

令和 4 年 4 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16416

研究課題名（和文）体外肺灌流保存中の肝細胞増殖因子による肺移植後虚血再灌流障害の軽減

研究課題名（英文）Protective effects of hepatocyte growth factor during ex vivo lung perfusion on ischemia-reperfusion injury in lung transplantation

研究代表者

中島 大輔（Nakajima, Daisuke）

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：50812286

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：肺移植では、未だドナー不足は非常に深刻な問題である。本研究では動物モデルを用い、心停止ドナー肺の使用に注目した。心停止ドナー肺の使用には、虚血再灌流障害を予防しより優れた臓器保存による評価と治療が必要となる。体外肺灌流保存（Ex Vivo Lung Perfusion：EVLP）は、正常体温（37℃）下のより生理的環境に近い、すなわち換気と灌流が維持された状態で臓器を保存することにより、体外での移植前の肺機能評価を可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心停止ドナー肺は、心停止に至る過程や心停止後の温虚血、冷虚血などにより様々な障害を受けている可能性がある。動物モデルで機能評価として確立した体外肺灌流保存（EVLP）システムを、心停止ドナー肺の各障害の治療・修復のプラットフォームとして用いることができる。すなわちEVLP中に肝細胞増殖因子などの修復因子を投入することにより、障害を受けたドナー肺を移植できる状態に改善させることで、今後の肺移植におけるドナーソースの拡大に期待される。

研究成果の概要（英文）：There has been a progressive increase in the number of patients on the waiting list, which continually exceeds the number of available organs in Japan. The use of donation after circulatory death (DCD) donors can resolve this problem. We simulated a clinically relevant uncontrolled DCD model in the current study. Ex vivo lung perfusion (EVLP) recreated the physiological environment by maintaining normothermia and providing the essential substrates for cellular metabolism, which enabled organ viability assessment of DCD donor lungs.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：体外肺灌流保存 EVLP 肺移植 心停止ドナー 肝細胞増殖因子 HGF 虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

肺移植は終末期呼吸器疾患の一治療法として確立されてきた。近年、改正臓器移植法施行後の脳死下臓器提供数の増加に伴い、脳死肺移植数が増加している一方で、新規移植登録患者数は倍増しており、未だドナー不足が非常に深刻な問題である。マージナル脳死ドナー肺や生体ドナー肺の使用など様々な対策が講じられている中、本研究では心停止ドナー肺に注目する。2001年に世界で初めて心停止ドナーからの肺移植が成功して以来、ヨーロッパ、北米での心停止ドナー肺の使用は増加している。しかしながら問題点として、病院内外における突然の心停止による臓器提供であり、移植前にドナー肺の機能評価が行われているのは非常に稀である。第二に心停止ドナーでは、冷保存(冷虚血)時間前に常温での温虚血時間が加わることにより、長時間の虚血状態が不可避であり、移植再灌流後に虚血再灌流障害による早期移植肺機能不全を生じる危険性が非常に高くなる。したがって心停止ドナー肺の使用には、虚血再灌流障害を予防しうるより優れた臓器保存による評価と治療が必要となる。

トロント大学総合病院研究施設(Toronto General Hospital Research Institute)にて確立された体外肺灌流保存(*Ex Vivo Lung Perfusion*: EVLP)は、正常体温(37℃)下のより生理的環境に近い、すなわち換気と灌流が維持された状態で臓器を保存することにより、体外での移植前の肺機能評価を可能としている。トロント大学総合病院は、2008年より既にEVLPを臨床応用しており、心停止ドナーを含めたマージナルドナーの肺機能を移植前に適確に評価することで、今までと変わらぬ良好な肺移植成績を公表している(Cypel M. et al. *N Engl J Med* 2011;364:1431-40)。さらに近年、EVLPがマージナルドナー肺の移植前治療のプラットフォームとして有効であることが動物実験にて証明されており、体外でのドナー肺のテラーメイド治療に注目が集まっている。

