

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22953

研究課題名(和文) CORMを使った小腸グラフト虚血再灌流障害の予防

研究課題名(英文) Luminal Administration of a Water-soluble Carbon Monoxide-releasing Molecule (CORM-3) Mitigates Ischemia/Reperfusion Injury in Rats Following Intestinal Transplantation

研究代表者

小原 隆史 (Obara, Takafumi)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：00880840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：雄性LEWラットにて同種同系・同所性小腸移植モデルを作成し、生理食塩水またはUW液に6時間保存した後、腸管腔内に水溶性CO遊離分子(CORM-3:100 μ M)を注入し、移植3時間後に組織学的・免疫学的検討を行った。対象群として空気中にCOを脱気させたiCORM-3を用いた。CORM-3投与群では、小腸粘膜構造が保たれ、腸管透過性や抗炎症性サイトカインの発現が抑制されていた。生存実験においても優位性を認めた。メカニズム解析として、Soluble guanylyl cyclase (sGC)/cGMPの関連を考え、sGCの阻害剤であるODQを用いたところ、CORM-3の効果が抑制されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小腸は他の臓器よりも虚血再灌流障害に弱く、移植後も急性・慢性拒絶反応が高い傾向にあることから、移植後虚血再灌流障害の抑制は小腸移植の発展に必要不可欠と考えられてきた。一酸化炭素(CO)は抗炎症作用を持つシグナルガスとして臨床応用が期待されているが、気体では細胞内窒息に中毒性が懸念される。一方、CO供与体であるCORMsはCO-Hb濃度を上げることなく、標的組織内にCOを取り込ませることが可能となる。また、本方法はCORM含有保存的をグラフト腸管腔内に充填するだけであり、簡便で臨床上に汎用性の高い方法となり得る可能性がある。本方法の有用性が実証されれば、医療経済的観点からも意義が大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：Orthotopic syngeneic intestinal transplantation was performed in Lewis rats following 6h of cold preservation in Ringer solution or UW solution. Saline containing CORM-3 (100 μ M) or its inactive counterpart (iCORM-3) was intraluminally introduced in the intestinal graft before cold preservation. Histopathological analysis of CORM-3 treated grafts attenuated an erosion and blunting of the intestinal villi. CORM-3 significantly inhibited upregulation of proinflammatory mRNA levels, ameliorated intestinal morphological changes, and improved mucosal barrier function. Additionally, CORM-3 grafts increased recipient survival rates. Pharmacological blockade of soluble guanylyl cyclase activity significantly reversed the protective effects conferred by CORM-3, indicating that CO partially mediates its therapeutic actions via soluble guanylyl cyclase activation. Our study demonstrates that lumenally delivered CORM-3 provides beneficial effects in cold-stored rat small intestinal grafts.

研究分野：救急医学

キーワード：小腸移植 虚血再灌流障害 一酸化炭素 CO-releasing molecules soluble guanylyl cyclase carbon monoxide

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

在宅中心静脈栄養や腸管リハビリテーションの進歩で、腸管機能不全の患者の予後は劇的に改善してきたが、長期にわたる静脈栄養管理は患者の生活の質 (QOL) を著しく低下させ、それに伴う合併症は時に致死的である。小腸は他の臓器よりも虚血再灌流障害に弱く、移植後も急性・慢性拒絶反応が高い傾向にあることから、依然として移植が困難な臓器である一方、小腸移植でしか救命できない患者がいることも事実であり、移植後虚血再灌流障害の抑制は小腸移植の発展に必要な不可欠と考えられてきた。

近年、生体内で微量に産生されるシグナルガス分子を治療に応用する研究が行われ、一酸化炭素 (CO) も抗炎症作用を有することが示され、にわかに注目を集めてきた。無色無臭の気体である CO はヘモグロビンとの親和性が強く、細胞内窒息をおこすことから、CO 吸入療法は臨床では応用しにくい。そこで、遷移性金属のカルボニル化合物が化学的 CO 供与体: CO 遊離分子 (CORM) として開発され、臓器移植における虚血再灌流への効果も期待されている。CORM-3 は親水性であり、緩衝液に溶解すると溶液中でただちに CO を遊離することから、我々は、臓器保存液中に CORM-3 を溶解させることで、グラフトに効率的に CO を取り込ませることが可能ではないかと考えた。

