

平成 21 年 4 月 13 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890111

研究課題名（和文）一酸化炭素吸入による肺虚血再灌流障害及び慢性肺拒絶病変進展の制御

研究課題名（英文）Control of ischemia-reperfusion injury and chronic allograft rejection of lung by inhaled carbon monoxide in miniature swine.

研究代表者

佐原 寿史（SAHARA HISASHI）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90452333

研究成果の概要：

肺移植後急性期に生じる虚血再灌流障害（ischemia-reperfusion injury：IRI）のコントロールは、急性期の術後成績の改善のみならず、臨床肺移植の直面する 2 つの大きな課題であるドナー不足の解消と慢性期グラフト機能不全を克服するという点において非常に重要である。

（Carbon Monoxide；CO）は種々の細胞保護作用をもち、移植領域においても CO の投与による IRI 抑制やグラフト生存期間の延長効果が示されているが、小動物モデルによる結果が殆ど全てである。CO が有毒ガスとして知られることを考慮すると、臨床応用のためには translational research として大動物を用いた検討は不可欠であり、今回の研究に着手した。この結果、ミニブタによる肺 IRI モデルを確立し、安全性の高い 250ppmCO 吸入によって IRI が抑制されるということを示し、またこの CO 吸入による IRI 抑制効果が特に血管内皮の保護効果、炎症性サイトカインの有意な産生抑制を介したものであることを示した。この実験結果をもとに、臨床肺移植に即した MHC 完全不適合間ミニブタ左肺移植モデルを用いて、CO 吸入の移植肺生存期間延長効果および慢性拒絶病変進展抑制効果の検討実験へと進むことが可能となった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,330,000	0	1,330,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：胸部外科学

キーワード：肺移植・虚血再灌流障害・一酸化炭素・慢性拒絶・ブタ

## 1. 研究開始当初の背景

肺の保存方法や灌流液に関する研究により虚血再灌流障害（ischemia-reperfusion injury：IRI）による早期グラフト機能不全の発生率は約 20%前後と減少したものの、依然として肺移植後急性期の死亡の主因であ

る。更に IRI の克服は急性期の術後成績の改善のみならず、慢性的なドナー不足を解消するための手段として、より条件の悪いマージナルドナーや心停止ドナーからの肺移植を考慮した場合に不可避の問題になるという点、あるいは、IRI が免疫学的要因や非免疫

学的要因が複雑に絡みあって進展する慢性期の肺拒絶病変を進展させる引き金となっているという点からも、IRI をコントロールするという事は臨床肺移植の直面する2つの大きな問題であるドナー不足の解消と慢性期のグラフト機能不全の克服へと繋がるという意味において非常に重要である。

Heme oxygenase (HO) は、ヘモグロビンから産生されるヘムを、一酸化炭素 (Carbon Monoxide; CO)、ビリベルディン、鉄に分解する酵素である。特に HO のアイソザイムのうち、酸化ストレスや敗血症性ショック、低酸素血症、臓器移植後など種々のストレス時に誘導される酵素である HO-1 が持つ細胞保護作用や alloresponse を減少させる働きが注目され、研究されてきた (Trends Immunol 2003;24: 449)。更に HO-1 の作用メカニズムをより詳細に解明するため代謝分解産物である CO に着目した研究が行われ、これまでは副作用を持つ有毒ガスとしてのみ知られてきた CO には、抗炎症作用、抗アポトーシス作用、血管拡張作用、血小板凝集抑制作用、血管上皮細胞障害保護作用、T 細胞増殖抑制作用といった様々の細胞臓器保護作用があり、これらの臓器保護作用に着目して、低濃度の CO 吸入によって臓器移植モデルにおける IRI の抑制効果、グラフト生存期間の延長効果、慢性拒絶反応進展抑制効果等についての報告がなされてきた (J Cell Mol Med 2006;10:650)。しかしこれらの実験は殊に肺移植領域においては小動物モデルでの報告が散見されるのみであり (AJP 2003;163: 231)、臨床応用を目指した大動物実験の報告は未だない。

## 2. 研究の目的

CO の多彩な生理機能は移植医療の新しい有力な治療法になると期待されるが、有毒ガスとして広く知られる物質であるため、CO を新たな治療戦略として臨床応用するには translational research として大動物を用いた検討が必須である。

