

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09542

研究課題名（和文）ガス状シグナル物質の複合的投与による移植腎保護効果と機序の解明をはかる前臨床実験

研究課題名（英文）Preclinical experiments to elucidate the protective effect and mechanism of kidney transplantation by combined administration of gaseous signaling agents

研究代表者

有吉 勇一（ARIYOSHI, Yuichi）

鹿児島大学・先端科学研究推進センター・学外協力研究者

研究者番号：10643520

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）：移植医療における絶対的臓器不足は依然として深刻であり、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、脳死下提供とともに、心停止ドナーからの腎臓提供の推進など適応拡大が必須である。しかし、急性腎障害や慢性移植腎不全への進展を防ぐため、特に術後早期の虚血再灌流障害の抑制が重要になる。これまでに得た一酸化炭素や硫化水素の有効性を発展させ、これらのガスの腎移植への応用性を評価した。腎移植実験で明確な有効性を示すことはできなかったものの、投与方法や対象臓器による効果の差異、さらには評価に用いるモデルの妥当性など、新たな治療法の開発に向けた様々な基礎データの蓄積に結び付いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドナー臓器数の絶対的な不足という移植医療の最大の課題を克服するための一つの対策として、術後の虚血再灌流障害を抑制する新たな方法を、実験結果を臨床応用に直結させることができる主要組織適合性抗原（MHC）確立ミニミニプタを用いた評価により行った。一酸化炭素や硫化水素の腎移植での有効性は十分ではなかったものの、投与方法、臓器や年齢による効果の差異など、様々な観点からの評価につながる基礎的結果を得ており、大動物を用いた研究の発展に寄与する成果を得た。

研究成果の概要（英文）：The shortage of donor organs for transplantation remains critical, and expanding the donor pool is a social responsibility of transplant physicians. One of the strategies is to expand the indications for donation after circulatory death. However, it is important to control ischemia-reperfusion injury, especially in the early postoperative period, to prevent progression to acute kidney injury or chronic graft failure. We have extended the previous efficacy of carbon monoxide and hydrogen sulfide and evaluated the applicability of these gases in renal transplantation. Although we have not been able to demonstrate clear efficacy in kidney transplantation, we have been able to accumulate a number of fundamental data for the development of new treatment methods, including differences in efficacy depending on the method of administration and target organ, as well as the validity of the model used for evaluation.

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 腎移植 ミニプタ 一酸化炭素 硫化水素 心停止ドナー 前臨床実験

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 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。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などの適応拡大が必須であるが、適応拡大ドナーからの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、急性腎障害や慢性移植腎不全への進展対策が急務である。従って、臨床現場において移植臓器を適切な状態に保つことは、臓器利用率増加のみならず、移植医療の成績向上に直接寄与するものとなる。

(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と言われる一酸化炭素 (Carbon monoxide: CO) や硫化水素 (Hydrogen sulfide: H<sub>2</sub>S) が臓器保護効果を有することに着目し、移植医療への応用を図るミニプタを用いた大動物実験を進めてきた。その結果、肺あるいは肝臓温虚血再灌流モデルで、250 ppm (血中 COHb 濃度<15%) の CO 吸入が IRI 抑制効果を有すること (Sahara H. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010, Murokawa T. *J Gastrointest Surg* 2019)、CO 吸入により移植肺拒絶抑制効果が得られ (Sahara H. *Transplantation* 2010)、かつドナー臓器に対する CO 投与が効果のカギを握ること、腎温虚血再灌流モデルで、腎臓再灌流前後に経腎動脈的な持続 H<sub>2</sub>S 投与が IRI 抑制に有効であること (同様に肺では経 SVC = 経肺動脈投与による IRI 抑制効果) (Sekijima M. *J Surg Res* 2017) を明らかにしてきた。これらの結果は CO や H<sub>2</sub>S のより効果的かつ安全な治療方法の探索を通じて、医療応用への展開が期待される成果である。

