

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20354

研究課題名(和文)一酸化炭素吸入はドナー臓器を保護しえるのか？ラット心臓移植を用いた検討

研究課題名(英文) Donor pretreatment with carbon monoxide prevents ischemia/reperfusion injury following heart transplantation in rats

研究代表者

藤崎 宣友 (FUJISAKI, NORITOMO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：90732644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラット異所性心臓移植モデルを用い、ドナーラットへの低濃度一酸化炭素(CO)吸入による移植後虚血再灌流障害軽減を検討した。COは心筋マーカーであるCPK、トロポニンIを改善し、再灌流後の拍動再開を早め、炎症細胞の浸潤や炎症性メディエーターを抑制して、虚血再灌流障害を軽減した。血管拡張に関連するVEGFが増加することや、炎症性メディエーターの抑制が機序として考えられるが、それらを変動させる関連遺伝子の同定は本研究期間では明らかに出来なかった。しかし、本研究は脳死ドナーへのCO吸入の有効性や、一酸化炭素中毒など高COHb濃度のドナー組織の移植適応を考えるにあたっての学術的根拠となると考えている。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that the pretreatment with carbon monoxide (CO) gas before organ procurement effectively protected cardiac grafts from ischemia reperfusion (I/R)-induced injury in a rat heterotopic cardiac transplantation. CO-inhaled group improved serum troponin I, CPK, and reanimation time after I/R. Inflammatory cytokines mRNAs and migration of neutrophils and macrophages on the graft were decreased. VEGF, a potent growth factor that promotes differentiation and proliferation of endothelium and mediates vasodilatation, was increased by CO-inhalation. Our study showed CO-inhalation of donors was highly effective to provide potent anti-inflammatory effects against I/R injury. But the mechanisms by which CO potentiated the protective effects were unclear because we could not find the meaningful data from gene array analysis. CO treatment of potential organ donors can increase the future pool of organs suitable for transplantation, which could have a substantial clinical impact.

研究分野：救急医学

キーワード：虚血再灌流障害 一酸化炭素 心臓移植

1. 研究開始当初の背景

治療的医学ガスは、その代表である一酸化窒素(NO)を筆頭に硫化水素(H₂S)、そして一酸化炭素(CO)で特に近年研究がすすんでいる(Nakao, et al. J Clin Biochem Nutr, 2009)。高濃度CO吸入はヘモグロビン親和性が酸素より強いいため組織低酸素症を起こす。一方、低濃度CO吸入は細胞保護作用を有し、臓器移植後の拒絶反応や炎症を抑制する事も示されている。COを用いた臓器移植の研究は、主にラットやマウスなどの小動物、ブタなどの大動物を用いて行われており、非常に期待される治療戦略の一つである。COはヘム代謝を担うヘムオキシゲナーゼ(HO)により恒常的につくられており、ストレス誘導型のHO-1の細胞保護作用は、その代謝物質であるCOに起因するとされる。COは生理的であるが、治療濃度(250-500 ppm)の短時間吸入で強力な抗炎症作用、抗アポトーシス作用が報告されており(Otterbein LE et al. Nat Med 2000)、臓器移植分野では虚血再灌流傷害などに対し多く研究がされている。しかし、ほとんどはレシピエントに吸入させるものであり、ドナーに使用した研究はほとんどされていない。またCOは集中治療領域でも、効果は大いに期待されるが、その毒性が問題となり、臨床応用には高いハードルがある。

一方で、救命救急センターに搬送された脳死患者がドナーとなる場合、臓器摘出までの前処置としてCOを呼吸器から投与することは、倫理的にも比較的受容されやすいと思われる。さらに、高いCOHb濃度を有する一酸化炭素中毒患者や熱傷患者の臓器も躊躇されるべきでない、という強い学術的根拠になり本研究の臨床的社会的意義は大きいと思われた。

2. 研究の目的

経気道的吸入療法は簡便な手段であり、集中治療室で臓器提供ドナーが前処置として

CO吸入療法を行う事が想定できる。また、一酸化炭素中毒など高COHb濃度のまま脳死となった患者からの臓器提供なども想定される。本研究では、ラット心臓移植モデルを用い、ドナーラットへCO吸入を行い、レシピエントラットへの移植後、移植心における再灌流障害を検討し、ドナーへのCO吸入が移植臓器の保護や再灌流障害の予防に効果的であるか、基礎的なデータを構築する事が目的である。

3. 研究の方法

8~9週齢、体重200~250gの雄性LEWラットを使用した。ラットは室温22℃、12時間毎の明暗条件下で自由に摂食させ飼育した。ドナーラットは、流量1.5 L/minで灌流し、CO 250 ppmを維持した専用チャンバー内で24時間飼育を行い、イソフルランを用いた全身麻酔下に抗凝固剤を投与、その後冷却したUniversity of Wisconsin (UW)液を下大静脈から注入し心停止を得た後、可及的に心臓グラフトを採取した。摘出心は4℃のUW液内で8時間保存した後、レシピエントの腹部に異所性心臓移植を行った。

