

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10032

研究課題名(和文) ドナー拡大と心停止下腎移植成績向上を目指す硫化水素療法の大動物モデルによる検討

研究課題名(英文) Establishment of hydrogen sulfide therapy against renal ischemia-reperfusion injury using large animal to attempt to increase the donor organ pool

研究代表者

関島 光裕 (SEKIJIMA, Mitsuhiro)

鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研究センター・特任助教

研究者番号：20568589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ドナー不足の解消は移植医療にとって重要課題であり、虚血再灌流障害IRI抑制は解決策の一つとなる。我々はクラウンミニブタを用いた前臨床大動物実験により、2時間腎臓温虚血により誘導されたIRIに対し、硫化水素H<sub>2</sub>Sの投与が抑制効果を持つこと(術後クレアチニン上昇抑制や病理学的な障害軽減)、経静脈的な全身投与よりも経腎動脈的な臓器投与の有効性、抗炎症、抗アポトーシス作用が主な作用機序であることを明らかにした。この結果は、体外灌流保存中にドナー臓器にH<sub>2</sub>Sを直接投与することによって、温虚血腎移植の成績向上につながりうる可能性を示しており、ドナー不足解決に対する新たな治療の確立に結び付く成果である。

研究成果の概要(英文)：The prevention of ischemia-reperfusion injury (IRI) is important for both early and long-term graft function, especially when using extended-criteria or donation after cardiac donors. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) has recently been reported to have both anti-inflammatory and cytoprotective effects. We investigated the effectiveness and optimal method of administration of H<sub>2</sub>S for renal IRI using miniature swine. H<sub>2</sub>S therapy significantly reduced the increase of serum creatinine levels of 120-min warm ischemic kidney. Furthermore, beneficial effects of selective H<sub>2</sub>S administration directly to the kidney was more prominent than systemic intravenous H<sub>2</sub>S administration. Further work investigating the benefits of H<sub>2</sub>S for organ procurement and preservation using ex-vivo normothermic machine perfusion system may allow for improved outcomes of renal transplantation.

研究分野：移植外科学

キーワード：移植・再生医療 腎移植 硫化水素 マージナルドナー 臓器保護 前臨床実験 ミニブタ 腎臓体外灌流保存

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) ドナー臓器保護戦略の重要性

臓器移植医療において臓器の不足は世界的に深刻な問題であり、より条件の厳しい心停止ドナーのさらなる適応拡大が必要不可欠である。その解決にはドナー臓器が利用不能になる最大の原因である虚血再灌流障害 (ischemia-reperfusion injury: IRI) の抑制、それに伴う臓器障害の修復が極めて重要である。IRI ではマクロファージの活性化、炎症性サイトカインの放出、血管内皮細胞障害など多彩な機序が関与し急性臓器不全だけでなく、免疫学的因子の活性化による急性・慢性拒絶の誘因となることが報告されている。従って、臨床現場において移植臓器を適切な状態に保つことは臓器利用率増加のみならず、移植医療の成績向上に直接寄与するものである。

### (2) 内因性生体活性ガスとしての硫化水素 (hydrogen sulfide: H<sub>2</sub>S) の臓器保護効果

近年、有毒ガスとして知られる硫化水素 (H<sub>2</sub>S) が内因性生体活性ガスとして生体内で産生され、抗炎症作用、抗酸化作用など多彩な細胞保護効果を有することが報告されている (Kimura H. *Antioxid Redox Signal* 2013)。我々は前臨床ミニブタ肺移植実験から、H<sub>2</sub>S と同様の内因性ガスである一酸化炭素 (CO) 吸入が IRI 抑制・移植肺の生着延長効果を有することを示した (Sahara H. *J Thorac Cardiovasc Surg & Transplantation* 2010)。内因性生体活性ガスとして、CO と同様に、H<sub>2</sub>S についても細胞保護効果が小動物実験から示されていることから、移植医療への応用が期待される。しかし、H<sub>2</sub>S は毒ガスとして広く知られる物質であり、その応用には大動物を用いた前臨床実験による効果および安全性試験が必須である。

