

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670547

研究課題名(和文) siRNAを用いた肝移植グラフトの革新的体外治療法の開発

研究課題名(英文) Development of extracorporeal therapeutic method of liver grafts using siRNA during machine perfusion preservation

研究代表者

武富 紹信 (Taketomi, Akinobu)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70363364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、機械灌流法を応用した体外siRNA導入法を開発である。低温状態下でのsiRNA導入は困難なこと、また、siRNAの担体である灌流液は血液成分を含まない方がよいことから、実験モデルとして20℃で180分間の非冷温期を確保したsub-normothermic oxygenated machine perfusionをマウス肝移植モデルで実現した。このモデル上で体外siRNA導入を行ったところ、この条件下ではsiRNAの体外導入は成立しなかった。ドナーsiRNA導入モデルを用いた検討より20℃前後に維持された肝臓におけるsiRNAの取り込み効率は不十分であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We conducted this study to develop an extracorporeal siRNA transfection method during machine perfusion. Because siRNA could not be transfected under hypothermic condition and perfusion fluid without blood components was preferable as a carrier of siRNA, we achieved sub-normothermic oxygenated machine perfusion (20℃, 180min) in mouse liver transplantation model. We performed extracorporeal siRNA transfection on this mouse model, however, siRNA could not be introduced into liver grafts under such perfusion conditions. According to the results of donor siRNA transfection model, it was suggested that siRNA up-take activities of the liver grafts were not maintained at sufficient levels at 20℃.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝移植 機械灌流 グラフト治療

## 1. 研究開始当初の背景

肝移植において、グラフト再灌流により惹起される細胞内シグナルの活性化やサイトカイン・ケモカインの産生などの傷害性反応は、虚血再灌流傷害を始めとする様々な移植後グラフト傷害の発症および進行を助長し、その予後に多大な影響を及ぼす。

肝臓グラフトの虚血再灌流傷害を軽減する方法として、現在最も有望視されているのは機械灌流法であり、すでに臨床研究における有用性を報告している移植施設もある。我々は、肝移植における機械灌流法に関する基礎研究を行ってきており、動物実験系として冷温機械灌流法を導入したマウス肝移植モデルの確立に世界で初めて成功している。

本研究では、グラフト傷害の軽減を目的とした機械灌流法をさらに移植前のグラフト修復を目的とした体外治療への拡張を目的として、灌流装置上における灌流液を介した体外 siRNA 導入法に関する研究を行う。siRNA は細胞内に取り込まれると、標的遺伝子の mRNA の切断を誘導することにより遺伝子抑制効果を発現する。siRNA はウイルスベクターを用いないリポフェクション法により肝臓への導入が可能であり、効果発現後はゲノムに取り込まれることなく消耗性に消失するため、移植後の数日間に一過性に惹起される虚血再灌流傷害関連性遺伝子に対する抑制方法としては機能面からも安全面からも理想的と考えられる。また、siRNA は任意の遺伝子を標的として作製することができるため拡張性が高く、複数の標的遺伝子発現を複合的に抑制することも可能となる。

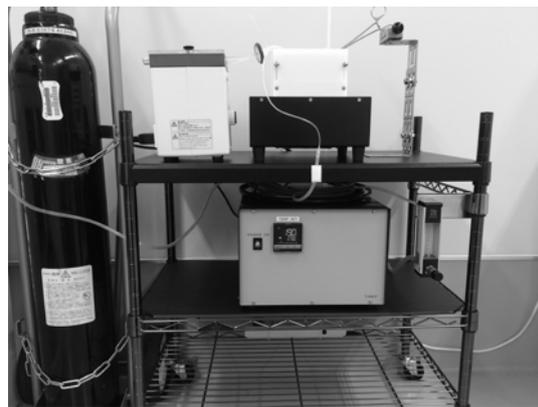
## 2. 研究の目的

肝移植における虚血再灌流傷害に対する新規体外グラフト治療法として、機械灌流法を応用した体外 siRNA 導入法を開発すること

## 3. 研究の方法

### 灌流装置

我々が開発したマウス肝臓用体外灌流装置はグラフトに流入路カテーテルと流出路カテーテルを挿入し、ローラーポンプにより灌流回路内に灌流液を循環させる。灌流回路には、膜型人工肺モジュールが組み込まれており灌流液の酸素化が可能である。また、グラフト保存容器および灌流回路の大部分は温度制御装置に埋め込まれており、室温環境下で任意の保存温度に設定可能である。従ってこの体外灌流装置を用いれば、マウス肝臓を任意の温度で長時間の酸素化灌流することが可能であり、全ての操作は顕微鏡視下に行うことができる。



### ドナー術式

吸入麻酔下に胆嚢の摘出、肝下部下大静脈の剥離、右副腎静脈および右腎静脈の切離、固有肝動脈の切離、総胆管へのステント挿入、幽門上静脈の切離、門脈の剥離を行った。陰茎静脈よりヘパリンを投与し、左腎静脈および脾静脈を結紮した後、胸腔内および肝下部下大静脈を切開し、冷温乳酸リンゲル液にてフラッシュした。門脈、脾静脈、肝下部下大静脈、左腎静脈および肝上部下大静脈を離断し、グラフトを摘出した。

### バックテーブル処理

グラフト摘出後、門脈および肝下部下大静脈にカフを装着し、肝上部下大静脈に 10-0 ナイロン糸をかけた。バックテーブル処理は、氷冷によるグラフト冷却したに行った。

