

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10520

研究課題名(和文) RNA干渉を用いたドナー臓器修復・免疫寛容誘導戦略の前臨床大動物実験による開発

研究課題名(英文) Development of protection and repair of preserved organs using small interfering RNA (siRNA) in large animal model .

研究代表者

昇 修治 (Nobori, Shuji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30433288

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)：臓器移植治療におけるドナー不足の問題について、マージナル脳死・心停止ドナーへ適応拡大の際は、虚血再灌流障害(IRI)に伴う急性臓器不全や、免疫活性化による急性・慢性拒絶反応誘発が懸念され、本研究では small interfering RNA (siRNA) を用いた保存臓器の保護・修復についての開発を目的とした。主要組織適合性抗原 MHC 確立ミニブタ脳死ドナー腎臓に対し、独自開発の siRNA を直接投与し、ドナー臓器内の炎症・拒絶惹起因子 HMGB1、IL-6、CD40 を中心とする発現制御について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

灌流保存を行った腎移植の特徴、遺伝子発現について、灌流中の指標(血流量や血管抵抗値)と術後のピーク Cre 値の相関を検討したところ、灌流時の血管抵抗から術後の腎機能を予測しうることを示唆する結果を得た。移植後の線維化関連遺伝子発現増加あるいは炎症関連遺伝子の発現増加を認めた。

RNA阻害剤の投与効果は、投与例は非投与症例と比較して、血清 Cre の変化および病理学的に腎障害は軽度であった。また病理学的に障害腎臓の速やかな再生が得られることを示唆する結果を得、灌流液への薬物添加によって RNA 発現の抑制効果が得られ、術後に新たな薬物投与の負担を強いることのない新たな治療薬の開発につながる結果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Regarding the problem of donor shortage in organ transplant treatment, when expanding the indication to marginal brain death / cardiac arrest donors, there is concern about acute organ failure associated with ischemia-reperfusion injury (IRI) and induction of acute / chronic rejection due to immune activation. In this study, we aimed at the development of protection and repair of preserved organs using small interfering RNA (siRNA). We investigated the expression control of HMGB1, IL-6, and CD40 in the donor organs by direct administration of an independently developed siRNA to the major histocompatibility antigen MHC-established mini-pig brain-dead donor kidney.

研究分野：移植・再生医療

キーワード：前臨床研究 虚血再灌流障害 移植免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重篤な臓器不全に対する移植医療の効果は広く認知されるが、ドナー不足は極めて深刻である。ドナー適応拡大としてマージナル・心停止ドナーなど条件の悪い臓器を用いた移植は、虚血再灌流障害 (Ischemia-reperfusion injury: IRI) 等の急性臓器不全の危険に加え、免疫活性化による急性拒絶や慢性期臓器機能不全の誘因となりうるため、ドナー臓器の適切な保護は、ドナー数確保に加え、移植後成績向上に直結する。更に、術後永続的な複数の免疫抑制剤服用にも関わらず、臓器移植の長期予後は必ずしも改善していない現状を考慮すると、移植前のドナー臓器保護・修復から移植成績の向上、更には免疫抑制剤服用を必要としない免疫寛容誘導を導くことは、患者に新たな服薬の負担を生じない重要な治療戦略になるものと期待されていた。

免疫寛容誘導に関する成果の殆どは小動物実験によるものであり大動物での再現性は乏しい (Nat Med 2013)。我々が報告した「拒絶反応に重要な血管内皮細胞上の主要組織適合性抗原 (Major histocompatibility complex: MHC) class II 発現は大動物では恒常的であるが、小動物では抗原刺激を受け初めて発現する (Transplantation 2004)」など、小・大動物間の免疫学的相違が主な理由と考えられる。しかしこれまで大動物実験の多くは MHC に配慮のない急性実験に限られ、長期間にわたる観察が重要な移植臓器免疫寛容誘導の機序解明及び治療法の確立には、移植免疫応答に最重要な MHC 背景の均一化は不可欠であり、我々は、アジア唯一の MHC 確立大動物クラウン系ミニブタを用いた移植実験を推進していた。

