

博士論文

肺移植後グラフト不全の予測は可能か？

移植前ドナー肺の遺伝子発現解析の有用性

安樂真樹

論文タイトル：肺移植後グラフト不全の予測は可能か？移植前ドナー肺の遺伝子
発現解析の有用性

所属：東京大学医学部附属病院呼吸器外科

指導教員：中島淳教授

申請者名：安樂真樹

【要旨】

肺移植において primary graft dysfunction (PGD) は急性期術後死因としてその 3 割程度を占めるが、PGD を移植前に予測することは困難である。そこで今回、移植前のドナー肺の特定の遺伝子発現や遺伝子発現パターンが肺移植後 PGD と関連があるとの仮説で研究を行った。肺移植後に重度の PGD を生じたドナー肺と、移植術後に PGD を起さず予後良好であったドナー肺の遺伝子発現解析を行い、特定の発現パターンが肺移植術後 PGD 発症の予測因子に成り得ることを示した。ドナー肺評価に遺伝子発現解析を導入することでより正確な術後予後予測に寄与することが期待される。

【序文】

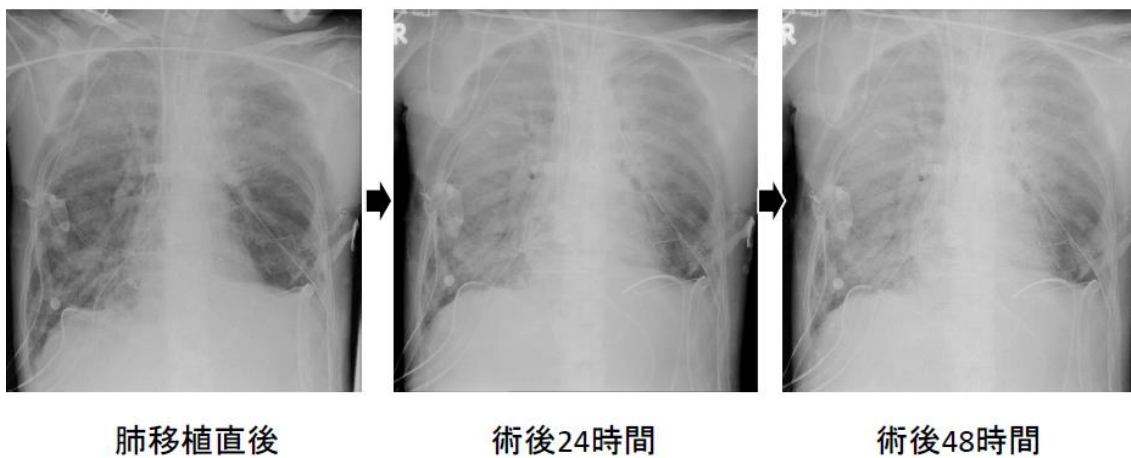
脳死肺移植は内科的治療に抵抗性の進行性肺疾患に対する治療として確立されており、現在年間約 4000 例の肺移植が世界全体で行われている。原因疾患や術式（両肺もしくは片肺移植）の違いにより移植術後の予後は異なるが、国際レジストリー（国際心肺移植学会による 1990 年から 2012 年までの成人肺移植総数 41,767 例）では 1 年生存率 80%、5 年生存率 53%、10 年生存率 32%と報告されている (1)。術後比較的早期の死因として、感染、移植肺拒絶、そして移植肺不全 (graft failure) が知られているが、なかでも移植肺不全は術後 30 日以内の死因の 24.1%、術後 1 年以内の死因の 16.6%を占めている (1)。

Primary graft dysfunction (PGD) は、非特異的肺胞障害、肺水腫、重度低酸素血症に特徴づけられる症候群として 2005 年に定義されている (2,3)。PGD はその重症度により Grade 0（肺ガス交換能に問題がなく、胸部レントゲン写真上肺水腫の所見がないもの）から、Grade 3（肺ガス交換能が著しく障害され、また胸部レントゲン写真上肺水腫の所見を認める）までの 4 段階に分けられており、どの段階までを PDG と取るかで発症頻度が変わってくる。肺移植術後 PGD の発症頻度は、Grade 2 以上で概ね 12%から 25%と報告されており (4)、さらにその発症は移植肺不全の原因として重要である (5)。PGD の臨床的所見として、前述のように肺ガス交換能の低下と胸部レントゲン写真上肺の浸潤影がその特徴であるが（図 1）、一方で同様の所見を示し得る他の病態、すなわち急性肺拒絶、心不全、吻合部狭

窄（肺静脈吻合部）による肺うっ血、などを除外する必要がある。臨床的にはこれらの因子を除外するために血清中の抗 HLA 抗体、特に donor specific antibody (DSA) の検出（もし存在すれば液性拒絶の可能性が高い）、心エコー（左心不全による肺水腫の除外）、経食道エコー（左房吻合部の狭窄除外）を行う。しかし純粋に PGD のみの病態と診断できる症例はむしろ少なく、たとえば若干の感染や一時的な心不全状態、また循環血液量過多による肺水腫の要素が重なっていることもまれではない。

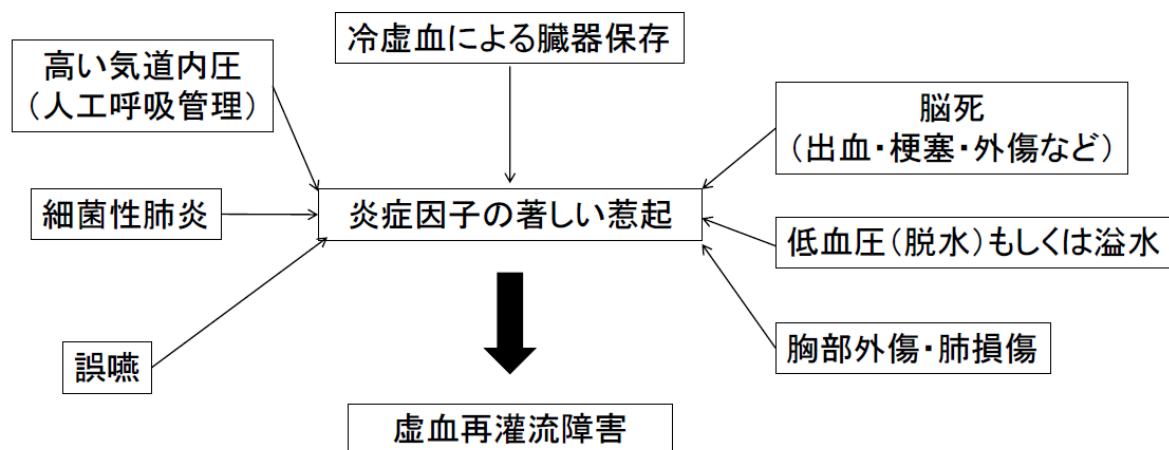
図 1. Primary graft dysfunction における胸部レントゲン所見の典型的な経過。

時間経過とともに、両側移植肺の浸潤陰影が増強している。



PGD は術後 72 時間以内に発症する病態として定義されており、その本体は虚血・再灌流による組織障害と考えられ、組織障害を惹起する様々な因子が要因と考えられている (2)。虚血再灌流障害と関連する因子をまとめて図 2 に示す。

図 2. 虚血再灌流障害を増悪させる因子。ドナー肺は臓器提供前の管理、すなわち人工呼吸器設定（高い気道内圧による肺損傷）、過剰補液もしくは脱水、血管作動薬の投与、脳障害（出血、梗塞、外傷など）、細菌感染症などのストレスにさらされることが、移植後再灌流という劇的変化に伴う肺血管透過性の異常亢進につながる。



PGD の発症や肺移植術後のレシピエントの予後に、ドナーに関連した因子が果たす役割については以前より報告されている (6,7,8)。きわめて重度の PGD を生じるドナー肺は図 2 の背景に加えて、高齢者、喫煙者、長期の人工呼吸管理がなさ

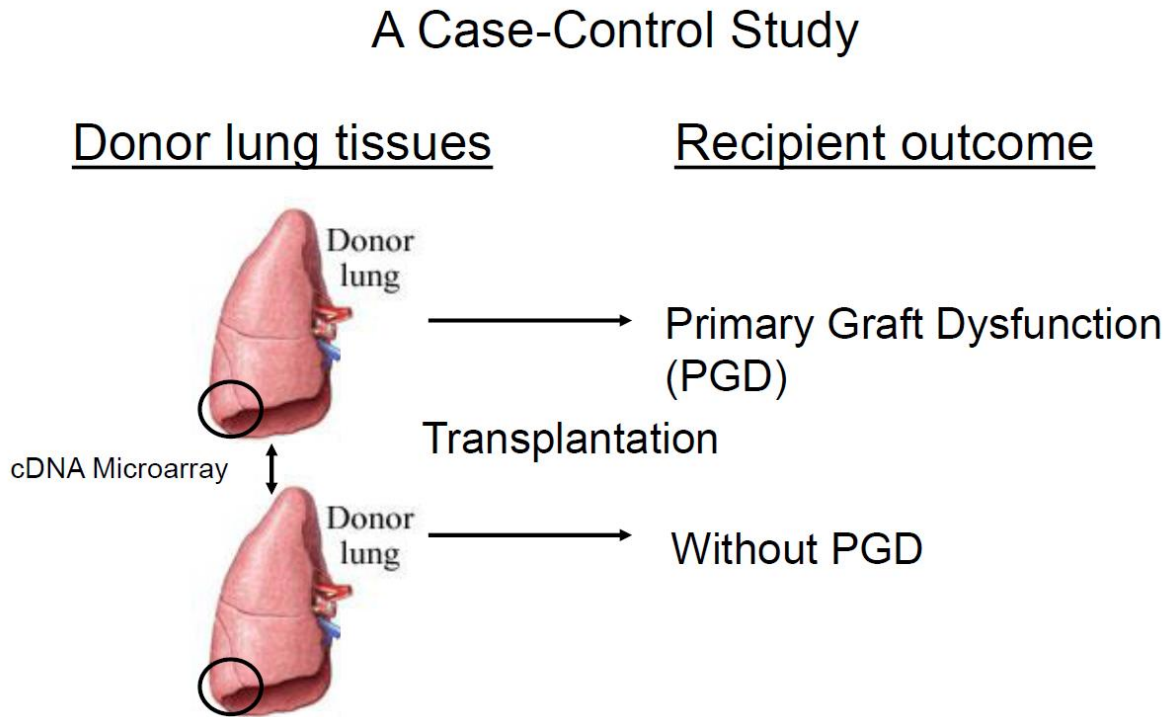
れたドナー、血行動態の不安定なドナーから採取されたことなどが要因として知られている。現在ドナー肺を移植に使用するかどうかの判断は、臨床所見（年齢、喫煙歴、胸部レントゲン写真、気管支鏡所見、そして摘出時の直視下触診での評価など）を基に行われているが、選択基準となる上記臨床所見がすべて理想的と思われるドナー肺でも、移植後に重度の PGD を来たす場合がある (9,10)。結果としてドナー肺を使用できるかどうか迷うケース（マージナルドナー）では、術後 PGD のリスクから移植への使用を断念する傾向にあり、ひいては待機患者の死亡率増加に繋がると考えられる (11)。

