

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293355

研究課題名(和文) マージナルグラフトに対する移植前臓器保護・機能回復戦略に関する前臨床研究

研究課題名(英文) Preclinical study on protection strategy and function recovery strategy of preimplantation for marginal graft

研究代表者

日下 守 (Kusaka, Mamoru)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：40309141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：炎症前駆物質の活性化が組織傷害を惹起するマージナルドナー腎に対し、種々の細胞保護効果を有する薬剤に焦点を当て、詳細な免疫反応評価が可能な組織適合性抗原MHC確立ミニブタを用いた前臨床実験によって、ドナー、レシピエント、グラフト持続灌流保存中への薬物投与による臓器保護・修復効果を検討し、マージナルドナー臓器を生体臓器に匹敵しうる状態に修復・回復する戦略の確立をはかる実験を実施した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on agents with various cytoprotective effects on marginal donor kidneys where activation of inflammatory precursors caused tissue injury. Using established MHC miniature swine which can evaluate detailed immune reaction, we investigated the effect of organ protection and repair by drug administration to donor, recipient, graft persistent perfusion preservation. We conducted experiments to establish a strategy to restore and recover marginal donor organs to conditions comparable to living organs.

研究分野：移植・再生医療

キーワード：移植・再生医療 腎移植 常温腎臓持続体外灌流保存 マージナルドナー 臓器保護 前臨床実験 ミニブタ

1. 研究開始当初の背景

重篤な臓器不全に対する移植医療の効果は広く認知されるが、ドナー不足は極めて深刻である。ドナー適応拡大としてマージナル・心停止ドナーなど条件の悪い臓器を用いた移植が期待されるが、虚血再灌流障害 (Ischemia-Reperfusion Injury: IRI) 等の急性臓器不全の危険に加え、免疫因子活性化による急性・慢性拒絶の誘因となりうる。また、術後永続的な複数の免疫抑制剤服用にも関わらず、抗体性拒絶や細気管支炎など慢性期の移植臓器機能不全のため臓器移植の長期予後は必ずしも改善していない。ドナー適応拡大によるドナー不足の解消や、移植後長期予後の改善を図るためには、条件の悪いドナー臓器を保護・修復し、術後の機能回復促進をはかること、永続的な免疫抑制剤を必要としない免疫寛容誘導戦略を確立することは移植医療の向上のためには克服すべき必須の課題である。

本申請は、炎症前駆物質の活性化が組織傷害を惹起するマージナルドナー臓器 (腎) に対し、種々の細胞保護効果を有する医療ガス (一酸化炭素 Carbon monoxide: CO あるいは硫化水素 Hydrogen sulfide: H₂S) 炎症惹起物質である High mobility group box 1 (HMGB1) の制御、さらには補体活性抑制因子や mTOR 阻害剤などに焦点を当て、ドナーやレシピエントへの薬物投与、あるいはグラフト持続灌流保存中の投与による臓器保護・修復効果を検討し、マージナルドナー臓器を生体臓器に匹敵しうる状態に修復・回復する戦略を大動物モデルで確立する。本研究の成果は、臨床応用可能な実践的橋渡し研究として、ドナー適応拡大や、移植短期のみならず長期成績の向上に直結し、レシピエントへの負担の少ない有力な新規治療に応用しうるものである。

2. 研究の目的

深刻なドナー不足を背景に、厳しい臨床条件のいわゆるマージナルドナーを用いてドナー適応の拡大を行うことは、IRI に伴う急性臓器不全の増悪や、免疫学的因子の活性化による急性・慢性拒絶反応誘発が懸念される。

本研究では、代表者のラット腎移植実験、心停止下献腎移植臨床例から得た知見と、分担者が確立した主要組織適合性抗原 (Major Histocompatibility Complex: MHC) 確立ミニプタを用いた腎移植・IRI・脳死モデルを融合させ、マージナルドナー臓器 (腎) の機能保持および修復によってドナー拡大および長期予後向上に直結する戦略の開発をはかるものである。大動物を用いた前臨床研究でありながら、詳細な免疫反応評価が可能な組 MHC 確立ミニプタを用いた研究によって、新たな IRI 抑制あるいは拒絶反応抑制効果治療法を確立することをその目的とする。また薬物の投与方法として、従来からのレシピエント投与のみならず、ドナーへの投与、さら

にはドナー臓器への直接投与を可能とする移植前臓器の常温灌流による臓器保存法 (Normothermic Machine Perfusion: NMP 法) に着目し、さらに臨床応用性の高い新たな治療法の確立をはかることも課題とする。

特に本研究では、脳死および心停止ドナー腎移植後の炎症性 Innate immunity の制御によるマージナル臓器の更なる機能回復促進効果について評価する目的で、種々の細胞保護効果を有する CO や H₂S、炎症惹起物質 HMGB1 の制御 (抗 HMGB1 抗体) をはじめとする薬物に焦点をあて、詳細な免疫学的・病理学的・分子生物学的評価により各々の治療効果の機序を明らかにする。

