

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09722

研究課題名（和文）マージナルグラフトに対する移植前臓器蘇生に関する前臨床研究

研究課題名（英文）Preclinical study on organ preconditioning before transplantation for marginal grafts

研究代表者

日下 守（Kusaka, Mamoru）

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：40309141

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：深刻なドナー不足のため、厳しい臨床条件のマージナル腎への適応拡大が求められる。本研究では、マージナル腎の臓器評価・修復を可能とする灌流保存に着目し、ミニプタを用いた橋渡し研究や臨床腎移植検体を用いた検討によって、最適な灌流法の検討や、腎障害の進展に關与するdeath signalの同定、death signal抑制による臓器修復を目指した検討を行った。臨床検体解析では、death signalとしてのtotal cell free DNAの有用性、またミニプタ実験から、簡便な低温灌流保存によって保存中の腎機能評価やdeath signal制御に基づく治療が可能であることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、臨床腎移植検体を用いた解析と、遺伝的背景が判明した主要組織適合性抗原MHC確立大動物であるクラウン系ミニプタを用いた実践的橋渡し研究に基づく結果であり、前臨床研究から臨床応用まで一貫した検討を多角的な解析によって得た結果である。従って移植成績向上を目指す橋渡し研究として学術的意義は高く、またマージナルドナー提供推進につながる社会的意義の高い成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The shortage of donor organ is severe, and there is a need to expand the use of marginal kidneys. In this study, we focused on a preservation method (machine perfusion) that enables evaluation and repair of marginal kidneys and investigated the optimal perfusion method and the identification of death signals involved in the development of renal damage. The analysis of clinical specimens showed that total cell free DNA is useful as a death signal in marginal renal transplantation, and large animal experiments suggested that hypothermic machine perfusion can be used to evaluate renal function during preservation and to provide treatment based on death signal control.

研究分野：腎移植

キーワード：腎移植 虚血再灌流障害 マージナルドナー 灌流保存

## 1. 研究開始当初の背景

移植医療における絶対的臓器不足は依然深刻であり、ドナー拡大は移植医の社会的責務である。ドナー拡大をはかるための戦略の一つとして、脳死下提供とともに、心停止ドナーからの献腎提供推進が必須である。しかし、献腎移植の長期成績は健常ドナーからの生体腎移植成績に及ばず、その原因となる急性腎障害 (Acute kidney injury: AKI) や慢性移植腎不全への進展対策が急務である。

現在臨床移植の際の臓器保存法として汎用される方法は、臓器を冷却することにより臓器の代謝抑制をはかる冷却浸漬保存法である。この方法は簡便である一方、特にマージナル腎で低温に伴い、むしろ血管内皮障害や細胞浮腫を助長する可能性が報告され (Summers DM. *Lancet* 2010)、さらに保存中の腎機能評価が不可能であるという問題がある。これに対し灌流保存 (Machine perfusion: MP) 法は、保存中の臓器の機能評価が可能であり、さらに機能を維持することや、保存中に薬物投与を行うことによって機能修復が可能となる利点があるため、マージナル腎移植での有効性が期待されている。

MP は、灌流する際の温度によって大きく 2 つのタイプに分けることができる。一つは、低温による代謝抑制という従来の臓器保存の概念を発展させた低温灌流保存 (Hypothermic MP: HMP) 法であり、もう一つは、常温で保存することによって、代謝を維持させながら臓器保存を行う常温灌流保存 (Normothermic MP) 法である。HMP 法は、現行の主流である冷却浸漬保存法による臓器保存方法の概念を延長させたもので、安全性や簡便性に対する利点がある一方、非生理学的な低温での灌流による血管内皮障害や細胞浮腫が引き起こされ、また代謝が抑制されるため臓器の機能評価や治療に対して制限があることが課題とされる。一方 NMP 法は、より生理学的に近い状態を維持したまま臓器を保存することによって、保存中の臓器機能評価や治療に優れた反面、代謝産物による微小循環・組織障害が危惧され、また一般的に保存装置が大型かつ複雑になることが課題とされる。