### レシピエント手術

吸入麻酔下に右副腎静脈の切離、肝下部下大静脈の剥離、固有肝動脈の切離、総胆管への仮ステント留置を行った。肝臓を受動した後、肝下部下大静脈、門脈、肝上部下大静脈をクランプし、肝臓を摘出した。グラフトを挿入し、肝上部下大静脈を縫合法、門脈をカフ法により吻合し、再灌流を行った。肝下部下大静脈をカフ法により吻合し、胆管をステント法により再建した。



#### ドナー内 siRNA 導入

siRNA 導入はリポフェクション法により行い、導入試薬には Invivofectamine 2.0 (Live technologies) を用いた。

siRNA-Invivofectamine complex をドナーマウスの陰茎静脈より投与した。siRNA 投与量は 12.5µg/mouse とした。

#### 体外 siRNA 導入

機械灌流状態の肝臓グラフトへの siRNA 導入は、灌流液を介した経門脈投与により行う。非冷温機械灌流下の siRNA 導入では、復温開始 15 分後 (平均グラフト温度は 19.3°C) より回路内への siRNA-Invivofectamine complex の投与を行った。siRNA 投与量は 50µg/liver とした。

#### 4. 研究成果

我々は、まず冷温条件下での siRNA 導入の条件検討を行った。しかしながら、4°C でインキュベートされたマウス肝細胞株 AML12 に対しては、十分な siRNA 導入を行うことはできず、マウス肝移植モデルにおいて浸漬保存下および灌流保存下にある肝臓グラフトに対して保存液および灌流液を介した冷温下 siRNA 導入を行ったところ、レシピエントにおけるノックダウン効果は得られなかった。これらの結果から、我々は冷温条件下での siRNA 導入は困難であり、十分な量の siRNA の取り込みにはグラフトにおける十分な代謝レベルの維持が必須であると考えに至り、灌流保存中に非冷温期を設け、その間に siRNA 導入を行う方針とした。

我々は、この非冷温グラフト灌流保存法の開発のため、まず灌流装置に小型気液コンタクターを用いた灌流液の酸素化モジュールの組み込みを行った。また、保存液および灌流液を William Medium E に L-グルタミン酸、ヒドロコルチゾン、ヘパリン、インスリンおよび抗生剤を添加した sWME に変更した。この灌流装置上で灌流温度を 20°C とする Sub-normothermic oxygenated machine perfusion を確立する方針とした。

体外 siRNA 導入法では、限られた保存時間において可能な限り灌流時間を長くすることが望ましいが、それまでの機械灌流法では、グラフトと灌流装置との接続操作が複雑で灌流開始までに時間を要し、また、機械灌流を終了し、グラフトを灌流装置から取り外すまでバックテーブル処置 (門脈および肝下部大静脈へのカフ装着および肝上部大静脈への縫合糸の取り付け) が行えないためレシピエント手術開始前に灌流を停止し、冷温浸漬保存に切り替える必要があった。また、流出路抵抗によるグラフト浮腫の危険性も問題であった。

そこで、我々はこれらの問題点を改善するため、灌流装置および術式を一部改変した。グラフトは一般的なマウス肝移植モデルと同様に、肝上部大静脈を離断して摘出することとした。灌流装置と門脈の接続部を、カフを装着した門脈の外形に合わせたコネクタに門脈側を挿入する形式とした。肝上部および肝下部大静脈は解放のままとし、保存液中に自然流出する形式とした。灌流液は保存液を再循環させる形式とし、二重のフィルターをかける事により品質を維持した。この方法では、灌流前にグラフトのバックテーブル処置は完了しており、灌流装置からの離脱の容易であるため、機械灌流はレシピエントへのグラフト挿入直前まで継続可能であった。これにより灌流装置上において 20°C で 180 分間の体外導入時間が確保出来るようになり、その移植後成績も大幅に改善した。



このモデル上で体外 siRNA 導入実験を行ったところ、この条件下では siRNA の体外導入を成立させることはできなかった。グラフト摘出前にドナー体内で siRNA 導入を行う in vivo siRNA transfection モデルを用いた検討では、グラフト温度が体温に保たれた通常ドナーでは、siRNA の全身投与により肝臓グラフトへの導入が良好に行われるのに対し、開腹によるグラフト温度が室温程度に低下したドナーでは、同様の siRNA 投与により導入は成立せず、20°C 前後に維持された肝臓における siRNA の取り込み効率は不十分であることが示唆された。

我々は、本研究で得られた知見をもとに、今後は、in vivo siRNA transfection モデルにおける詳細な導入条件の検討と灌流温度を 37°C まで上げた normothermic oxygenated machine perfusion の確立を行い、肝臓グラフトへの体外 siRNA 導入法の開発を継続する。

## 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)

[学会発表] (計 4 件)

1. Fujiyoshi M, Taketomi A. Sub-normothermic Machine Perfusion Preservation for Graft Selection and Therapies in A Mouse Liver Transplantation Model. AASLD Liver Meeting 2014, Boston, USA, Nov. 2014.

2. 藤好真人, 武富紹信. マウス肝移植における酸素化機械灌流法の導入と非冷温保存の実現. 第 50 回日本移植学会総会, 京王プラザホテル (東京), 2014 年 9 月.

3. Fujiyoshi M, Taketomi A. A Mouse Model of Orthotopic Liver Transplantation after Sub-normothermic Acellular Oxygenated Machine Perfusion. The 12th Congress of the International Society for Experimental Microsurgery, The Westin Miyako Kyoto, Kyoto, Japan, Apr. 2014.

4. 藤好真人, 植木伸也, 武富紹信. 機械灌流保存を導入したマウス肝移植モデル. 第 114 回日本外科学会総会, 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 (京都), 2014 年 4 月.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武富 紹信 (TAKETOMI, Akinobu)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 70363364