このような背景から、ドナー肺を移植する前に利用可能な PGD 予測因子があれば大変有用であると考えられ、本研究はその探索が目的である。移植前のドナー肺のサンプルを用いた研究では、RT-PCR による mRNA の発現レベルにおいて、pro-inflammatory cytokine である interleukin-6 (IL-6) および IL-6 と IL-10 の発現比が、肺移植術後の予後を反映していることが示された (12)。またドナー肺の自然免疫 toll-like receptors に関連する mRNA の発現が、ドナーの挿管期間と関連があることを示してきた (13)。

遺伝子発現マイクロアレイを用いた解析は、慢性、急性肺拒絶の遺伝子発現パターンの認識に用いられている (14)。また我々は以前にラット肺移植モデルを用いて、虚血再灌流障害における遺伝子発現マイクロアレイによる手法の有用性を示した (15)。また Ray らは、移植前のドナー肺の遺伝子発現パターンが、移植後

の primary graft dysfunction に関連していることを示している (16)。今までの先行研究は、ドナー肺での遺伝子発現パターン (16)、もしくは移植後のレシピエントからのサンプルによる遺伝子発現解析が主であった (14, 17,18)。本研究の目的は、移植前のドナー肺の特定の遺伝子発現もしくは発現パターンが、移植後の PGD 発症の予測に役立つのか解析することである。さらに将来的には PGD を引き起こす可能性あるドナー肺を移植から除外することを可能にすることで、ドナー肺の選択をより確実なものにすることが目標である。今回の研究では遺伝子発現解析を行うにあたって、ケース・コントロールスタディの形を採用した (図 3)。

図 3. 本ケース・コントロール研究のデザイン



すなわち、ケースを PGD で死亡もしくは extracorporeal membrane oxygenation (ECMO)を要した症例群とし、それぞれの群の移植前にサンプルされたドナー肺組織の遺伝子発現を比較・解析することで PGD 関連の遺伝子やその発現パターンを探ることにした。またこれらの症例でドナー肺には臨床的所見においてその適応に問題がなかったと考えられたものに限って解析を行った。さらに、背景因子を揃えるため、マッチさせる対象としてレシピエントの原疾患が同じで、かつ肺移植後きわめて良好な経過をたどった症例を選択した。

【方法】

スタディデザインと遺伝子マイクロアレイ解析のためのサンプル選択

症例選択は Figure 1 に示す通りである。PGD に関与する遺伝子発現を認識するために、PGD 症例と non-PGD 症例をマッチさせるデザインとした。ケース (PGD group) は重症の PGD で移植術後 30 日以内に死亡した症例、もしくは重症の PGD のために ECMO を必要とした症例とした。移植後の死因と、重症の PGD とされた症例はすべてトロント肺移植プログラムの移植外科医 (Shaf Keshavjee, Thomas K. Waddell, Andrew F Pierre, Marc de Perrot) により検討され、コンセンサスを得た症例に限定した。誰の目にも明快な PGD の規準やゴールドスタンダードがない状況では、全ての移植外科医が definitive PGD と認めた症例のみを選択することが必要と考えられたからである。これらの症例は International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) の PGD に関する定義をほぼ満たしている。すなわち、(1) グラフト不全を来たす他の原因を認めない、(2) 胸部レントゲン写真で肺水腫と合致する所見を認める、(3) ガス交換能が著しい障害を受けている ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio < 200)、(4) 急性肺拒絶ではない、の各項を満たしていることが条件である (3)。一方コントロール群は、PGD を発症せず、かつ少なくとも移植後半年間を生存している症例から選ばれた。さらに症例選択のバイアスを減らすために、次の項目をケースとコントロールの症例でマッチさせた：(1) レシピエントの年齢

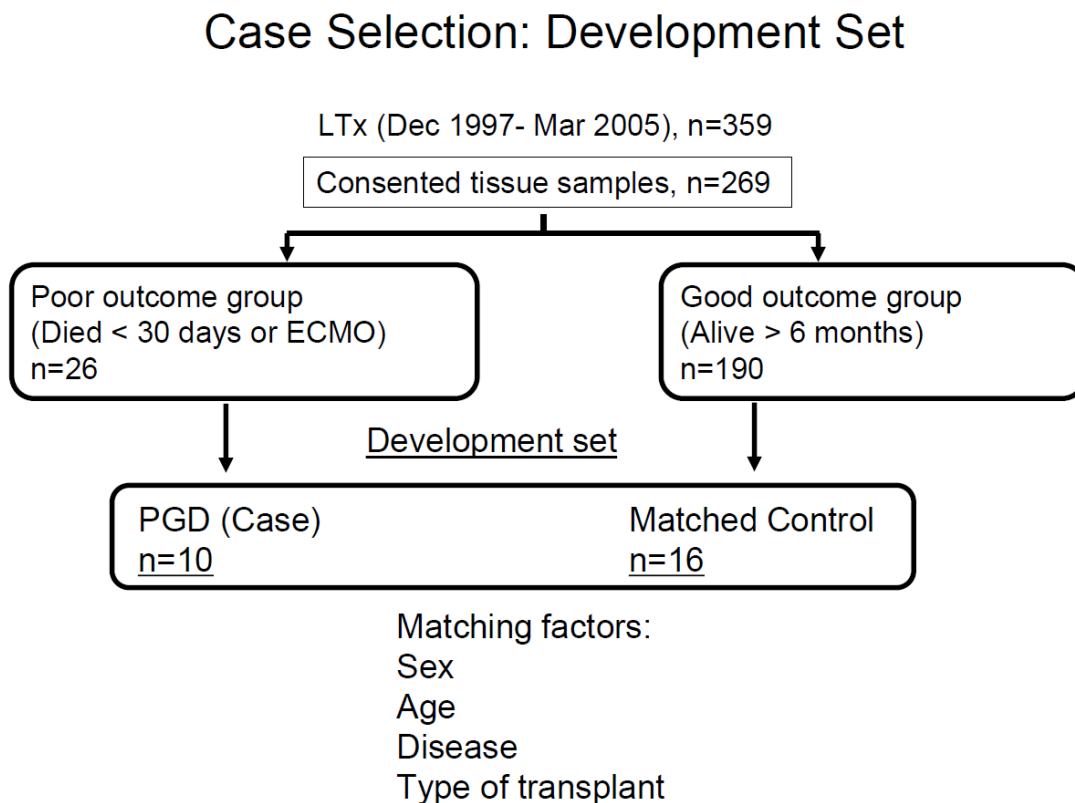
(± 10 歳)、(2) レシピエントの性別、(3) レシピエントの肺原疾患、(4) 肺移植の術式(片肺移植か両肺移植か)。

1997 年 12 月から 2005 年 3 月の期間に肺移植を行われ、またドナー肺より遺伝子解析用のサンプルが採取されている症例の中から、上記の選択項目を満たして development set のサンプルとして選ばれた症例が本研究に使用された。心肺同時移植症例は除外した。PGD の診断が間違いなく合意を得られた 10 症例と、マッチする条件を満たした計 16 症例が最初の遺伝子マイクロアレイ解析の対象となった。図 4 に上記症例 (development set) 選択のフローチャートを示す。

図 4. 遺伝子マイクロアレイ解析に使用する症例選択のフローチャート

(Development set)

PGD 症例（ケース）は、術後 30 日以内に死亡もしくは ECMO を使用した症例のうち、トロント大学肺移植外科医（Drs. Keshavjee, Waddell, de Perrot, Pierre）が全員一致でほぼ純粋な（他の要因がない）PGD と判断した症例が選択された（n=10）。予後良好症例（コントロール）は、術後 PGD を起すことなく短くとも術後半年間は生存・経過観察されている症例の中から、レシピエントの背景（性別、年齢、原疾患、肺移植術式の別）が PGD 症例とマッチする症例が選択された（n=16）。



ドナー肺のサンプルについて

ドナー肺のサンプルは、冷虚血時間帯（移植術直前のタイミング）に、ドナー肺末梢部分よりステイプラーを用いて 1 cm x 1 cm 大で採取された。採取した末梢肺組織は主に肺胞組織が中心であるが、末梢の気管支上皮細胞や脈管系組織も含まれている。肺サンプルは採取直後に液体窒素で -80°C に冷却、保存した。サンプリング、および検体の研究使用に関しては全例から事前に同意を得て行われた。本研究はトロント大学の University Health Network (UHN) に設置された倫理委員会より承認を得て行われた。

cDNA マイクロアレイ実験と、マイクロアレイデータ解析

Total RNA (10 µg) を肺サンプル (0.5-1 g 前後) から抽出するために Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用し、RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA) と DNase treatment (RNase-free DNase Set, Qiagen) を用いて純度を高めた。また RNA のクオリティは Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA) で確認した。cDNA マイクロアレイチップは、UHN Microarray Center より供給されたものを使用した。全ての抽出 RNA は universal reference RNA (Stratagene, La Jolla, CA) とハイブリダイズすることで、検体間の比較が可能になるようにした。cDNA マイクロアレイに関しては <http://www.uhnres.utoronto.ca/facilities/microarray.htm> のサイトに詳細が記載されている。ハイブリダイズされたアレイは GenePix 4000 scanner (Axon Instruments Inc.,

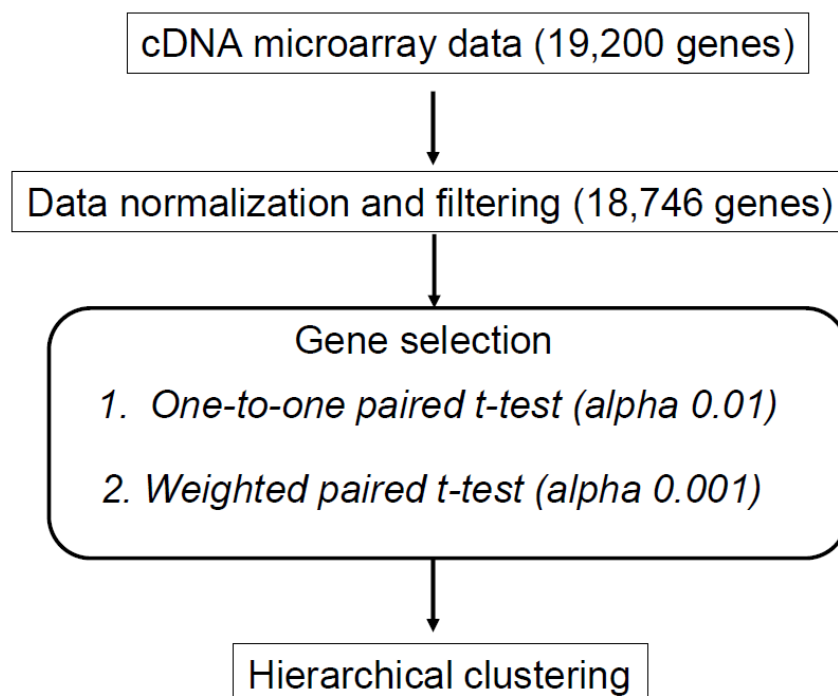
Union City, CA)を用いて読み取り、読み取られたデータは TIGR ExpressConverter version 1.7 (The Institute for Genomic Research)を用いて(.gpr)ファイルから(.mev)ファイルへ変換した。それぞれのマイクロアレイのスポットの蛍光強度(Cy3 と Cy5)は、すべてのハイブリダイゼーションの蛍光強度から算出された standard deviation(SD)を用いて、マイクロアレイチップ内で normalization された。この normalization は、Microarray Data Analysis System version 2.19 (The Institute for Genomic Research)を用いて、locally weighted scatterplot smoothing (LOWESS) normalization の手法で行った(19,20)。

