

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390337

研究課題名(和文)ドナー臓器保護作用に基づく大動物移植肺生着延長戦略 - 同種移植から異種移植への展開

研究課題名(英文)Attenuation of hyperacute dysfunction and coagulopathy in GalT-KO pulmonary xenotransplantation

研究代表者

佐原 寿史 (SAHARA, Hisashi)

鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研究センター・准教授

研究者番号：90452333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：ブタをドナーとする異種移植は、ドナー臓器不足に対する有力な解決策となる。腎臓や心臓では2か月超える異種臓器の生着が得られる一方、異種肺移植の生着は数時間から数日に留まる。本研究では、ブタ肺をヒト血液で灌流するex-vivoモデルやカニクイザルへ同所性左肺移植を行うモデルによって、GalT-KOブタ肺が超急性期の肺機能不全を回避しうること、ドナーへの一酸化炭素投与による血管内皮保護効果を介して、術後微小血管障害軽減が得られた。しかし異種移植肺は術後3日以内に血栓性微小血管障害による機能不全を呈したことから、長期効果を得るためには新たな遺伝子改変ブタを用いた治療方針の開発が望まれる結果となった。

研究成果の概要(英文)：The results of both heart and kidney GalT-KO swine-to-primate studies have been more encouraging than for lung xenotransplantation. This may be because research in pulmonary xenotransplantation is limited. Here, we evaluated 1) whether GalT-KO lungs could prevent hyper-acute pulmonary xenograft dysfunction using ex-vivo lung perfusion or in-vivo orthotopic left lung transplant model and 2) the effect of carbon monoxide (CO) on reducing the development of microangiopathy (CO-treated animals). GalT-KO lungs exhibited stable pulmonary function compared with wild-type lungs when perfused with human blood in an ex-vivo perfusion model, which was confirmed by the in-vivo transplant model. Although, thrombotic microangiopathy ultimately developed in all grafts of the CO-treated animals, the degree of microangiopathy was reduced in these animals. Reduction of the innate immune response by CO treatment would be one of the therapeutic strategies for prolonging pulmonary xenograft survival.

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：トランスレーショナルリサーチ 異種肺移植 GalT-KOブタ カニクイザル 一酸化炭素 急性期肺機能不全

1. 研究開始当初の背景

ブタをドナーとする異種移植は、ドナー制限のない移植医療として注目が寄せられる。臨床応用を目指したブタ・霊長類間異種移植研究は、異種移植における超急性拒絶反応の標的抗原である α -Gal を発現しない GalT (-1,3-galactosyltransferase) ノックアウト (GalT-KO) ブタの開発を契機に、着々と進み、腎臓や心臓ではグラフト長期生着例が報告される。一方、異種移植肺の生存は概ね数時間にとどまっている。成績改善には抗 Gal 抗体と補体活性による超急性拒絶反応の制御は必須であると考えられるが、抗 Gal 抗体を吸着除去した実験では、浮腫やグラフトの微小血栓、肺高血圧などによる急性グラフト機能不全を生ずることが示されており、肺の解剖・生理学的特殊性に基づく対策を考えることが必要と考えられる。そこで、急性期移植肺機能不全における GalT-KO ブタ役割を明確にすることに加え、肺の特異性から生ずる血管内皮細胞障害を契機とする異種間の凝固・炎症反応異常亢進の制御が必須であると考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

腎臓・心臓異種移植では、GalT-KO ブタは異種抗原 α -Gal に対する超急性抗体拒絶反応制御に対し大きな役割を果たし、研究発展の基礎となった。しかし異種肺移植では GalT-KO ブタを用いた報告はわずかに一報のみであった。そこで、まず GalT-KO ブタを用いた実験により急性期移植肺機能不全における GalT-KO ブタの役割を解明する(目的1)。更に血管内皮障害は炎症や凝固の活性化を惹起するが、特に異種肺移植では豊富な肺血管内皮細胞に加え、ブタ肺の特異性から、内皮障害によって激しい障害反応が術後数時間で生じるとされる。そこでミニブタ同種移植実験で得られた一酸化炭素 CO による強力な血管内皮保護作用 (Sahara H et al. J Thorac Cardiovasc Surg 2010 & Transplantation 2010) の効果に着目した新たな治療法の評価を行った(目的2)。更に、異種肺移植後の血管内皮障害からの凝固・炎症作用の活性化という障害カスケードの制御に対し、異種肺移植後に生ずるブタ von Willebrand factor (vWF) を介する異常な血小板活性化を制御し、微小血栓障害の制御をはかることによって、異種移植肺急性期機能不全の克服を目指す新たな治療法の確立が可能であるかについて検討を行った。

