

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20087

研究課題名(和文) ラット腎移植モデルを用いた新規臓器保存液の開発

研究課題名(英文) Evaluation of new antioxidant-based preservation solution in a rat kidney transplantation model

研究代表者

阿部 豊文 (ABE, TOYOFUMI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90750894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは新規臓器保存液であるSS-IIを開発、マウス異所性心移植モデルにおいて、臓器冷保存後の虚血再灌流障害に伴う酸化ストレスを軽減し、移植心生着率を改善させることを報告した。本研究ではラット腎移植モデルでSS-IIの有用性を検証した。腎移植で一般的に用いられているUW solution、もしくはSS-IIに24時間冷保存したドナー腎を、レシピエントラットに同所性に移植した。UW群の75%のラットが60日以上生存した一方、SS-II群は14日以内に全てのラットが死亡した。腎臓用にSS-IIの電解質濃度の調整を重ね、移植実験を進めたが、本研究期間中にUWの腎生着率を凌ぐ新たな臓器保存液は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：Our group has reported that the new organ preservation solution, SS-II solution, which contains 3 antioxidants: L-cysteine, glycine, ascorbic acid/ascorbic acid-2-phosphate magnesium, prolonged cold storage and protected the function and structure of myocardial from ischemia/reperfusion injury via inhibiting hypoxic and oxidative stress damage. In the present study, we evaluated the efficacy of SS-II solution in a rat kidney transplantation model. Syngeneic rat kidney transplantation was performed with grafts preserved in UW or SS-II solution for 24 hr. Recipient survival rate was significantly worse in SS-II group compared to UW group (UW vs. SS-II, 75% vs. 0%, respectively, at 60 days after kidney transplantation; $p=0.0018$). Thus, no protective effect of SS-II solution was observed in a rat kidney transplantation model. Further study is needed to adjust ingredients of our new preservation solution for kidney transplantation.

研究分野：腎移植

キーワード：腎移植 臓器保存 虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

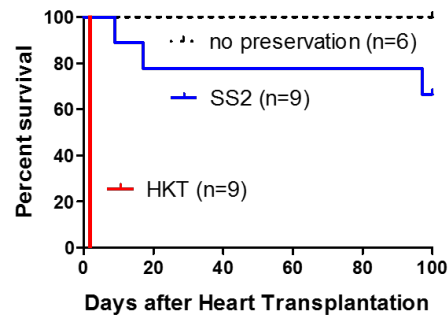
臓器移植において虚血再灌流障害は避けることができない合併症である。摘出されたドナー臓器は虚血に陥り、嫌氣的解糖によって生じる乳酸などにより細胞内はアシドーシスに傾く。移植後に酸素化された血液が再灌流する際に、フリーラジカル(活性酸素)が過剰産生され組織障害を引き起こす。移植臓器の血管内皮細胞はフリーラジカルの他にも再灌流時にさまざまな炎症性サイトカインを産生することが知られており、局所の炎症反応を惹起する。そのため虚血再灌流障害が移植後の急性拒絶反応や慢性拒絶反応の発症に影響を与えることが報告されている。また阻血時間は移植の成否を左右する重要な因子で、心移植においてはドナーの心臓を摘出後 4-5 時間以内に移植する必要がある。比較的虚血時間が長くても移植可能とされる腎移植においても、冷阻血時間が長期予後に影響する重要な因子であることが報告されている (Am J Transplant 2007;7:1797)。最近の英国のレジストリーからの報告では、心停止ドナーからの献腎移植において、12 時間以上保存した移植腎の生着率は、冷阻血時間が 12 時間未満であった移植腎と比較して有意に予後が不良であった (Lancet 2010;376:1303)。また同報告は冷阻血時間が 12 時間未満となるような条件の良い移植が少数であったと伝えている。