以上の解析の結果、18,746 遺伝子が少なくとも 80%の検体で解析可能な発現蛍光強度として検出された。解析には TIGR MutiExperiment Viewer version 3.1 (The Institute for Genomic Research) (20)、Cluster version 2.11 、及び Tree View version 1.60 (Stanford University) (21)を使用した。データは Gene Expression Omnibus www.ncbi.nlm.nih.gov/geo よりアクセス可能である(accession number GSE9102 and GPL5909)(22)。図 5 にマイクロアレイ遺伝子発現データの解析のフローを示す。

図 5. マイクロアレイ遺伝子発現解析の流れ

本研究で用いた cDNA マイクロアレイのチップは 19,200 遺伝子が検出可能であり、有意に発現を認めた（バックグラウンドではないと考えられる発現）18,746 遺伝子が解析の対象となった。2 種類の t-test を用いて、PGD 群（ケース）と予後良好群（コントロール）間の比較で有意に発現の差を認める遺伝子を検出した。それらの遺伝子は階層的クラスタリング解析 (hierarchical clustering) にも使用して発現のパターン解析を行った。

Microarray Data Analysis (Development Set)

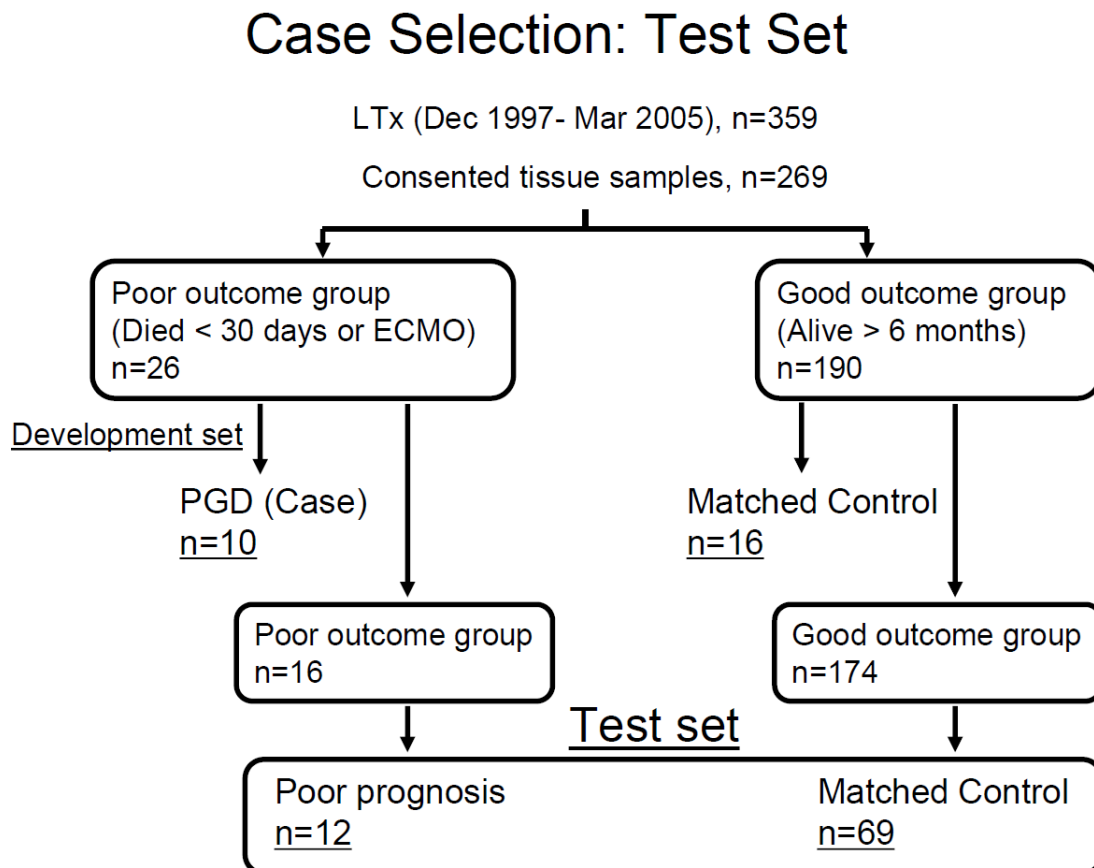


Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

マイクロアレイ遺伝子発現解析を用いて Development set で選択された遺伝子は、RT-PCR を用いて発現を確認した。さらにこれら選択された遺伝子は、先述の development set とは独立した 12 例の予後不良であった症例と、これらとマッチされた予後良好であった 69 例のサンプルを使用して発現を解析した(test set)。Test set の症例選択のフローチャートを図 6 に示す。Development set では、より”純粋な” PGD 症例を選択することで、他の要因による遺伝子発現ノイズを極力排除し PGD 関連遺伝子の検出に努めた一方、test set では“純粋な” PGD 症例の選択は困難であったものの、PGD の要素も有する極端に予後不良の症例を選択できたことから、選ばれた遺伝子の test set として用いることは妥当と考えた。

図 6. Test set 症例サンプルの選択

Test set 中の予後不良症例中、明らかに手術の技術的問題による術後早期死亡例などは除かれている。しかし、より“純粋な” PGD 症例は、すでに development set として使用していることから、test set の予後不良群は純粋な PGD 症例ではなく、PGD の要素に加えて他の要因（一過性の心機能障害による肺水腫症例など）も重なっている。これらの予後不良症例と、レシピエントの患者背景をマッチさせた予後良好な 69 症例も併せて test set として遺伝子解析に使用した。



総 RNA 3 μg から cDNA 60 μl を合成するために GeneAmp® RNA PCR Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK)を使用した。機器は PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research, Inc., Waltham, MA) を用い、25°C で 10 分、48°C で 30 分、95°C で 5 分のプログラムとし、cDNA 合成を行った。PCR の primer デザインには Primer Express software version 2.0 (Applied Biosystems) を用いた。RT-PCR には PRISM 9700HT (Applied Biosystems) を使用し、反応には cDNA (800 ng/ μl) 2 μl 、SYBR® Green PCR Master Mix (2 \times) (Applied Biosystems) 7.5 μl 、そして gene primers (300 nM, 15 μl) を用いた。RT-PCR は 95°C で 15 分、その後 94°C 15 秒間、60°C 1 分間を計 40 サイクル行った。Standard curve は計 5 つの cDNA 希釈液及び cDNA テンプレートを入れていない negative control を使用して計算した。全てのアッセイは duplicate で行った。遺伝子発現はすべてのプレートでアッセイした beta-2-microglobulin を house-keeping gene として用いることで normalization とした。

統計解析手法について

マイクロアレイ遺伝子発現解析、及び RT-PCR での遺伝子発現の解析は以下の 4 ステップで行った。

Step 1. Development set におけるマイクロアレイ遺伝子発現解析による PGD 予測
遺伝子抽出と、その発現の RT-PCR による確認

Step 2. Development set において選択された遺伝子群の hierarchical clustering algorithm を用いた発現パターン解析

Step 3. Development set と独立した症例サンプル群 (test set) による、上記 step 1, 2 で選択された遺伝子およびその発現パターンの解析

Step 4. Hierarchical clustering algorithm を用いて選択された遺伝子群発現パターンを test set の症例サンプルの遺伝子発現解析にあてはめることで、予後良好な症例と予後不良な症例を判別できるか検討

発現遺伝子の選択には paired t-set (two-sided) を用いた。図 2 に示したように、10 例の PGD 症例とそれらにマッチした 16 例のコントロール（すなわち 1:1 マッチの症例が 4 例ずつ、1:2 マッチの症例が 6 例ずつ）でマイクロアレイ遺伝子発現解析を行った。2 例のコントロールでマッチした場合、2 例の遺伝子発現の平均を使用して PGD 症例との weighted paired t-test に用いるか ($p < 0.001$)、もしくはランダムに 2 例マッチしたコントロール症例の 1 例を除いて paired t-test ($p < 0.01$) を行った。

統計解析には JMP version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC)を用いた。また臨床的因子の解析には Fisher's Exact test を用いた。症例群別の生命予後推定には Kaplan-Meier curves を用いた。その際 P 値は 0.05 未満を有意とした。

【結果】

ドナー関連 PGD リスク因子の比較 (PGD 群と予後良好群)

標準的なドナー関連のリスク因子の比較では、PGD 群と予後良好群の間で有意な差を認めなかった (Table 1)。解析したドナー関連リスク因子は以下である：ドナーの年齢 (55 歳以上)、喫煙歴 20 pack-years 以上、ABO non-identical status、外傷性脳挫傷の有無、胸部レントゲン写真上の浸潤影、気管支鏡観察での気道分泌物増加、サイトメガロウイルス mismatch (positive donor and negative recipient)、ドナー臓器摘出前の最終 P/F ratio < 300 mmHg、臓器提供に至るまでの人工呼吸器装着期間 > 72 時間。なお PGD の定義上、片肺移植には定義を当てはめにくかったものの、臨床的に PGD と考えられた 1 症例は PGD 群として使用した。検討した全 269 症例中 15 例 (0.06%) は片肺移植症例であった。

Table 1. PGD 群と予後良好群におけるドナー関連 PGD リスク因子の比較

Characteristics	Clinical outcome group		p-value
	PGD (n = 10)	Good (n = 16)	
Age			
≥ 55	3/10	6/16	1.0
Smoking history			
≥ 20 pack-years	4/10	6/16	1.0
ABO compatibility			
Identical	9/10	15/16	1.0
Traumatic head injury	3/10	3/16	0.64
Chest x-ray			
Abnormal	4/10	4/16	0.66
Bronchoscopic findings			
Abnormal	0/10	4/16	0.14
Cytomegalovirus mismatch			
Donor (+) recipient (-)	0/10	1/16	1.0
Last PaO ₂ /FiO ₂ ratio			
<300	0/10	2/16	0.49
Time on ventilator			
>72 hr	0/10	3/16	0.26
Organ ischemic time			
Cold ischemic period*			0.61
≤ 2 hr	0/9	2/15	
>2 hr, ≤ 4 hr	4/9	6/15	
>4 hr, ≤ 6 hr	4/9	5/15	
>6 hr, ≤ 8 hr	1/9	2/15	
Warm ischemic period			0.70
≤ 1 hr	5/10	6/15	
>1 hr, ≤ 2 hr	5/10	9/15	

PGD = primary graft dysfunction.