本研究では、まず国産クラウン系ミニブタを用いた大動物による肺温虚血再灌流障害モデルを確立し、このモデルを用いた CO による IRI 抑制効果を検討する (目的 1: CO 吸入による IRI・慢性肺病変進展抑制効果の検討)。次いで臨床に即した実際の肺移植症例を用いて、ミニブタ肺移植時に CO を投与することによる IRI 抑制効果および特に慢性拒絶に焦点をあてた拒絶反応抑制効果について検討する (目的 2: 肺移植モデルにおける CO 吸入の IRI・慢性期肺病変進展抑制効果の検討)。なお目的 2 では IRI という非免疫学的因子が慢性拒絶病変進展に及ぼす影響を免疫学的因子の関わりをできるだけ排除した状態で評価するため、MHC 適合間 (マイ

ナー抗原不適合) 肺移植手術をモデルとした検討を行う。

## 3. 研究の方法

### 目的 1: CO 吸入による IRI 抑制効果の検討

90 分間の左肺動静脈及び主気管支遮断 (気管支切離により肺は完全虚脱) により温阻血を誘導後再灌流するミニブタ肺 IRI モデルを用い、4 例 (CO 群) では手術開始より再灌流 2 時間後まで計 6 時間にわたり約 250ppm の CO 吸入を行う。再灌流後の血液ガス、胸部 X 線、肺生検所見等について経時的に CO 無吸入 (コントロール群) 4 例と比較検討する。

### 目的 2) 肺移植モデルにおける CO 吸入の IRI・慢性期肺病変進展抑制効果の検討

ドナーを犠牲死させると同時に胸腔内に直ちに冷却しグラフト肺を摘出、左同所性肺移植を行うコントロール群に対し、カリウムの静脈内投与による心停止誘発後、ドナーを 90 分間室温に放置することで温虚血を設けたグラフト肺を用いた左肺移植 (温虚血群) を行い、温虚血にさらされたグラフトが IRI 発生に与える影響、及び IRI という非免疫学的因子が慢性拒絶反応進展に及ぼす影響を、経時的な胸部 X 線や肺生検による直接的なグラフト肺の評価、血液ガスやサイトカイン産生などを指標として評価を行う。この温虚血群での肺移植モデルに対して CO 吸入を行うことによって、肺移植モデルにおいて CO が IRI および慢性拒絶病変の進展抑制効果をするか、という点について検討する。

## 4. 研究成果

### 目的 1: CO 吸入による IRI 抑制効果の検討

(1) 90 分の温虚血によって、コントロール群では、1 例が術後 4 時間の時点で虚血肺の高度肺水腫により死亡し、また PaO<sub>2</sub> は術前の 513mmHg から、再灌流後 2 時間の時点では 227mmHg と有意に低下した。病理学的にも著名な肺障害所見が確認され、90 分の温虚血によるミニブタ IRI モデルを確立した (Figure 1A)。

Figure 1

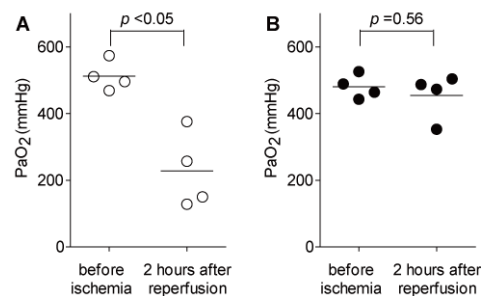


Figure 1. コントロール群 (A) および CO 群 (B) における虚血前及び虚血再灌流 2 時間後の血液ガスの推移

(2) 約 250ppm の CO 吸入により COHb 濃度は平均 12% で維持された (Figure 2)。この濃度は副作用が殆ど問題とならない量であり、大動物モデルにおける適切な CO 吸入方法・CO 吸入濃度を確立した。

Figure 2

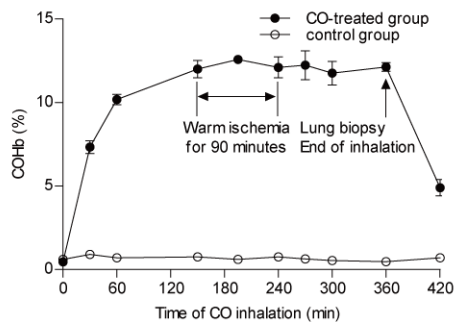


Figure 2. 250ppmCO 吸入後の血中 COHb 濃度の推移

(3) 250ppm の CO 吸入によって、CO 群での死亡例はなく、再灌流 2 時間後の時点で有意な PaO<sub>2</sub> の改善が認められた (Figure 1B)。

