

令和元年6月26日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10686

研究課題名(和文)人工赤血球が持つ肺虚血再還流障害抑制効果の臨床応用を目指した、臓器保護の研究

研究課題名(英文)Reducing ischemic lung perfusion injury by artificial hemoglobin

研究代表者

宮崎 拓郎 (MIYAZAKI, Takuro)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：00584749

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)：人工赤血球の高い酸素運搬能力が、移植肺の虚血再還流障害を防止・抑制するかを検証し、臨床応用することを目的とした。また肺の酸素化能を測定できる試験薬としての能力に着眼し、再生肺モデルで再生肺の酸素化能力が測定可能かを検討した。

移植肺の検討において、虚血再還流障害に人工赤血球投与による差は認められなかった。配合灌流液の肺保護への有用性の証明を組織学的検討で行い、アポトーシス関連遺伝子が抑制されることを証明した。この結果は人工赤血球を用いた新灌流システムが肺保護に繋がる第一歩と考えた。ラット摘出肺、再生肺ともに換気で人工赤血球溶液は酸素化され肺拡散能を体外で検査するモデルとなりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工赤血球(Hb)が小粒子径で高い酸素運搬能力がある事に注目し、肺移植で重篤な合併症である移植肺の虚血再還流障害(IRI)を防止・抑制するかを小動物モデルで検討した。

IRIの程度にHb投与の差は認められず、現在の保存液はHbの効果を必要とする程障害されない事を示唆した。研究過程で肺の酸素化能を測定できる試験薬としての能力に着眼し、再生肺モデルで再生肺の酸素化能力が測定可能かを検討し、アポトーシスが抑制されることを証明した。この結果は人工赤血球を用いた新灌流システムが肺保護に繋がる第一歩と考えた。ラット摘出肺、再生肺ともに換気でHb溶液は酸素化され肺拡散能をex vivoで検査するモデルとなる。

研究成果の概要(英文)：Ischemic reperfusion injury (IRI) still has been a big problem to be solved for long term survival for lung transplant recipients. Hemoglobin vesicles (HbVs) are artificial oxygen carriers that encapsulate purified human Hb solution in phospholipid vesicles. The smaller average particle size of HbVs, compared to human red blood cells, allows better perfusion through narrow capillaries. The purpose of this study was to evaluate the effect of HbVs with lung preservation solutions to improve IRI.

In our rat model, we could not identify the usefulness of HbVs with lung preservation. Current lung preservation solution is strong enough not to be needed HbVs. Thus we used HbVs for evaluation of decellularization ex-vivo perfusion models. Recellularization of decellularized organ scaffold is a promising option for organ regeneration. In rat model, we demonstrated that HbVs was the good evaluation tool for ex vivo functional analysis as HbVs -PBS solution passed through regenerated lungs.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：人工赤血球 臓器保存 肺移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヘモグロビン(以下Hb)小胞体(以下、人工赤血球)は、日赤で期限切れとなった赤血球から生成される人工酸素運搬体である(Sakai et al, Artif Organs, 2011)。高純度高濃度ヒトHb溶液を脂質膜で被覆して小胞体とし、粒子表面のPEG(polyethylene glycol)修飾と脱酸素化により長期間の室温備蓄が可能となり輸血治療を補完する技術として開発された。この人工赤血球の利点は、血液型がない、感染源なし、室温で2年間保存、高い酸素運搬能、小粒子径(250 nm)(赤血球8 μ m:32倍)等が挙げられる。

現在動物実験において人工赤血球の有用性が報告され始めている。ラットの下肢切断モデルにおいて、臓器保存液に人工赤血球を添加し6時間再還流し再接着したところ、下肢の酸素化や機能の復元を認めたことが報告された(Araki et al. Transplantation 2015)。これは人工赤血球の粒径が小さいため微小循環改善効果を有し、組織の酸素化に有効であった可能性が示唆された。さらに、濃縮したHbだけでなく一酸化炭素(CO)を運搬することも可能である。実際ラット肺線維症モデルにCOを結合した人工赤血球を使用し、各種サイトカインや炎症細胞浸潤が抑制された(Nagao, Biomaterials, 2014)。これらの結果より、我々はこれまでに試みられてきた手術の肺虚血再還流障害治療の中で、この人工赤血球が新しい治療に成り得るのではないかと注目した。

我々は以前より、ラビット・ラットによる肺虚血再還流モデル、ラット肺移植モデルを作成・使用し、肺障害や肺移植の研究を行ってきた(Yamashita et al. Ann Thorac Surg 2004, Hatachi et al. Transplantation 2015, Ide et al. J Thorac Cardiovasc Surg 2007)。これらの経験と知見から、下記のような仮説を導き出した。