* PGD 群、Good 群の cold ischemic time は 1 例ずつ記録なし

ドナー肺摘出は標準的方法であり、臓器保存液は Perfadex® (Vitrolife, Inc., Englewood, CO)を使用し、anterograde 及び retrograde で十分に灌流した。

肺移植の際人工心肺を使用したのは PGD 群では 10 例中 8 例、予後良好群では 16 例中 9 例であった ($p = 0.4$)。人工心肺の使用はレシピエントの因子に基づく場合もしくは重症の移植グラフト機能障害の前兆とも考えられるが、使用自体が PGD 発症の原因もしくは PGD 発症予測因子とは言えない。PGD 症例におけるレシピエント臨床因子のサマリーを Table 2 に示す。PGD 10 例中 6 例はグラフト機能障害が理由で Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) による治療を必要とし、また 10 例中 1 例を除いて移植後 30 日以内に死亡した。PGD は片肺移植では定義が難しい（肺水腫に合致する両側肺浸潤影を認めることが PGD の定義である）が、臨床的に PGD と考えられた片肺移植症例 1 例も、PGD 関連遺伝子を選択するために PGD 群として含まれている。

Table 2. PGD 症例のレシピエント関連臨床因子

Case	Age/Sex	Primary Disease	Type of LTx	Death (day)	ECMO	Primary Graft Dysfunction Grade*			
						0	24	48	72 (hours [†])
1.	29/M	Cystic fibrosis	Bilateral	Alive	Yes	0	3	3	3
2.	29/F	Emphysema (α 1-antitrypsin deficiency)	Bilateral	1	Yes	2	3	-	-
3.	30/M	Pulmonary fibrosis	Bilateral	6	Yes	3	3	3	3
4.	43/F	Primary pulmonary hypertension	Bilateral	2	Yes	3	3	-	-
5.	45/M	Idiopathic pulmonary fibrosis	Single	7	No	3	3	3	3
6.	47/F	Primary pulmonary hypertension	Bilateral	1	No	2	2	-	-
7.	53/F	Emphysema	Bilateral	7	Yes	3	2	3	3
8.	62/F	Idiopathic pulmonary fibrosis	Bilateral	28	Yes	3	3	3	3
9.	63/F	Idiopathic pulmonary fibrosis	Bilateral	1	No	2	3	-	-
10.	64/M	Pulmonary fibrosis	Bilateral	9	No	1	3	3	3

ECMO = extracorporeal membrane oxygenation.

* International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) Grading System for Primary Graft Dysfunction (PGD) を適用した (ref 3): Grade 0 = $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (P/F) ratio > 300、胸部レントゲン写真上肺水腫を認めない; Grade 1 = P/F ratio < 300; Grade 2 = P/F ratio, 200-300; Grade 3 = P/F ratio < 200. Grade 1-3 の場合、胸部レントゲン上肺水腫の所見を有すること。ECMO 使用された場合は全て Grade 3 に分類される。

† 移植終了日時からの経過時間

高発現遺伝子の抽出

Weighted paired t-test ($p < .001$) を用いることで、計 16 遺伝子が予後良好群より PGD 群で有意に高発現していた (Table 3)。Paired t-test では 24 遺伝子が有意差をもって発現していた (Table 4)。個々の遺伝子と Unigene ID をテーブルに示す。

Table 3. Weighted paired t-test ($p < .001$) で抽出された 16 遺伝子

Gene name	Unigene ID (GenBank no.)	Biologic process/function
Up-regulated in the PGD samples		
Zinc finger protein 395 (ZNF395)	Hs.435535	Papillomavirus genes transcription
Microcephaly, autosomal recessive 1 (MCPH1)	Hs.490892	DNA repair
Male sterility domain containing 2 (MLSTD2)	Hs.501991	Catalytic activities, Nucleotide-sugar metabolism
Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)	Hs.533683	Protein-tyrosine kinase activity
ATPase, Class VI, type 11B (ATP11B)	Hs.478429	Phospholipid-translocating ATPase activity
Egl nine homolog 1 (EGLN1)	Hs.444450	Oxidoreductase activity
Synaptonemal complex protein 2 (SYCP2)	Hs.202676	Cytokinesis, Cell cycle, Meiosis
COMM domain containing 6 (COMMD6)	Hs.508266	Nuclear Factor-kappaB signalling
Signal-induced proliferation-associated 1 (SIPA1)	Hs.268774	Induction of apoptosis, GTPase activator activity
Human immunodeficiency virus type 1 enhancer binding protein 2 (HIVEP2)	Hs.510172	DNA binding
Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9 (NEDD9)	Hs.37982	Protein binding, Signal transduction
Cerebellin 1 precursor (CBLN1)	Hs.458423	Synaptic transmission, Nervous system development
Ferrochelatase (FECH)	Hs.465221	Ferrochelatase activity, Ferrous iron binding
cDNA clone IMAGE:470324	(AA029349)	Undefined
cDNA clone IMAGE:26031	(R11835)	Undefined
Down-regulated in the PGD samples		
Phosphatidylinositol 4-kinase type II (PI4KII)	Hs.25300	Integral to plasma membrane, Magnesium ion binding

Table 4. Paired t-test ($p < .01$) で抽出された 24 遺伝子

Gene name	Unigene ID (GenBank no.)	Biologic process/function
Up-regulated in the PGD sample		
<i>Zinc finger protein 395 (ZNF395)</i>	<i>Hs.435535</i>	<i>Papillomavirus genes transcription</i>
<i>Microcephaly, autosomal recessive 1 (MCPH1)</i>	<i>Hs.490892</i>	<i>DNA repair</i>
<i>Male sterility domain containing 2 (MLSTD2)</i>	<i>Hs.501991</i>	<i>Catalytic activities, Nucleotide-sugar metabolism</i>
<i>Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)</i>	<i>Hs.533683</i>	<i>Protein-tyrosine kinase activity</i>
<i>ATPase, Class VI, type 11B (ATP11B)</i>	<i>Hs.478429</i>	<i>Phospholipid-translocating ATPase activity</i>
<i>Egl nine homolog 1 (EGLN1)</i>	<i>Hs.444450</i>	<i>Oxidoreductase activity</i>
<i>Synaptonemal complex protein 2 (SYCP2)</i>	<i>Hs.202676</i>	<i>Cytokinesis, Cell cycle, Meiosis</i>
<i>COMM domain containing 6 (COMMD6)</i>	<i>Hs.508266</i>	<i>Nuclear Factor-kappaB signalling</i>
<i>Hydroxysteroid dehydrogenase like 2 (HSDL2)</i>	<i>Hs.59486</i>	<i>Oxidoreductase activity</i>
<i>Mannosidase, alpha, class 1A (MAN1A1)</i>	<i>Hs.102788</i>	<i>Calcium ion binding, Carbohydrate metabolism</i>
<i>Hypothetical protein LOC284244</i>	<i>Hs.4267</i>	<i>Undefined</i>
<i>Methionine aminopeptidase 1D (MAP1D)</i>	<i>Hs.298250</i>	<i>Hydrolase activity, Methionyl aminopeptidase activity</i>
<i>G protein-coupled receptor 157 (GPR157)</i>	<i>Hs.31181</i>	<i>Receptor activity, Rhodopsin-like receptor activity</i>
<i>Protein kinase, X-linked (PRKX)</i>	<i>Hs.390788</i>	<i>ATP binding, cAMP-dependent protein kinase activity</i>
<i>Rho GTPase activating protein 28 (ARHGAP28)</i>	<i>Hs.183114</i>	<i>Viral release, Membrane</i>
<i>Hypothetical protein LOC285733</i>	<i>Hs.388715</i>	<i>Undefined</i>
<i>cDNA clone IMAGE:120597</i>	<i>(T95563)</i>	<i>Undefined</i>
<i>Hypothetical protein FLJ33814 (CCDC117)</i>	<i>Hs.406460</i>	<i>Undefined</i>
<i>cDNA clone CS0DK010YA20</i>	<i>Hs.446559</i>	<i>Undefined</i>
<i>Hypothetical protein FLJ38973</i>	<i>Hs.471040</i>	<i>Undefined</i>
Down-regulated in the PGD samples		
<i>Angiomotin like 1 (AMOTL1)</i>	<i>Hs.503594</i>	<i>Muscle contraction</i>
<i>Actin-related protein 1 homolog B (ACTR1B)</i>	<i>Hs.98791</i>	<i>Motor activity, Protein binding</i>
<i>Intraflagellar transport 57 homolog (IFT57)</i>	<i>Hs.412196</i>	<i>Receptor activity</i>
<i>Surfactant protein B (SFTPB)</i>	<i>Hs.512690</i>	<i>Gaseous exchange, Regulation of surface tension</i>

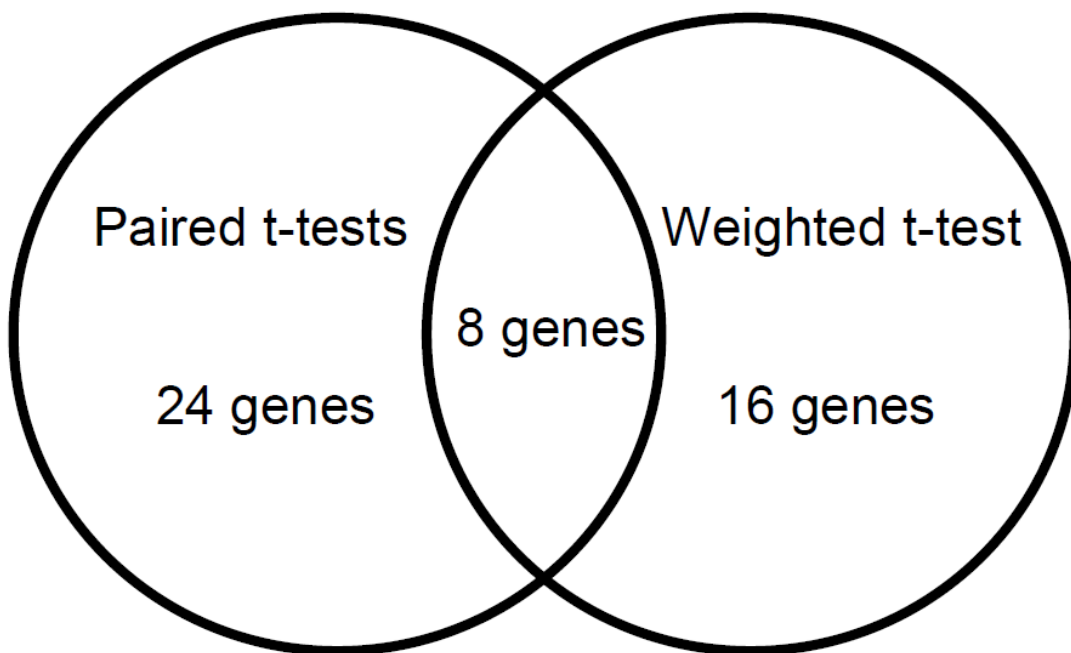
EST = expressed sequence tag; ATPase = adenosine 5'-triphosphatase; ATP = adenosine 5'-triphosphate; cAMP = cyclic adenosine monophosphate; GTPase = guanosine triphosphatase.