我々は、加齢あるいは胸腺摘出若年ミニブタは免疫寛容が困難である (Yamada K. J Exp Med 1997, Transplantation 1999) という現象を基に、免疫寛容誘導における胸腺の役割を検討し、(1) 加齢退縮胸腺を若年宿主に移植すると、若年胸腺と同様な胸腺構築へ若返ること (Nobori S. Proc Natl Acad Sci U S A 2006)、(2) LH-RH アゴニスト投与により加齢退縮ブタ胸腺が若返ること (Yamada K. Transplant Immunol 2010)、(3) 胸腺の若返りにより胸腺固有能力が再生し、免疫寛容誘導が可能になる、という結果を得た。これは臓器に対する外因子が、免疫寛容誘導に優位に働くことを示唆する結果であった。

さらに申請者らは、移植臓器への外因子投与による拒絶抑制という観点から研究を進め、抗炎症効果を示した一酸化炭素 CO (J Thorac Cardiovasc Surg 2010, Transplantation 2010) を用い、ドナー CO 投与が移植成績の改善につながることを、機序としてドナー臓器での炎症や HMGB1 (High mobility group box 1) 制御や、樹状細胞の成熟抑制 (抗原提示能低下) の重要性を示していた。また、120 分温虚血腎障害モデルで HMGB1 が TNF- α 、IL-6 に先行上昇し、IRI 進展の鍵となること、HMGB1 抗体投与による IRI 抑制効果を初めて大動物モデルで示し、移植後臓器障害・拒絶反応の契機となる移植前ドナー内 HMGB1 や炎症性サイトカインなど炎症前駆物質の活性化の制御は必須であることを示してきた。

2. 研究の目的

このように条件の悪いドナーでは、移植後臓器障害・拒絶反応の契機となる移植前ドナー内 HMGB1 や炎症性サイトカインなど炎症前駆物質の活性化の制御は必須である。従来は、障害細胞から放出される障害促進因子を制御する抗体療法が主であるが、一旦障害カスケードが切られた後は、種々の標的因子に対する限定された時期での薬物投与の必要性に加え、レシピエントへの新たな投薬負担ともなる。そこで、ドナー臓器内で誘導される内因性障害促進因子をドナー臓器内で早期に制御し、移植臓器障害カスケードを制御し免疫寛容をはかる治療戦略を開発するという観点に基づき、移植の際に活性化をされる RNA を阻害するという手法から、新たな免疫制御療法の確立につながる前臨床研究を立案した。

3. 研究の方法

(1) 実験の概要

MHC 確立クラウン系ミニブタを用いた腎移植実験を実施した。心停止後 60 分にわたり 37 $^{\circ}$ C で温虚血にさらされた腎臓 (温度を一定にするため 37 $^{\circ}$ C に設定した恒温槽内に静置) をドナー腎として用い、灌流保存を行った後に後述のように腎臓移植を行った。灌流保存中には薬物の臓器への直接投与が可能であるという特性を生かし、保存中に RNA を阻害する薬剤を投与して、移植周術期の臓器内での障害カスケードの変化や移植後の腎機能の評価を行った。

(2) 移植動物・免疫抑制療法

移植後のアロ T 細胞反応を極力排除し、移植臓器の状態に焦点をあてた研究を行うため、MHC 適合間腎移植を行った。12 日間低濃度持続タクロリムス投与 (血中濃度: 10-15 ng/ml) によりマイナー抗原応答を制御した。レシピエントの移植腎のみの機能評価を可能とするため、移植反対側の固有腎は摘出した。

(3) 手術方法

塩化カリウム静脈投与による心停止後に、大動脈・下大静脈付きで両腎を摘出し、60 分間 37

に静置して、強い温虚血を惹起した（温度条件を一定化するため 37 に調整）。摘出両腎の片方の腎動脈、静脈、尿管にカニューレションを行い、確立している体外循環回路に接続した。60 分灌流後、すでに確立した手法により腎移植を行った（*Transplantation* 2012）。