(1) 人工赤血球は肺移植の分野に応用すれば、移植肺の虚血再還流障害を予防し肺移植の成績が向上できる可能性が高い。さらに良好な機能を有したまま、長時間の臓器保存が可能となれば、ゆくゆくは心臓死ドナーへの応用も期待できる。虚血時間を考慮すると臓器搬送に地理的に不利とされる地方の病院でも安全な肺移植が施行できる可能性がある。もちろん現在本邦で施行されている腎臓、肝臓、心臓、膵臓、小腸移植など多臓器移植にも応用可能で、今回の研究がその布石となりうる。

(2) 肺障害モデルに関わる炎症性マーカーや酸化ストレス反応、酸素化能等の機能的解析により、人工赤血球の働きを解明する一助となる。

2. 研究の目的

本研究では、通常廃棄される有効期限の過ぎた献血より作成される人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)が、小粒子径でありながら高い酸素運搬能力があることに注目した。当初はこれを臨床肺移植で、最も頻度が高くかつ重篤な合併症のひとつである移植肺の肺虚血再還流肺障害を防止・抑制するか、(1)ラット肺虚血再還流モデル、(2)ラット肺移植モデルを使用して検証し、その臓器保護効果を明らかにすることで、早期に臨床応用の実現へと繋げることを目的とした。また(3)人工赤血球の酸素運搬能によってラット摘出肺を常温で48時間維持可能か、長期的な臓器保護効果を検証した。さらに研究の過程で、(4)肺の酸素化能を測定できる試験薬としての能力に着眼し、私たちが行っている再生肺の研究モデルで、実際に人工赤血球が再生肺の酸素化能力を測定可能か確認することとした。

3. 研究の方法

(1) ラット虚血再還流モデルにおける人工赤血球の効果の病理学的・機能的検討

*オスのWistar rat(7週齢、体重約250g前後)を使用した。

虚血再還流(IR)モデルの作成

全身麻酔後、頸動静脈にルート確保しヘパリン(400U/kg)投与し、保存液(生食)を投与し40分後に左開胸し以下の操作を加えた。

a. 20mlの生食投与後+左肺門剥離のみ(Sham群)

b. 20mlの生食投与後+左肺門1hrクランプ(IR群)

c. EP-TU 20ml投与後+左肺門1hrクランプ(Control群)

d. 人工赤血球混和EP-TU投与群(10ml+10ml, HbV群)+左肺門1hrクランプ

グラフトの病理学的・機能的検討

病理組織(48hr後)を、HE染色で虚血再還流障害の程度を評価し、TUNEL染色にてアポトーシスを確認した。

(1)-2 臓器保存液(EP-TU液)と人工赤血球混和比の検討

EP-TU 10ml(A群)およびEP-TU 10ml+人工赤血球 10mlの1:1の組成(B群)でラット摘出肺を灌流したのち、その保存液内で12時間、4°C冷保存を行った。

ラット保存肺の病理学的検索を行った。

(2) ラット肺移植モデル

当科の確立した方法でラット左片肺移植を行う(Hatachi et al. Transplantation 2015)

(3)人工赤血球の酸素運搬能による長期的な臓器保護効果の検証

ラット摘出肺をバイオリアクター内で培養液を灌流し、その際に摘出ラット肺に培養液

のみ灌流群 (Control 群) と ARBC と培養液を 1:9 で配合した液を灌流する群 (HbV 群) に分け、ex vivo lung perfusion system を用いて 48 時間灌流した。
48 時間灌流後、各群の肺の障害の程度を HE 染色で評価し、TUNEL 染色にてアポトーシスを確認した。またアポトーシス関連遺伝子の real-time PCR 法を行い、RT-PCR、Western blotting によって低酸素マーカーである HIF1 α 、carbonic anhydrase 9、PDK1、GLUT1、Endothelin1 などの発現を測定した。

- (4) ラット摘出肺および再生肺における人工赤血球の酸素化能の検討
ラット摘出肺を NaOH-PBS(N 群)または SDS を用いて脱細胞化(S 群)し、さらに脱細胞化された組織骨格を、ラット肺胞血管内皮細胞(RLMVEC)と肺胞上皮細胞を灌流させることで再細胞化して再生肺を作成した。
ラット摘出肺、再生肺を、空気または 100%酸素で換気させながら人工赤血球溶液を肺動脈より灌流させ、肺静脈から溶液を採取して血液ガスを測定した。
還流前後の血液ガスを分析し、人工赤血球の酸素化能を測定した。