虚血再灌流障害は、腸管粘膜の脱落が主な病態であり、それに伴うバリア機能の喪失が Bacterial Translocation を引き起こすとされる。これまでの小腸臓器保存の概念は、主に血管を灌流し、保存液を血管内より臓器に流し込むことであり、小腸移植において特異的な消化管内腔をターゲットにした治療的戦略は研究されてこなかった。本研究は臓器保存液中の CO による粘膜面からの直接的なアプローチを想定し、血管経由ではなく粘膜細胞に直接的に CO を取り込ませるという点で極めて独自性・新規性が高い。また、本方法では CORM 含有保存液をグラフト腸管内に充填するだけであるため、簡便で臨床的に汎用性の高い方法となり得る可能性がある。

2. 研究の目的

CORM を含んだ水溶液を臓器保存液中のグラフト腸管の管腔内に投与することにより、再灌流後の小腸グラフトにおきる虚血再灌流障害を制御できるか? またそのメカニズムは何か? を小動物を用いて解明することである。

3. 研究の方法

【同種同系・同所性小腸移植モデル】

雄性 LEW ラットを用い、同種同系・同所性小腸移植モデルを既報の方法を用いて作成した (Buchholz BM, Nakao A, et al. Am J Transplant. 2008; ;8:2015-24)。小腸グラフトは内腔を生理食塩水で洗浄後、氷冷した生理食塩水または UW solutions の中に 6 時間保存した。CORM は 34mL の生理食塩水に溶解して 100 μ M の濃度に調整した。対照群として CORM を空気中に 48 時間放置し CO を脱気したものを iCORM として使用した。また、CO は GTP を cGMP に変換する酵素である Soluble guanylyl cyclase (sGC) を活性化することで効果を発揮することが知られており、sGC の阻害剤である ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3- a] quinoxalin-1-one) を用いることで CORM の効果に関する影響を検討した。実験群は、(1) Sham コントロール (麻酔薬のみ使用し、外科的処置は実施せず、腸管内腔に生理食塩水を流したもの)、(2) Sham (生理食塩水 + ODQ)、(3) 移植腸管 (ischemia reperfusion: IR)/生理食塩水、(4) IR/iCORM-3、(5) IR/CORM-3、(6) IR/CORM-3+ODQ の 6 群を準備し、それぞれ、移植 3 時間後にレシピエントを犠牲死させ、小腸グラフトサンプルを採取した。

【効果判定】

サンプルは液体窒素で凍結保存、あるいはホルマリンで固定した後、病理医による組織学的検討に供した。さらに、Realtime RT-PCR を用いて IL-6 などの炎症性サイトカインの mRNA の検討、Everted gut method (Wilson TH, Wiseman G. J Physiol 123: 116-125, 1954.) による腸管透過性を測定し、CORM の効果判定を行った。また、メカニズム解析の一環として、凍結検体を用いて cGMP 定量を ELISA 法にて実施した (Cyclic GMP Complete, Enzo Life Sciences Inc, NY) さらに、モデルの一部を用いて、移植後 14 日間の生存実験を実施した。

【統計学的解析】

統計解析は、適宜、非対称の Student t test または ANOVA を用いて実施した。生存率については、Kaplan-Meier 曲線と log-rank 検定を実施した。P < 0.05 を統計的に有意と判断した。

