

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791322

研究課題名(和文) 移植肺生存向上とドナー数拡大を目指す一酸化炭素療法の大動物肺移植モデルによる検討

研究課題名(英文) Beneficial Effects of Inhalation of Carbon Monoxide on Pulmonary Allograft Survival in MHC-inbred CLAWN Miniature Swine.

研究代表者

佐原 寿史 (SAHARA HISASHI)

鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推進センター・特任准教授

研究者番号：90452333

研究成果の概要(和文)：一酸化炭素(CO)のもつ強力な細胞臓器保護作用は移植医療での有効な治療となりうるが、有毒ガスとして知られるCOの臨床応用には大動物による検討が必須と考え、MHC 確立クラウン系ミニブタを用いた肺移植実験に着手した。移植時のドナー180分およびレシピエント390分の低濃度CO吸入が、副作用を生ずることなく、MHC 完全不適合移植肺の生存延長効果を有した。更にドナーへのCO吸入のみでも同様の効果が得られた。前臨床大動物実験で得られたこれらの結果は、副作用の懸念が少ない臨床応用性の高いCOを用いた新たな治療法の確立に重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：

Carbon monoxide (CO) is produced endogenously as a byproduct of heme catalysis, and has been shown to provide protection against ischemia-reperfusion injury (IRI) in a variety of organs in murine models. Since CO is also known to be a toxic gas, translational research using large animals is essential prior to its use in the clinic. To attempt CO to apply for the clinical setting, we examined whether (1) perioperative CO inhalation to both donor and recipient prolongs lung graft survival (2) donor treatment alone is sufficient to prolong graft survival and (2) postoperative CO therapy has additional survival benefits in MHC-inbred CLAWN miniature swine.

Eighteen CLAWN swine received fully MHC mismatched lungs with 12 days of tacrolimus (days 0-11; 35-45 ng/ml). In Group 1 (n=6), recipients received tacrolimus alone. In Group 2 (n=5), both donors and recipients inhaled 200-250 ppm CO (180 min for donors; 390 min for recipients until 2-hr reperfusion). In Group 3 (n=4), only donors were treated with CO for 180 min. In Group 4 (n=3), recipients were additionally given daily 1-hour 250 ppm CO for 14 postoperative days.

All recipients in Group 1 uniformly rejected their grafts by postoperative day 63 with development of cytotoxic antidonor antibodies. In contrast, 4 out of 5 recipients in Group 2 accepted their grafts beyond 63 days. Short-term CO treatment only with donor (Group 3) was effective in prolonging allograft survival. Three out of 4 recipients accepted their grafts beyond 63 days with the longest survivor lasting 150 days. In Group 4, two out of 3 recipients maintained their grafts for 91 days; however, postoperative CO did not prolong graft survival compared to Group 2. Development of antidonor-antibodies and donor-specific responsiveness by MLR and CML assays was delayed in animals that received CO therapy. Furthermore, fewer inflammatory cell infiltrates and injuries of endothelial cells were seen on POD2 biopsies, and serum concentrations of the pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6) also decreased in Group 2-4.

These data suggest that donor CO treatment alone is sufficient to improve lung allograft survival in a clinically relevant large animal model. Donor cytoprotective preconditioning with CO during organ harvest or preservation could be accomplished in a clinical setting, potentially improving graft survival with little risk of adverse effects on the recipient.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度			
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：肺移植・一酸化炭素・ミニブタ・拒絶反応・心停止ドナー

1. 研究開始当初の背景

臨床肺移植が直面する課題として、慢性期移植肺機能不全を主因とする低長期生存率とドナー数の絶対的な不足が挙げられる。慢性移植肺病変進展の引き金には、非免疫学的要因としての虚血再灌流障害（IRI）や肺感染症などによる組織障害、免疫学的要因としての主要組織適合性抗原（MHC）の相違による慢性組織傷害等が関与し、種々の治療が試みられているがその克服には至っていない。一方、ドナー拡大を目指した心停止ドナーからの肺移植が非常に注目されているが、ドナー肺の温虚血時間の存在が不可避であり、術後発生するIRIに起因する急性グラフト機能不全の危険性が懸念され、更にIRIを誘因とした慢性期移植肺機能不全の発生率が高まる可能性も指摘される。このように肺移植における最重要課題である慢性期病変の克服とドナー拡大対策は一体の関係にあり、急性期IRIの制御と慢性期病変に対する治療法を同時に視野に入れた治療法の確立が重要となる。

