

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09169

研究課題名（和文）前臨床大動物モデルによる希ガスをを用いた新規移植肺保護戦略の確立

研究課題名（英文）Large animal study to develop a novel inhaled noble gas strategy to protect transplanted lungs

研究代表者

岩永 健裕（Iwanaga, Takehiro）

東京医科歯科大学・統合研究機構・技術職員

研究者番号：40518916

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）：移植医療における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。戦略の一つとして、脳死下だけでなく心停止ドナーからの提供へと拡大が検討されるが、虚血再灌流障害IRIによる急性臓器不全が懸念される。近年、希ガスであるアルゴンに抗炎症・抗アポトーシス作用などを介した細胞保護効果が報告されることに注目し、クラウン系ミニブタを用いた大動物実験によって、アルゴンの移植医療への応用性について評価を行った。この結果、アルゴンが副作用を生ずることなく、抗アポトーシス、抗酸化作用などに基づき、肺の虚血再灌流障害を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床肺移植が直面する課題として、ドナー数の絶対的な不足および慢性移植肺機能不全が主因となり、移植後の5年生存率は依然として60%に満たないことが挙げられる。ドナー拡大を目指した心停止ドナー肺移植が注目されるものの、ドナー肺の温虚血時間が不可避であり、術後虚血再灌流障害に起因する急性機能不全が懸念される。今回温虚血が惹起する再灌流障害に対して、アルゴン吸入によって、副作用を生ずることなく治療効果が得られたことは、移植医療の課題に対する新しい治療戦略の開発につながるものとして、高い社会的意義を有するものである。

研究成果の概要（英文）：Organ shortages in transplantation medicine remain serious, and measures to increase the number of donor organs are a social responsibility of transplant physicians. Organ donation from cardiac death donors is being considered, but acute organ failure due to ischemia-reperfusion injury is a concern. In recent years, attention has been focused on the reported cytoprotective effects of argon, a noble gas, through its anti-inflammatory and anti-apoptotic effects, and the applicability of argon in transplantation was evaluated through large animal experiments using CLAWN miniature swine. The results showed that argon suppressed ischemia-reperfusion injury of the lung due to its anti-apoptotic and antioxidant effects without causing any side effects.

研究分野：移植・再生医療

キーワード：移植・再生 虚血再灌流障害 希ガス アルゴン 肺移植 大動物 ミニブタ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床肺移植が直面する課題として、ドナー数の絶対的な不足および慢性移植肺機能不全 (chronic lung allograft dysfunction: CLAD) が主因となり、移植後の5年生存率は依然として60%に満たないことが挙げられる (ISHLT Registry Report 2019)。ドナー拡大を目指した心停止ドナー肺移植が注目されるものの、ドナー肺の温虚血時間が不可避であり、術後虚血再灌流障害 (ischemic-reperfusion injury: IRI) に起因する急性機能不全の危険性に加え、IRIに伴う自然免疫を主体とする血管内皮や気道上皮障害は、獲得免疫の活性化による急性・慢性拒絶の誘因、あるいは閉塞性細気管支炎 (Obstructive bronchiolitis: OB) を誘発し、これらの障害が複雑に絡み CLAD 進展の引き金となると考えられる。CLAD に対する有効な治療は確立されていないことから、その発生予防も念頭に置き、新たな治療法を確立することが必要となる。

(2) 申請者らのチームはこれまでに、生体の恒常性を担うガス状シグナル物質である一酸化炭素 (Carbon monoxide: CO) や硫化水素 (Hydrogen sulfide: H<sub>2</sub>S) が、大動物移植モデルで臓器保護効果を有することを示しているが (JTCVS & Transplantation 2010, J Surg Res 2017, Xenotransplantation 2018, J Gastrointest Surg 2019 など)、毒性が懸念されることが、臨床応用の障壁となっている。大気中に微量に存在するキセノン (Xe)、ヘリウム (He)、アルゴン (Ar) などの希ガスは低毒性の不活性ガスで、半導体などの工業製品の製造、医療用の機器など幅広く使用されている。近年、希ガスが持つ臓器保護効果に着目する研究が進められ、特に Xe の有効性は多く報告されるものの、精製コストの高さと麻酔作用の強さのため臨床応用性が懸念されている。一方で He には麻酔作用はなく、密度が低いため N<sub>2</sub> や O<sub>2</sub> より拡散速度が速く、吸入気管支拡張剤の末梢への送達と CO<sub>2</sub> 呼出を補助するという特性を持ち、He 吸入による気道閉塞 (喘息増悪、COPD、ARDS、細気管支炎等) の補助療法に用いられてきた (Levy SD. *Lancet* 2016)。近年、He による心筋や神経保護効果が明らかになり (De Denken J. *Crit Care Med* 2016)、さらに He が ERK1/2 シグナル伝達活性や Bcl-2 の発現を介した抗アポトーシス作用 (Wang YH. *Med Gas Res* 2019)、あるいは自然免疫の活性制御 (Oei GT. *J Transl Med* 2012) を持つことが示され、IRI 抑制や気道病変の制御など、肺移植への応用が強く期待されるガスと考えられる。また Ar については、大気中に 9,300ppm という高濃度で存在し、麻酔作用は乏しく、近年心筋保護や神経保護効果 (De Denken J. *Crit Care Med* 2016)、ERK1/2 シグナル伝達活性や Bcl-2 の発現を介した抗アポトーシス作用 (Wang YH. *Med Gas Res* 2019) や TLR2/TLR4 シグナルを介した自然免疫の活性制御 (Urblich F. *Plos One* 2015) も報告されるなど、Ar の多彩な作用は移植医療の有力な新しい治療方法になると期待される。