The overlapped eight genes among the two gene lists (Table 3 and 4) were italicized.

その 24 遺伝子のうち 20 遺伝子が PGD 群で高発現していた。Paired t-test で検出された PGD 群で高発現していた 20 遺伝子のうち、8 遺伝子は Weighted paired t-test で高発現していた遺伝子と一致していた（図 7）。

図 7. 予後良好群より **primary graft dysfunction (PGD)** 群で有意に高発現していた遺伝子群

Significant Genes from Development Set



高発現していた 8 遺伝子は : Zinc finger protein 395 (*ZNF395*); Microcephaly, autosomal recessive 1 (*MCPH1*); Male sterility domain containing 2 (*MLSTD2*); Fibroblast growth factor receptor 2 (*FGFR2*); ATPase, Class VI, type 11B (*ATP11B*); Egl nine homolog 1 (*EGLN1*); Synaptonemal complex protein 2 (*SYCP2*); COMM domain containing 6 (*COMMD6*) だった。これらの遺伝子について臨床予後との関連についてさらに検索を行った。

Hierarchical Clustering による遺伝子発現パターン解析

Weighted paired t-test、paired t-test で選択された遺伝子群と、PGD 群およびコントロール群との関連を調べるために development set のサンプルを用いて hierarchical (階層的) clustering method を使用し解析した。Paired t-test で抽出した 24 遺伝子、weighted paired t-test で抽出した 16 遺伝子でそれぞれ階層的クラスタリングを行った。いずれの遺伝子群でも PGD 群と予後良好群はクラスターとして認識されており遺伝子発現パターンの類似性が示唆された (図 8)。

図 8. 階層的クラスタリング解析 (Weighted paired t-test、paired t-test で選択された遺伝子群と、PGD 症例、予後良好症例の関連

・ Weighted paired t-test 16 遺伝子を使用したクラスタリング

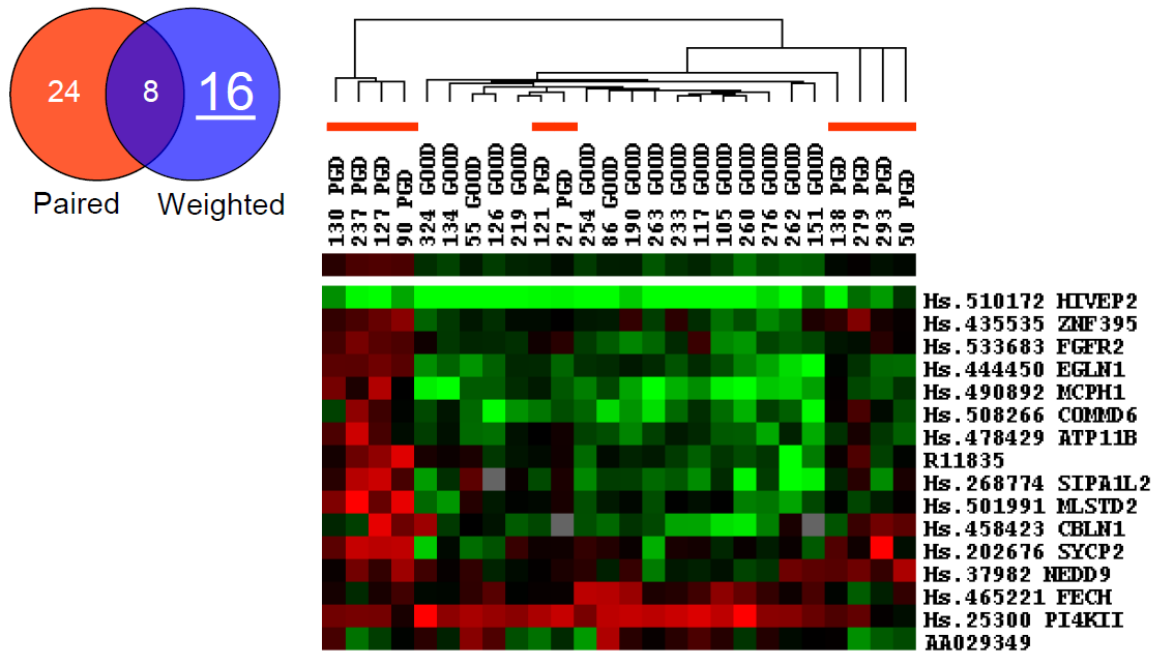
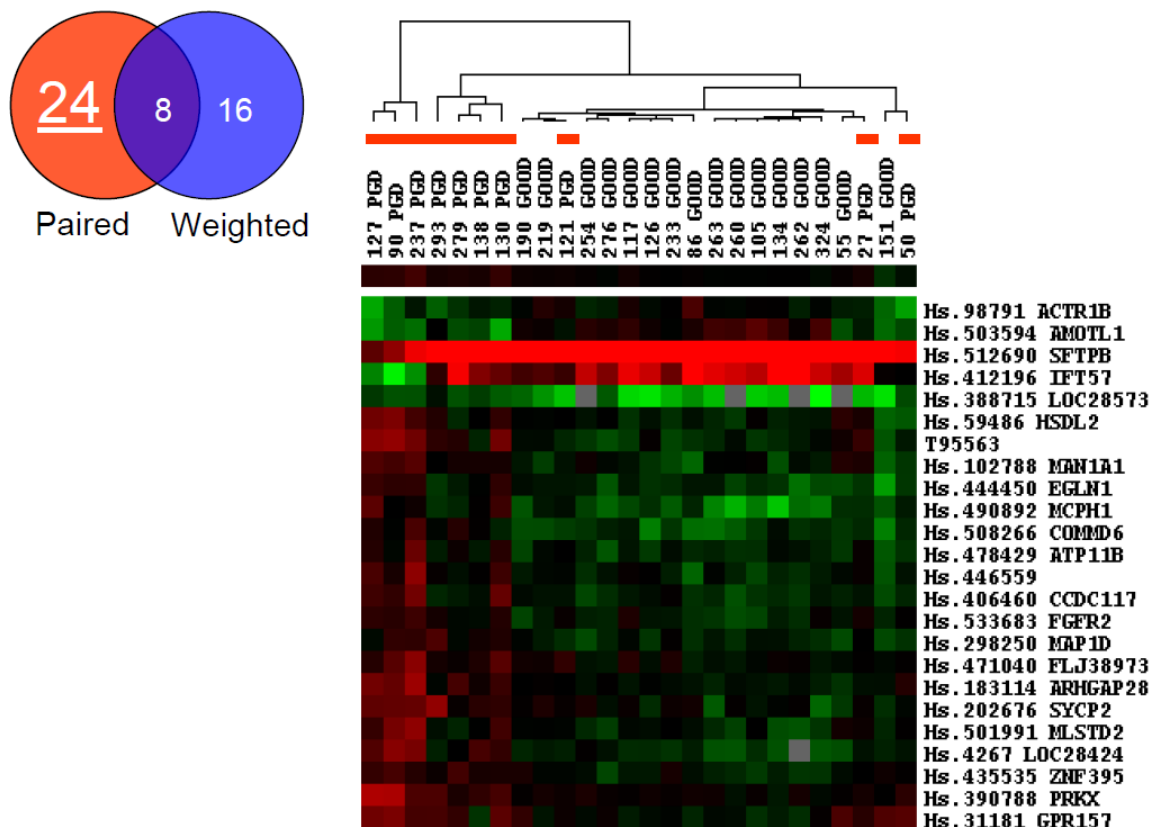


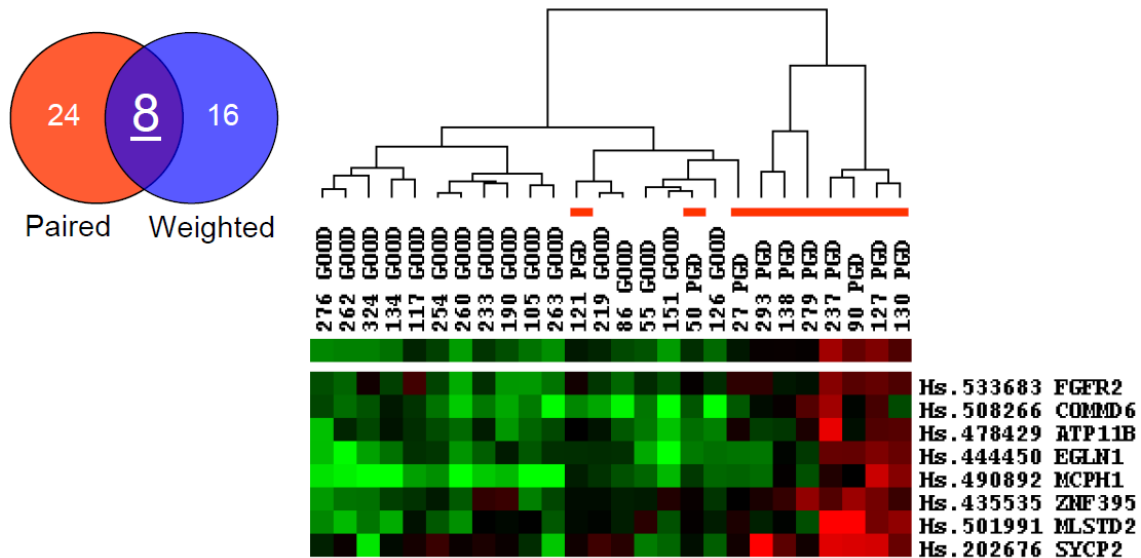
図 8. 続き

・ Paired t-test 24 遺伝子を使用したクラスタリング



また両 t-test で共通して抽出された 8 遺伝子のセットでクラスタリングを行うと、サンプルは 2 群に分かれうち 1 群は PGD 群の症例のみで構成された。もう 1 群は予後良好であったコントロール群の症例と PGD 群の症例から構成された。クラスタリングからは、PGD 群のサンプルの遺伝子発現パターンは類似していることが分かった (図 9)。

図 9. 階層的クラスタリング解析 (Weighted paired t-test、paired t-test で選択された遺伝子群と、PGD 症例、予後良好症例の関連