対象は移植処置を行わない正常ラット(normal)群、CO吸入の代わりに大気吸入とする移植Air吸入群を用い、目的とする移植CO吸入群の3群で比較を行った。ドナー心臓における心筋障害の評価は、再灌流3時間後の血清生化学検査でcreatin phosphokinase (CPK)、troponin Iを測定する事で行い、またその形態学的特徴を色調、収縮力、硬性それぞれ5段階で評価を行った。移植された心臓グラフトよりmRNAを抽出し、虚血再灌流障害で誘発される早期の炎症性メディエーターや細胞接着因子であるinterleukin (IL)-6、Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、inducible nitric oxide synthase (iNOS)、endothelin (ET)-1、vascular endothelial growth factor (VEGF)

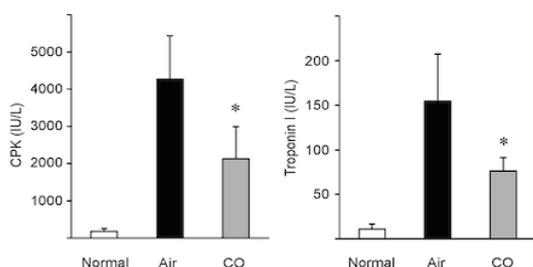
を quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)で検出し、内部標準として *gapdh* を使用した。

病理学的には移植 6 時間後の心臓から、左室中央部の組織を切り出し、4%パラホルムアルデヒド液に浸漬、固定後、3 μm の切片を作成し検討した。3 群それぞれヘマトキシリンエオジン (HE) 染色、ナフトール染色、マクrofアージ検出のため抗 CD68 モノクローナル抗体 (ED-1) を用い免疫染色を行った。観察は 1 匹あたり 5 視野を 400 倍視野 (High Power Field: HPF) で行い、平均値を算出した。前処置として行った 24 時間 CO 吸入による影響を、Gene array により心筋組織内の遺伝子発現の変化で網羅的に検索した。

4. 研究成果

血清生化学所見では CPK は normal 群で 178.3 ± 33.1 IU/L、Air 群で 4265 ± 477 IU/L、CO 群で 2132 ± 353 IU/L であった。一方、Troponin I では normal 群で 10.7 ± 6.2 IU/L、Air 群で 154 ± 53.1 IU/L、CO 群で 76.3 ± 14.9 IU/L であり有意差 ($P < 0.05$) をもって CO 群で心筋障害を抑制する事が示された (Figure 1)。

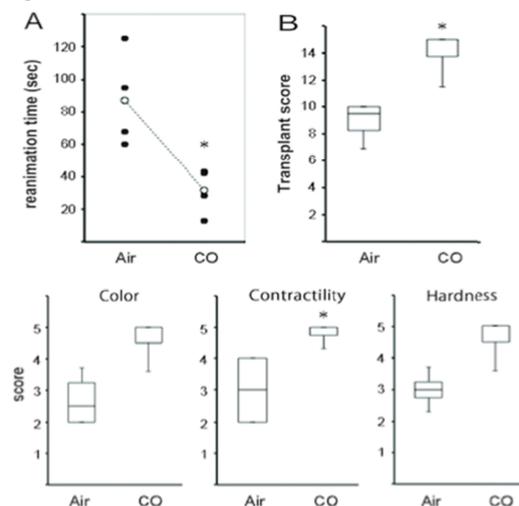
Figure 1



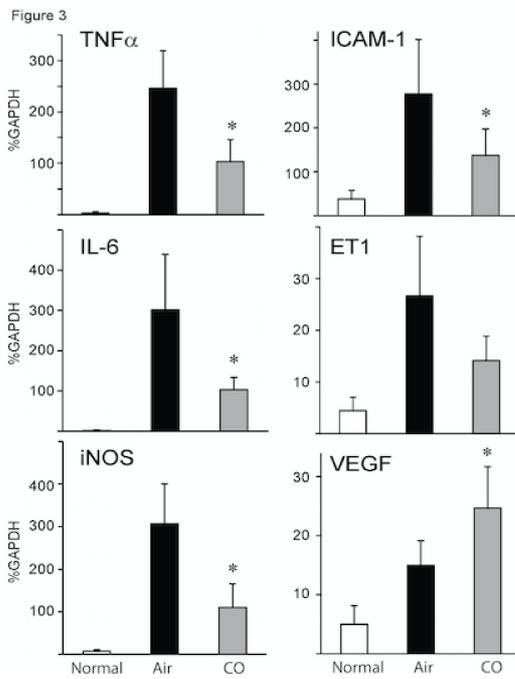
形態学的特徴の肉眼的評価では、ドナー心臓が異所性移植され再灌流し、再拍動するまでの時間 (Reanimation time) は Air 群 87 ± 29.4 秒、CO 群 31.5 ± 14.1 秒であり有意差 ($P < 0.05$) をもって CO 群で早期に再拍動を認めた。ま