4. 研究成果

【組織学的検討】

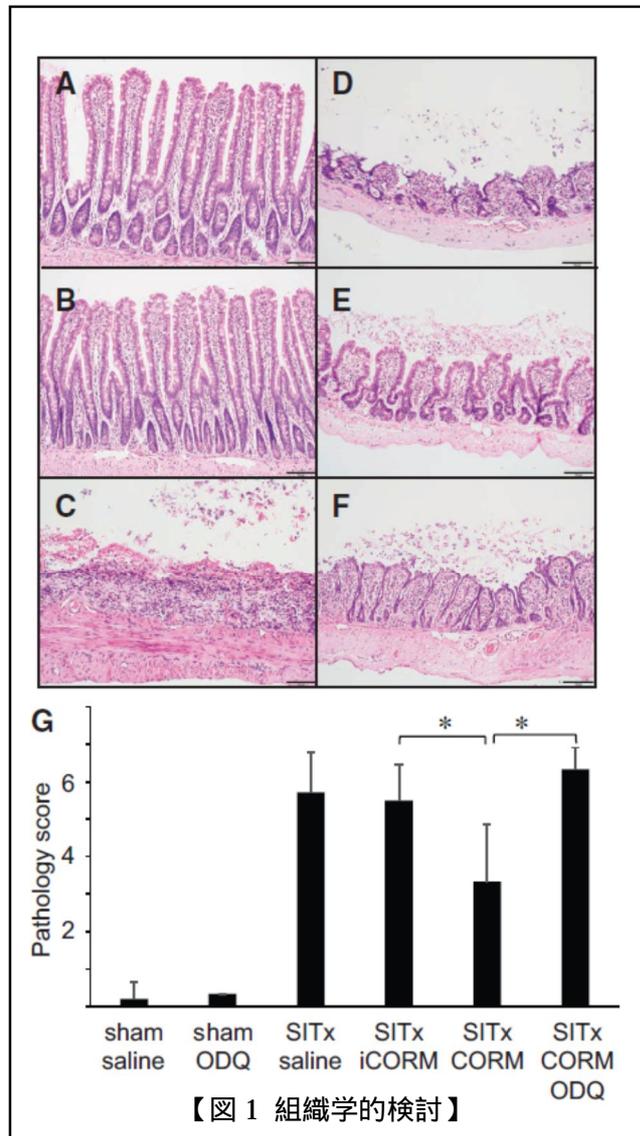
移植による再灌流 3 時間後に採取した腸管組織の粘膜損傷の程度を、盲検化した状態にて病理医により病理組織学的スコアを用いて評価した (G)。CORM-3 を用いた検体 (E) に関して、生理食塩水 (C) や iCORM-3 (D) を用いた移植腸管モデルと比較しても、組織構造が保たれており、有意に改善を認めた。また、CORM+ODQ (F) では CORM による組織改善効果が抑制されていた。(図 1)

【腸管透過性】

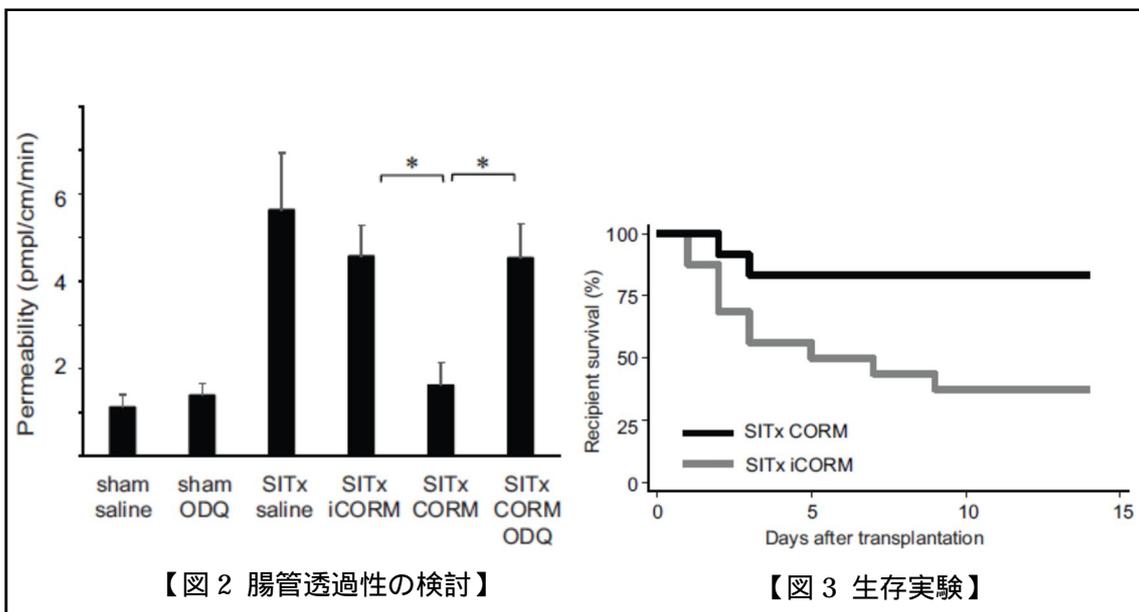
腸管のバリア機能を評価する指標として分子量 4kDa の fluorescein isothiocyanate-labeled dextran ; FD-4 を用いた腸管反転法を実施し、蛍光プレートリーダー (Flexence Plate Reader) を用いて測定した。iCORM で処理した移植腸管は、腸管壁の透過性に著しい障害を認めた。一方、CORM-3 で腸管内腔を処理した検体に関しては、バリア機能が有意に改善していた。ODQ を添加すると、CORM-3 の腸管壁の保護効果が失われる結果となった。(図 2)