本邦においては深刻なドナー不足が問題となっており、2012 年において献腎移植登録者数 12639 人に対して献腎移植を受けることができたのは 193 人に過ぎない (臓器移植ファクトブック 2013)。ドナー不足は日本だけでなく欧米も同様で、以前は移植の対象にならなかった高齢者、糖尿病患者、腎機能低下患者、心停止後患者もドナー候補とされるようになった (マージナルドナー)。そのようなマージナルドナーからの腎移植では、移植しても機能が発現しないこと (primary nonfunction) も多く、腎機能予後も悪いことが問題となっている。

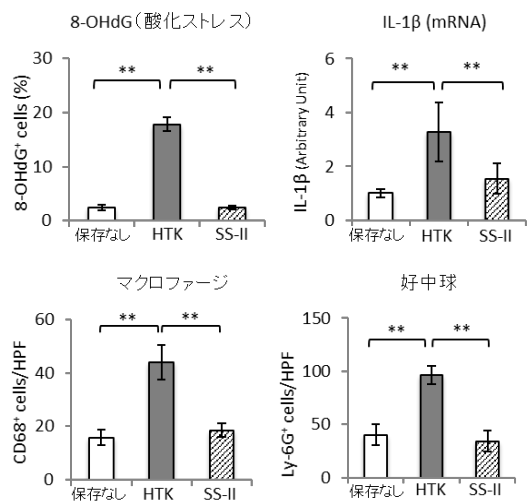
現在、本邦の腎移植においては、1980 年代に開発された University of Wisconsin solution (UW) を用いた単純浸漬保存法が主流である。心停止ドナーを始めとするマージナルドナーに頼らざるを得ない現状において、移植臓器の生着率を改善するために虚血再灌流障害を軽減する新たな臓器保存法の開発が望まれている。

われわれの研究グループは虚血再灌流障害時に発生する酸化ストレスに注目し、種々の抗酸化剤含む新規臓器保存液、SBI-Seiiku solution (SS-) を開発し、マウス異所性心移植モデルで有効性を検証した。

B6 マウスからドナー心を摘出、一般的な心筋保存液である Histidine Triptophan Ketoglutarate solution (HTK) もしくは SS- に 48 時間単純浸漬保存し、同系レシピエントの腹部に移植した。



HTK と比較して、SS- は 48 時間冷保存した心グラフトの心生着率を有意に改善した。



また SS- は HKT と比較し、有意に酸化ストレスを軽減し、炎症性サイトカイン産生を抑制した。そして組織におけるマクロファージ、好中球の浸潤を抑制することを報告した (Transplantation 2016,100:1032-1040)。

2. 研究の目的

マウス心移植モデルでは、固有心はそのままにドナー心臓を腹部に異所性に移植、体表から拍動を触知して生着期間を評価しており、実際の心機能を評価していない。一方、ラット腎移植モデルでは両側固有腎を摘除するため、血中クレアチニン、尿タンパクの測定などにより、移植した腎臓の機能を正確に評価することが可能である。本研究は、安価で簡便に作成可能な日本発の新たな臓器保存液 SS- の臨床応用を目標に、その前段階として SS- の有効性をラット腎移植モデルで検証することを目的とする。

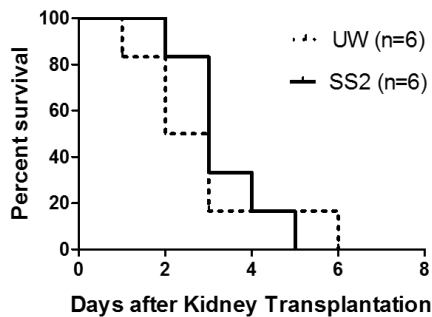
3. 研究の方法

現在、腎移植領域で一般的に用いられている保存液は UW であり、本研究では対照群に UW を使用した。Lewis ラット (雄性、6~10 週齢) をドナー、レシピエントに用いて同系腎移植を行った。ドナーから摘出した左腎を 24 時間 UW もしくは SS- に単純浸漬冷保存した後、左腎を摘除したレシピエントに同所性に