一酸化炭素（CO）投与によるIRI抑制、グラフト生存延長、慢性拒絶反応抑制等の効果が報告されており、移植医療の新しい有力な治療法になると期待されるが、COは有毒ガスとして広く知られるため臨床応用にはtranslational researchとして大動物を用いた検討が必須である。移植領域では小動物による報告が殆どであった状況を鑑みて、我々は90分間の左肺温虚血によるIRIを惹起するミニブタモデルを確立後、250ppm CO吸入によるIRI抑制効果を世界で初めて大動物モデルにより報告した。本申請研究ではこの研究成果を更に発展させ、慢性拒絶病変進展対策あるいは臓器不足対策としての心停止ドナーやマージナルドナーへのドナー適応拡大に寄与する治療法の確立を目的とし、臨床に即した慢性拒絶を呈するMHC完全不

適合ミニブタ肺移植モデルによってCO吸入のグラフト生存期間延長および慢性拒絶病変進展抑制効果を明らかにし、更に心停止ドナーからの肺移植モデルでも同様の効果が得られるかについても検討する。

2. 研究の目的

申請研究は、申請者がこれまで得た研究成果による大動物臨床実験系を更に発展させ、以下の4つの目的について、MHC確立クラウンミニブタを用いた肺移植モデルを用いてCO吸入の効果を明らかにする。

（1）目的1：COによる治療効果検討 - 移植手術中のドナー及びレシピエントへのCO吸入により移植肺の生存期間の延長が得られるか？

準備実験として、術後約60日で拒絶されるMHC不適合間肺移植時にドナーに対し180分間、レシピエントに390分（手術開始～再灌流後2時間）の250ppm CO吸入のみで、CO吸入例では術後60日で完全に含気が保持され、免疫学的評価でもドナー特異的な反応性の低下を認めた。症例数を増やし、短期間CO吸入によるグラフト生存期間延長効果を明らかにする。

（2）目的2：ドナー因子制御作用の検討 - CO吸入による移植肺生存期間延長はドナー肺の保護によるものか？

移植時の短時間CO吸入のみで効果が得られるという結果は、CO吸入によるドナー臓器保護が移植肺生存に大きく寄与している可能性を示唆する。小動物実験ではドナーへのCO投与によるマクロファージ活性抑制が拒絶反応抑制の鍵となることが示唆される一方で、レシピエントへのCO投与がより有効であるという報告もあり、本実験によりドナー因子の制御とグラフト生存期間の延長

の関係を明らかにする。

(3) 目的 3: 慢性拒絶病変抑制効果の検討 - レシピエント CO 吸入期間の延長により移植肺生存期間が更に延長し、慢性拒絶病変進展抑制効果が得られるか?

レシピエントに対する長期間持続 CO 吸入による慢性拒絶反応抑制という小動物実験結果に基づき (Nakao A. *Transplantation*. 2006;81:220-30)、術後長期の CO 吸入によってより強力な拒絶抑制・慢性拒絶病変抑制効果が得られるかを明らかにする。同時に CO 吸入によるレシピエント因子への作用を明らかにする。更に、投与期間の延長による副作用の有無という臨床応用の際の問題点の可能性を明らかにする。

(4) 目的 4: ドナー拡大への寄与の検討 - CO 吸入の効果が心停止肺移植モデルでも同様に得られるか?

臓器不足対策として期待される心停止ドナーからの移植は、温虚血によりグラフトに障害が惹起されている可能性が高く IRI 対策、更には慢性期グラフト機能不全に対する対策は特に重要である。本実験では心停止 90 分を経たドナーを用いた肺移植モデルで IRI 発症、慢性拒絶病変進展への影響を検討した後、周術期の CO 吸入による病変抑制効果を明らかにする。

3. 研究の方法

実験モデルとしては、目的 1~3 では MHC 確立クラウン系ミニブタ C1 をドナー、C2 をレシピエント (MHC 完全不適合) とした左同所性肺移植を行い、免疫抑制剤としては唯一、12 日間の持続 FK506 (定常血中濃度を 35-45ng/ml に維持) を用いる。目的 4 ではドナー・レシピエントの MHC が一致した MHC 適合モデルによる。移植肺の評価は画像的あるいは肺生検により経時的に行い、肉眼的に全く含気を認めない時点 (グラフト肺喪失時) をエンドポイントとする。また経時的にリンパ球混合試験や細胞障害試験により免疫学的評価を行う。なおこの免疫抑制療法のみでは MHC 完全不適合移植肺は術後約 60 日までに完全拒絶されることが確認されている (n=6)。

(1) 目的 1: 移植手術時のドナー及びレシピエントへの CO 吸入による移植肺生存延長効果の検討

ドナーに対しグラフト摘出 180 分前から、またレシピエントに対し手術開始から 390 分 (再灌流 2 時間後まで) の 250ppm CO 吸入を移植手術中に行い、対照群である CO 無吸入症例 (n=6) との間での治療効果を比較検討する。