(4) 再灌流 2 日後の時点で、CO 群では胸部 X 線上コントロール群と比べて著明な肺浸潤影の改善を認めた (Figure 3)。

Figure 3

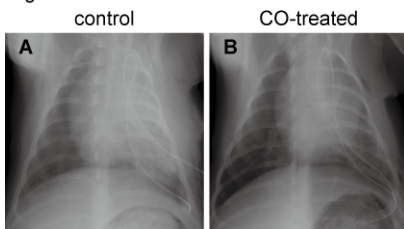


Figure 3. 胸部 X 線を指標とした CO 吸入による IRI 改善効果 (再灌流 2 日後)

(5) 肺生検による病理学的評価では、再灌流 2 時間後の時点で、コントロール群では間質の浮腫及び出血、炎症細胞浸潤、肺胞腔内へのフィブリンの析出を認め、CO 群ではこれらの所見は極めて軽度であった。再灌流 2 日後のコントロール群では病変の進行を認めたが、CO 群では病変の進行は軽度であった (Figure 4)。

Figure 4

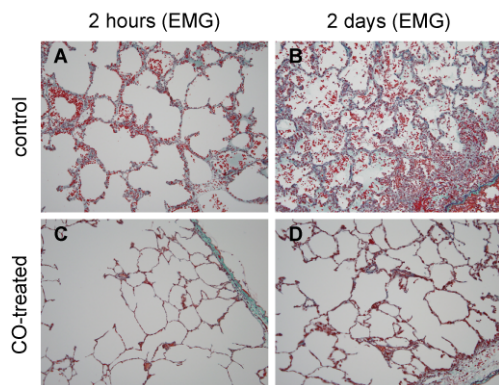


Figure 4. 組織学的にみた CO 吸入の IRI の進展抑制効果 (EMG×200)

(5) 電子顕微鏡では、コントロール群で著しい血管内皮細胞の腫大と空胞化、細胞配列の乱れを認めたが、CO 群では血管内皮障害を殆ど認めず、CO による効果が特に血管内皮の保護にあることが示唆された。

(6) CO 群では術後 2 日までに認められる、IL-1 $\beta$ 、IL-6、HMGB1 といった炎症性サイトカインの有意な産生抑制が認められた、CO 吸入の効果が炎症性メディエータの抑制効果を介することが示唆された。

目的 2: 肺移植モデルにおける CO 吸入の IRI・慢性期肺病変進展抑制効果の検討

(1) クラウン系ミニブタ MHC 適合 (マイナー抗原不適合) の組み合わせを用いた 12 日間の高容量 FK506 投与下 (血中 FK506 濃度を 35-50ng/ml に維持) 左肺移植モデルにおいて、コントロール群 2 症例ではドナー肺は術後 1 年以上にわたり拒絶されなかった。一方、ドナー肺に 90 分の温虚血を設けた温虚血群 3 症例のうち、1 例で術後 56 日の時点でグラフト肺は完全拒絶されたものの、残り 2 例ではグラフト肺は拒絶されず、コントロールと同様に 1 年以上にわたりグラフト肺は維持された。このように当初計画していた今回の実験モデルからは、グラフト拒絶に関して均一な結果が得られなかったため、温虚血により誘導される IRI が慢性拒絶病変に対して非免疫学的因子として病変進展に影響を与えるかという点を評価することは困難であった。この結果、CO 吸入が実際の肺移植症例で IRI 及び慢性拒絶病変進展に及ぼす効果を検討する目的として、当初計画した MHC 適合 (マイナー抗原不適合) 肺移植モデルを用いることは適切ではないと判断した。

(2) 上記の結果を受け、代替実験として、CO 吸入が移植肺拒絶に対し抑制的に働くか、即ち CO 吸入によってグラフト肺の生存期間が延長するか、という点についての検討を行った。クラウン系ミニブタ MHC 完全不適合の組み合わせを用いた 12 日間の高容量 FK506 投与下 (血中 FK506 濃度を 35-50ng/ml に維持) 左肺移植モデルでは、5 例全例のグラフト肺が術後 63 日以内に完全拒絶された。しかし、ドナーにグラフト肺摘出までの約 150 分、レシピエントに手術開始からグラフト肺再灌流 2 時間後まで 250ppm の CO 吸入を行うことによって、グラフト肺が 90 日生存するという preliminary result を得 (Figure 5)、同時に放射性同位元素を用いずにブタ T 細胞の反応性を評価する手法を確立した (Oku M et al. Transplant Immunol;20:78)。