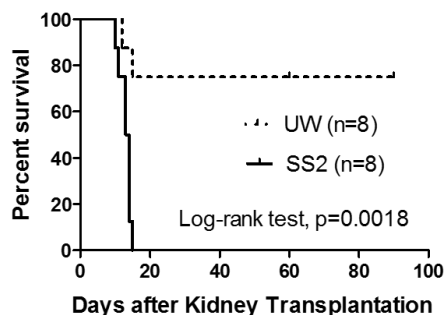
移植を行った。顕微鏡下に 10-0 ナイロン糸を用いて、腎動静脈、尿管をそれぞれ端々吻合した。レシピエントの右腎は移植と同時に、または移植後 7 日目に摘除した。移植後生存期間を以て SS- と UW の臓器保護効果を比較検討した。

4. 研究成果

レシピエントの右腎を移植と同時に摘除した場合、UW 群 (n=6)、SS- 群 (n=6) いずれも移植後 6 日間以内に腎不全ですべて死亡した。



実臨床において、阻血時間が短い生体腎移植に比べ、阻血時間が長い死体腎移植においては急性尿細管壊死による移植腎機能発現遅延はめずらしくなく、透析を行いながら移植腎機能が発現するのを待つ。24h 保存したラット腎移植モデルにおいても急性尿細管壊死による移植腎機能発現遅延が考えられたため、レシピエント右腎を移植後 7 日目に摘除することにした。



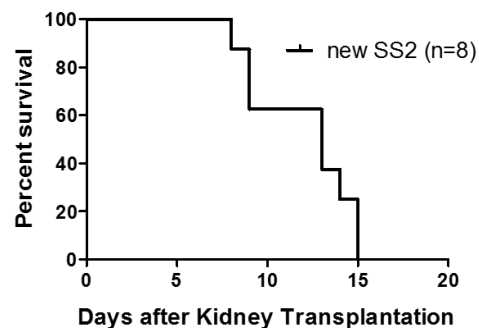
レシピエント右腎を移植後 7 日目に摘除した場合、UW 群 (n=8) の 75% のラットが 60 日以上生存した。一方、SS- 群 (n=8) は、予想に反して、移植後 14 日以内に全てのラットが死亡した。UW の方が SS- と比較し、有意に移植腎生着率が良好で、マウス心移植モデルの結果とは反して UW に対する SS- の優位性を証明することはできなかった。

臓器移植において、摘出された臓器は酸素供給がなくなり、ATP が低下、細胞膜の Na^+/K^+ -ATPase の働きが低下するために Na^+ と Cl^- が濃度勾配に従って水とともに細胞内へ移動、細胞浮腫を引き起こし細胞の崩壊へ至る。腎移植領域でよく用いられる UW やユー

ロコリンズ液は低 Na、高 K 組成になっており、細胞浮腫を予防している。一方、SS- は他の心筋保護液と同様に高 Na、低 K 組成に設定していたため、ユーロコリンズ液を参考に下記のように腎臓用に低 Na、高 K 組成になるよう、電解質を調整した。

Ingredients	SS-II	New SS-II for Kidney
KCl	15mM	15mM
Na_2HPO_4	42.5mM	/
NaH_2PO_4	15mM	/
Ascorbic acid	0.25mM	0.25mM
Ascorbic acid 2-phosphate (Mg)	0.45mM	0.45mM
L-Cysteine.HCl.H ₂ O	0.63mM	0.63mM
Glycine	10mM	10mM
K_2HPO_4	/	42mM
KH_2PO_4	/	15mM
NaHCO_3	/	10mM
Glucose	194mM	194mM