(1)目的1: Ex-vivo 異種肺移植モデル確立および GalT-KO ブタ肺移植による治療効果の検討

ヒト血液によりブタ肺を体外循環回路で灌流する ex-vivo 異種肺移植モデルを確立し、そのモデルを用いて通常のブタと GalT-KO ブタの肺を用いた場合で、移植肺の

生存を経時的な生理機能や組織学的・血液学的評を加え評価する。Ex-vivo 移植モデルは、肺の生理学的機能に加え、頻回な血液・組織採取によるモニタリングが可能であり、特に急性期評価においては in-vivo 移植モデルにはない利点を有する。

(2)目的2: in-vivo 同所性異種肺移植モデルを用いた異種移植肺の急性期機能不全を克服する戦略の確立

肺には豊富に血管内皮細胞が含まれるため、異種間での凝固因子や抗凝固・抗炎症因子の不一致により、血管内皮障害は強い凝固反応・炎症反応を惹起し、急性期のグラフト機能不全を引き起こす。一酸化炭素 CO による血管内皮細胞保護効果が異種肺移植の急性期障害を軽減することが可能であるかという点を中心に、ブタ・カニクイザル間異種肺移植モデルに適応し、前臨床実験としての治療効果や臨床応用性を検討する。またあわせて、目的1で評価を行った Ex-vivo 実験モデルと in-vivo 肺移植実験結果の相同性を評価する。

3. 研究の方法

(1) Ex-vivo 異種肺移植モデル確立および GalT-KO ブタ肺移植による治療効果の検討 (目的1)

摘出心肺ブロックを体外循環回路に接続し、ブタ/ヒト血液を用いて灌流を開始後、段階的に灌流量を増やし、1) Group 1 (n=3): 通常のブタ肺を自己ブタ血液で灌流、2) Group 2 (n=2): 通常のブタ肺をヒト血液で灌流、3) Group 3 (n=2): GalT-KO 肺を異種ヒト血液で灌流する各群で、生理機能(肺動脈圧、酸素化能等)、血液学的(血算、凝固・線溶系因子等)、病理学的に灌流肺を評価する。

(2) ブタ・サル間異種肺移植モデルの確立と急性期移植肺機能不全の制御法の確立(目的2)

GalT-KO ブタの左肺を摘出し、カニクイザルに対し同所性に左肺移植を行う。免疫抑制療法として術前に抗サイモグロブリンによる T 細胞除去とリツキシマブ投与による B 細胞除去を、術後はタクロリムス、MMF、抗 CD40L 抗体を中心とする療法を用いる。投薬のため左右内頸静脈にカテーテル留置を行い、確実な免疫抑制剤投与を行う。術前・術後の血液検査として、血算、凝固系因子、サイトカイン、補体活性等を測定し、移植肺評価は経時的な胸部 X 線、移植肺生検により評価を行う。

移植時にドナー (GalT-KO ブタ) に対し、これまでの同種肺移植実験で効果が得られた 180 分間の 250 ppm 一酸化炭素吸入を加え、治療効果を評価した。また、ドナーおよびレシピエントに対するステロイド投与によって術後超急性期のサイトカインストームが

ら生ずる血管内皮障害を制御することが可能であるかを評価した。更に、ドナーに対してデスプレッシンを投与することによって、異種肺移植後に生ずるプタ vWF を介する異常な血小板活性化を制御し、微小血栓障害の制御をはかることが可能であるかを評価した。

4. 研究成果

(1)GalT-KO プタ肺による急性期異種肺機能不全の制御 (Ex-vivo 異種肺移植モデル)