(2) 目的 2

ドナーに対してのみ、グラフト摘出 180 分前から CO 吸入 (250ppm) を行い、実験 1 で得られたドナー及びレシピエントの両者に CO 吸入を行った症例との間での治療効果を比較検討し、CO 吸入による移植肺生存期間延長はドナー肺の保護作用が有意であるかを検討する。

(3) 目的 3

ドナーに 180 分前、レシピエントに手術開始から 390 分 (再灌流 2 時間後まで) の 250ppm CO 吸入を行い、更にレシピエントに術後連日 1 時間、気管内挿管下に 250ppm CO 吸入を 14 日間行うことにより、CO 吸入期間の延長によるグラフト生存期間・慢性拒絶病変進展抑制効果を検討する。

(4) 目的 4: 心停止肺移植モデルによる CO 吸入の効果の検討

目的 1~3 は、摘出肺保存時間の短い生体肺移植に近いモデルであるが、本実験では心停止ドナーからの肺移植を想定し、まず心停止 90 分後のドナーからの MHC 完全不適合間肺移植による IRI 発生及び慢性拒絶病変進展への影響を評価し、次いでこのモデルでの CO 吸入効果を検討する。心停止モデルで生ずる高度の IRI、早期の拒絶病変進展が CO 吸入により抑制され、慢性拒絶病変の制御とドナー数の拡大に寄与する有効な治療法の確立が期待される。

4. 研究成果

(1) 目的 1

移植時のドナーおよびレシピエントに対する低濃度 CO 吸入により、移植肺の生着が延長するかについて検討した。

12 日間の高濃度持続 FK506 下 (35-45ng/ml) の完全 MHC 不適合間肺移植時に、250ppmCO 吸入を、ドナーに対しグラフト摘出までの 180 分、レシピエントに対し手術開始から移植肺再灌流 2 時間後まで 390 分を行うことによって、28 日から 63 日 (平均 47 日) で拒絶された CO 無吸入例 (n=6) に比べ、CO 吸入症例 (n=5) では、5 例中 4 例で 63 日以上の移植肺生存が得られ (平均 82 日)、移植時の CO 吸入による移植肺生着延長効果が明確となった。また CO 吸入により抗ドナー抗体の産生が遷延し、術後 60 日目までの細胞性免疫反応も抑制されることが示された。更に CO 吸入による効果の機序として、術後早期の IRI 抑制効果の関与が示唆された。なお血中 COHb 濃度を 15%維持することによって、CO 吸入による明らかな副作用は認めなかった。

(2) 目的 2

移植時の CO 吸入に加え、術後 14 日間、60 分の 250ppm CO 吸入を行った CO 継続群 (n=3) で、更に CO 効果が増強されるかを検討した。

連日の CO 吸入での副作用は認めず、最高血中 COHb 濃度は 20%以下で推移した。FK 単独群は術後 63 日以内 (平均 47 日) のグラフト完全拒絶に対し、CO 継続群では、2 例で 91 日の移植肺生存が得られたが 1 例は 28 日で拒絶した (平均 70 日)。FK 単独群に対する効果は認めたものの、CO 吸入継続による更なる移植肺生存延長は得られず、また抗ドナー抗体産生、MLR および CML でも明らかな差はなかった。本実験により、移植時 CO 吸入による移植肺生長延長効果は再現されたものの、小動物で示された術後 CO 持続吸入による効果は認めず、ドナー肺のみの CO 吸入という臨床応用性の高いモデルでも CO 吸入効果が得られる可能性を示唆した。また小動物実験の結果が再現されなかった点は、前臨床実験としての大動物実験の必要性を強く示すものであった。

(3) 目的 3

ドナーに対する CO 吸入のみで効果が得られるかについて検討を行った。

グラフト摘出までの計 180 分間にわたり CO 吸入を行った D 群では (n=4)、3 例で術後 90 日をこえる生存が得られ、ドナーとレシピエントの両方に CO 吸入を行った症例 (D+R 群) と同様の効果を得ることができた。術後 2 病日のグラフト肺静脈血 PaO₂ は、D + R 群 408±38mmHg に対し、D 群では 487±72mmHg と有意差を認めず、胸部 X 線、肺生検でも軽度の IRI に留まった。長期生着例では両群ともに MLR、CML で術後 63 日をこえてドナー特異的細胞性免疫低反応が維持された。これらの結果はドナー CO 吸入のみで十分な効果が得られる可能性を示すものである。

(4) 目的 4

CO 吸入実験に先立ち、心停止後肺移植モデルの確立のための実験に着手した。本実験では、免疫学的因子の関わりをできるだけ排除した MHC 適合 (マイナー抗原不適合) の組み合わせを用いた肺移植手術を行うことにより検討を開始した。

