

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11201

研究課題名(和文) 腎臓常温灌流保存法によるグラフト修復から生着延長：MHC確立ミニブタによる検討

研究課題名(英文) Normothermic machine perfusion of the kidney to evaluate the donor organ before transplantation: Preclinical large animal study using MHC-defined CLAWN miniature swine

研究代表者

有吉 勇一 (ARIYOSHI, Yuichi)

鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研究センター・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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：深刻なドナー不足を背景に、厳しい臨床条件のマージナルドナーへと適応拡大を行うことは、虚血再灌流障害による急性臓器不全の増悪や、免疫因子の活性化による急性・慢性拒絶誘発が懸念される。本研究では障害臓器の修復・治療から、移植医療の向上を目指す戦略を開発するため、常温灌流保存NMP法に着目した実験を実施した。主要組織適合性抗原MHC確立ミニブタを用いて、温虚血にさらされた腎臓を用いた常温灌流保存実験およびMHC適合動物に対する慢性移植実験を実施し、NMP法の手技確立、温虚血腎臓の移植前腎機能評価法としてのNMP法の有用性、NMPを用いたより積極的な臓器修復法の開発の可能性、という3点を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、MHC確立ミニブタを用いた多くの実験経験を有する研究チームの利点をいかし、急性期だけでなくグラフト長期生着の観察も可能とする前臨床研究体制のもとで、臨床移植医療における最大の課題であるドナー臓器不足を克服するための解決策の一つとして、新たな臓器保存法である腎臓の常温灌流保存法の有用性を示した。この研究成果は、ドナー適応拡大や移植短期・長期成績の向上による移植医療全般への寄与、新たな免疫抑制療法による患者負担を強いることのない有力な治療となり、また他の臓器移植へも応用可能であることから、移植医療の課題克服へとつながる高い意義を有する成果である。

研究成果の概要(英文)：The organ donor shortage remains one of the largest challenges faced by the transplant community. The donation after circulatory death (DCD) donors has the potential to match the increasing need for transplantable organs, however, DCD kidneys have a higher risk of primary graft dysfunction or delayed graft function following transplantation due to the inevitable warm ischemia. Normothermic machine perfusion (NMP) of the kidney is expected to be a novel approach for graft preservation and functional improvement, as well as graft quality assessment before transplantation. In this translational study using major histocompatibility complex (MHC)-defined CLAWN miniature swine, we concluded that the assessment of perfusion characteristics during NMP of the warm-ischemic kidney allows the prediction of the graft function after kidney transplantation.

研究分野：腎移植外科学

キーワード：移植・再生医療 常温灌流保存 腎移植 ミニブタ 前臨床実験 虚血再灌流傷害 温虚血

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重篤な臓器不全に対する移植医療の効果は広く認知されるが、ドナー不足は極めて深刻である。脳死マージナルドナーや心停止ドナーの提供推進は必須であるが、条件の悪いドナーを用いた移植は虚血再灌流障害 (Ischemia-reperfusion injury: IRI) 等の急性臓器不全の危険に加え、免疫活性化による急性拒絶や慢性期機能不全の誘因となる。したがって、ドナー臓器の適切な保護や正常に近い状態への修復は、ドナー数確保に加え、移植後成績向上に直結することが期待される。

ドナー臓器保存は、臓器の代謝抑制を目的とする浸漬冷却保存法が主体である。浸漬保存に対し、保存液の持続灌流による灌流保存 (Machine perfusion: MP) 法は、保存臓器に対し、①機能評価、②機能回復、③機能向上 (薬物・遺伝子投与)、④保存時間延長などを行える可能性があり、条件の悪い腎臓を用いる際の術前評価や治療の可能性から注目を浴びる。現行の低温による代謝抑制という保存概念を発展させた低温 MP 法は欧米で臨床応用が始まり、心停止を含めたマージナルドナーの予後改善への役割が報告される (*N Engl J Med* 2009)。しかし低温下の非生理学的条件での灌流は、長期保存には適する一方、酸素化や赤血球等を利用した臓器の代謝管理は十分に行えず、臓器機能評価は限定的となる。また臓器治療も、不十分な薬物代謝により限定されうる。これらの課題を解決するため、生理的条件で灌流を行う常温灌流保存 (normothermic machine perfusion: NMP) 法が新たに期待される。一方で NMP 法は常温であるがゆえ、灌流初期の代謝産物による障害、微小循環障害、易血栓形成性などの問題があるため、臨床応用化には克服すべき課題は多い状況であった。