マージナル腎に対する臓器保存・修復法として MP 法の開発を進めるに際しては、前臨床実験として、ドナー条件に応じた詳細な灌流温度や酸素化・代謝管理を定めることが、臨床普及の観点からも極めて重要である。しかし現状では、HMP 法、NMP 法の各々の立場に基づく研究は進むものの、ドナー条件や灌流条件など複合因子を同時に検討した報告は乏しいことから (Kaths JM. *Transplant Rev* 2017)、多角的観点から新たな臓器保存方法の解明をはかる研究、特に大動物を用いた長期的な前臨床研究は必須である。

## 2. 研究の目的

深刻なドナー不足を背景に、厳しい臨床条件のドナー (マージナル腎) への適応拡大は、急性腎障害 (AKI) のリスクや慢性移植腎不全への進展が懸念される。本申請研究は、強い冷虚血 (脳死後冷却保存) や温虚血 (心停止) にさらされたマージナル腎の臓器評価・修復を可能とする灌流保存 (MP) に着目し、主要組織適合性抗原 (MHC) 確立ミニプタを用いた実践的橋渡し研究によって、最適な灌流温度や酸素投与など至適灌流条件の検討 (目的 1)、組織・血液・尿・エクソソーム検体を用い、腎障害の進展に関与する death signal となる分泌タンパクおよび mRNA、miRNA (micro RNA) の同定 (目的 2)、さらに death signal 抑制によりマージナル臓器を生体臓器と同じレベルに“蘇生”させる治療を開発し (目的 3)、マージナルドナー提供推進と移植成績向上を目指すものである。

## 3. 研究の方法

MHC 確立クラウン系ミニプタを用いた移植実験は下記のように実施する。また別途、臨床腎移植検体を用いて death signal の解析を行う。

(1) 移植動物・免疫抑制療法: 拒絶免疫反応を最小限とするクラウン系ミニプタ MHC 適合間腎移植により評価を行う。マイナー抗原拒絶制御のため低用量タクロリムスを 12 日間持続静注する (血中濃度: 10-15 ng/ml)。移植体側の腎臓は摘出することによって、移植後は移植腎臓のみによって腎機能評価を行う。

(2) 体外灌流: 常温灌流保存 NMP では、摘出腎臓の腎動静脈、尿管にカニューレションし、遠心ポンプを用いて灌流を行う (灌流圧 85 mmHg)。灌流液として、ヘパリン化リンゲル液に糖、ステロイド、重炭酸イオン、新鮮赤血球を添加したものをを用い、灌流中の灌流圧・流量、尿量、動静脈採血による酸素消費量、灌流液の生化学検査をもとに腎機能を評価する。低温灌流保存 HMP では、市販の灌流装置と灌流液を用いて 25 mmHg の灌流圧で灌流を行い、灌流流量や灌流抵抗を灌流中の指標とする。

(3) 移植臓器評価: 生化学 (Cr 等)、超音波、経時的な腎生検を基に評価する。

(4) death signal 解析 (灌流液・血液・組織・血中/尿エクソソーム): サイトカイン、接着因子、マイクロ RNA などを評価する。

## 4. 研究成果

### (1) 臨床腎移植検体を用いた death signal の解析

心停止下献腎移植(Donation after circulatory death: DCD)では、本研究の課題である蘇生すべき移植臓器変化が予測され、death signal を中心とする解析が必要である。今回の研究では death signal の一つとして、total cell free DNA(total cfDNA)に着目し、移植直後における血中の total cfDNA を解析した。心停止下献腎 DCD では、脳死(Brain death: BD)、あるいは生体腎移植(Living-related donor: LD)と比較して、移植直後の total cfDNA が著しく増加していることが判明した。さらに移植後 5 日目(POD5)の検討では、total cfDNA は DCD、BD、LD のいずれの移植においても移植直後より減少を認めるものの、DCD からの移植が最も高値であるという傾向は同様であった。

