全身麻酔後に左開胸のみ行い、他群と同様、再灌流2時間後に検体採取および犠牲死を行った。グラフト機能は生理学的評価、組織学的評価、細胞死経路のシグナル評価、細胞死評価、炎症性サイトカイン評価の計5項目で評価した。Control群と治療群の2群比較の解析は、nonparametric testであるthe Mann-Whitney U testを用いて行った。 〔結 果(Results)〕 1、生理学的評価：グラフトの酸素化 (PaO₂/FiO₂)、二酸化炭素の貯留、および肺水腫の程度を示す湿乾重量比 (Wet-to-dry ratio) はControl群に比べ、治療群で有意に改善した (P=0.0009, 0.0028, 0.0014)。 2、病理学的評価 (Lung injury score)：肺泡出血、鬱血、フィブリンの析出、ミエロペルオキシダーゼ染色で評価した好中球の浸潤、の計4項目を各々の症例について、grade 0-3の4段階で評価した。Control群に比べ、治療群で肺障害度は低い傾向にあった (P=0.0528)。 3、シグナル評価 (Western blotting)：Control群に比べ、治療群でcalpain活性を反映するcalpastatinの発現が低下し、さらにSTAT3のリン酸化およびRIPK3の発現が抑制されていることから、治療群でnecroptosis経路の抑制を認めた。一方で、apoptosisのシグナルであるcleaved caspase-3はControl群と比べ、治療群で低い傾向のみで、apoptosis経路には変化がなかった。 4、細胞死評価 (蛍光免疫染色)：necroptosis細胞およびapoptosis細胞の割合は、Control群に比べ、治療群で有意に低かった (P=0.0009) が、apoptosis細胞の割合は変わらなかった (P=0.372)。 5、炎症性サイトカイン評価 (ELISA法)：血漿中の炎症性サイトカインであるinterleukin-1βの発現はControl群に比べ、治療群で有意に低下した (P=0.0313)。 〔総 括(Conclusion)〕 冷虚血中のALLN投与が抗necroptosis作用を介し、IR肺損傷に対して有意な保護効果を示すことを実証した。この戦略は、肺移植後の急性期におけるPGDを改善するための有望な候補となる可能性がある。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 松井 優紀				
論文審査担当者		(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	新谷 康	新谷 康
	副 査	大阪大学教授	宮川 繁	宮川 繁
	副 査	大阪大学教授	奥山 宏臣	奥山 宏臣

論文審査の結果の要旨

肺移植後急性期の主な死因は、原発性移植片機能不全であり、虚血再灌流障害がその主因である。本研究では、ラット肺移植モデルを用いて、新規細胞死であるネクロプトーシスを主体とした虚血再灌流障害を抗ネクロプトーシス作用をもつカルパイン阻害薬をドナー肺に投与することによって、グラフト機能が改善し、移植肺機能不全が抑制されることを示した。これまでに、生体における長時間虚血によるネクロプトーシスの発症機序に関する報告は少なく、さらにドナー肺のみへの投与で長時間の虚血再灌流による肺障害を抑制する薬剤の報告はなく、本研究の成果が移植後患者の治療成績向上に寄与する可能性がある。したがって、本研究は学位に値するものと認める。