4. 研究成果

- (1) ラット虚血再還流モデルにおける人工赤血球の効果の病理学的・機能的検討
前段階のグラフトの病理学的・機能的検討において、病理組織 (48hr 後) は、HE 染色で虚血再還流障害の程度、TUNEL 染色で人工赤血球投与による差は認められなかった。
- (1)-2 臓器保存液(EP-TU 液)と人工赤血球混和比の検討
HbV と EpTU 液を 1:1 ~ 1:9 で混和した保存液中に肺を 12 時間 4°C で保存したが組織検索では組織障害抑制効果は認められず。現在の保存液では冷保存状態 12 時間程度では人工赤血球の効果が必要とする程組織障害が抑制されている事を示唆した。灌流のない人工赤血球内の酸素は消費され臓器保存に影響を与えていなかった。

(2) ラット肺移植モデル

上記の結果から、肺移植モデルについては作成せず、下記の研究を行った。

(3)人工赤血球の酸素運搬能による長期的な臓器保護効果の検証

人工赤血球配合灌流液が肺保護に有用であることを証明するために、HE 染色,TUNEL 染色による組織所見から検討を行い、アポトーシス関連遺伝子の real-time PCR 法を行い、HbV 群でアポトーシスが抑制されることを証明した。この結果は人工赤血球を用いた新灌流システムが肺移植での肺保護に繋がる第一歩と考えた。一方で、48 時間の灌流で人工赤血球は組織内に入り肺水腫の状態になった。改善策として、灌流液の浸透圧の調整が必要と考えられたが、人工赤血球のサイズの問題から、Air-blood バリアーを通過して肺胞内に漏出してしまっても推察された。人工赤血球は現時点では、肺の特性に合わず、肺組織への長期使用には不向きであることが示唆された。

(4) ラット摘出肺および再生肺における人工赤血球の酸素化能の検討

まず、人工赤血球は人工肺で灌流可能なことが分かった(右図)。ラット摘出肺、再生肺ともに換気により人工赤血球溶液は酸素化され、肺拡散能を ex vivo で検査するモデルとなりうる事が分かった(下表参照)。



再生肺の人工赤血球による還流

表 1. 換気の有無による再生肺のガス交換能

Table 1. Gas exchange function of regenerated lung with or without ventilation evaluated by HbVs-PBS solution

Group	Without ventilation		With ventilation (O ₂ : 0.21)		With ventilation (O ₂ : 1.0)	
	Pre admin.	PV	Pre admin.	PV	Pre admin.	PV
SDS						
pH	6.77	6.83	6.78	6.82	6.81	6.84
PaO ₂ (mmHg)	31	120	26	51	50	289
PaCO ₂ (mmHg)	14.8	13	13.7	10.1	12	9.5
NaOH-PBS						
pH	6.76	6.83	6.77	6.85	6.77	6.88
PaO ₂ (mmHg)	28	166	29	116	40	283
PaCO ₂ (mmHg)	14.4	12.2	13.3	10.1	13.2	8.2

Abbreviations. HbVs; hemoglobin vesicles. Pre admin; pre administration. PV indicates harvested HbVs-PBS solution from pulmonary vein.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Sodium hydroxide based non-detergent decellularizing solution for rat lung. Sengyoku H, Tsuchiya T, Obata T, Doi R, Hashimoto Y, Ishii M, Sakai H, Matsuo N, Taniguchi D, Suematsu T, Lawn M, Matsumoto K, Miyazaki T, Nagayasu T. Organogenesis. 2018 14(2):94-106. doi: 10.1080/15476278.

〔学会発表〕(計1件)

第36回呼吸器外科学会学術集会 細胞置換技術を利用した肺再生 -細胞外マトリックスに関する研究- 土谷 智史、小畑 智裕、橋本 泰匡、松本 桂太郎、宮崎 拓郎、畑地 豪、土肥 良一郎、渡邊 洋之助、谷口 大輔、永安 武 2019年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：永安 武

ローマ字氏名：NAGAYASU, Takeshi

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科(医学系)

職名：教授

研究者番号(8桁)：80284686

研究分担者氏名：土谷 智史

ローマ字氏名：TSUCHIYA, Tomoshi

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科(医学系)

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30437884

研究分担者氏名：畑地 豪

ローマ字氏名：HATACHI, Go

所属研究機関名：長崎大学

部局名：病院(医学系)

職名：助教

研究者番号(8桁)：80437889

(2)研究協力者

研究協力者氏名：酒井 宏水

ローマ字氏名：SAKAI, Hiromi

研究協力者氏名：高木 克典

ローマ字氏名：TAKAGI, Katsunori

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。