(3) しかし移植領域での少数の報告例では、ラット小腸 (Du L. *Shock* 2015) やマウス肝臓 (Zhang R. *J Hepatol* 2014) での IRI 抑制効果が示される一方、ラット肝臓 IRI での非有効性 (Braun S. *Shock* 2014) も報告された。この相反する結果の一因として、検討により臓器障害モデルや投与時期・方法が異なること、また観察期間が極めて短いことなどが考えられ、更に大動物モデルを用いた論文報告は限られる。希ガスの臨床応用性を評価するには、臨床移植医療に基づく大動物実験モデルを用いて、慢性期にわたる治療効果や安全性の検証、さらに至適投与時期の評価を行う必要がある。

### 2. 研究の目的

移植医療における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。戦略の一つとして、脳死下だけでなく心停止ドナーからの提供へと拡大が検討されるが、虚血再灌流障害 IRI による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・慢性拒絶の増加が懸念される。近年、希ガスである Xe、He、Ar に、抗炎症・抗アポトーシス作用などを介した心筋・神経保護効果が報告されることに注目し、詳細な免疫反応の評価が可能な主要組織適合性抗原 (Major histocompatibility complex: MHC) 確立クラウン系ミニプタを用いた大動物実験によって、希ガスの移植医療への応用性について多角的に評価することを研究の目的とする。特に本研究では、MHC 確立ミニプタを用いた前臨床実験として、肺 IRI モデルを用いて、希ガスの吸入が肺 IRI 抑制を有するかという点、および吸入時の至適濃度、さらに安全性についても評価を行うことを目的の主眼とする。さらに、クラウン系ミニプタ MHC 不適合間肺移植モデルを用いた評価によって、希ガスによる治療効果 (IRI 抑制や拒絶抑制効果) を評価することを発展的な目的とする。

### 3. 研究の方法

今回の研究では希ガスとして、世界的なヘリウムガス供給不足という課題、あるいはキセノンが非常に高価であるという点を考慮し、臨床応用性の制限が少ないと考えられる比較的容易に、入手しうる Ar を用いて検討を行った。

#### (1) 周術期の Ar 吸入による肺 IRI 抑制効果の検討

動物：10頭のクラウン系ミニブタを(5ヶ月齢~6ヶ月齢)を用い、Ar吸入群と対照群の2群に分けて評価を行った。本研究は、動物実験における3R(Replacement, Reduction, Refinement)に最大限留意し、実験動物の苦痛軽減や飼育環境について最大限の注意を払い、かつ動物愛護の観点からも犠牲動物数は最小になるように立案し、鹿児島大学動物実験委員会承認されたプロトコールに基づき実施した。

吸入混合ガス：Ar吸入群に対しては、70%Arと30%酸素の混合ガスを、また対照群に対しては、70%窒素(Nitrogen: N<sub>2</sub>)と30%酸素の混合ガスを充填したガスボンベを用い、各々の群に対して吸入を行った。

#### 肺 IRI モデルおよびガス投与方法・時間

手術開始後、人工呼吸器の接続ガスを酸素100%から、Ar(Ar吸入群)あるいはN<sub>2</sub>混合ガス(対照群)に切り替え、各群でガス吸入を開始した。肺IRIモデルは我々の既報に従い、左第5肋間開胸により肺門部を剥離して、左肺動静脈及び左主気管支を90分間遮断後に開放した。両群ともに、遮断までの150分、虚血中の90分、および再灌流120分後まで、計360分間にわたりガス吸入を行った。