目的 1~3 と同様の 12 日間の高濃度持続 FK506 下 (35-45ng/ml) に MHC 適合間肺移植を行ったところ (n=3)、3 例全例で移植肺は 1 年以上生着した。一方、カリウム投与により心停止を誘導したドナーから心停止 90 分後に肺を摘出し、同様の MHC 適合間肺移植を行ったところ (n=6)、全例で術後 2 日目の生検で高度の IRI が確認された。IRI は

経時的に改善したものの、6 例中 2 例で移植肺は 63 日までに拒絶された。

今後、この心停止肺移植モデルのドナーに対して CO 吸入を行うことにより、CO 投与の臨床応用性と有用性を評価し、ドナー拡大の際に付随する問題に対する対策の一つとしての CO 吸入療法の確立を目指す。

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 6 件、すべて査読有)

1. Sahara H, Shimizu A, Setoyama K, Okumi M, Oku M, Samelson-Jones E, Yamada K, Carbon Monoxide Reduces Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury in Miniature Swine, J Thorac Cardiovasc Surg, Vol.139, No.6, pp.1594-1601 (2010).

2. Sahara H, Shimizu A, Setoyama K, Oku M, Okumi M, Nishimura H, Oriyhan W, Tasaki M, Scalea J, Wada H, Bando T, Date H, Yamada K, Beneficial Effects of Perioperative Low-dose Inhalation of Carbon Monoxide on Pulmonary Allograft Survival in MHC-inbred CLAWN Miniature Swine, Transplantation, Vol.90, No.12, pp.1336-1343 (2010).

[学会発表] (計 15 件)

1. Sahara H, Yamada K, "Symposium 3. Basic, Kidney, liver". Translational Research of Carbon Monoxide (CO) Therapy for Prolonging Pulmonary Allograft Survival using MHC-inbred CLAWN Miniature Swine, The 8th Japan-Korea Transplantation Forum, 2010 年 10 月 20 日 (京都).

2. 佐原寿史、屋 万栄、田崎正行、西村博昭、瀬戸山健太郎、Oriyhan Wunimenghe、奥見雅由、清水 章、山田和彦、「ワークショップ 5. 移植免疫における新たな試み」MHC 確立クラウン系ミニブタ大動物同種移植モデルを用いた移植免疫学的機序に基づく新たな治療戦略の確立、第 46 回日本移植学会総会、2010 年 10 月 21 日 (京都).

3. Sahara H, Tasaki M, Setoyama K, Nishimura H, Oku M, Shimizu A, Yamada K, Beneficial Effects of Perioperative Low-dose Inhalation of Carbon Monoxide on Pulmonary Allograft Survival in MHC-inbred CLAWN Miniature Swine, XXIII International Congress of the Transplantation Society, 2010 年 8 月 18 日

(Vancouver, Canada).

4. Sahara H, Oku M, Setoyama K, Tasaki M, Nishimura H, Oriyanhan W, Okumi M, Shimizu A, Yamada K, Anti-High Mobility Group Box-1 Antibodies Reduce Pulmonary Ischemia Reperfusion Injury in Miniature Swine, XXIII International Congress of the Transplantation Society, 2010年8月19日 (Vancouver, Canada).

5. 佐原寿史, 招待講演: 肺移植の臨床及び最先端研究の紹介, 日本移植者協議会第53回移植セミナー, 2010年7月18日 (鹿児島).

6. Sahara H, Setoyama K, Nishimura H, Oriyanhan W, Shimizu A, Yamada K, Carbon Monoxide (CO) Prolongs Survival of Pulmonary Allografts in MHC-inbred CLAWN Miniature Swine, International Society for Heart and Lung Transplantation 30th Annual Meeting, 2010年4月22日 (Chicago, USA).

7. 佐原寿史, シンポジウム: MHC 確立クラウン系ミニブタを用いた移植実験—すでにここまで進んでいる, 先進医用ミニブタの開発と前臨床研究拠点プロジェクト第1回シンポジウム, 2010年2月23日 (鹿児島).

8. 佐原寿史, 瀬戸山健太郎, 西村博昭, W. Oriyanhan, 屋万栄, 奥見雅由, 清水章, 山田和彦, 「シンポジウム心・肺移植における長期生着阻害因子とその対策」移植肺生着阻害因子としてのMHC 差異・虚血再灌流障害 (IRI) 及び一酸化炭素 (CO) 吸入を用いた拒絶抑制効果—MHC 確立ミニブタ肺移植モデルによる検討, 第45回日本移植学会総会, 2009年9月17日 (東京).

9. Sahara H, Oku M, Okumi M, Setoyama K, Shimizu A, Yamada K, Carbon Monoxide Inhalation Reduces Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury in Miniature Swine, *International Society for Heart and Lung Transplantation 28th Annual Meeting and Scientific Sessions*, 2009年4月23日 (Paris, France).

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐原 寿史 (SAHARA HISASHI)
鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推進センター・
特任准教授
研究者番号: 90452333