新たに調整した SS- (new SS-) を用いて、24h 冷保存したドナー腎を移植、レシピエント右腎を移植後 7 日目に摘除した。



しかし、電解質を調整した新たな SS- でも移植後 15 日以内にすべてのラットが死亡した (n=8)。

その後も組成の調整を行い、移植実験を継続したが、本研究期間中に UW の腎生着率を凌ぐ新たな臓器保存液は作成できなかった。

UW もしくは SS- で 24h 冷保存した移植前の腎組織の HE 染色を確認すると、UW と比較し SS- で保存した腎組織は間質の浮腫が目立った。種々の抗酸化剤を含む SS- は心筋保存には有用であったが、腎臓においては UW に含まれる細胞膨張予防目的のラフィノースやペンタフラクション等が重要であることが考えられた。今後は細胞浮腫予防を念頭に SS- の組成について再検討し、改良を進める予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Abe T, Yazawa K, Fujino M, Imamura R, Hatayama N, Kakuta Y, Tsutahara K, Okumi M, Ichimaru N, Kaimori JY, Isaka Y, Seki K, Takahara S, Li XK, Nonomura N.
High-pressure carbon monoxide preserves rat kidney grafts from apoptosis and inflammation.
Lab Invest. 2017;97(4):468-477.
2. 阿部豊文, 中澤成晃, 山中和明, 角田洋一, 今村亮一, 貝森淳哉, 市丸直嗣, 小角幸人, 高原史郎, 野々村祝夫.
当院における腎移植後妊娠出産症例の検討.
日本臨床腎移植学会雑誌. 2016;4(1):99-106.
3. Yamanaka K, Kakuta Y, Miyagawa S, Nakazawa S, Kato T, Abe T, Imamura R, Okumi M, Maeda A, Okuyama H, Mizuno M, Nonomura N.
Depression of Complement Regulatory Factors in Rat and Human Renal Grafts Is Associated with the Progress of Acute T-Cell Mediated Rejection.
PLoS One. 2016;11(2):e0148881.
4. Ichimaru N, Nakazawa S, Yamanaka K, Kakuta Y, Abe T, Kaimori JY, Imamura R, Nonomura N, Takahara S. Adherence to Dietary Recommendations in Maintenance Phase Kidney Transplant Patients.
Transplant Proc. 2016;48(3):890-2.
5. Ichimaru N, Obi Y, Nakazawa S, Yamanaka K, Kakuta Y, Abe T, Kaimori JY, Imamura R, Nonomura N, Moriyama T, Takahara S. Post-Transplant Anemia Has Strong Influences on Renal and Patient Outcomes in Living Kidney Transplant Patients.
Transplant Proc. 2016;48(3):878-83.
6. Yamanaka K, Kakuta Y, Nakazawa S, Kato T, Abe T, Imamura R, Okumi M, Ichimaru N, Kyo M, Kyakuno M, Takahara S, Nonomura N.
Induction Immunosuppressive Therapy With Everolimus and Low-Dose Tacrolimus Extended-Release Preserves Good Renal Function at 1 Year After Kidney Transplantation.
Transplant Proc. 2016;48(3):781-5.
7. Iida S, Tsuda H, Tanaka T, Kish DD, Abe T, Su CA, Abe R, Tanabe K, Valujskikh A, Baldwin WM 3rd, Fairchild RL.
IL-1 Receptor Signaling on Graft Parenchymal Cells Regulates Memory and De Novo Donor-Reactive CD8 T Cell Responses to Cardiac Allografts.
J Immunol. 2016;196(6):2827-37.