た色調 (Air 群 2.8 点、CO 群 4.5 点)、収縮力 (Air 群 3.0 点、CO 群 4.8 点)、硬性 (Air 群 3.0 点、CO 群 4.5 点)、それらの総計である transplant score は Air 群 8.8 点、CO 群 13.5 点であり、これらにおいても有意な差をもって CO 群で障害が抑制されていることが示された (Figure 2)。

Figure 2

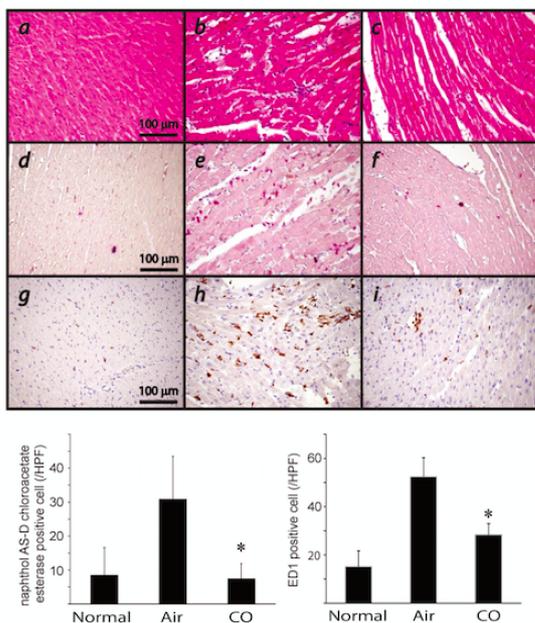


移植後心臓組織の mRNA は normal 群をコントロールとして Air 群、CO 群を比較した。TNF- α (Air 群 74.2 倍、CO 群 31.2 倍)、ICAM-1 (Air 群 7.3 倍、CO 群 3.6 倍)、IL-6 (Air 群 151 倍、CO 群 52 倍)、ET-1 (Air 群 6.8 倍、CO 群 3.5 倍)、iNOS (Air 群 43.9 倍、CO 群 15.7 倍) であり、いずれも CO 群で有意に低値を示したが、VEGF (Air 群 3 倍、CO 群 4.9 倍) では Air 群で有意に低値を認めた (Figure 3)。



病理学的評価は、HE 染色において Air 群で有意に細胞浸潤を認めた。ナフトール染色で好中球浸潤を測定すると Normal 群 8.8 cells/HPF、Air 群 28.3 cells/HPF、CO 群 7.6 cells/HPF、ED-1 染色によるマクロファージ浸潤は Normal 群 15.1 cells/HPF、Air 群 52.4 cells/HPF、CO 群 28.3 cells/HPF であり、有意 ($P < 0.05$) に CO 群で好中球、マクロファージの浸潤が少なかった (Figure 4)。

Figure 4



Gene array では発現量に有意な変化が出た遺伝子は存在したが、直接的に虚血再灌流障害を防ぎ得る遺伝子 (抗炎症性サイトカインや抗アポトーシス経路に関する遺伝子) ではなく、我々が想定していた経路にも該当しなかったため、未知の経路が存在する可能性も考えられた。これらの遺伝子が虚血再灌流障害の抑制にどのように関与しているかは今後検討する必要がある (Table 1)。