（４）灌流保存の設定および灌流中の測定データ

灌流液を用いて、4 、灌流時の動脈圧を 30/20 mmHg に設定した。灌流中測定データとして、灌流圧や灌流流量を経時的に測定し、記録を行った。

（５）移植臓器および個体

連日の血液採血を行い、術後血清クレアチンを指標として移植後腎機能評価を行った。また経時的な腎生検を、虚血前、温虚血 1 時間後、移植前、移植腎再灌流 1 時間後、POD4、POD7、POD14 に実施し、病理学的解析や遺伝子・タンパク発現解析を実施した。また血清 Cre に加えて超音波検査による腎血流や膀胱内の尿貯留などを腎機能の補助的指標として用いた。また食欲の有無、痩身の程度、容易に起立しうるか、などをもとに個体の状態観察を行った。

（６）移植ブタ腎臓からの RNA 抽出および遺伝子発現解析

生検で得られた腎臓組織をホモジナイズした後に処理を行い、RNA を抽出した。抽出した RNA を用いて、炎症や線維化、あるいは抗酸化や細胞保護に関する遺伝子発現評価および対象とする RNA の発現評価を行った。18S を内部標準とし、各サンプルの移植前検体に対する相対値を用いて発現評価を行った。

（７）薬物投与

経腎動脈的に薬剤が腎臓に投与されるように、灌流液中に RNA を阻害する薬剤の投与を行った。

4 . 研究成果

（１）灌流保存を行った腎移植の特徴および臓器内での遺伝子発現

灌流中の指標（血流量や血管抵抗値）と術後腎機能の相関関係を明瞭化するために、灌流終了までの 1 時間の灌流指標値、術後ピーク Cre 値とピークに至る日数、各症例の予後に基づいて、灌流中の抵抗値と術後のピーク Cre 値の相関を検討したところ、有意な相関関係が得られた。また灌流時の血管抵抗から術後の腎機能を予測しうることを示唆する結果を得た。

さらに、移植腎臓の遺伝子発現解析では、温虚血腎臓を用いた腎移植では、移植後の線維化関連遺伝子発現増加、あるいは炎症関連遺伝子の発現増加を認めた。これらに加えて、対象とする RNA の発現を確認することができた。

（２）RNA 阻害剤の投与効果

薬物非投与群として 4 例、投与群として 4 例の腎移植を行い、温虚血/保存腎への RNA 阻害薬の投与が移植後の腎機能を改善しうるかについて評価を行った。薬物投与例のうち 1 例で移植後に高度腎機能障害を認めたため、両群の平均値としては差を認めなかったものの、この 1 例を除く 3 例では、非投与症例と比較して、血清 Cre の変化および病理学的に腎障害は軽度であった。また薬物投与によって、病理学的に障害腎臓の速やかな再生が得られることを示唆する結果を得た。

また特筆すべきこととして、灌流液への薬物添加によって、実験概念どおりに経腎動脈的に腎臓への薬物投与が可能であるだけでなく、腎臓内での RNA 発現の抑制効果が得られることを確認した。術後に新たな薬物投与の負担を強いることのない新たな治療薬の開発につながる結果であると考えられる。

（３）今後の展開

薬物投与によっても効果が得られなかった原因を探索することによって、どのような症例に効果があるのか、またどのような改良を加えることによって、確実に効果が得られるのかについて、評価を進める必要があると考える。また今回の研究では、特に IRI 制御に焦点をあてた実験を実施したものの、今後 IRI 制御から免疫寛容誘導へという我々の研究概念を更に明確化するために、MHC 不適合間の腎移植実験の際に薬物を投与することによって、臓器保存時の RNA 阻害薬投与が拒絶反応の抑制、さらには免疫寛容誘導につながるのかについて、評価を進める必要があると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山田 和彦 (Yamada Kazuhiko) (40241103)	鹿児島大学・総合科学域総合研究学系・教授 (17701)	
研究分担者	佐原 寿史 (Sahara Hisashi) (90452333)	鹿児島大学・総合科学域総合研究学系・准教授 (17701)	
研究分担者	関島 光裕 (Sekijima Mitsuhiro) (20568589)	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 (17701)	