移植後の虚血再灌流障害は、様々な要因により惹起される。酸化ストレスによる組織障害や細胞死(アポトーシス、ネクローシスなど)により生じた damage-associated molecular patterns (DAMPs)が、自然免疫系-樹状細胞やマクロファージによる炎症性サイトカインやケモカインの産生、放出を活性化し、さらにはTh1やTh17細胞による獲得免疫の始動により炎症反応の増幅を生じる。私はトロント大学総合病院研究施設にて、長時間の冷虚血により障害をうけたブタドナー肺のEVLP中に、様々な成長因子、増殖因子の分泌能を有するヒト間葉系幹細胞を投与し、肝細胞増殖因子(*hepatocyte growth factor*: HGF)が有意に分泌される事実を発見した。HGFは抗アポトーシス作用、血管増生、血管透過性制御作用、抗炎症作用、免疫調節作用などを有する多機能性因子であり、虚血により障害されたドナー肺を移植前に修復する、もしくは移植後の虚血再灌流障害を予防しうる最重要な因子になりうることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究は前臨床研究として、ラットやビーグル犬の心停止ドナー肺移植モデルとEVLP装置を用い、EVLP中に投与するHGFの虚血再灌流障害に対する有効性を検討する。現在、本邦では心停止ドナーの対象となる臓器は腎臓、膵臓、角膜に制限されているが、本研究にて心停止ドナー肺に対するEVLP中のHGF投与の有効性が証明されれば、肺移植においても心停止ドナー使用の可能性が期待できる。

3. 研究の方法

小動物ラットと大動物ビーグル犬の心停止ドナーモデルと、EVLV システムを確立し、心停止ドナー肺に対する HGF 投与の有効性を検討する。

1. ラット心停止ドナーを用いたプロトコール

心室細動にて心停止を導入し、120 分間室温にて安置した後、ラットドナー肺を臓器保存液でフラッシュし摘出する。その後、ラット肺体外灌流装置(Figure 1A)と灌流液に Steen solution を用い、4 時間の EVLP を行う。ラットドナー肺は、無治療群と HGF による治療群(高投与量群と低投与量群)の 3 群に分ける(各群、n = 6)。治療群では、EVLV 灌流液中に低量(50 µg/kg)もしくは高量(500 µg/kg)の recombinant human HGF を投与する。投与量は私がトロント大学総合病院研究施設にて得たデータと、以前の参考文献(Makiuchi A. et al. *J Hear Lung Transplant* 2007;26:935-943)をもとに設定している。その後、左肺をレシピエントのラットに移植し、2 時間の再灌流評価を行う。

2. ビーグル犬心停止ドナーを用いたプロトコール

心停止 3 時間後、ビーグル犬ドナー肺を臓器保存液にてフラッシュし、心肺ブロックを摘出する。ドナー肺を冷保存(4)10 時間後に、無治療群(n = 3)もしくは HGF による治療群(n = 3)の 2 群に無作為に分け、EVLV(Figure 1B)を 6 時間行う。治療群では、灌流液中に recombinant human HGF を投与する。投与量は、上記の小動物実験にて得たデータをもとに決定する。EVLV は京都大学でも既に確立されているトロントプロトコールに従い行う(Cypel M. et al. *J Heart Lung Transplant* 2008;27:1319-25)。EVLV 終了後、2 時間の冷保存を経て、レシピエント犬に左片肺移植を行い、4 時間の再灌流評価を行う。

4 . 研究成果

小動物での心停止ドナー肺に対する EVLV を確立した。実験はルイスラット雄 300-400 g を使用し行った。心室細動にて心停止を導入し、心停止 90 分後に両肺ブロックを摘出。以後、isolated rat lung perfusion model を用い、60 分間の EVLV を安定して施行できる設定を確認した。灌流液として STEEN solution を用い、流量 10-11 ml/min、chamber pressure -8, -4 cmH₂O、respiratory rate 60/min の設定で EVLV を行なった。EVLV 中の肺生理データはいずれも安定していた。