### (3) 申請者の研究チームが行ってきた組織適合性抗原 (Major histocompatibility complex: MHC) 確立ミニブタを用いた大動物実験と成果

小動物移植実験の多くが免疫系の相違から大動物では再現できず、新規治療法確立には前臨床大動物実験が必須である。一方、これまでの臓器保護薬剤の大動物実験の多くは免疫学的背景の均一化が得られず、その観察期間は移植後短期間に限られてきた。当研究チームは均一化した免疫学的背景という小動物の利点を兼ね備えた MHC 確立クラウンミニブタを用いた実験に着手し、移植実験の基礎となる免疫学的評価法 (Oku M. *Transplant Immunol* 2008) や、免疫学的反応評価に基づく新規治療法の検討を前臨床研究として精力的に行っている (Yamada K et al. *Transplantation* 2010 & 2012)。これまでに本申請研究実施に対する有用なモデルとして 1) ミニブタ腎 IRI モデルの作成と、IRI 進展に關与する HMGB1 を中和抗体で

制御することで IRI 抑制効果が得られること (Miura K. *Transplantation* 2014)、2) 120 分温虚血腎を用いた MHC 不適合腎移植モデルの確立 (*World Transplant Congress* 2012) を始め、MHC 確立ミニブタを用いた各種臓器慢性移植実験モデルを確立している。

## 2. 研究の目的

これまでに *in vitro* および小動物実験によって、IRI に伴う酸化ストレスやミトコンドリア障害による細胞障害に対し、H<sub>2</sub>S が抗酸化シグナルの活性化や ATP 産生の活性化などにより抑制するという報告がなされている (Elrod JW. *PNAS* 2007)。本研究では、内因性生体活性ガスである H<sub>2</sub>S の新規臓器保護薬剤としての可能性に着目し、前臨床大動物による評価を行う。

我々は準備実験において、既に確立した腎 IRI モデルに対し H<sub>2</sub>S 供与体である Na<sub>2</sub>S 投与を行ったところ、短期評価で腎 IRI 抑制効果が得られること、更に術後 2 日目の全身評価 (犠牲死後の各臓器病理評価) で副作用を認めなかったという結果を得ている。このことは H<sub>2</sub>S の安全かつ臓器保護効果の期待される薬剤であり、新しい臓器保護法として極めて有力な臨床応用性を持つことを示唆している。本申請研究では準備実験の結果を進展させ、H<sub>2</sub>S の移植医療への応用性を評価する。

(目的 1) ミニブタ腎 IRI モデルを用いて、H<sub>2</sub>S 投与による臓器保護、IRI 抑制効果と機序解明を行う。あわせて H<sub>2</sub>S の投与経路の違いによる効果の違いを検討する。

(目的 2) 次いで、長時間心停止後の摘出腎を用いた腎移植を想定し、120 分温虚血後の腎臓を使用した MHC 完全適合腎移植モデルに対する H<sub>2</sub>S 投与効果を、免疫学的因子の影響を極力排除したモデルにより検討する。また臨床応用性の高い H<sub>2</sub>S のドナー腎への選択的投与 (摘出臓器に対する体外持続灌流保存法を用いた薬物投与) が有効であるかについて検討を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 目的 1: 腎 IRI モデルを用いた H<sub>2</sub>S 投与の安全性とその臓器保護効果の検討

対象動物: 9 頭のクラウン系ミニブタを用いて実験を行った。全身麻酔下に左腎動静脈を 120 分間遮断し、左腎臓に IRI を誘導した。右腎臓は摘出し、障害を受けた左腎臓のみで術後経過を評価した。

実験群: 以下の 3 群を設定し、H<sub>2</sub>S 治療群に対しては、H<sub>2</sub>S 供与体として硫化ナトリウム (Sodium sulfide: Na<sub>2</sub>S) 溶液を投与した。

・Group 1 (n=3): Na<sub>2</sub>S 投与を行わない対照群。

・Group 2 (n=3): 再灌流 10 分前から再灌流 30 分後にかけて計 40 分にわたり Na<sub>2</sub>S を経静

脈的に全身投与を行った群。

・Group 3 (n=3)：再灌流 10 分前から再灌流 30 分後にかけて計 40 分にわたり Na2S を経腎動脈的に腎選択的投与を行った群。

Na2S 投与方法： Na2S 投与群 (Group 2、3) では、再灌流 10 分前から再灌流までに 1.1 mg/kg、また再灌流時から再灌流 30 分後にかけて 1.1 mg/kg、計 2.2 mg/kg の Na2S を持続投与した。

