

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09302

研究課題名(和文) ドナーグラフト内の白血球を標的とした肺移植における新規治療法の開発

研究課題名(英文) Reduction of donor mononuclear phagocytes during ex vivo lung perfusion attenuates ischemia-reperfusion injury in a rat lung transplantation model

研究代表者

大角 明宏 (Ohshumi, Akihiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90829574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：臓器保存液によるドナー肺のフラッシュ後、肺内に白血球が残存する。白血球分画の中で、単核貪食細胞は移植後の肺障害に関与することが報告されている。欧米の肺移植臨床において、体外肺灌流装置は移植前のドナー肺の機能評価に頻繁に使用されている。この灌流中にドナー肺の治療を試みた。本研究においては、ラットのドナー肺を灌流している間に、薬剤(clodronate liposome)を投与し、ドナー肺内の単核貪食細胞を減少させることに成功した。更に、この治療を行ったグラフト肺を別のラットに移植した群は、治療を行わなかった群と比較し、移植後の肺傷害が軽減される事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺移植においてドナー肺不足は深刻な問題である。前述のように、ドナー肺内には白血球が残存し、特に白血球分画の中で単核貪食細胞は移植後のドナー肺の機能不全に大きく関与するとされている。貴重な使用し得るドナー肺を増加させ、かつ移植肺の機能を向上させるには、移植前に治療を行い、かつ機能評価を行うことが極めて重要である。本小動物研究においては、体外肺灌流中に薬剤を用いて単核貪食細胞を除去し、移植後の肺傷害を軽減することを見出した。今後、中・大動物においても効果を確認する必要があるが、同治療法は、移植前の治療・評価により、移植し得るドナー肺を増加させ、かつ質を改善させうる、非常に有用な手段と考える。

研究成果の概要(英文)：Despite flushing with preservation solution during donor procurement, donor lungs still contain leukocytes. Among leukocyte subtypes, mononuclear phagocytes are considered the main cause of lung injury. Ex vivo lung perfusion (EVLP) has been applied for the pretransplant assessment of lung quality. The true potential of EVLP lies not only in evaluating the quality of donor grafts but also in reconditioning them. In this study, clodronate-liposome was administered into the perfusate during EVLP in a rat model and mononuclear phagocytes in donor lungs were significantly reduced using this drug. Moreover, lung injury after lung transplantation was significantly attenuated in the treatment group compared with the control group.

研究分野：肺移植

キーワード：肺移植 体外肺灌流 虚血再灌流傷害 単核貪食細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

移植におけるドナー臓器不足は日本と同様、諸外国でも課題である。欧米では近年、ドナーの摘出肺を移植に用い得るか否か、体外肺灌流 (ex vivo lung perfusion: EVLP) 装置を用いて評価している。このシステムは、肺動脈幹・左房・気管にカニューレを装着し、特殊な灌流液で循環させ、かつ人工呼吸器を用いて換気させながら、ドナー肺の機能を評価するものである。

一方、ドナー肺は臓器保存液によってフラッシュされているが、グラフト内に白血球は残存する。これらの残存する白血球の中で、単核貪食細胞は移植後の虚血再灌流傷害に関与するとされており、移植後の機能傷害に大きな影響を与えられていると考えられている。

近年、clodronate liposome という単核貪食細胞を死滅させる薬剤が開発された。この薬剤は、毒素である clodronate 粒子を多重層リポソームにより内包した物質である。単核貪食細胞は clodronate liposome を貪食することによって細胞内に取り込み、clodronate 粒子が細胞のアポトーシスを引き起こし、単核貪食細胞を死滅させる。移植前に EVLP 装置を用いて、clodronate liposome をドナー肺に投与し、単核貪食細胞を除去することで、虚血再灌流傷害が軽減される考え、本研究課題の提案に至った。

2. 研究の目的

(1) 臨床の肺移植において、摘出後のドナー肺は冷保存され搬送される。実験では、ラット肺を臓器保存液でフラッシュ後に冷保存し、冷虚血時間によってグラフト内の単核貪食細胞がどの程度生存するのか検証した。