大動物での EVLV を確立した。EVLV 回路を作成後、ビーグル犬(12.6-14.5 kg)を用い、トロント大学のプロトコールを基に、常温(37 度)での換気、灌流保存を 8 時間行った。ドナー肺は肺水腫をきたすことなく、EVLV 中の肺生理データ(気道内圧、肺コンプライアンス、肺血管抵抗)は 8 時間安定していた。

EVLV 消耗品の購入が困難となり、今回の研究期間で、心停止ドナー肺に対する HGF の有効性を証明するにまで至ることができなかった。今後の研究推進方策として下記を掲げる。

ラット心停止ドナー肺に対する肝細胞増殖因子(HGF)の有効性の検討：心室細動にて心停止を導入し、120 分間室温にて安置した後、ラットドナー肺を臓器保存液でフラッシュし摘出。その後、ラット肺体外灌流装置と灌流液に Steen solution を用い、4 時間の EVLV を行う。ラットドナー肺は、無治療群と HGF による治療群(高投与量と低投与量)の 3 群に分ける(各群、n = 6)。治療群では、灌流液中に低量(50 µg/kg)もしくは高量(500 µg/kg)の recombinant human HGF を投与する。投与量は私がトロント大学総合病院研究施設にて得たデータと、以

前の参考文献をもとに設定している。その後、左肺をレシピエントのラットに移植し、2時間の再灌流評価を行う。

ビーグル犬心停止ドナー肺に対する HGF の有効性の検討：心停止 3 時間後、ビーグル犬ドナー肺を臓器保存液にてフラッシュし、心肺ブロックを摘出。ドナー肺を冷保存（4 ）10 時間後に、無治療群（n = 3）もしくは HGF による治療群（n = 3）の 2 群に無作為に分け、EVLV を 4-6 時間行う。治療群では、灌流液中に recombinant human HGF を投与する。投与量は、上記の小動物実験にて得たデータをもとに決定する。EVLV は京都大学でも既に確立しているトロントプロトコールに従い行う。EVLV 後、レシピエント犬に左片肺移植を行い、4 時間の再灌流評価を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Daisuke Nakajima, Shunichi Nagata, Hidenao Kayawake, Satona Tanaka, Yoshito Yamada, Yojiro Yutaka, Akihiro Ohsumi, Masatsugu Hamaji, Toyofumi F. Chen-Yoshikawa, Hiroshi Date	4. 巻 70
2. 論文標題 Successful lung transplant cases with ex vivo lung perfusion assessment of extended criteria donor lungs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 General Thoracic and Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 406-412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11748-022-01774-x	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Nakajima Daisuke, Date Hiroshi	4. 巻 69
2. 論文標題 Ex vivo lung perfusion in lung transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 General Thoracic and Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 625 ~ 630
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11748-021-01609-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島大輔、芳川豊史、伊達洋至
2. 発表標題 本邦の肺移植におけるEx Vivo Lung Perfusionの臨床導入の現況
3. 学会等名 第73回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島大輔、芳川豊史、伊達洋至、Shaf Keshavjee
2. 発表標題 Ex vivo lung perfusionを用いたマージナルドナー肺の移植前治療
3. 学会等名 第56回日本移植学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島大輔、芳川豊史、伊達洋至
2. 発表標題 肺移植における体外肺灌流保存 (EVLP) を用いたマージナルドナー肺の治療
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島大輔、芳川豊史、伊達洋至
2. 発表標題 肺移植におけるEx Vivo Lung Perfusionの現状
3. 学会等名 第57回日本移植学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島大輔、田中里奈、山田義人、豊洋次郎、大角明宏、濱路政嗣、芳川豊史、伊達洋至
2. 発表標題 Ex vivo lung perfusion (EVLP) 導入によるマージナルドナー肺の使用拡大
3. 学会等名 第38回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------