腎機能評価： 術後の血清クレアチニン値 (Cre) を経時的に測定し、術後 28 日目まで腎機能を評価した。

病理学的評価： 経時的な腎生検 (術前、再灌流前、再灌流 2 時間後、2 日後、7 日後、14 日後、28 日後) を行い、H-E 染色によって腎障害の評価を行った。また 2 日後の検体を用い、尿細管組織のアポトーシスを TUNEL 染色により、さらに尿細管上皮の再生を PCNA 染色により評価した。

炎症性サイトカインの評価： 血清炎症性サイトカインとして、IL-6、TNF- $\alpha$ 、HMGB1 を測定し (ELISA 法)、また組織における炎症性サイトカインについては、生検で得た腎組織を用いて IL-1 $\beta$ 、IL-6 の mRNA 発現を測定した (RT-PCR 法)。

(2) 目的 2： MHC 完全適合腎移植モデルに対する H2S 投与効果の検討および体外灌流中の H2S 投与効果の評価

実験方法： MHC 完全適合腎移植を、既に申請者研究チームが確立した手技に準じて行う (n=3)。ドナーに対して 120 分温虚血時間を設けた後、腎を摘出し移植を行った。

体外灌流保存・灌流条件： 摘出腎臓の腎動脈、静脈、尿管にカニューレションを行い、遠心ポンプを用いた体外循環回路に接続し、設定平均動脈圧 (85 mmHg) のもとで、ヘマトクリットを 15%程度に調整したヘパリン化血液 + リンゲル液をベースとする灌流液を用いて灌流した (糖・ステロイド・PGI2 などを規定量添加)。経時的な灌流圧や灌流流量、15 分毎の動脈・静脈採血による酸素消費量や電解質・糖・生化学検査等をもとに EVKP 中の腎機能を推測し、また灌流液の pH や血糖を随時調整した。

レシピエント： 移植腎再灌流時に、目的 1 と同様に経静脈的 Na2S 投与を行った。

免疫抑制療法： 申請者らがすでに報告する 12 日間持続タクロリムス投与を唯一の免疫抑制療法として用いた (血中濃度：35-45 ng/ml)。

腎機能、腎組織、炎症サイトカインの評価： 全て目的 1 に準じた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 目的 1

腎機能評価： Group 1 では 120 分の腎臓の温虚血および再灌流によって、著明な Cre 上昇を認めたものの、Na2S 投与群 (Group 2、3) では Group 1 と比較し、腎虚血再灌流後の Cre 上昇は抑制された。特に腎選択的に Na2S 投与を行った Group 3 では、Group 1 と比較し有意な Cre の上昇抑制を認めた。術後 14 日および 28 日を経た時点では全群で Cre は正常値であり統計学的な有意差を認めなかった。また、全症例において Na2S 投与に伴う副作用は確認されなかった。

病理学的評価： 術後 2 日目の腎生検標本において、Group 1 では尿細管上皮障害や尿細管拡張を始めとする腎 IRI 所見を認めるのに対し、Na2S 投与群 (Group 2、3) ではこれらの病像が明らかに抑制された。更に術後 7 日目の腎生検標本では、Group 1 では病像は進展したのに対し、Group 2 および Group 3 では IRI 像の改善を認めた。特に Group 3 では術後 7 日目にはほぼ正常に近い組織像への回復が示された。また Group 1 において、尿細管上皮のアポトーシス亢進 (TUNEL 染色) および盛んな障害からの尿細管再生 (PCNA 染色) を認めるのに対し、Group 2、3 ではこれらの染色における陽性細胞数は少なく、特に Group 3 では陽性細胞はごくわずかに認められるのみであった。Na2S 投与による IRI 抑制効果や抗アポトーシス効果が顕著であることが示された。

