

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08964

研究課題名（和文）アルゴンによる移植腎保護効果と至適投与法の前臨床ミニブタ実験による解明

研究課題名（英文）The protective effect of argon on transplanted kidneys in preclinical models using miniature swine

研究代表者

昇 修治（Nobori, Shuji）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：30433288

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：移植医療における臓器不足は依然深刻でありドナー拡大が戦略の一つとなるが、虚血再灌流障害IRIによる急性臓器不全が懸念される。近年、希ガスであるアルゴンArに抗炎症・抗アポトーシス作用などを介した細胞保護効果が報告されることに注目し、クラウン系ミニブタを用いた大動物実験によって、Arの腎臓移植への応用性について評価を行った。腎動静脈遮断によりIRIを誘導するモデル、5時間冷保存腎を用いた腎移植モデルいずれにおいても周術期の70%Ar吸入に明らかな腎IRI抑制効果は認められなかった。Arによる抗炎症作用が弱いことや腎臓へのAr到達が十分でないことを、今回Ar吸入が無効であった原因として考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドナー臓器の絶対的な不足という移植医療の課題を克服するための一つの対策として、虚血再灌流障害（IRI）を抑制する新たな方法を検討した。この研究では、実験結果を臨床応用に直結させることができる主要組織適合性抗原確立ミニミニブタを用いた評価を行った。今回の検討から、希ガスであるアルゴンの周術期の吸入療法は安全であるものの、明確な効果を示すことはできなかった。しかし、臓器間での作用の違いや作用機序の詳細な解析を通じて、腎臓のIRIを抑制する鍵となる因子が今後明らかになることが期待される。本研究は、今後医療ガスを用いた新しい腎臓IRI抑制療法の開発につながる高い意義を有する実験であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Organ shortage in transplantation remains serious and donor expansion is one of the strategies, but acute organ failure due to ischemia-reperfusion injury (IRI) is a concern. Recently, attention has focused on the reported cytoprotective effects of the noble gas argon (Ar) via anti-inflammatory and anti-apoptotic effects, and the applicability of Ar to kidney transplantation was evaluated in large animal experiments using CLAWN miniature swine. Both in the model of IRI induced by renal artery and vein clamping and in the renal transplantation model using a 5-hour cold preserved kidney, 70% Ar inhalation in the perioperative period had no clear inhibitory effect on renal IRI. The weak anti-inflammatory effect of Ar and the inadequate reach of Ar to the kidneys are considered to be the reasons for the ineffectiveness of Ar inhalation in this study.

研究分野：虚血再灌流障害

キーワード：腎移植 アルゴン ミニブタ 大動物 トランスレーショナル研究 臓器移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 深刻なドナー不足に対し、脳死下提供とともに、心停止ドナーからの献腎提供推進などの適応拡大が必須であるが、移植の長期成績は健常ドナーからの生体腎移植成績に及ばず、特に虚血再灌流障害(Ischemic-reperfusion injury: IRI)を代表とする急性腎障害の発症対策は必須である。また IRI による急性臓器不全だけでなく、免疫学的因子の活性化による急性・慢性拒絶の発生増加が懸念される。

(2) 大気中に微量に存在するキセノン、ヘリウム、アルゴンなどの希ガスは低毒性の不活性ガスで、半導体などの工業製品の製造、医療用の機器など幅広く使用されている。近年、希ガスが持つ臓器保護効果に着目する研究が進められ、特にキセノンの有効性は多く報告されるものの、精製コストの高さと麻酔作用の強さのため臨床応用性が懸念されている。一方でアルゴンについては、大気中に 9,300ppm という高濃度で存在し入手が容易であることに加え(ヘリウムは世界的に供給困難な状況が続く)麻酔作用は乏しく、近年心筋保護や神経保護効果(*Crit Care Med* 2016) ERK1/2 シグナル伝達活性や Bcl-2 の発現を介した抗アポトーシス作用(*Med Gas Res* 2019)や TLR2/TLR4 シグナルを介した自然免疫の活性制御(*Plos One* 2015)も報告されるなど、Ar の多彩な作用は移植医療の有力な新しい治療方法になると期待される。

(3) しかし移植領域での少数の報告例では、ラット小腸(*Shock* 2015)やマウス肝臓(*J Hepatol* 2014)での IRI 抑制効果が示される一方、ラット肝臓 IRI での非有効性(*Shock* 2014)も報告された。この相反する結果の一因として、検討により臓器障害モデルや投与時期・方法が異なること、また観察期間が極めて短いことなどが考えられ、更に大動物モデルを用いた論文報告は限られる。希ガスの臨床応用性を評価するには、臨床移植医療に基づく大動物実験モデルを用いて、慢性期にわたる治療効果や安全性の検証、さらに至適投与時期の評価を行う必要がある。