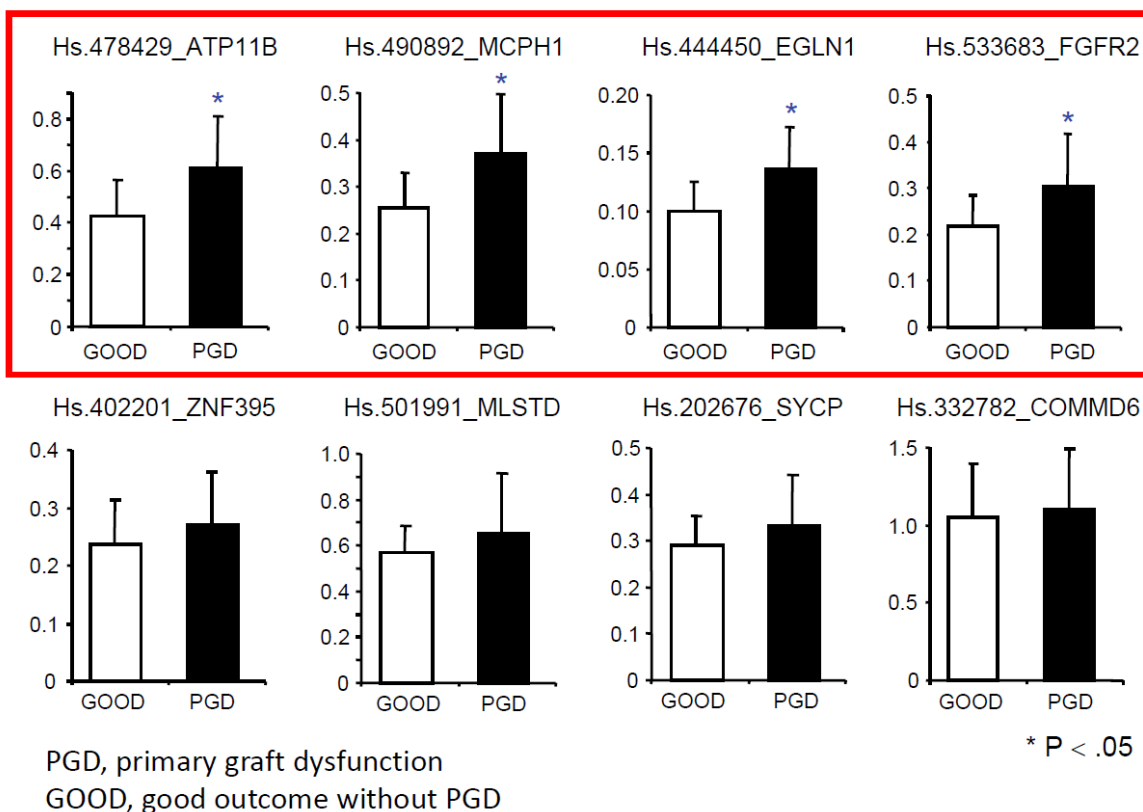
Quantitative RT-PCR による遺伝子発現の確認

選ばれた 8 遺伝子は RT-PCR の手法を用い、development set のサンプルで検証された。RT-PCR で使用されたこれらの遺伝子のプライマーは Table 5 に示す。8 遺伝子のうち development set のコホートで遺伝子発現の差が有意であったのは 4 遺伝子であった (*ATP11B*, *FGFR2*, *EGLN1*, *MCPH1*) (図 10)。

Table 5. RT-PCR で用いた 8 遺伝子のプライマー

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
B2M	TGT GCT CGC GCT ACT CTC TCT	CTG AAT CTT TGG AGT ACG CTG GA
ATP11B	ATT GAG GCA GCT TGC CAG AA	ATC CAC TAC CAG CCC ATG CT
COMMD6	AGC CTC AGC TCC TGG CAA C	TGC AGC AAT TTC CTT GAA CTG TC
EGLN1	AAT AAA GAC TGG GAT GCC AAG G	TCA ATG TCA GCA AAC TGG GCT
FGFR2	TGG CGG GTA ACT CTA TCG GA	ACT GCC GGC CTC TCT TCC
MCPH1	CTC ACC ACT TCC CTG AGC T	CCT GCA GAC AAG TGG CAC TC
MLSTD2	ACC TGT GGA TCC CAA GAA GCT	GGC CAT CAT CCA TCC ACT CT
SYCP2	CCG AGA TGT GTT TGA TGA AAG AAG	GAA GCC TGT CTT GCA GCA CTT T
ZNF395	TTG TAC AGA GTC CTC CCG GG	GCT GTC CGA GAT GTC ACC ACT

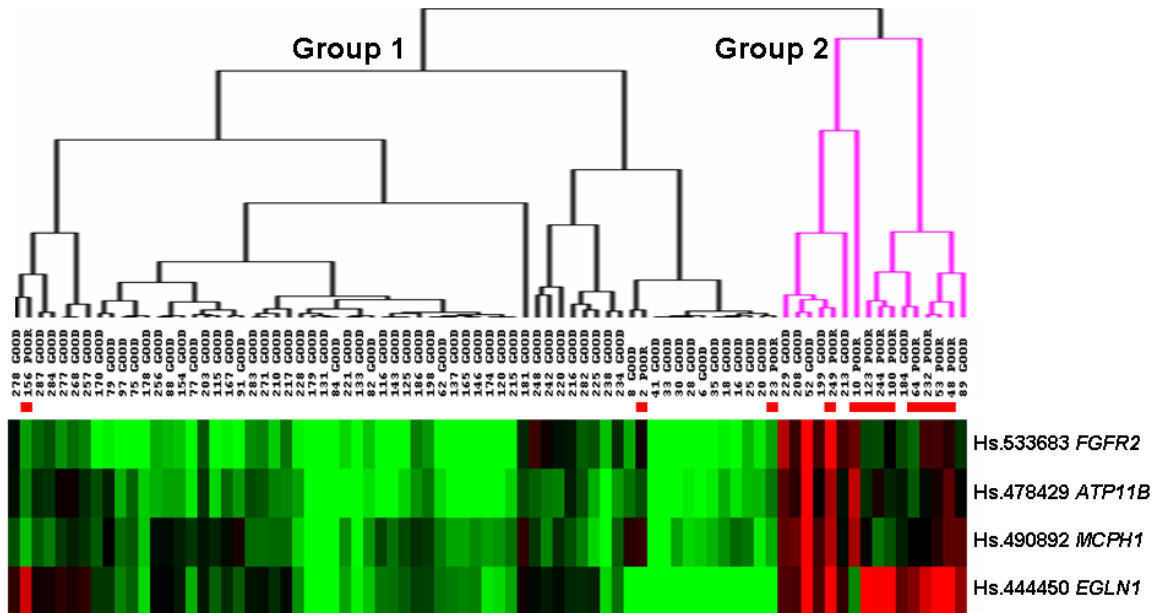
図 10. マイクロアレイ遺伝子発現解析で抽出された遺伝子のプライマーを用いた、RT-PCR による発現の確認（4 遺伝子は RT-PCR でも PGD 群で高発現していた）



RT-PCR で高発現が確認された 4 遺伝子 (*ATP11B*, *FGFR2*, *EGLN1*, *MCPH1*) を用いて、development set のサンプル以外の新たなドナー肺サンプル (test set、図 4) を用いて検討を行った。Test set のサンプルには術後 30 日以内に死亡した症例のサンプルも含まれる。

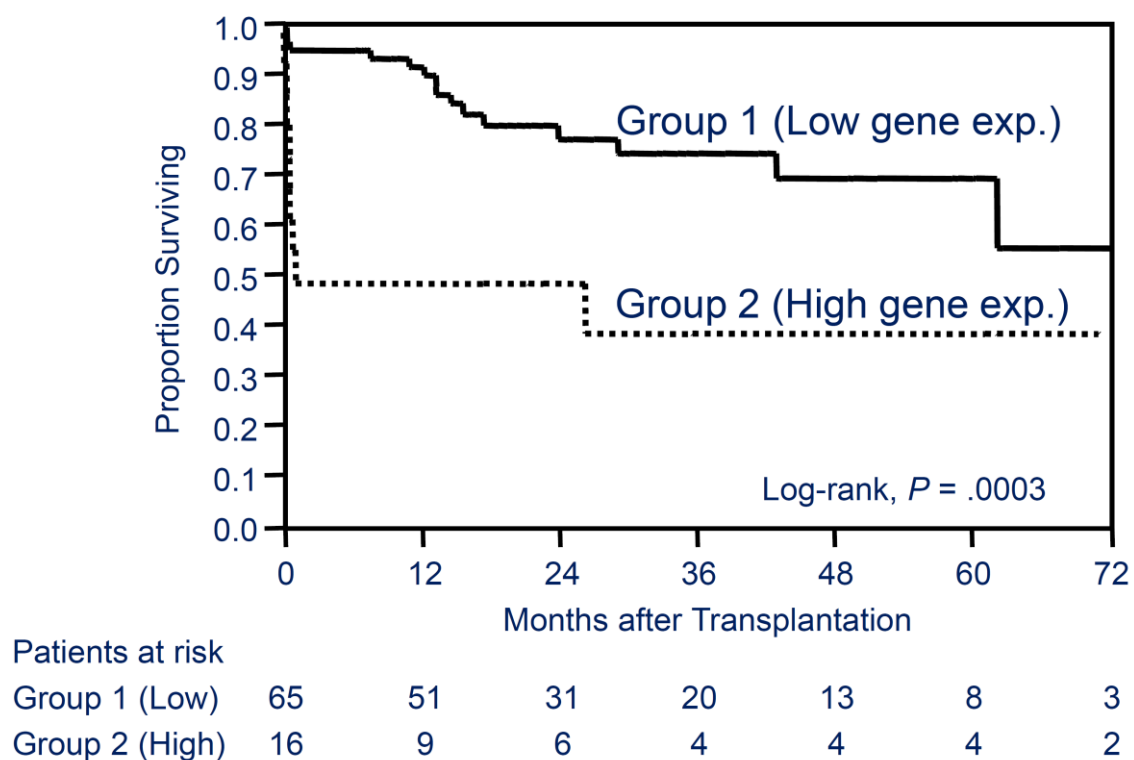
これら 4 遺伝子の発現パターンの臨床的予後との関連を、unsupervised sample clustering method (臨床的予後の情報を与えずにクラスタリングを行う) で解析してみると、予後不良症例と予後良好症例が極めて良好に分別されることが分かった。Test set サンプルを用いたクラスタリングでは、明らかな発現パターンの違いを認める 2 群が形成された (Group1 and 2, 図 11)。Group 2 は 12 サンプル中 7 サンプルの予後不良症例を含む一方で、4 遺伝子の発現が低い Group 1 は予後良好 (PGD を起こさず少なくとも術後 6 か月は生存している) な症例を多く含んでいることが分かる。つまり本クラスタリングは症例の予後に対してはブラインドで、純粹に PGD 関連 4 遺伝子の発現パターンのみで行われたので、4 遺伝子が高発現している症例群 (Group 2) には症例選択の際 “予後良好” グループの中から選ばれた 7 症例がクラスタリングされている一方、4 遺伝子が低発現している症例群 (Group1) に、症例選択の際 “予後不良” グループから選ばれた 3 症例が含まれた。

図 11. Test set の症例における、抽出した 4 遺伝子による症例クラスタリング
(GOOD, 予後良好だった症例のサンプル、POOR, 予後不良だった症例のサンプル)



このクラスタリングの結果をもとに予後曲線を描出したものが図 12 である。4 遺伝子が高発現を示す症例群（Group 2）は、そうでない群（Group 1）に比較して有意に予後不良であった（log-rank test, $p = .0003$ ）。