### (2) MHC 確立ミニブタを用いた前臨床腎移植実験

低温灌流保存法 HMP に焦点をあてた実験として、欧米で既に臨床使用される低温灌流保存用の機器を用いて、温虚血にさらされた腎臓を、HMP により 6 時間保存した後に、MHC が一致した動物に対して移植を行った。灌流中の流量や抵抗などの種々の指標と、移植後長期評価(腎機能あるいは経時的な腎生検に基づく病理評価)の相関関係を中心として評価を行った。この結果、120 分の温虚血腎に対し HMP 法を行った後に移植した群では、60 分の温虚血後に同様の保存・移植を行った群に比べ、有意に腎機能は増悪した。また保存中の流量や抵抗値と術後の腎機能に関して相関関係を認め、HMP 法でも保存期間中に十分に移植後の腎機能を予測しうることを明らかにした。また病理学的検討による組織学的解析も、これらの結果を裏付けるものであった。これまでに、常温灌流保存 NMP 法を行う手法として、人工心肺回路を用いた保存方法を確立していたことから、灌流保存の際の温度を始めとする各種条件によって、移植腎の機能がどのように異なるのかという点について、病理評価あるいは death signal に基づく解析(灌流液・組織・血液・尿・エクソソームなどを用いた解析)が可能となる実験基盤が整ったと考える。

灌流保存の際の至適条件を評価する目的として、灌流保存中の酸素投与の必要性を検討した。常温灌流保存 NMP の際には酸素投与が必須と考えられるが、低温灌流保存法 HMP に関しては、酸素投与の必要性あるいは有効性について検討の余地がある。そこで実験として、酸素投与下で HMP を行う手法の確立を目指し研究を進めた。まず、すでに確立した NMP 法の手法を用いることによって、HMP が可能であるかについて検討したところ、低圧・低流量で安定した腎灌流を行うことはできなかった(常温灌流では 85 mmHg という高圧力下での灌流保存となるが、低温灌流では灌流圧は 25 mmHg 程度の圧力下での低流量となる)。これは、灌流に使用する回路が長いため、低圧力・低流量で安定した灌流を行うことが難しいためと判断した。そこで、すでに確立した HMP 法(市販の灌流保存機器。酸素投与なし)の改良を、文献を参考として試みた。酸素投与を可能とする簡易的な人工心肺回路を HMP 回路に接続し、酸素投与下で HMP が行えるように改良した結果、酸素投与・血液添加下でも腎臓がない状態では安定した灌流が得られることを確認した。しかし腎臓(虚血は最小)を回路に接続して灌流を試みたところ、高い回路抵抗となり安定した灌流を行うことができず、移植に用いるのは不適當な灌流保存方法であることが示唆された。改良機器自体の問題だけでなく、低温による血管攣縮によって、粘性の高い血液添加灌流液を腎臓内に灌流させることができなかった可能性、もしくは灌流液自体の改良の必要性を考え、今後の検討課題とする。

低温灌流保存 HMP の際に、death signal の一つであるマイクロ RNA を阻害する薬剤投与によって、腎臓内での対象 RNA の発現が低下する結果を得た。従来、低温灌流では保存中の臓器修復は難しいと考えられていたものの、新たな薬物開発によって、低温保存の臓器蘇生につなげうるという知見を得たと考える。