このような状況のなかで、NMP 法の臨床応用性を評価する慢性評価が可能な前臨床大動物実験への期待が高まっていた。特に移植領域では小動物実験結果の大動物での再現性は低く (*Nat Med* 2013)、これは我々の既報のように、小動物は拒絶反応に重要な血管内皮での MHC class II は抗原刺激により発現するが、大動物では恒常的に発現する (*Transplantation* 2004) という点など、小・大動物間の免疫学的相違が主因と考えられていた。また臓器のサイズという観点から、灌流を伴う保存実験では臨床医療に直結する装置の開発を含めて、大動物を用いた実験が必要となっていた。このように移植領域で新たな臓器保存方法を確立するためには大動物実験が必須と考えられていたが、これまでの多くの実験は、移植拒絶反応に重要な主要組織適合性抗原 (Major histocompatibility complex: MHC) に配慮のない急性実験に限られていた。我々は、免疫背景を均一化した大動物実験を実施するため、アジア唯一の MHC 確立大動物クローン系ミニブタを用いた長期観察が可能な腎・肺・小腸・肝臓など種々の移植実験系を確立しており、前臨床研究として新たな保存方法の検討を行うための実験体制の整備がなされていた。

2. 研究の目的

本研究は、上記の背景を踏まえ、MHC 確立ミニブタを用いた前臨床研究として、マージナルドナー腎臓を用いる際に、移植前臓器の機能評価、機能回復、機能向上 (薬物・遺伝子投与) を行うことが可能と考えられる常温灌流保存 NMP 法に着目し、NMP 法の手技の確立と有効性および機序の解明をはかるために以下を目的とする研究を立案した。

目的 1: 灌流保存時に得られる種々の指標と、移植後腎機能の相関を検討し、移植前機能評価法としての NMP 法の有効性を明らかにする。

目的 2: 目的 1 で得られた結果をもとに、NMP 法によって臓器修復効果が得られるのか、また、生検、血清、尿検体等をもとにして、灌流保存による機能回復メカニズムを明らかにする。

目的 3: 保存中に常温で直接腎臓に薬物投与が可能であるという利点をいかし、薬物としての治療効果が高いものの、個体への全身投与では副作用の懸念が高い治療法に注目し、NMP 法で保存中の臓器に直接薬剤投与を行い、障害臓器に対する修復、さらには機能の向上効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験の概要

心停止後 120 分にわたり 37°C で温虚血にさらされた腎臓 (温度を一定にするため 37°C に設定した恒温槽内に静置) を、60 分間にわたって 4°C もしくは 22°C で 1 時間浸漬保存した。実験 1 として、これらの条件で保存された腎臓を用いて 120 分 NMP 法による常温灌流を行い、NMP 中の各種パラメーターについて、保存温度による 2 群間で比較することによって、NMP 法の特徴を明らかにすることを試みた。また実験 2 として、120 分温虚血後に 60 分間 4°C もしくは 22°C で浸漬保存を行った腎臓を、MHC が適合する他の個体に腎移植を行い、移植後の腎機能を評価することによって、実験 1 により得られた NMP 中の様々な灌流パラメーターが、移植後の腎機能と相関するかどうかの検討を試みた。また実験 1 のモデルに対し、灌流保存中に血管拡張作用や好悪炎症作用がある薬物 (Adenosine A_{2A}R アゴニスト) を投与して、灌流中の各種パラメーターがどのように変化するかについて評価を行った。

(2) 移植動物・免疫抑制療法

移植後のアロ T 細胞反応を極力排除し、移植臓器の状態に焦点をあてた研究を行うため、MHC 適合間腎移植を行った。12 日間低濃度持続タクロリムス投与（血中濃度：10-15 ng/ml）によりマイナー抗原応答を制御した。

(3) 手術方法

塩化カリウム静脈投与による心停止後に、大動脈・下大静脈付きで両腎を摘出し、2 時間 37°C に静置して、強い温虚血を惹起した（温度条件を一定化するため 37°C に調整）。摘出両腎の片方の腎動脈、静脈、尿管にカニューレーションを行い（対側は摘出）、遠心ポンプを用いた体外循環回路に接続した。120 分灌流後すでに確立した手法により腎移植を行った（*Transplantation* 2012）。

(4) NMP の設定

ヘパリン化リンゲル液をベースとする灌流液を用いて、37°C、平均動脈圧を 85 mmHg に設定し灌流を行った。

(5) 灌流液

ヘパリン化リンゲル液に、MHC が一致する全血から分離した新鮮赤血球を添加した。また糖やビタミンなどの栄養剤、あるいはステロイド、血管拡張剤などをあらかじめ設定した投与量のもとに添加した。灌流液の pH や血糖は、随時生理的範囲に調整した。

(6) 灌流中測定データ

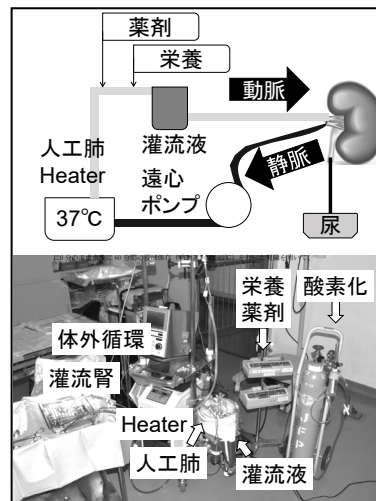
灌流圧や灌流流量、尿量、動脈・静脈採血の酸素化や組織酸素消費量、電解質・糖・生化学検査（腎機能や、ALT や LDH など組織障害指標）などについて、経時的に測定を行った。