【生存実験】

移植後、14 日間以上生存した個体は、iCORM-3 群では 37.5% (6/16) であった一方、CORM-3 群では 83.3% (10/12) と生存率が有意に向上した。($P < 0.05$, Kaplan-Meyer, log-rank test) (図 3)



【図 1 組織学的検討】

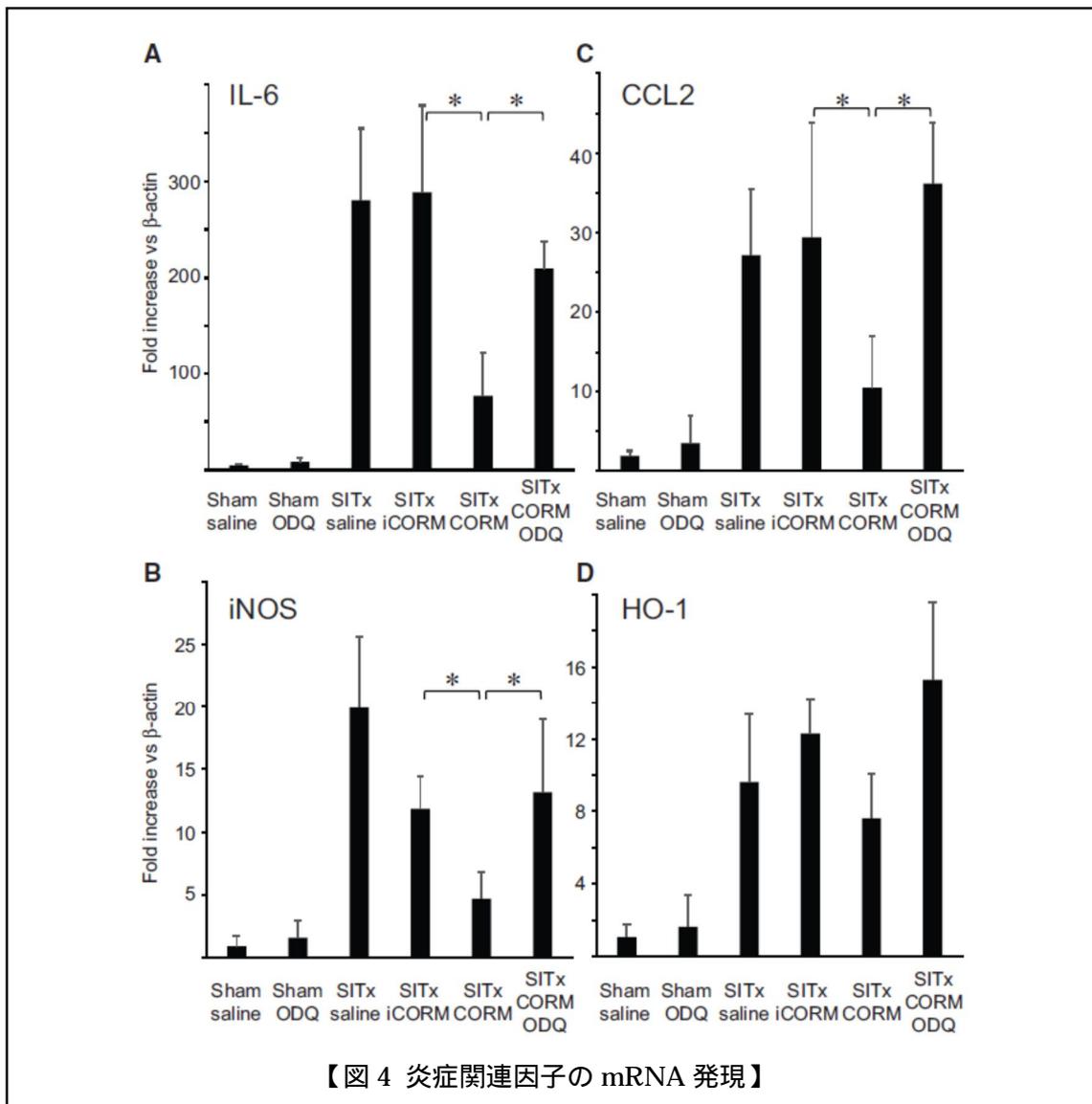


【図 2 腸管透過性の検討】

【図 3 生存実験】

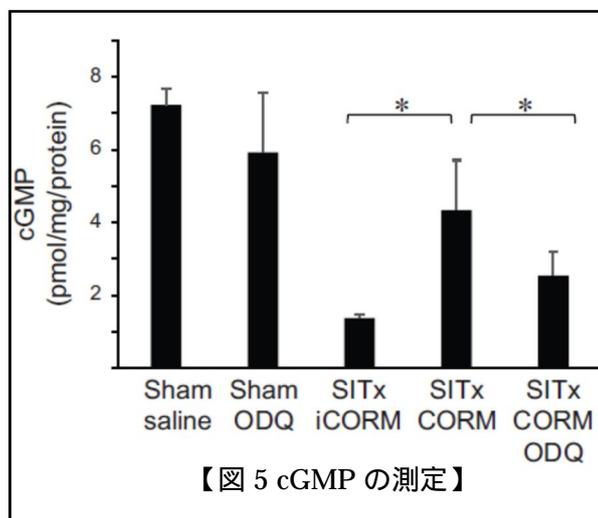
【腸管組織内の炎症性メディエーターmRNA の発現】

炎症性サイトカインである IL-6 や誘導性 NO 産生酵素である iNOS、好中球遊走に関連する CCL2、ヘム経路の誘導体である HO-1 を測定したところ、iCORM-3 と比較して、CORM-3 の管腔内投与により有意に抑制されていた。また、ODQ を添加することで CORM-3 の効果を抑制した。以上の結果から、CORM-3 は腸管粘膜において炎症刺激を抑制していることが示唆された。(図 4)



【cGMP 濃度の測定】

再灌流後 3 時間後の腸管組織の cGMP 組織濃度は、iCORM-3 群では著しく減少していた (1.38 ± 0.09 pmol/mg protein) 一方で、CORM-3 群では十分に保たれており (4.34 ± 1.37)、ODQ を添加することで sGC が阻害され、cGMP の組織濃度も低下した (2.55 ± 0.64)。以上より、sGC/cGMP 経路がメカニズムとして関与している可能性が示唆された。(図 5)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Obara Takafumi, Yamamoto Hirotsugu, Aokage Toshiyuki, Igawa Takuro, Nojima Tsuyoshi, Hirayama Takahiro, Seya Mizuki, Ishikawa-Aoyama Michiko, Nakao Atsunori, Motterlini Roberto, Naito Hiromichi	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Luminal Administration of a Water-soluble Carbon Monoxide-releasing Molecule (CORM-3) Mitigates Ischemia/Reperfusion Injury in Rats Following Intestinal Transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/TP.0000000000004007	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小原隆史
2. 発表標題 一酸化炭素遊離分子(CORM)管腔内投与による 小腸グラフト保存への新しいアプローチ
3. 学会等名 第57回日本移植学会総会
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
---------	---------