(2) 実験では、ラット肺の EVLP モデルを用いて、灌流液及び肺内の単核貪食細胞の変動を追跡した。また、clodronate liposome を灌流液に投与することによって単核貪食細胞を除去できるか否かを検証した。

(3) 実験では、ラット肺の EVLP および肺移植モデルを用いて、グラフト内の単核貪食細胞の除去が、移植後の虚血再灌流傷害を改善し得るか検証した。

3. 研究の方法

(1) Lewis ラットのドナー肺を Perfadex 液でフラッシュ後に、4℃で冷保存する。冷保存時間は 20 分、6 時間、15 時間、18 時間の 4 群として、各群 6 例のグラフト肺をホモジネート後に、単核貪食細胞数をフローサイトメトリー法で測定する。

(2) 既報 (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2020;319:L61-70) では、ラット肺の EVLP モデルにおいては 12 時間までの冷虚血時間であれば、グラフト機能を損なうことなく灌流できると報告されている。肺傷害の改善を観察する実験であり、冷虚血時間は 15 時間に設定した。冷保存したグラフトを、EVLP 装置を用いて 4 時間灌流し (Control 群 5 例・Clodronate 群 5 例)、灌流液中およびグラフト内の単核貪食細胞数をフローサイトメトリー法で測定した。Clodronate 群においては、灌流液に clodronate liposome を 3 ml 投与した。

(3) 同様に冷保存したグラフトを、EVLP 装置を用いて 4 時間灌流し (Control 群 6 例・Clodronate 群 6 例)、左片肺移植後に 2 時間再灌流した。血液ガス分析、肺組織の湿乾重量比の測定や病理学的評価を行う。

4. 研究成果

(1) ドナー肺内の生存白血球数は冷保存時間を延長するにつれて、減少傾向であった (図 1A)。一方、生存単核貪食細胞数は 18 時間までの冷保存時間であれば、殆ど変化がなかった (図 1B)。これらの所見より、長時間冷保存したドナー肺内において、単核貪食細胞は生存することが示された。

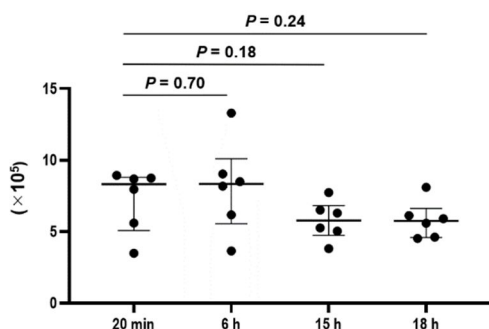


図 1A 各保存時間における白血球数

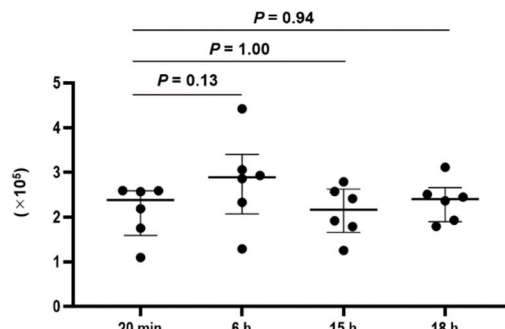


図 1B 各保存時間における単核貪食細胞数

(2) EVLP 中の灌流液中の単核貪食細胞数は、Clodronate 群で有意に減少した ($P = 0.023$; 図 2A)。また、EVLP 後のグラフト内の単核貪食細胞数も Clodronate 群で有意に減少した ($P = 0.008$; 図 2B)。このことから、EVLP 中に clodronate liposome を灌流液に投与することによって、灌流液中およびグラフト肺内の単核貪食細胞が減少することが示された。