Group 1 では軽度な肺血管抵抗上昇 (灌流前 25%上昇) のみで安定した灌流が可能であったが、Group 2 では、灌流量の増加に伴い肺血管抵抗上昇が進行し、開始 60 分以内に100%以上の上昇となった。Group 3 では、灌流開始 30 分で30%の肺血管抵抗上昇を認めたものの、その後の上昇は緩徐であった (図 1)。Group 2 での灌流 60 分での著名な血小板数減少に比べ (灌流前値の 14%) Group 3 では前値の 50%減少に留まった (図 2)。

病理・免疫組織検査では Group 2 で生じた顕著な肺胞内出血、血栓形成、好中球浸潤が Group 3 では著明に減少し (図 3)、IgM や補体沈着も軽度であった。

図1. GalT-KO肺による肺血管抵抗上昇の抑制

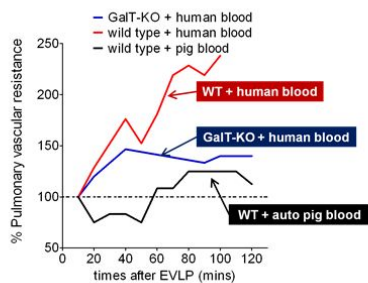


図2. GalT-KO肺による血小板減少の抑制

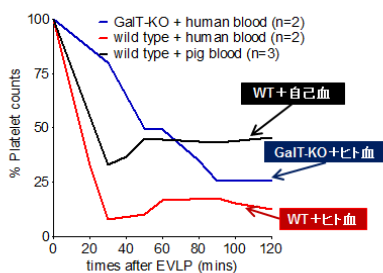
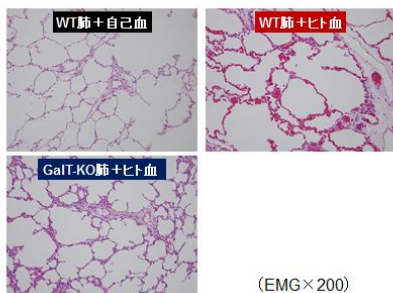


図3. GalT-KO肺による出血・血栓の抑制

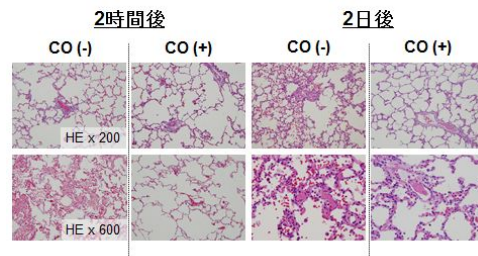


(2)In-vivo 肺移植モデルの確立およびドナーに対する一酸化炭素、バゾプレッシン投与による急性機能不全制御の可能性

In-vivo 移植モデル (ミニプタ・カニクイザル左同所性肺移植) において (n=2)、Ex-vivo モデルと同様に GalT-KO プタを用いた肺移植では、術後 2 時間の時点で血小板減少は約 40%前後に抑制され、Ex-vivo 実験の再現性が得られたとともに、組織学的にも超急性拒絶反応は抑制されており、GalT-KO プタ肺を用いることによる超急性の移植肺機能不全制御に対する効果が明らかとなった。

Gal-KO プタへの CO 投与による移植肺血管内皮細胞保護効果に基づく異種移植肺生着延長効果を検討したところ (n=4)、病理学的には術後 2 日までの時点で移植肺障害抑制効果が確認された (図 4)。しかし、microangiopathy による移植肺機能不全は抑制されず、急性期異種移植肺機能不全の克服には、CO に加え更に治療を追加する必要性が示唆された。

図4. CO吸入によるPaO₂好中球浸潤血栓形成抑制(再灌流2時間・2日後)



更に、CO に加え、ステロイド、デスプレッシンの投与効果を評価したところ、1) ステロイドの投与のみでは急性期の肺機能不全に対する更なる投与効果が得られなかったが、2)デスプレッシンの投与によって、術後 2 日目までは移植肺は良好に機能し、かつ血栓形成は軽度であることが明らかとなった。しかしその後急速に血栓形成が進行し、術後 3 日にはびまん性に血栓形成から肺出血を呈し、移植肺機能不全を呈した。

以上のように、現時点では、一酸化炭素、あるいはデスプレッシンなど、異種移植肺の急性期 (移植後 2 日間) 機能不全の抑制効果を有する治療法が見出されてきた。しかし、長期効果が得られる治療戦略を確立するためには、今後これらの知見を基にして、特に新たな遺伝子改変プタ (ノックアウトあるいは遺伝子導入プタ) の開発が異種移植肺急性機能不全の克服には必須であることが示唆される結果であると考えた。