(3) CO や H<sub>2</sub>S は、いずれも血管拡張作用や抗炎症・抗アポトーシス・抗酸化作用により IRI 抑制作用を示すものの、例えば CO がグアニル酸シクラーゼ (sGC) のヘムに結合し、これを活性化して cGMP 量増加をもたらす血管弛緩を起こすのに対し、H<sub>2</sub>S は ATP 感受性 K チャネル (K<sub>ATP</sub>) の開口活性化を介して平滑筋細胞の弛緩を引き起こすこと (Mustafa AK. *Circ Res* 2011) あるいは H<sub>2</sub>S により強い活性酸素種 (ROS) の Scavenger 作用があること (Kimura H. *Antioxid Redox Signal* 2012) など、CO や H<sub>2</sub>S は相互に作用を補完しうる可能性がある。一方で、CO は部位によって、内因性 H<sub>2</sub>S 産生酵素である CBS のヘムに結合して H<sub>2</sub>S 産生を抑制し、むしろ血管収縮を引き起こすなど (Taoka S. *J Inorg Biochem* 2001) CO と H<sub>2</sub>S は投与部位や環境に応じ複雑なクロストークを示す可能性がある。したがって CO や H<sub>2</sub>S 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モデルを用いて、至適投与法や慢性期にわたる治療効果を評価する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究は、臨床医療に即した心停止ドナーからの臓器移植を想定した前臨床ミニプタ腎移植実験モデルを用いて、ドナー臓器保存時にガス状シグナル物質である一酸化炭素 (CO) や硫化水素 (H<sub>2</sub>S) を複合的に直接投与する高い安全性のもとで、虚血再灌流障害 (IRI) 抑制に代表される急性障害のみならず、臓器生着期間の延長効果の評価と作用機序の解明をはかるものである。CO や H<sub>2</sub>S は相互に有効性を補完しうる一方で、投与部位や環境によって、複雑なクロストークから作用を減ずる可能性もあるため、大動物を用いた前臨床移植実験として、どのような投与が効果的であるのかを明らかにする実験を行う。

### 3. 研究の方法

動物：遺伝学的背景を均一化した大動物実験を実施するため、MHC が確立したクラウン系ミニプタを用いた実験を行う。

虚血再灌流障害モデル：120 分腎動静脈遮断による虚血後に血流を再開するモデルを用いる (右腎摘により腎機能は虚血腎に依存)。

移植モデル：クラウン系ミニプタ MHC 不適合間腎移植を、既に我々が確立した方法 (Oku M. *Transplantation* 2012) で行う。

免疫抑制療法：12 日間低濃度タクロリムス持続投与 (血中濃度：35-45 ng/ml) により急性拒絶反応を制御する。

CO 投与方法：これまでの実験に準じ、人工呼吸器回路に CO ボンベを接続し、血中 COHb 濃度が 15% 以下になるように調整する (CO 濃度≈250ppm)。これまでの実験に準じて再灌流 2 時間後までの計 360 分間 CO を投与する。

H<sub>2</sub>S 投与方法：腎動脈から、H<sub>2</sub>S 供与体である Na<sub>2</sub>S を 1.0 mg/kg で持続投与する。論文報告実験に準じて、再灌流 2 時間後までの計 360 分間 CO を投与する。

なお CO や H<sub>2</sub>S 投与時はガス警報器を用いて大気中の CO や H<sub>2</sub>S 濃度に異常がないかをモニタリングする。

腎臓・他臓器評価：血清 Cre 等の生化学、超音波、腎生検検体（虚血前後、再灌流 2 時間、2、7、14、30 日、以後 30 日ごと）を用いて、H&E、Masson Trichrome（線維化病変）Elastica-Masson（血管病変）、TUNEL（アポトーシス）染色等で評価を行う。  
血液・組織・サイトカイン評価：炎症性サイトカイン（IL-1 /IL-6/TNF- /HMGB1）、抗炎症性サイトカイン（IL-10/TGF- ） 接着因子（ICAM-1）、酸化ストレス（MDA assay）ATP/ADP/AMP 解析などに着目した評価を行う。  
免疫学的解析（血液・組織浸潤細胞）：CD3/CD4/CD8 細胞、制御性 T 細胞（CD4/Foxp3）樹状細胞（MHC class II、CD14）マクロファージ（CD68/制御性 CD163）等を解析する。またドナー/レシピエント間で CFSE-MLR や抗ドナー抗体産生を経時的に評価する。

#### 4．研究成果

（1）これまでに、肺や肝臓で CO 吸入による CO 効果を認めたことから、同様に腎 IRI モデルにおいても効果が得られるのについて評価を行った。上述の 120 分間温虚血により IRI を誘導するモデルに対して再灌流 2 時間後まで CO 吸入を行ったものの、有意な IRI 抑制効果は得られなかった。また、腎移植モデルを用いた検討によっても、CO 吸入による有為な治療効果（虚血再灌流障害抑制効果や拒絶反応抑制効果）は認めなかった。