#### 肺機能評価

術前、再灌流1時間後、再灌流2時間後に、動脈血液を用いたガス分析を行った。また再灌流2時間後、2日後に左肺静脈の直接穿刺によって、肺静脈血液ガス分析を行った。

#### 胸部 X 線および病理組織学的検査による虚血肺の障害評価

再灌流2日後、7日後、14日後、28日後に全身麻酔下で胸部 X 線撮影を行った。また、再灌流後2時間後、および以後胸部 X 線撮影実施時に、開胸肺生検を行った。

#### 血清および組織を用いた評価

ELISA や PCR 法により、炎症、酸化、アポトーシスなどに関する評価を行った。

#### 経時的な生化学検査

Ar 吸入による腎機能や肝機能等への影響や副作用を評価するため、経時的に評価を行った。

#### (2) ドナーに対する周術期 Ar 吸入による移植肺に対する効果

##### 動物・脳死誘導・移植・免疫抑制療法

臨床移植に準じたクラウン系ミニブタ MHC 不適合間移植(ドナー C1/レシピエント C2)を、12日間持続タクロリムス投与(血中濃度: 35-45 ng/ml)下で行った。我々の先行研究で、ドナーだけに対し一酸化炭素を吸入させることによって、拒絶反応が抑制されるという結果が得られていることから、ドナーに対するアルゴン吸入を行った後に、肺移植を行う系を立案した。

#### 肺機能・血液・組織・免疫学的解析など

全て(1)の肺IRI抑制効果の評価実験と同様に実施する。

#### 4. 研究成果

Ar 吸入に伴う血圧や麻酔覚醒の遷延、腎・肝機能障害など、明らかな副作用は認めなかった。90分間の温虚血により、対照群では動脈血 P/F 比が再灌流2時間後に有意に低下したものの、Ar 吸入群では良好に維持された。左 PV 採血によって障害肺の機能を直接評価したところ、Ar 吸入群では有意に P/F 比が良好に維持される結果を得た。胸部 X 線では、対照群で認めた浸潤陰影や左肺拡張不全は、Ar 吸入により軽減した。また、細胞浸潤、肺胞内浮腫、フィブリン滲出、出血の4項目に基づく肺生検の組織学的スコアは、再灌流後2時間および2日後ともに、Ar 吸入群で有意に良好であった。さらに病理や血清を用いた評価から、抗アポトーシス効果や抗酸化作用を示唆する所見を認めた。

一方、これまでに肺、肝臓など様々な動物実験によって強い抗炎症反応が示された一酸化炭素と異なり、Ar による抗炎症反応の抑制効果は軽微であった。移植前のドナー内で惹起される炎症反応を効果的に抑制し、拒絶反応抑制効果を発揮する一酸化炭素と異なり、Ar をドナーのみに投与しても移植の拒絶反応抑制効果が期待されないことが明らかとなった。

このように、クラウン系ミニブタを用いた前臨床実験によって、周術期 Ar 吸入による抗アポトーシスや抗酸化作用に基づく肺 IRI 抑制効果が大動物モデルで明らかにした。しかし、抗炎症作用は必ずしも強くないことから、臨床医療に即した冷保存を含めた肺移植モデルを用いた評価、あるいは安全性の高いガスであるという利点を活かし、術後の長期的な投与を行うなどの効果が期待される投与法の検討を通じ、Ar が臨床移植医療に応用可能であるかについて、継続的な研究が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岩永健裕, 佐原寿史, 関島光裕, 市成ゆりか, 清水章
2. 発表標題 アルゴンガス吸入によるミニブタ肺虚血再灌流障害抑制効果
3. 学会等名 第38回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩永健裕, 関島光裕, 市成ゆりか, 清水章, 佐原寿史
2. 発表標題 クラウン系ミニブタ用いたアルゴン吸入による肺虚血再灌流障害軽減効果
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐原寿史, 岩永健裕, 関島光裕, 市成ゆりか, 清水章
2. 発表標題 クラウン系ミニブタを用いた希ガス吸入による肺虚血再灌流障害抑制効果の評価
3. 学会等名 第74回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩永健裕, 佐原寿史, 関島光裕, 市成ゆりか, 清水章
2. 発表標題 肺虚血再灌流障害に対するアルゴン吸入の治療効果 - クラウン系ミニブタを用いた検討
3. 学会等名 第47回日本臓器保存生物医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sahara H, Iwanaga T, Sekijima M, Ichinari Y, Shimizu A.
2. 発表標題 Argon Inhalation Reduces Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury in MHC-inbred CLAWN Miniature Swine.
3. 学会等名 International Society for Heart and Lung Transplantation 42nd Annual Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Iwanaga T, Sekijima M, Ichinari Y, Kondo A, Shimizu A, Sahara H.
2. 発表標題 Effects of argon inhalation on reducing pulmonary warm ischemia-reperfusion injury in CLAWN miniature swine.
3. 学会等名 TTS2022 (29th International Congress of The Transplantation Society). (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔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	佐原 寿史  (SAHARA Hisashi)  (90452333)	鹿児島大学・総合科学域共同学系・准教授   (17701)	
研究分担者	関島 光裕  (SEKIJIMA Mitsuhiro)  (20568589)	鹿児島大学・先端科学研究推進センター・協力研究者   (17701)	
研究分担者	有吉 勇一  (ARIYOSHI Yuichi)  (10643520)	鹿児島大学・先端科学研究推進センター・学外協力研究者   (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
---------	---------