図 12. Test set 症例のドナー肺組織遺伝子発現パターンによるクラスタリング解析をもとにしたグループ別予後の比較（抽出遺伝子の発現パターンでクラスターされた症例群別、すなわち図 9 での Group 1 と Group 2 の生命予後曲線）



さらに多変量解析を用いて遺伝子発現パターンが予後因子となり得るか検討した。多変量解析に取り入れた因子は以下である：性別（male versus female）、レシピエントの年齢（< 55 versus 55 or older）、レシピエントの原疾患（pulmonary fibrosis versus others）、そして遺伝子発現パターン（high versus low expression pattern）である。多変量解析でも遺伝子高発現パターンは予後不良因子として有意であった（hazard ratio, 1.96; confidence interval, 1.04-1.85; $p = .025$ 、Table 6）。

Table 6. PGD 関連 4 遺伝子の発現パターンを含む、レシピエント予後因子の多変量解析

Covariate	Risk Ratio (Confidence Interval)		<i>p</i>
4 gene exp. (high vs low)	1.96	(1.04-1.85)	0.025
Age (55 or more vs < 55)	0.8	(0.46-1.41)	0.25
Sex (female vs male)	1.12	(0.85-1.46)	0.42
Disease (PF vs Others)	1.02	(0.75-1.39)	0.92

【考察】

近年の臓器保護法の改善、手術手技の改良、また周術期管理の向上は目覚ましいが、primary graft dysfunction (PGD) は未だに術後早期の死因の首位を占めている(23)。PGDの要因としては、主なものだけでもドナー側の因子(6)、レシピエント側の因子(24)、術中の手術関連因子(25)、そしてドナー肺とレシピエントとの組み合わせによる因子(8, 26)が報告されてきた。良好な肺移植術後成績には、適切なドナー選択と臓器保護が必須であることは論を待たないが、一方でドナーの有する背景(年齢、性別、人種など)(27,28)をはじめ、ドナー肺管理に関する因子(臓器保護液、肺換気方法、臓器保護温度、虚血時間、inotrope使用の有無など)が術後PGDの発症要因として報告されてきた(29,30)。さらに移植術後24時間までの移植グラフト機能は、レシピエント因子よりドナー関連因子の影響をより強く受けるとの報告もなされている(31)。

近年PGDに関連する遺伝子検索についてのレポートがワシントン大学のグループから出ているが(16)、本研究は研究目的や研究方法の点で異なっている。第一に、ワシントン大学のレポートでは遺伝子もしくは分子生物学的 pathway の検索が中心である一方、本研究では移植前のドナー肺の分子生物学的検索を行うことで肺移植後のPGD発症の予測を行うことを研究の目的としている。それゆえ本研究では臨床的にPGDを発症した症例群とコントロール群(PGDを発症せず、かつ予後の良好であった群)の症例選択基準を明確に決めることで、両群での遺伝子

発現の差を検討した。それにより、明らかに重度の PGD を発症した症例と、極めて良好な転帰をとった症例を比較することが可能になった。症例選択の過程でも、単に ISHLT の PGD grade III の基準を満たすだけでなく、症例毎に PGD の原因まで追究した。例えば術中の大量輸血や、手術手技に起因するトラブルは容易に PGD を引き起こしうるが、そういった症例は本研究では PGD 群としては使用されていない。なぜならそのような症例の、“移植前の”ドナー肺からは PGD と関連するユニークな遺伝子発現や分子生物学的な特徴は抽出し得ないと考えたからである。加えて、肺移植後の経過として良好ともいえないが極めて重度の PGD を生じたともいえない症例（たとえば術後 1 か月は生存したが、半年以内に死亡した症例など）も除外することで、PDG 発症関連遺伝子群を抽出する精度が上がることを期待した。第二として、今回ケース・コントロールの比較に当たり、いくつかの臨床的に重要な肺移植後予後因子（レシピエントの年齢、性、レシピエントの呼吸器原疾患、肺移植術式）を両群でマッチさせることで潜在的な交絡因子を排除することに努めた。さらに両群間解析では paired テストを行うことで、限られた症例プールからの検体選択において交絡バイアスを最小限にする工夫を行ったわけである (32)。このように慎重な症例選択が、より精度の高い PGD 発症関連遺伝子の選択に寄与したと考えている。実際今回用いた paired テストは、unpaired テストや unpaired two-class Significance Analysis of Microarrays (SAM) (33)を用いた遺伝子検索より術後予後予測の観点から精度が高かった。第三に、PGD 発症関連

遺伝子検索を行った群とは別に、独立した症例群 (independent set) を抽出することで選択された遺伝子群の有用性を確認することが可能であった。

最終的に選択された遺伝子 (*ATP11B*, *FGFR2*, *EGLN1*, *MCPH1*) は、クラスタリング解析を用いた検討で独立した別の症例群においても、移植術後の予後良好な症例とそうでない症例を区別することに有用であった。ただし test set での純粋に遺伝子発現パターンのみで行ったクラスタリングでは、図中の Group 2 (4 遺伝子が高発現している症例群) にも予後良好な症例が少数 (7 例) クラスタ化されていたことから、4 遺伝子高発現がすべて PGD を発症するわけではないことが示唆された。遺伝子選択に使用された症例群は PGD 関連遺伝子抽出が目的であった一方で、独立した別の症例群 (test set) は PGD による予後不良症例だけを含んでいたわけではないことから、選択された遺伝子群は純粋にドナー側の因子であるだけでなく、レシピエントの分子生物学的背景と関連して PGD もしくは術後予後不良につながる背景を有する可能性がある (6, 34)。

抽出された遺伝子群は、ドナー関連肺障害に関連すると考えられるメカニズムを包含すると考えられる。Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (*FGFR2*) は肺胞上皮を含む上皮細胞にほぼ特異的に発現している遺伝子だが、そのレセプターである hepatocyte growth factor (*HGF*) と keratinocyte growth factor (*KGF*) は、いずれも急性もしくは慢性肺障害の修復に関与する重要な因子として知られている (36,37)。

HGF と *KGF* はいずれも酸化反応による肺胞上皮障害に対するバリア機能に関連し

た重要な因子であり (35)、それら遺伝子のレセプター遺伝子である *FGFR2* の高発現は酸化関連肺上皮障害の程度を反映していると推察される。ATPase, Class VI, type 11B (*ATP11B*) は ATP 依存性のイオントランスポーターであり、また細胞内エネルギー伝達の因子として知られており (38,39)、その遺伝子高発現はやはり高度の酸化ストレスに曝された肺上皮細胞の障害の程度を反映していると考えられる。

EGL nine homolog 1 (*EGLN1*)、また prolyl hydroxylase domain 1 (*PHD2*) としても知られる本遺伝子は低酸素状態で誘導され (40)、また重度の四肢虚血の患者の血液細胞において高発現していることが知られることから極度の虚血状態を反映すると考えられる (41)。本遺伝子を阻害することで hypoxia-inducible transcription factor-1 α (*HIF-1 α*) 及びその target gene である vascular endothelial growth factor A (*VEGF-A*) の発現が誘導されることで虚血組織の血管新生や修復に有利であることが知られている (41)。同様に虚血性心疾患モデルでも、本遺伝子の阻害により低酸素状態で誘導され組織保護に働く *HIF-1 α* の発現が認められる (42)。よって本研究において PGD 症例で有意に高発現を認めたことは、ドナー肺組織の著しい虚血低酸素状態の反映と考えられた。

Microcephaly, autosomal recessive 1 (*MCPH1*)、別名 BRCT-repeat inhibitor of hTERT expression (*BRIT1*) は、小頭症患者で低発現していることが知られているが、近年では放射線照射などによる細胞障害に対する DNA 障害制御因子として重要な役割を担う遺伝子であることが報告されている (43,44)。集約すると、今回抽出された PGD 関連遺伝子は、術後 PGD を発症したドナー肺が高度の酸化や低酸素（おそらくは虚血に関連する）といったストレスに曝された組織

であることを示している。これらの障害はドナー肺摘出前にすでに生じていたものか、もしくは摘出から保存のプロセスで生じたストレスを反映していると考えられる。またこれらの遺伝子はまだ未検討の様々なタイプの障害を反映している可能性があり、今後より詳細に（たとえば **genetic polymorphisms** など）検討していく必要がある。

近年肺移植のドナー肺もしくはレシピエントの病肺の遺伝子発現解析により、新たな知見が得られている。**Cypel** らはドナー候補として評価されながら、臨床的理由で実際の肺移植に使用されなかった肺組織の遺伝子発現と、実際に使用されたドナー肺とのそれを比較・検討し、炎症性サイトカインである **IL-1 β** が使用されなかったドナー肺で著明に発現していることを示した (45)。**Kang** らは脳死ドナー肺と心臓死ドナー肺の遺伝子発現パターンを解析することで、脳死肺ドナーの肺組織では自然免疫、アポトーシス、炎症性サイトカイン関連遺伝子の発現がより顕著であることを示した (46)。またドナー肺の遺伝子発現パターンが、肺移植後の長期予後に関わる可能性についても検討されている。**Saito** らは移植前のドナー肺組織のサイトカイン関連の遺伝子発現のパターンが、**chronic lung allograft dysfunction**（慢性移植肺障害）と関連していることを報告している (47)。

本研究では、移植前のドナー肺の分子生物学的背景（遺伝子発現パターン）が、移植後の **PDG** 発症もしくは急性期の予後を反映している可能性があることを示した。従来の臨床的ドナー肺選択基準（胸部レントゲン写真、血液ガス分析、気管

支鏡による評価)に加えて、この種の分子生物学的評価を加えることで、ドナー肺選択の判断基準の精度をより高められると考えられる。また今後検討対象として予後良好群に高発現している遺伝子を抽出し、移植前に迅速に遺伝子発現解析が可能になれば、ドナー肺使用するかどうかの決定する際のマーカーとして有用である可能性がある。

さらに、術後 PGD 発症のリスクを 移植前に検出することで、ドナー肺に治療介入の可能性を開くことにつながると考えられる。例えば体外肺灌流 (*ex vivo lung perfusion*, EVLP) を用いた *adenoviral gene transfer* による治療介入 (48)は有力なドナー肺治療方法であるが、体外肺灌流を行う前後に特定の遺伝子発現やそのパターンを解析・比較することで、種々の障害を受けたドナー肺の回復の程度の指標となり得る可能性がある。現在トロント大学では、本研究結果を *proof of concept* としてドナー肺組織の移植前遺伝子発現迅速診断の実用化に向けた取り組みが行われている。

【謝辞】

本研究の遂行と学位論文作成にあたり、多大な指導をいただいたトロント大学胸部外科教授 Shaf Keshavjee 先生、及び東京大学呼吸器外科教授 中島淳先生に深謝いたします。

【参考文献】

- ¹ Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, Goldfarb SB, Levvey BJ, Lund LH, Meiser B, Stehlik J; International Society for Heart and Lung Transplantation. J Heart Lung Transplant. 2014; 33(10):1009-1024.
- ² de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. Am J Respir Crit Care Med 2003; 167(4):490-511.
- ³ Christie JD, Carby M, Bag, Corris P, Hertz M, Weill D. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part II: definition. A consensus statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation. J Heart Lung Transplant 2005; 24(10):1454-1459.
- ⁴ Christie JD, Sager JS, Kimmel SE, Ahya VN, Gaughan C, Blumenthal NP, Kotloff RM. Impact of primary graft failure on outcomes following lung transplantation. Chest 2005; 127(1):161-165.
- ⁵ Trulock EP, Christie JD, Edwards LB, Boucek MM, Aurora P, Taylor DO, Dobbels F, Rahmel AO, Keck BM, Hertz MI. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult lung and heart-lung transplantation report-2007. J Heart Lung Transplant 2007; 26(8):782-795.
- ⁶ de Perrot M, Bonser RS, Dark J, Kelly RF, McGiffin D, Menza R, Pajaro O, Schueler S, Verleden GM; ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part III: donor-related risk factors and markers. J Heart Lung Transplant 2005; 24(10):1460-1467.