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](計3件)

Shimatsu Y, Yamada K, Horii W, Hirakata A, Sakamoto Y, Waki S, Sano J, Saitoh T, Sahara H, Shimizu A, Yazawa H, Sachs DH, Nunoya T. Production of cloned NIBS (Nippon Institute for Biological Science) and -1, 3-galactosyltransferase knockout MGH miniature pigs by somatic cell nuclear transfer using the NIBS breed as surrogates. Xenotransplantation. 2013; May-Jun; 20(3):157-64 (査読有). doi: 10.1111/xen.12031.

Yamada K, Scalea J. Current progress in xenogeneic tolerance. Curr Opin Organ Transplant. 2012 Apr; 17(2): 168-73 (査読有).

doi:10.1097/MOT.0b013e32835090f6

山田和彦、佐原寿史。異種臓器移植の臨床応用をめざして - 前臨床異種移植はここまで進んでいる。医学のあゆみ。2011;237(5):559-66 (査読無)。http://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiArticleDetail.aspx?BC=286290&AC=10269

[学会発表](計6件)

佐原寿史、山田和彦。シンポジウム「肺移植の現況と将来展」GalT-KO ブタ・カニクイザル間異種肺移植実験の現状 - 異種腎臓移植との比較による治療標的の解明と対策。第31回日本呼吸器外科学会総会。2014.5.29-30 (30)。東京

Sahara H, Nagashima H, Miura K, Waki S, Kawai A, Nakano K, Matsunari H, Arai Y, Sekijima M, Tasaki M, Setoyama K, Shimizu A, Date H, Yamada K. Attenuation of hyperacute dysfunction and microangiopathy by the treatment of carbon monoxide in GalT-KO pulmonary xenotransplantation. 12th Congress IXA (International Xenotransplantation Association 2013). 2013.11.10-13 (12)。Osaka, Japan

Sahara H, Nagashima H, Sekijima M, Tasaki M, Setoyama K, Matsunari H, Nakano K, Date H, Shimizu A, Yamada K. Attenuation of hyperacute dysfunction and coagulopathy in GalT-KO pulmonary xenotransplantation. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation. 2013.9.3-6 (5)。Kyoto, Japan

佐原寿史、清水章、関島光裕、田崎正行、瀬戸山健太郎、長嶋比呂志、伊達洋

至、山田和彦。GalT-KO ブタ肺による急性期グラフト機能不全抑制効果の体外循環肺移植モデルによる評価。第29回日本呼吸器外科学会総会。2012.5.17-18 (18)。秋田市

Sahara H, Nagashima H, Sekijima M, Tasaki M, Setoyama K, Matsunari H, Nakano K, Date H, Shimizu A, Yamada K. Prevention of hyper-acute pulmonary xenograft dysfunction using GalT-KO swine in an ex-vivo lung perfusion model. CTS (Cell Transplant Society) -IXA (International Xenotransplantation Association) 2011 Joint Congress. 2011.10.23-26 (26)。Miami beach, FL, US

佐原寿史、長嶋比呂志、齋藤敏樹、島津美樹、伊達洋至、清水章、山田和彦。シンポジウム2。次世代の移植医療に向けて：先端技術を応用した移植医療の開発「臨床応用を目指したブタ・サル間異種移植実験」第47回日本移植学会総会。2011.10.4-6 (6)。仙台市

[その他]

ホームページ等

http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~xeno tx/

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐原 寿史 (SAHARA, Hisashi)

鹿児島大学 医用ミニブタ・先端医療開発研究センター 准教授

研究者番号：90452333

(2)研究分担者

山田 和彦 (YAMADA, Kazuhiko)

鹿児島大学 医用ミニブタ・先端医療開発研究センター 教授

研究者番号：40241103

長嶋 比呂志 (NAGASHIMA, Hiroshi)

明治大学・農学部・教授

研究者番号：50318664

伊達 洋至 (DATE, Hiroshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院) 教授

研究者番号：60252962

(3)連携研究者

清水 章 (SHIMIZU, Akira)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：00256942