Figure 6

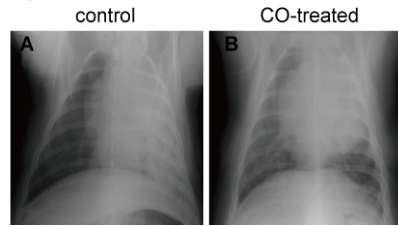


Figure 6. CO吸入によるMHC不適合肺移植モデルにおけるグラフト生存期間の延長効果 (POD63. A: コントロール群、B: CO吸入群)

(3) この preliminary result はCOによる拒絶病変進展抑制効果を大動物肺移植モデルによって始めて示した結果であり、今後はこのより臨床に即したモデルといえるMHC完全不適合の組み合わせによる左肺移植モデルを基本として更に実験を積み重ねていき、CO吸入が肺移植後のIRIや慢性拒絶進展に及ぼす効果、あるいはその作用機序について詳細な検討を積み重ねていく方針としている。

#### 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4件)

- ① Weiss MJ, Guenther DA, Mezrich JD, Sahara H, Ng CY, Meltzer AJ, Sayre JK, Cochrane ME, Pujara AC, Houser SL, Sachs DH, Rosengard BR, Allan JS, Benichou G, Madsen JC. The indirect alloresponse impairs the induction but not maintenance of tolerance to MHC class I-disparate allografts. *American Journal of Transplantation* 2009;9:105-113. 査読有。
- ② Meltzer AJ, Weiss MJ, Veillette GR, Sahara H, Ng CY, Cochrane ME, Houser SL, Sachs DH, Rosengard BR, Madsen JC, Wain JC, Allan JS. Repetitive gastric aspiration leads to augmented indirect allorecognition after lung transplantation in miniature swine. *Transplantation* 2008;86:1824-29. 査読有。
- ③ Oku M, Okumi M, Sahara H, Hirakata A, Onoe T, Griesemer AD, Yamada K. Porcine CFSE mixed lymphocyte reaction and PKH-26 cell-mediated lympholysis assays. *Transplant Immunology* 2008;20:78-82. 査読有。
- ④ Shoji T, Sahara H, Muniappan A, Guenther DA, Wain JC, Houser SL, Bravard MA, Pujara AC, Hasse RS, Sachs DH, Madsen JC, Allan JS. Operational tolerance to class I disparate lungs

can be induced despite pretransplant immunization with class I allopeptides. *Transplantation* 2007;84:1467-73. 査読有。

[学会発表] (計6件)

- ① 佐原寿史、奥見雅由、屋 万栄、瀬戸山健太郎、西村博昭、Wunimenghe Oriyanhan、清水 章、山田和彦. クラウン系ミニブタモデルを用いた一酸化炭素吸入の肺虚血再灌流障害抑制効果及び HMGB1 に焦点をあてた作用機序の解明—早期臨床応用を目指した大動物モデルによる検討とその発展. 第35回日本臓器保存生物医学会定期学術集会. 2008年11月22日. 東京.
- ② 佐原寿史、奥見雅由、屋 万栄、瀬戸山健太郎、清水 章、山田和彦. ミニブタモデルを用いた一酸化炭素吸入による肺虚血再灌流障害抑制効果及びHMGB1の意義. 第61回日本胸部外科学会定期学術集会. 2008年10月14日. 福岡.
- ③ 佐原寿史、屋 万栄、奥見雅由、瀬戸山健太郎、清水 章、山田和彦. 一酸化炭素吸入による肺虚血再灌流障害抑制効果のミニブタモデルを用いた検討. 第44回日本移植学会総会. 2008年9月21日. 大阪.
- ④ Hisashi Sahara, Manei Oku, Masayoshi Okumi, Kentaro Setoyama, Akira Shimizu, Kazuhiko Yamada. BENEFICIAL EFFECTS OF CARBON MONOXIDE ON ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY OF LUNG IN MINIATURE SWINE. XXII International Congress of the Transplantation Society. 2008年8月10日. Sydney.
- ⑤ 佐原寿史、奥見雅由、屋 万栄、瀬戸山健太郎、上村亮三、和田洋巳、山田和彦. MHC適合の相違による移植肺拒絶病変進展形式の差異. 第108回日本外科学会定期学術集会. 2008年5月15日. 長崎.
- ⑥ 佐原寿史、奥見雅由、屋万栄、瀬戸山健太郎、上村亮三、清水 章、山田和彦. MHC inbred クラウンミニブタにおけるMHC適合の相違による移植肺拒絶病変進展形式の差異. 第43回日本移植学会総会. 2007年11月23日. 仙台.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐原 寿史 (SAHARA HISASHI)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：90452333

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者