⁷ Pierre AF, Sekine Y, Hutcheon MA, Waddell TK, Keshavjee SH. Marginal donor lungs: a reassessment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123(3):421-427; discussion, 427-428.

⁸ Sekine Y, Waddell TK, Matte-Martyn A, Pierre AF, de Perrot M, Fischer S, Marshall J, Granton J, Hutcheon MA, Keshavjee S. Risk quantification of early outcome after lung transplantation: donor, recipient, operative, and post-transplant parameters. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23(1):96-104.

⁹ Sundaresan S, Semenkovich J, Ochoa L, Richardson G, Trulock EP, Cooper JD, Patterson GA. Successful outcome of lung transplantation is not compromised by the use of marginal donor lungs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 109(6):1075-1079.

¹⁰ Bhorade SM, Vigneswaran W, McCabe MA, Garrity ER. Liberalization of donor criteria may expand the donor pool without adverse consequence in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19(12):1199-1204.

¹¹ De Meester J, Smits JM, Persijn GG, Haverich A. Listing for lung transplantation: life expectancy and transplant effect, stratified by type of end-stage lung disease, the Eurotransplant experience. *J Heart Lung Transplant*. 2001; 20(5):518-524.

¹² Kaneda H, Waddell TK, de Perrot M, Bai XH, Gutierrez C, Arenovich T, Chaparro C, Liu M, Keshavjee S. Pre-implantation multiple cytokine mRNA expression analysis of donor lung grafts predicts survival after lung transplantation in humans. *Am J Transplant* 2006; 6(3):544-551.

¹³ Andrade CF, Kaneda H, Der S, Tsang M, Lodyga M, Chimisso Dos Santos C, Keshavjee S, Liu M. Toll-like receptor and cytokine gene expression in the early phase of human lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2006; 25(11):1317-1323.

- ¹⁴ Lande JD, Patil J, Li N, Berryman TR, King RA, Hertz MI. Novel insights into lung transplant rejection by microarray analysis. *Proc Am Thorac Soc*. 2007; 4(1):44-51.
- ¹⁵ Yamane M, Liu M, Kaneda H, Uhlig S, Waddell TK, Keshavjee S. Reperfusion-induced gene expression profiles in rat lung transplantation. *Am J Transplant*. 2005;5(9):2160-2169.
- ¹⁶ Ray M, Dharmarajan S, Freudenberg J, Zhang W, Patterson GA. Expression profiling of human donor lungs to understand primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am J Transplant* 2007; 7(10):2396-2405.
- ¹⁷ Lu BS, Yu AD, Zhu X, Garrity ER, Jr., Vigneswaran WT, Bhorade SM. Sequential gene expression profiling in lung transplant recipients with chronic rejection. *Chest*. 2006; 130(3):847-854.
- ¹⁸ Gimino VJ, Lande JD, Berryman TR, King RA, Hertz MI. Gene expression profiling of bronchoalveolar lavage cells in acute lung rejection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 168(10):1237-1242.
- ¹⁹ Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* 2002; 32 Suppl:496-501.
- ²⁰ Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, Li J, Thiagarajan M, White JA, Quackenbush J. TM4 Microarray Software Suite. *Methods Enzymol* 2006; 411:134-193.
- ²¹ Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(25):14863-14868.
- ²² Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(1):207-210.

- ²³ Arcasoy SM, Fisher A, Hachem RR, Scavuzzo M, Ware LB. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part V: predictors and outcomes. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24(10):1483-1488.
- ²⁴ Barr ML, Kawut SM, Whelan TP, Girgis R, Bottcher H, Sonett J, Vigneswaran W, Follette DM, Corris PA; ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part IV: recipient-related risk factors and markers. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24(10):1468-1482.
- ²⁵ Hartwig MG, Davis RD. Surgical considerations in lung transplantation: transplant operation and early postoperative management. *Respir Care Clin N Am*. 2004; 10(4):473-504.
- ²⁶ Sommers KE, Griffith BP, Hardesty RL, Keenan RJ. Early lung allograft function in twin recipients from the same donor: risk factor analysis. *Ann Thorac Surg* 1996; 62(3):784-790.
- ²⁷ Christie JD, Kotloff RM, Pochettino A, Arcasoy SM, Rosengard BR, Landis JR, Kimmel SE. Clinical risk factors for primary graft failure following lung transplantation. *Chest* 2003; 124(4):1232-1241.
- ²⁸ Pilcher DV, Snell GI, Scheinkestel CD, Bailey MJ, Williams TJ. High donor age, low donor oxygenation, and high recipient inotrope requirements predict early graft dysfunction in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24(11):1814-1820.
- ²⁹ Wood KE, Becker BN, McCartney JG, D'Alessandro AM, Coursin DB. Care of the potential organ donor. *N Engl J Med* 2004; 351(26):2730-2739.
- ³⁰ Thabut G, Mal H, Cerrina J, Darteville P, Dromer C, Velly JF, Stern M, Loirat P, Leseche G, Bertocchi M, Mornex JF, Haloun A, Despins P, Pison C, Blin D, Reynaud-Gaubert M.

Graft ischemic time and outcome of lung transplantation: a multicenter analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(7):786-791.

³¹ de Perrot M, Sekine Y, Fischer S, Waddell TK, McRae K, Liu M, Wigle DA, Keshavjee S. Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(2):211-215.

³² Potter JD. At the interfaces of epidemiology, genetics and genomics. *Nat Rev Genet* 2001; 2(2):142-147.

³³ Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(9):5116-5121.

³⁴ Keshavjee S, Davis RD, Zamora MR, de Perrot M, Patterson GA. A randomized, placebo-controlled trial of complement inhibition in ischemia-reperfusion injury after lung transplantation in human beings. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 129(2):423-428.

³⁵ Ray P, Devaux Y, Stolz DB, Yarlagadda M, Watkins SC, Lu Y, Chen L, Yang XF, Ray A. Inducible expression of keratinocyte growth factor (KGF) in mice inhibits lung epithelial cell death induced by hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(10):6098-6103.

³⁶ Stern JB, Fierobe L, Paugam C, Rolland C, Dehoux M, Petiet A, Dombret MC, Mantz J, Aubier M, Crestani B. Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor in bronchoalveolar lavage fluid in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med*. 2000; 28(7):2326-2333.

³⁷ Crestani B, Dehoux M, Hayem G, Lecon V, Hochedez F, Marchal J, Jaffre S, Stern JB, Durand G, Valeyre D, Fournier M, Aubier M. Differential role of neutrophils and alveolar

macrophages in hepatocyte growth factor production in pulmonary fibrosis. *Lab Invest.* 2002; 82(8):1015-1022.

³⁸ Halleck MS, Schlegel RA, Williamson PL. Reanalysis of ATP11B, a type IV P-type ATPase. *J Biol Chem.* 2002; 277(12): 9736-9740.

³⁹ Scarborough GA. Rethinking the P-type ATPase problem. *Trends Biochem Sci.* 2003; 28(11): 581-584.

⁴⁰ Metzen E, Stiehl DP, Doege K, Marxsen JH, Hellwig-Burgel T, Jelkmann W. Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element. *Biochem J.* 2005; 387(3):711-717.

⁴¹ HoWangYin KY, Loinard C, Bakker W, Guérin CL, Vilar J, d'Audigier C, Mauge L, Bruneval P, Emmerich J, Lévy BI, Pouysségur J, Smadja DM, Silvestre JS. HIF-prolyl hydroxylase 2 inhibition enhances the efficiency of mesenchymal stem cell-based therapies for the treatment of critical limb ischemia. *Stem Cells.* 2014;32(1):231-243.

⁴² Wang WE, Yang D, Li L, Wang W, Peng Y, Chen C, Chen P, Xia X, Wang H, Jiang J, Liao Q, Li Y, Xie G, Huang H, Guo Y, Ye L, Duan DD, Chen X, Houser SR, Zeng C. Prolyl hydroxylase domain protein 2 silencing enhances the survival and paracrine function of transplanted adipose-derived stem cells in infarcted myocardium. *Circ Res.* 2013;113(3) :288-300.

⁴³ Liang Y, Gao H, Lin SY, Peng G, Huang X, Zhang P, Goss JA, Brunicardi FC, Multani AS, Chang S, Li K. BRIT1/MCPH1 is essential for mitotic and meiotic recombination DNA repair and maintaining genomic stability in mice. *PLoS Genet.* 2010;6(1):e1000826.

⁴⁴ Rai R, Dai H, Multani AS, Li K, Chin K, Gray J, Lahad JP, Liang J, Mills GB, Meric-

Bernstam F, Lin SY. BRIT1 regulates early DNA damage response, chromosomal integrity, and cancer. *Cancer Cell*. 2006; 10(2):145-157.

⁴⁵ Cypel M, Kaneda H, Yeung JC, Anraku M, Yasufuku K, de Perrot M, Pierre A, Waddell TK, Liu M, Keshavjee S. Increased levels of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in donor lungs rejected for transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2011 ;30(4):452-459.

⁴⁶ Kang CH, Anraku M, Cypel M, Sato M, Yeung J, Gharib SA, Pierre AF, de Perrot M, Waddell TK, Liu M, Keshavjee S. Transcriptional signatures in donor lungs from donation after cardiac death vs after brain death: a functional pathway analysis. *J Heart Lung Transplant*. 2011; 30(3):289-298.

⁴⁷ Saito T, Takahashi H, Kaneda H, Binnie M, Azad S, Sato M, Waddell TK, Cypel M, Liu M, Keshavjee S. Impact of cytokine expression in the pre-implanted donor lung on the development of chronic lung allograft dysfunction subtypes. *Am J Transplant*. 2013 ;13(12):3192-3201.

⁴⁸ Cypel M, Rubacha M, Sato M, Hirayama S, Fischer S, McRae K, Liu M, Waddell TK, de Perrot M, Keshavjee S. Adenoviral mediated interleukin 10 (ADHIL-10) gene therapy in normothermic ex-vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant*. 2007; 26(2S):S212.