（2）上記の結果は、CO は吸入に基づくものである一方、H2S では肺動脈への直接投与という手法を用いたという投与方法の違いによる可能性が考えられる。実際に H2S では経頸静脈投与による全身投与は無効であった。しかし、H2S 供与体である Na2S を用いたため、全身投与では H2S が有効に腎臓に到達しなかったため効果がえられず、腎動脈への投与が有効であった可能性も考えられる。CO 吸入に関しては、CO が拡散により速やかに全身に分布すること、また肝臓での治療効果が得られたことから、腎臓に CO が有効に到達しなかった可能性は高くないと考える。したがって、今回 CO が腎臓の実験モデルで有効な効果が得られなかった点については、CO と H2S の投与経路の違いだけでは明確に説明することは難しいと考える。第 2 の考察点としては、CO や H2S のいずれも、抗炎症作用、抗アポトーシス作用、抗酸化作用などにより IRI 抑制作用を示すとされるが、各々の作用の強度は異なると考えられる。また同じ IRI であっても、その進展に関して、炎症、アポトーシス、酸化など、どの要因が重要であるのかは臓器によって異なる可能性がある。今後、臓器間の IRI 進展機序の評価という新たな視点を加えることによって、腎 IRI あるいは移植実験によって CO が無効である一方、H2S によって効果が得られた要因を検討し、CO や H2S の至適投与方法、あるいは投与時期に応じた治療効果の違いなど多角的な検証が可能になると考える。

（3）更に、我々のこれまでの実験では、手術中は 100%酸素投与を行っていた。また実験に用いる動物は、比較的月齢の若い個体を使用していた。有毒ガスとされる CO や H2S の投与の効果だけでなく安全性を評価する際には、高濃度酸素下では血中 COHb の解離が進みやすく、また低酸素を回避しうる安全性が高い一方、長時間の高濃度麻酔では肺障害が懸念される。また動物の年齢により腎血管の加齢変化や腎実質変化によって IRI の程度も異なる可能性があることなどを考慮する必要も生ずる。そこで、本研究の発展に関連する実験モデルとして、前臨床実験としてより適切な実験条件の探索につながる検討を行った。この結果、100%酸素投与下と 30%酸素投与下では、腎 IRI の程度に差はみられないことを明らかにした。一方、個体が高齢になるに従い、腎 IRI はやや遷延する傾向が認められた。高齢の個体では、腎内の浸潤細胞および異所性リンパ組織形成を示唆する結果を得ておりこれが病変進展に関与する可能性が考えられたものの、必ずしも均一な結果が得られるわけではなかった。従って、引き続き適切な病態モデルの探索が必要であると考えている。

（4）このように、今回の CO や H2S を用いた実験では、腎移植実験系における明確な有効性を示すことはできなかった、しかし、これらの医療ガスを、腎臓移植を含む医療分野での臨床応用につなげる可能性の探索として、投与方法や臓器による効果の差異、さらには評価に用いる適切なモデルの検討など、新たな治療法の開発に向けた基礎データを蓄積することが可能であった。今後、これらの結果を国際学術誌にまとめることによって、国際的な医療ガス利用の現状と課題までも理解した上で、新たな治療方法の開発につなげる道筋を得ている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 佐原寿史	4. 巻 21
2. 論文標題 一酸化炭素の臓器移植への応用	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 医療ガス情報ファイル	6. 最初と最後の頁 4-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sahara H, Sekijima M, Iwanaga T, Ichinari Y, Tasaki M, Takeuchi K, Shimizu A, Yamada K.
2. 発表標題 Does postoperative inhalation of carbon monoxide prolong pulmonary allograft survival in miniature swine?
3. 学会等名 Transplantation Science Symposium (TSS) Asian Regional Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sahara H, Takeuchi K, Ichinari Y, Sekijima M, Shimizu A, Yamada K.
2. 発表標題 Carbon monoxide inhalation therapy administered after transplantation does not contribute to prolonged engraftment of transplanted lungs in CLAWN miniature swine
3. 学会等名 International Society for Heart and Lung Transplantation 44th Annual Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2023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)	

6. 研究組織（つづき）

	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	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	岩永 健裕  (IWANAGA Takehiro)  (40518916)	東京医科歯科大学・統合研究機構・技術職員    (12602)	

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