(7) 移植臓器評価

移植臓器の機能について、定期的に血清・尿検体を採取し、生化学（Cr 等）検査を中心とする腎機能評価を行った。また、超音波による移植腎血流定期的な生検（病理・分子生物学的解析）により評価を行った。病理学的評価については、心停止誘導前、NMP 前後（移植前）、同種移植後 2 時間、2、7、14、28 日、以後 4 週毎にグラフト生検を計画した。

(8) 灌流中の薬剤投与

われわれの実験から血管拡張作用（血圧降下作用）に加えて抗炎症作用を有することが示されている Adenosine A_{2A}R アゴニスト（CGS21680）を灌流回路に直接投与（7.5 μg/kg/min を 60 分間で投与）することによって、灌流パラメーターがどのような影響を受けるかについて評価を行った。



4. 研究成果

(1) 実験 1 の結果

120 分の温虚血後に 60 分間の浸漬保存（4°C もしくは 22°C）を行った腎臓を用いて、全例で、120 分間にわたる腎臓の常温灌流を行うことが可能であった（下図は実験中の写真と灌流方法の模式図）。

常温灌流を行っている際の腎臓の色調や硬さなどの肉眼的な所見は、浸漬保存温度によって差はなかったものの、灌流中の様々な灌流パラメーターについては 22°C 保存の方が 4°C 保存よりも良好であった。22°C および 4°C で保存を行った後の各種パラメーターについて、平均腎臓血流量では 26.7 ± 4.7 vs 10.0 ± 0.0 ml/min、平均血管抵抗 3.5 ± 0.5 vs 8.7 ± 0.1 mmHg/ml/min、2 時間灌流中の総尿量 14.3 ± 5.3 vs 5.4 ± 3.6 ml、酸素消費量 223.5 ± 38.6 vs 92.5 ± 15.6 ml/min/g であった。

(2) 実験 2 の結果

実験 1 で得られた結果から、NMP 法の手技の確立が得られ、また平均腎血流量、平均血管抵抗、灌流中の尿量、腎臓での酸素消費量が、移植腎機能と相関する可能性が示唆された。そこで、120 分の温虚血後に 60 分間の浸漬保存（4°C もしくは 22°C）を行った腎臓を用いて、MHC が同一の他の個体への腎移植を行った。その結果、移植後のピーク血清クレアチニン値は、22°C で保存後に移植を行った群では 3.9 ± 0.6 mg/dl であった一方、4°C で保存した後に移植した群では 8.9 ± 0.3 mg/dl と有意差をもって 22°C 保存後の移植腎機能が良好であった ($p=0.0015$)。実験 1 と実験 2 の結果から、灌流保存時に得られる種々のパラメーターと移植後腎機能の相関があることが明らかとなり、移植前機能評価として NMP 法が高い有用性があることが示唆された。また詳細な病理学的検査の結果、移植後腎機能が良好な群においては、尿細管傷害からの速やかな再生所見が認められており、NMP 法による効果発現の機序の一つであると考えられた。

また腎臓の灌流時の薬物投与によって、保存臓器の機能向上が得られる可能性を評価するため、灌流中に60分間にわたり Adenosine A_{2a}R アゴニスト (CGS21680) の投与を行ったところ、血管抵抗の低下と腎臓の血流量の増加効果が示された。今後、保存中の薬剤投与による各種パラメーターの改善が、移植後の腎機能改善に結びつくかという点について移植実験を行うことによって検討する必要があるものの、前段落で示したように灌流中の各種パラメーターと移植後の腎機能には強い相関関係が得られていることから、Adenosine A_{2a}R アゴニストの保存中の投与が保存臓器の機能向上につながる可能性が示唆される結果が得られたものとする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sekijima M, Ariyoshi Y, Sahara H, Kawai A, Iwanaga T, Murokawa T, Ichinari Y, Shimizu A, Kusaka M, Yamada K.
2. 発表標題 Effects of static subnormothermic preservation on extended warm ischemic porcine kidneys assessed by normothermic machine perfusion and renal transplantation.
3. 学会等名 TTS2018 (27th International Congress of The Transplantation Society). (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関島光裕, 有吉勇一, 佐原寿史, 岩永健裕, 室川剛廣, 市成ゆりか, 清水 章, 山田和彦
2. 発表標題 MHC確立クラウン系ミニブタを用いた慢性大動物移植実験による常温灌流保存法（NMP法：Normothermic Machine Perfusion）の有効性評価
3. 学会等名 第53回日本移植学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鹿児島大学医用ミニブタ・先端医療開発研究センター（臓器置換・異種移植外科分野）のホームページ http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~xenotx/index.html

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	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)	

6. 研究組織(つづき)

	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 (SEKIJIMA 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 協力者	清水 章 (SHIMIZU Akira)	日本医科大学・医学部・教授 (32666)	