Table.1

ProbeID	Genbank Accession	GeneSymbol	LOG2Ratio	Description	Translation product or related protein
A_64_P002431	XM_574591		-2.27426	similar to MAS-related G-protein-coupled receptor, member G, transcript variant 2 (REGD1562011)	Angiotensin(1-7) receptor
A_64_P065117	NM_001000072	Ole1057	-1.62705	olfactory receptor 1057 (Ole1057)	Olfactory receptor
A_44_P06444	XM_008763702		1.35428	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3 (Nr4a3), transcript variant X1	Nuclear receptor
A_44_P146695	NM_001004022	Ker15	-1.90307	keratin 15, type I (Ker15)	Type I cytokeratin
A_44_P30060	NM_001014154	Dnaaf1	-1.80188	dyx1c1, axonemal, assembly factor 1 (Dnaaf1)	Motril protein
A_44_P1109319	XM_008767739	LOC103693423	-1.56747	collagen alpha 1(I)NC3(III) chain (LOC103693423)	Type II transmembrane protein
A_43_P22106	XM_003750528		-1.80228	similar to C42C1.15 (LOC879247)	Methyltransferase like 21b
A_44_P116299	XM_008773357	Brow5f	-1.48077	bromodomain and WD repeat domain containing 5 (Brow5f), transcript variant X1	Histone modification and recognition
A_44_P101870	NM_001134593	Ctarp	-1.38026	circadian associated repressor of transcription (Ctarp)	Transcriptional repressor
A_44_P105989	NM_001109149	Nmb	-1.37186	neuromedin B (Nmb)	Bombesin-related peptide
A_44_P18724	NM_0193161	Arc	-1.36731	activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc)	Required for consolidation of synaptic
A_44_P18724	NM_0193161	Arc	-1.35546		
A_43_P11044	NM_001000632	G0u2	1.357051	G0/G1 switch 2 (G0u2)	Anti-apoptotic factor
A_44_P118015	XM_008759219		-1.66483	colloid-coil glutamate-rich protein 2 (Ccr2)	Colloid-coil domain
A_64_P100793	NM_021366	Ccr2	-1.42155	chemokine (C-C motif) receptor 2 (Ccr2)	Receptor for monocyte chemoattractant protein-1
A_44_P36055	AA18208		1.74434	cDNA clone UT-R-4b-ab-08-0-UT 3'	Unknown
A_44_P066425	AB05890		-1.46797	cDNA clone UT-R-C1-5a-e-12-0-UT 3'	Unknown
A_44_P219372	CA50569	G0u2	1.354726	cDNA clone UT-R-FS1-04j-05-0-UT 3'	Unknown
A_44_P112099	XR_000177	LOC102547852	-1.84172	uncharacterized LOC102547852 transcript variant X1	
A_44_P1110680	XR_597280	LOC103694152	-1.40984	uncharacterized LOC103694152	(ncRNA)

以上の結果から、移植ドナーの低濃度一酸化炭素吸入は炎症性メディエーターの発現を抑制することで心臓移植後の虚血再灌流障害を軽減することが示された。

これらを考察すると、CO 吸入により CPK, Troponin I, Reanimation time、心筋障害が有意に抑制されたことから、CO による細胞保護作用が移植において有利な結果をもたらす可能性が示唆された。機序としては、CO は炎症性サイトカインの mRNA を制御することが示され、かつ内皮細胞の分化、増殖の成長因子であり、血管内皮依存性血管拡張をもたらす VEGF の発現増加をしめすことから、それらが虚血再灌流障害予防の一助を担っている可能性がある。

一方で、Gene array により CO 吸入がもたらす未知分子の変化の検出を試み、それぞれ発現量の増加、減少した遺伝子を検出した。

ストレス応答物質、ATP 合成関連物質、抗アポトーシス物質、抗酸化物質、転写調整因子などの CO が潜在的に関与すると思われた細胞保護に関わる物質の検出は今回の検討ではできなかった。一方で、機序としての関連は不明であるが、アンジオテンシン II に拮抗する心血管作用を持つとされるペプチドアンジオテンシン(1-7)レセプター遺伝子、ケモカインレセプターである CCR2 遺伝子などでは Air 群に比べ減少が確認された。本検討ではドナー心臓の組織について網羅的に mRNA を検討したが、レシピエント内で再灌流が起こった際にドナー組織に残る CO がレシピエント側に作用することで細胞保護作用が出現する可能性考えられる。さらに、これまでの検討から、CO がレシピエント側のヘム蛋白などの標的分子と直接結合し機能を発現している可能性もあると考えており、今後の研究課題である。

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)

1. Fujisaki, N., K. Kohama, T. Nishimura, H. Yamashita, M. Ishikawa, A. Kanematsu, T. Yamada, S. Lee, T. Yumoto, K. Tsukahara, J. Kotani and A. Nakao (2016). "Donor pretreatment with carbon monoxide prevents ischemia/reperfusion injury following heart transplantation in rats." *Med Gas Res* **6**(3): 122-129.

[学会発表](計 2 件)

1. Fujisaki N., Keisuke Kohama, Takeshi Nishimura, Hayato Yamashita, Michiko Ishikawa, Akihiro Kanematsu, Taihei Yamada, Sungsoo Lee, Tetsuya Yumoto, Kohei Tsukahara, Joji Kotani, Atsunori Nakao. Donor pretreatment with carbon monoxide prevents ischemia/reperfusion injury following heart transplantation in rats. *26th International Congress of The Transplantation Society*, Hong Kong, Aug 18-23, 2016
2. 藤崎直友、石川倫子、小谷穰治 一酸化炭素によるドナー前処置が及ぼすラット心臓移植後虚血再灌流障害の予防効果 第 45 回日本救急医学会総会、リーガロイ

ヤルホテル大阪(大阪府 大阪市) 2017 年 10 月 24 日~26 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
藤崎 宣友 (Fujisaki, Noritomo)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：90732644

(2)研究分担者
研究者番号：

(3)連携研究者
研究者番号：