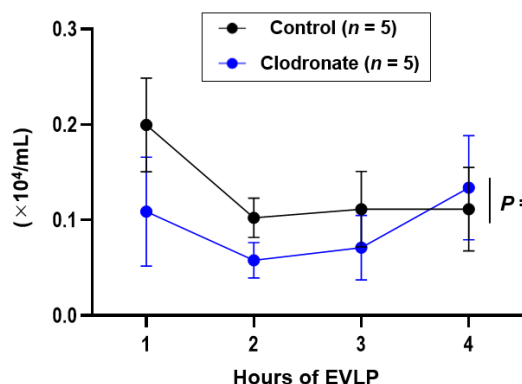


図 2A 灌流液中の単核貪食細胞数

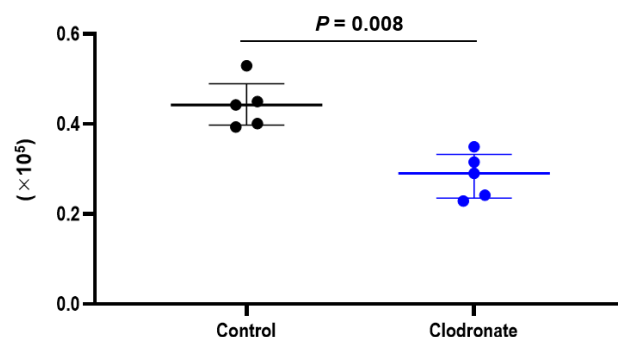


図 2B EVLP 後の肺内の単核貪食細胞数

(3) EVLP 後に左片肺移植を施行した。2 時間再灌流後の肺静脈血酸素分圧は Clodronate 群で有意に改善した (Control 群 vs Clodronate 群: 142.8 ± 72.6 mmHg vs 335.0 ± 128.0 mmHg; $P = 0.015$; 図 3A)。肺組織湿乾重量比は Clodronate 群で有意に低値であった ($P = 0.026$; 図 3B)。Lung injury score を用いた病理学的評価において、肺傷害は Clodronate 群で有意に抑制された ($P = 0.013$; 図 3C)。これらの結果から、EVLP 装置を用いた薬剤投与によって、グラフト肺内の単核貪食細胞が減少し、移植後の虚血再灌流傷害を軽減することが示唆された。

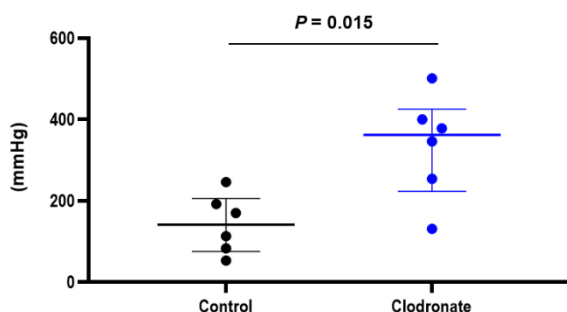


図 3A 肺静脈血酸素分圧

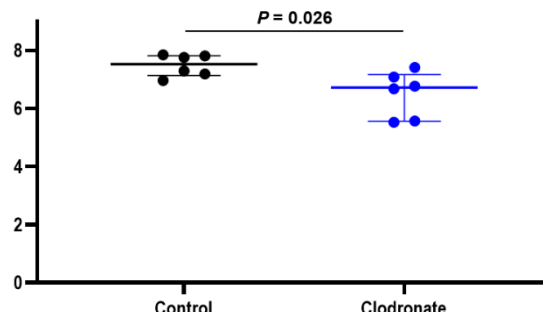


図 3B 湿乾重量比

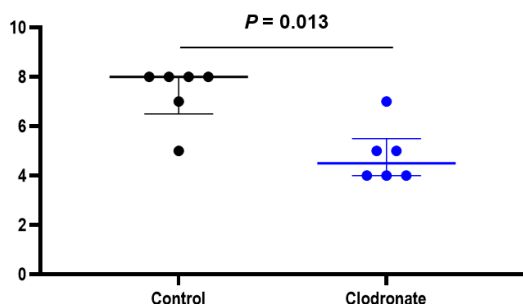


図 3C Lung injury score

本動物実験において、EVLP 中の clodronate liposome 投与はグラフト肺内の単核貪食細胞数を減少させ、移植後の虚血再灌流傷害を抑制することが示唆された。中・大動物においても効果を確認する必要があるが、同治療法は使用し得るドナー肺を増加させ、かつ質を改善させ得ると考える。

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	芳川 豊史 (YOSHIKAWA TOYOFUMI) (00452334)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	伊達 洋至 (DATE HIROSHI) (60252962)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------