このように、今回のミニブタを用いた研究からは、灌流保存の際の至適灌流条件を結論づけるだけの結果は得ていない。しかし、HMP 法、NMP 法という 2 つの灌流保存法を確立していることから、今後、簡便な HMP 法の利点を更に高めるものとして、HMP 中の至適灌流条件(灌流液や酸素投与の有無)の検討、さらに記載したように、従来は困難とされた低温臓器保存中の臓器修復を可能とする新たな薬物の開発によって、より高品質な灌流臓器保存法の開発に結び付く知見を得たものと判断する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yoshizawa Atsuhiko, Takahara Kiyoshi, Saruta Masanobu, Zennami Kenji, Nukaya Takuhisa, Fukaya Kosuke, Ichino Manabu, Fukami Naohiko, Niimi Atsuko, Sasaki Hitomi, Kusaka Mamoru, Suzuki Motoshi, Sumitomo Makoto, Shiroki Ryoichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Combined -methylacyl-CoA racemase inhibition and docetaxel treatment reduce cell proliferation and decrease expression of heat shock protein 27 in androgen receptor-variant-7?positive prostate cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Prostate International	6. 最初と最後の頁 18～24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pnrl.2020.07.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Zennami Kenji, Sumitomo Makoto, Takahara Kiyoshi, Nukaya Takuhisa, Takenaka Masashi, Fukaya Kosuke, Ichino Manabu, Fukami Naohiko, Sasaki Hitomi, Kusaka Mamoru, Shiroki Ryoichi	4. 巻 127
2. 論文標題 Two cycles of neoadjuvant chemotherapy improves survival in patients with high risk upper tract urothelial carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BJU International	6. 最初と最後の頁 332～339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bju.15230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sumitomo Makoto, Teramoto Atsushi, Toda Ryo, Fukami Naohiko, Fukaya Kosuke, Zennami Kenji, Ichino Manabu, Takahara Kiyoshi, Kusaka Mamoru, Shiroki Ryoichi	4. 巻 27
2. 論文標題 Deep learning using preoperative magnetic resonance imaging information to predict early recovery of urinary continence after robot assisted radical prostatectomy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 922～928
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iju.14325	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mori S, Yashiro H, Inoue M, Takahara K, Kusaka M, Shiroki R.	4. 巻 61
2. 論文標題 Urodynamic 4D-CT evaluation: 320-row area detector CT scanner combined with PhyZiodynamics software analysis provides an innovative system to evaluate urinary flow and outlet obstructions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Radiol.	6. 最初と最後の頁 558-567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0284185119868909.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahara K, Sumitomo M, Fukaya K, Jyoudai T, Nishino M, Hikichi M, Zennami K, Nukaya T, Ichino M, Fukami N, Sasaki H, Kusaka M, Shiroki R.	4. 巻 18
2. 論文標題 Clinical and oncological outcomes of robot-assisted radical prostatectomy with nerve sparing vs. non-nerve sparing for high-risk prostate cancer cases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 3896-3902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2019.10692.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe H, Ariyoshi Y, Pomposelli T, Takeuchi K, Ekanayake-Alper DK, Boyd LK, Arn SJ, Sahara H, Shimizu A, Ayares D, Lorber MI, Sykes M, Sachs DH, Yamada K.	4. 巻 27
2. 論文標題 Intra-bone bone marrow transplantation from hCD47 transgenic pigs to baboons prolongs chimerism to >60 days and promotes increased porcine lung transplant survival.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Xenotransplantation.	6. 最初と最後の頁 e12552.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/xen.12552.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sekijima M, Sahara H, Shimizu A, Iwanaga T, Murokawa T, Ariyoshi Y, Pomposelli T, Khosravi Maharlooei M, Sykes M, Yamada K.	4. 巻 26
2. 論文標題 Preparation of hybrid porcine thymus containing non-human primate thymic epithelial cells in miniature swine.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Xenotransplantation.	6. 最初と最後の頁 e12543.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/xen.12543.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mamoru Kusaka, Hitomi Sasaki, Naohiko Fukami, Kiyoshi Takahara, Manabu Ichino, Taihei Itoh, Takashi Kenmochi, Makoto Sumitomo, Ryoichi Shiroki
2. 発表標題 TOTAL CELL-FREE DNA AS A NONINVASIVE BIOMAKER OF A DELAYED GRAFT FUNCTION AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION FROM DONATION AFTER CARDIAC DEATH
3. 学会等名 The European Society for Organ Transplantation (ESOT) Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>鹿児島大学医用ミニブタ・先進医療開発研究センター 臓器置換・異種移植外科分野          (2022年4月鹿児島大学先端科学研究推進センター 生命科学動物実験ユニット 大動物研究推進部門に改組)  <a href="https://sharedspace.sakura.ne.jp/xenotx/index.html">https://sharedspace.sakura.ne.jp/xenotx/index.html</a></p>
--

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	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  (Seklijima 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)	
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)	

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
---------	---------