

畑地 豪 論文内容の要旨

主 論 文

The Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitor PJ34 Reduces Pulmonary Ischemia-Reperfusion

Injury in Rats

ポリ ADP リボースポリメラーゼ阻害薬 (PJ34) は
ラットにおける肺虚血再灌流障害を軽減する

畑地 豪、土谷智史、宮崎拓郎、松本桂太郎、山崎直哉、
沖田直之、七島篤志、樋上賀一、永安 武

Transplantation, 2014 掲載予定
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：永安 武 教授)

緒 言

肺虚血再灌流障害は肺移植において、急性拒絶の要因となりうる合併症である。その制御は移植肺の長期生着に重要な意味を持つと考えられ、現在に至るまで様々な治療法の検討がなされてきたが、未だ決定的な治療はない。

Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) は、1 本鎖 DNA 損傷の修復に関与する酵素であり、その阻害薬は乳癌の治療薬として臨床応用されている。

近年この PARP 阻害薬の新たな効果として、肝臓・脳などの虚血再灌流障害抑制や薬剤起因性急性肺障害に対する肺保護効果などが注目されている。PARP 阻害薬である PJ34 は抗酸化物質として抗炎症作用を有するとされているが、これまでは測定手技の煩雑さなどから、臨床的に酸化ストレス応答の定量的な評価は困難であった。今回我々は、PJ34 の肺虚血再灌流障害に対する肺保護効果を病理組織学的に評価し、抗酸化物質としての作用を酸化ストレス応答の定量的測定によって評価した。

対象と方法

ラット虚血再灌流障害モデルの作成

生後 7 週齢の Wistar ラットを用い、全身麻酔下に左頸静脈より生食もしくは PJ34(10 mg/kg)を投与した。薬剤投与 40 分後に左開胸による左肺動静脈および主気管支遮断による虚血モデルを作成した。虚血時間は 1 時間とし、十分な inflation による再灌流後に閉胸した。偽手術群(sham 群)、生理食塩水投与+虚血再灌流障害群(IR 群)と PJ34 投与+虚血再灌流障害群(PARP-i 群)の 3 群(各群：n=15)を作成し、評価を行った。

評価項目

- ・再灌流後 2 日目に、肺および肝・腎の病理組織評価、肺の TUNEL 染色および Western blotting 法で組織中 PARP 活性を測定した。また、血清中の肝機能 (AST, ALT, LDH) を測定した。
- ・再灌流後 4 時間、2 日目、7 日目に、ELISA で炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6) を測定し、Luciferase assay で組織内 ATP 濃度を測定した。また、湿乾肺重量比を測定した。
- ・酸化ストレス応答は、頸静脈に留置されたカテーテルを用いて同一個体から継時的に再灌流後 4 時間、2 日目、3 日目、5 日目、7 日目に 0.5ml の血液を採取して、Wisnerll 社の F.R.E.E を用いて d-ROM (酸化ストレス指標) 値、BAP (抗酸化力指標) 値を測定した。

結 果

- ◆病理組織学的に、IR 群では再灌流後 2 日目に強い炎症が誘導され、7 日目に消褪した。PJ34 投与 PARP-i 群では、2 日目の炎症が抑制された。
- ◆再灌流後 2 日目の TUNEL 染色では、IR 群において炎症細胞、肺胞上皮細胞、血管内皮細胞などに TUNEL 陽性細胞がみられるのに対して、PARP-i 群では sham 群と同程度に抑制された。
- ◆再灌流後 2 日目の組織中 ATP 濃度は IR 群で有意に低下したのに対し PARP-i 群では sham 群と同程度に維持された。血清中の炎症性サイトカインは IR 群と比較して、PARP-i 群で炎症の抑制が認められた。
- ◆酸化ストレス応答では、d-ROM 値、BAP 値は迅速かつ再現性のある指標であった。IR 群では、d-ROM 値は再灌流後 2 日目まで上昇し、7 日目に向かって徐々に低下した。一方で、BAP 値は再灌流後 4 時間で上昇したものの、その後低値となった。その結果、IR 群では酸化ストレス優位の状態が 7 日目でも持続していた。PARP-i 群では、d-ROM 値は IR 群と同様の経過を取るのに対して、BAP 値が再灌流後 2 日目にピークとなり、7 日目まで高値を保ちながら徐々に低下していき、酸化ストレスに対する抗酸化力のバランスが保たれていた。

考 察

PJ34 による肺虚血再灌流障害に対する炎症抑制効果と細胞内 ATP/NAD⁺維持、抗酸化力の維持による、肺胞上皮細胞や血管内皮細胞の細胞死抑制などの肺保護効果が認められた。興味深い点として、炎症が沈静化に向かう再灌流後 3 日目以降も、IR 群では d-ROM 値と BAP 値のバランスが崩れた状態が持続しているのに対し、PARP-i 群では d-ROM 値に対応するように BAP 値が高く保たれ、生体の恒常性維持に寄与していると考えられた。

PJ34 は肺虚血再灌流障害時に、マクロファージや肺胞上皮細胞、血管内皮細胞において、酸化ストレス応答のバランスを制御し、炎症とアポトーシスを制御する有効な薬剤と考えられた。今後は PJ34 を添加した組織還流保存液などによる臓器保存時間の延長効果の検討、移植モデルでの肺虚血再灌流障害抑制効果の検討や BAP 値がどのように PARP 阻害薬によって制御されているかなどの、より詳細な分子生物学的メカニズムの解明も必要と思われる。