京都大学	博士（医学）	氏　名	上田　聡司
論文題目	Protective effect of necrosulfonamide on rat pulmonary ischemia-reperfusion injury via inhibition of necroptosis (ラット肺虚血再灌流障害に対するネクロトーシス阻害作用を介したネクロスルフォナミドの保護効果)		

（論文内容の要旨）

【背景】虚血再灌流障害は肺梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患や固形臓器移植など様々な状況で生じ得る病態である。肺移植においては、虚血再灌流障害は早期移植肺機能不全の最も重要な原因となり、また慢性期移植肺機能不全の原因にもなると考えられている。細胞死研究において、以前は偶発的に生じると考えられてきた necrosis の中に分子メカニズムにより誘導される細胞死が含まれることが近年認知され、虚血再灌流障害に伴う細胞死との関連が注目されている。とりわけ necroptosis に関しての報告は多く、種々の固形臓器移植で necroptosis を抑制することによって虚血再灌流障害を軽減したと報告されている。しかしながら、necroptosis の実行因子と考えられている mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL)とその抑制による虚血再灌流障害の軽減効果に関してはほとんど報告がない。そこで本研究では MLKL 阻害薬である necrosulfonamide (NSA)に着目し、ラット肺虚血再灌流モデルにおいて薬剤介入の動物実験を行い、NSA による虚血再灌流障害の抑制効果を評価した。

【方法】雄の Lewis ラットを Sham 群（6 例）、Vehicle 群（8 例）、NSA 群（8 例）に分けた。Vehicle 群と NSA 群に関しては、麻酔下にヘパリン化、左開胸し 90 分間左肺門をクランプ、開放後 120 分間再灌流を行い評価した。NSA 群には NSA 0.5 mg/body、Vehicle 群には溶媒をそれぞれ肺門クランプの 30 分前に腹腔内投与した。Sham 群では開胸のみを行い、210 分後に評価した。評価項目は生理学的データ、組織学的所見、ウェスタンブロット法を用いた蛋白発現量、炎症性サイトカイン濃度とした。また細胞死に関して apoptosis と necroptosis をそれぞれ個別に評価するため Terminal deoxynucleotidyl transferase- dUTP nick-end labeling (TUNEL)と cleaved caspase-3 を使用した蛍光２重免疫染色を行い、コンピューターソフトで apoptosis 細胞と necroptosis 細胞をそれぞれ自動カウントし評価した。

【結果】動脈血酸素分圧、ダイナミックコンプライアンスに関しては NSA 群において有意に高く、また気道内圧は有意に低下していた。肺浮腫の評価である湿乾重量比も有意に改善を認めた。組織所見では、気道内赤血球数と間質内好中球浸潤は NSA 群で有意に低下していた。血管壁と全血管の面積の比における血管浮腫の評価でも湿乾重量比と同様に NSA 群で有意に改善を認めた。また肺組織を用いたウェスタンブロットで NSA 群において MLKL の発現が有意に抑制されていた。血漿中炎症性サイトカインも有意な減少が見られた。

蛍光２重免疫染色による細胞死の観察において、NSA 群は Vehicle 群と比較して視野あたりの necroptosis 細胞が有意に減少していた。しかしながら、apoptosis 細胞においてはやや減少を認めるものの有意差はなかった。また細胞数カウントにおいて、１視野における necroptosis 細胞は apoptosis 細胞と比較して多い傾向にあった。

【結語】肺虚血再灌流において MLKL 阻害薬である NSA を投与することにより、necroptosis が抑制され、障害を軽減しうる。NSA 投与により肺生理学的データ、組織学的所見、炎症性サイトカインの改善、及び necroptosis 細胞の減少が見られた。MLKL 阻害薬 necrosulfonamide は虚血再灌流障害に対しての有望な治療法の１つになりうる。

（論文審査の結果の要旨）

虚血再灌流障害は、肺移植において、移植肺機能不全の重要な原因になると考えられている。細胞死研究おいて、分子メカニズムで誘導される necrosis 様の細胞死と、虚血再灌流障害に伴う細胞死との関連が注目されている。本研究では、その一種の necroptosis とその実行因子と考えられている mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL)に着目し、ラット肺虚血再灌流モデルを用いて細胞死抑制による虚血再灌流障害の軽減効果を評価した。ラットに左肺門遮断 30 分前に MLKL 阻害薬 necrosulfonamide (NSA)もしくは溶媒のみを腹腔内投与し、左肺門を 90 分遮断した後に開放して 120 分再灌流した。

NSA 投与により、動脈血酸素分圧、ダイナミックコンプライアンス、気道内圧、肺浮腫の軽減効果が見られ、また組織学的に虚血再灌流障害の軽減を呈した。肺組織のウェスタンブロット法で NSA 投与により MLKL の発現が抑制され、血漿中炎症性サイトカインの減少も見られた。蛍光２重免疫染色において、NSA 投与により necroptosis 細胞の有意な減少を認めた。

結論として、NSA は necroptosis を抑制することにより、虚血再灌流障害を軽減し得ることが示された。

以上の研究は necroptosis 阻害作用を有する NSA を使用した肺虚血再灌流障害の軽減による肺保護効果の機序の解明に貢献するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 6 年 4 月 22 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野のための試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降