8. Kimakura M, Abe T, Nagahara A, Fujita K, Kiuchi H, Uemura M, Nonomura N.
Metastatic testicular cancer presenting with liver and kidney dysfunction treated with modified BEP chemotherapy combined with continuous hemodiafiltration and rasburicase.
Anticancer Drugs. 2016;27(4):364-8.
9. Kato T, Kakuta Y, Abe T, Yamanaka K, Imamura R, Okumi M, Ichimaru N, Takahara S, Nonomura N.
The benefits of cancer screening in kidney transplant recipients: a single-center experience.
Cancer Med. 2016;5(2):153-8.
10. Abe T, Ishii D, Gorbacheva V, Kohei N, Tsuda H, Tanaka T, Dvorina N, Nonomura N, Takahara S, Valujskikh A, Baldwin WM 3rd, Fairchild RL.
Anti-huCD20 antibody therapy for antibody-mediated rejection of renal allografts in a mouse model.
Am J Transplant. 2015;15(5):1192-204.
11. Kato T, Kakuta Y, Yamanaka K, Okumi M, Abe T, Imamura R, Ichimaru N, Takahara S, Nonomura N.
Early diagnosis and treatment of breast cancer in Japanese kidney transplant recipients: a single center experience.
Springerplus. 2015;4:196.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 阿部豊文, 中澤成晃, 角田洋一, 今村亮一, 貝森淳哉, 市丸直嗣, 小角幸人, 児島康行, 高原史郎, 野々村祝夫.
24時間蓄尿検査を用いた腎移植患者における塩分摂取量の評価
第 50 回臨床腎移植学会 (2017.2.15, 神戸).
2. 阿部豊文, 中澤成晃, 山中和明, 角田洋一, 今村亮一, 市丸直嗣, 高原史郎, 小角幸人, 岸川英史, 西村憲二, 蔦原宏一, 山口誓司, 野々村祝夫.
腎移植後妊娠出産症例の検討.
第 49 回臨床腎移植学会 (2016.3.24, 米子).
3. Abe T, Hatayama N, Nakazawa N, Yamanaka K, Kakuta Y, Imamura R, Ichimaru N, Li X, Takahara S, Nonomura N.
High-pressure carbon monoxide preserves rat kidney grafts from apoptosis and inflammation.
The 2016 TSS Asian Regional Meeting (2016.4.9, 東京)
4. 阿部豊文, 中澤成晃, 山中和明, 角田洋一, 今村亮一, 市丸直嗣, 高原史郎, 小角幸人, 岸川英史, 西村憲二, 蔦原宏一, 山口誓司, 野々村祝夫.
腎移植後妊娠出産症例の検討.

- 第 104 回日本泌尿器科学会総会
(2016.4.23, 仙台)。
5. 阿部豊文, 中澤成晃, 山中和明, 角田洋一, 今村亮一, 貝森淳哉, 市丸直嗣, 高原史郎, 野々村祝夫。
MUC1 遺伝子変異を認めた家族性尿細管間質腎炎の父子に対する生体腎移植の経験。
第 32 回腎移植・血管外科研究会
(2016.5.27, 姫路)
6. Abe T, Kokado Y, Nakazawa N, Yamanaka K, Kakuta Y, Imamura R, Ichimaru N, Takahara S3, Nonomura N.
Pregnancy after renal transplantation: A single-center experience.
26th International congress of the transplantation society (TTS 2016, 2016.8.21, Hong Kong)
7. 阿部豊文, 中澤成晃, 角田洋一, 今村亮一, 貝森淳哉, 市丸直嗣, 小角幸人, 児島康行, 高原史郎, 野々村祝夫。
腎移植後患者における 24 時間蓄尿検査を用いた塩分摂取量の評価。
第 52 回日本移植学会総会 (2016.9.30, 東京)
8. 阿部豊文, 中澤成晃, 角田洋一, 今村亮一, 市丸直嗣, 高原史郎, 野々村祝夫。
当院における鏡視下ドナー腎採取術の臨床的検討。
第 30 回日本泌尿器内視鏡学会総会
(2016.11.18, 大阪)。
9. 阿部豊文, 中澤成晃, 山中和明, 角田洋一, 今村亮一, 貝森淳哉, 市丸直嗣, 高原史郎, 小角幸人, 野々村祝夫。
当院における腎移植後妊娠出産症例の検討。
第 51 回日本移植学会総会 (2015.10.3, 熊本)。

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 豊文 (ABE, Toyofumi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 90750894