2. 研究の目的

ドナー不足の克服は移植医療の課題であるが、条件の悪いドナーへの適応拡大の際は、虚血再灌流障害 IRI の確実な制御が求められる。近年、希ガスであるキセノン、ヘリウム、アルゴンに、抗炎症・抗アポトーシス作用などを介した心筋・神経保護効果が報告されることに注目し、詳細な免疫反応の評価が可能な主要組織適合性抗原(Major histocompatibility complex: MHC)確立クラウン系ミニプタを用いた大動物実験によって、希ガスの移植医療への応用性について多角的に評価することを研究の目的とする。特に本研究では、MHC 確立ミニプタを用いた前臨床実験として、腎 IRI モデル、あるいは 5 時間冷保存を設けた移植モデルを用いて、アルゴンの吸入が腎 IRI 抑制を有するかという点について、安全性を加味した評価を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動物：遺伝学的背景を均一化した大動物実験を実施するため、MHC が確立したクラウン系ミニプタを用いた実験を行う。

(2) 虚血再灌流障害モデル：120 分腎動静脈遮断による虚血後に血流を再開するモデルを用いる。右腎摘により腎機能は虚血腎に依存する。

(3) 移植モデル：クラウン系ミニプタ MHC 不適合間腎移植を、既に我々が確立した方法(*Transplantation* 2012)で行う。UW 液を用い 5 時間の冷保存時間を設ける。

(4) 免疫抑制療法：12 日間低濃度タクロリムス持続投与(血中濃度：15-25 ng/ml)によりマイナー抗原に対する急性拒絶反応を制御する。

(5) 吸入混合ガス：アルゴン吸入群に対しては、70%アルゴンと 30%酸素の混合ガスを、また対照群に対しては、70%窒素と 30%酸素の混合ガスを充填したガスボンベを用い、各々の群に対して吸入を行った。

(6) 腎臓・他臓器評価：血清 Cre 等の生化学、超音波、腎生検検体を用いて、H&E、Masson Trichrome(線維化病変)、Elastica-Masson(血管病変)、TUNEL(アポトーシス)染色等で評価を行う。

(7) 血液・組織のサイトカイン評価：炎症性サイトカイン(IL-1 /IL-6/TNF- /HMGB1) 抗炎症

症性サイトカイン(IL-10/TGF-)、接着因子(ICAM-1)、酸化ストレス(MDA assay)、ATP/ADP/AMP 解析などに着目した評価を行う。

(8) 免疫学的解析(血液・組織浸潤細胞): CD3/CD4/CD8 細胞、制御性 T 細胞(CD4/Foxp3)、樹状細胞(MHC class II、CD14)、マクロファージ(CD68/制御性 CD163)等を解析する。

4. 研究成果

(1) 希ガスによる細胞保護効果を、移植医療へ応用することが可能であるのかという点を評価する目的で、大動物腎 IRI モデルを用いたアルゴンの吸入効果および安全性を評価した。モデルとしては、これまでに我々の研究チームが論文報告した手法(左腎動静脈遮断による温虚血 120 分後に遮断を開放し、IRI を誘発)を用いた。アルゴン吸入群では 30%酸素 + 70%アルゴン、対照群では 30%酸素 + 70%窒素を虚血前 60 分、虚血中 120 分、再灌流後 120 分の計 300 分間吸入した。各群について、副作用の有無とともに、腎障害の程度は、血清クレアチニンの推移、腎生検によって、術後 28 日まで経時評価を行った。この結果、アルゴン吸入に伴う明らかな副作用は認めなかったものの、血清クレアチニンの推移に関しては、明らかな有効性は認めなかった。

(2) IRI モデルでは明らかな Ar 吸入の有効性は示すことができなかったものの、移植モデルに展開することにより有効性が得られないかについて評価を進めた。UW 液で 5 時間保存した腎臓を MHC 適合レシピエントに移植した。アルゴン吸入群(n=3)では、再灌流後 2 時間までの計 360 分間 70%アルゴン + 30%酸素吸入を、一方、対照群(n=4)では 70%窒素 + 30%酸素の吸入を行った。この結果、アルゴン吸入による血圧変動や麻酔の覚醒遅延などの副作用は認めなかった。対照群で、クレアチニンのピーク値は 2.6~6.7 mg/dl(中央値 3.4 mg/dl)であり、2 例でクレアチニン低下が 5 日、9 日まで遷延した(残り 2 例は 3 日目以降回復)。一方アルゴン吸入群では、2 例で 3 日目以降にクレアチニンは回復したものの、残りの 1 例では術後 7 日にわたりクレアチニンの上昇を認めた。移植腎の組織学的検査では、アルゴン吸入群、対照群との間で明らかな差は認めなかった。

(3) このように、今回の結果からアルゴンによる移植時の腎保護効果は認めなかった。我々の研究室ではこれまでにアルゴン吸入が肺の IRI を抑制すること、効果発現の主要機序が抗酸化作用や抗アポトーシス効果が主であるという知見をいっている。腎臓と肺でアルゴンの吸入効果が相反する理由として、吸入により肺にアルゴンは速やかに到達するが、腎臓へはアルゴンが到達しない可能性、腎臓の IRI の進展を抑制するためには、抗酸化作用や抗アポトーシス作用よりも抗炎症作用が重要である可能性などが考えられる。特に の作用機序に関する検討を更に進めることによって、今回の検討でアルゴンによる治療効果が得られなかった理由について明確になるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
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)	
研究分担者	岩永 健裕 (Iwanaga Takehiro) (40518916)	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)	

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