炎症性サイトカイン： Group 1 と Group 2 の比較では、各サイトカインの産生に有意差はなかったが、Group 2 と Group 3 の比較において血清 HMGB1 では再灌流後 1 時間、また血清 TNF- $\alpha$  では再灌流後 1、2 時間において有意に産生が抑制された。一方、IL-6 の産生については各群に有意差を認めなかった。また再灌流 2 時間後、2 日後の腎組織中炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  の発現でも、再灌流 2 時間後、術後 2 日後ともに、mRNA 発現が有意に抑制された。

目的 1 のまとめ： 大動物を用いた前臨床実験によって、Na2S 投与が副作用を生ずることなく、腎臓での IRI 抑制効果を有することを明らかにした。特に腎臓選択的な Na2S 投与の方が全身投与よりも、局所的な炎症性サイトカイン産生抑制に寄与することによって強い腎 IRI 抑制効果があることを明らかにした。

(2) 目的 2： 120 分間温虚血にさらされた腎臓を用いて、12 日間のタクロリムスのみを周術期の免疫抑制剤として用いる移植モデ

ルを対照群とし、タクロリムスに加え周術期に経静脈的に Na<sub>2</sub>S を投与したレシピエント投与群と比較したところ、腎機能障害は可逆性であったものの、H<sub>2</sub>S 投与による有意な Cre 上昇抑制効果は認めなかった。

目的1で示したように、腎 IRI モデルでは全身（静脈）投与よりも局所（経腎動脈）投与の方が有効であるという結果を受けて、常温での腎臓持続体外灌流保存時の H<sub>2</sub>S 局所投与の有効性を評価する検討へと進んだ。この結果、遠心ポンプを用いた体外循環回路に腎臓を接続した後に、赤血球添加ヘパリン化リンゲル液を用い37℃で120分灌流（平均動脈圧 85 mmHg）し、灌流中の指標（灌流圧や灌流流量、尿量、動脈・静脈酸素化や組織酸素消費量、電解質・糖・生化学検査）を評価することが可能な常温灌流保存法を開発した。さらにこの方法を用いて、灌流保存腎臓を用いた移植も問題なく行いうることを確認した。今後、このモデルを用いて、移植前臓器に対して H<sub>2</sub>S を腎臓に直接投与することによって、移植後成績の改善が得られるか、という点について更に詳細に検討を行うための実験モデルの確立に至った。

#### 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1件)

Sekijima M, Sahara H, Miki K, Villani V, Ariyoshi Y, Iwanaga T, Tomita Y, Yamada K. Hydrogen sulfide prevents renal ischemia-reperfusion injury in CLAWN miniature swine. *J Surg Res*. 2017 Nov;219:165-172. 査読有.  
DOI: 110.1016/j.jss.2017.05.123.

##### 〔学会発表〕(計4件)

Ariyoshi Y, Sekijima M, Sahara H, Murokawa T, Shimizu A, Yamada K. Beneficial effects of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on renal ischemia-reperfusion injury (IRI) in CLAWN miniature swine. American Transplant Congress 2017. 2017年.  
関島光裕, 佐原寿史, 山田和彦. シンポジウム 10. Translational Research. 「硫化水素による新規腎臓保護戦略：臨床応用に向けた大動物実験」。第49回日本臨床腎移植学会。2016年。  
Sekijima M, Sahara H, Morita S, Ogawa Y, Miki K, Murokawa T, Iwanaga T, Ichinari Y, Shimizu A, Yamada K. Hydrogen sulfide prevents the kidney from ischemia-reperfusion injury in CLAWN miniature swine. 26th International Congress of the Transplantation Society. 2016年。  
佐原寿史, 関島光裕, 岩永健裕, 市成

ゆりか, 山田和彦. シンポジウム 5 「実験用ブタを用いた各種応用研究」 Medical Gas を用いた新たな移植医療：硫化水素の有用性。第3回日本先進医工学ブタ研究会。2015年。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~xenotx/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

関島 光裕 (SEKIJIMA, Mitsuhiro)  
鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研究センター・特任助教  
研究者番号：20568589

##### (2) 研究分担者

山田 和彦 (Yamada, Kazuhiko)  
鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研究センター・教授  
研究者番号：40241103

##### (3) 研究分担者

佐原 寿史 (Sahara, Hisashi)  
鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研究センター・准教授  
研究者番号：90452333

##### (4) 連携研究者

清水 章 (Shimizu, Akira)  
日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授  
研究者番号：00256942