3. 研究の方法

目的 1: 脳死ならびに心停止ドナー腎の移植前臓器保護・機能回復戦略の開発 (炎症性 innate immunity の制御によるマージナル臓器の更なる機能回復促進効果)

Study 1: 脳死ミニプタドナーへの一酸化炭素 CO 投与による腎移植虚血再灌流障害 IRI 抑制および移植臓器生着延長効果の検討

われわれはこれまでのミニプタ肺 IRI や肺移植実験において、CO が生体内情報伝達物質として働き、また抗炎症や抗アポトーシスなどの細胞保護作用を持つことに着目し、CO 吸入が肺移植後 IRI 抑制および移植肺の生着延長効果を有し (Sahara H. J Thorac Cardiovasc Surg & Transplantation 2010)、更にその効果は、ドナー個体への CO 吸入が鍵を握ることを報告した (Sahara H. Organ Biology 2012)。これらの準備実験をもとに、申請実験では CO 吸入効果を脳死腎移植モデルに応用し、ドナーへの CO 投与による腎移植後 IRI 抑制評価を行う。また、ドナー CO 吸入効果の発現機序解明をはかるため、血管内皮細胞保護や炎症細胞活性の抑制に基づく臓器保護や、CO による樹状細胞の immunogenicity の変化、ドナー臓器細胞でのマイクロアレイを用いた遺伝子の up regulation/down regulation に着目した分子生物学的解析、病理組織学・免疫学的な評価を行う。

移植動物: MHC 確立クラウン系ミニプタを用いた腎移植実験を 2 群 (CO 群、CO 非投与の対照群) に分ける。腎移植は、MHC 適合間 (C1→C1) の組み合わせで行い、移植後のアロ応答性による拒絶反応の影響を排除し、移植周術期の炎症反応がグラフトに与える影響を主として評価をできるモデルを用いた評価を行う。

手技・対象臓器・評価: 脳死誘導 3 時間後を経た動物に対し、3 時間 CO 吸入あるいは CO 無治療後に臓器を摘出し腎移植を行う。唯一の移植後免疫抑制療法として我々の既報 (Transplantation 2000) の 12 日間の持続タクロリムス投与 (血中濃度: 35-45 ng/ml) を用い、移植臓器生存は、生化学 (Cr 等)

定期的な生検（病理・分子生物学的解析）で評価する。

脳死誘導：硬膜外バルーン拡張により脳死を誘導する。脳死3時間後には、炎症性サイトカイン(IL-1 β /IL-6:血清・組織内 mRNA 発現)が上昇することを準備実験で確認している。

CO 吸入：経気道的に CO 吸入を行い、血中 COHb 濃度 15%に調節する(CO 濃度 200-250 ppm)。この濃度はヒトへの急性毒性の危険性が極めて低く、またこれまでの実験で最大 390 分間の CO 吸入でもミニプタに副作用が生じないことを確認している。加えて、CO に対するガス警報器(理研 GX-3000)を実験室に配備し、安全に十分配慮した実験体制を整えている。これらの手法は既に国際誌に掲載され(Sahara H. Transplantation 2010)、国際的な安全性が確認された方法である。

移植臓器の生検による病理学的評価：ドナー脳死誘導前・CO 吸入前・吸入後、ならびに同種移植後 2 時間、2、7、14、28 日、以後 4 週毎にグラフト生検を行い、H&E 染色、Masson Trichrome 染色(線維化病変)、Elastica-Masson 染色(血管病変)による光顕評価を行う。

移植腎検体の分子生物学的解析 mRNA 全遺伝子と miRNA に対する網羅的解析：Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) と miRNA アレイを用いた解析を実施し、CO 群と対照群を比較検討し、対象となる miRNA を選択し、遺伝子制御のターゲット遺伝子を絞り込む。また、ドナー腎生検の網羅的遺伝子解析を行い up regulation/down regulation された遺伝子を中心に CO 群と対照群を比較する。

Study 2：腎 IRI に対する硫化水素 H₂S の障害抑制効果の検討

(H₂S は、これまで有毒ガスとしての印象が強く持たれてきたが、近年、生体内でも生産される情報伝達物質である事が明らかとなり、さらに外因性に投与した H₂S には抗炎症効果があることが報告されている。H₂S の医療への応用として、これまでに、マウスやラットを用いた IRI 抑制効果が報告されているが、大動物を用いた検討は少ない。CO と同様に H₂S も移植医療への応用が期待されることから、周術期に H₂S 治療を行うことによる腎 IRI 抑制効果、安全性評価、作用機序の解明を行う。

腎 IRI の誘導：左腎動静脈を 120 分間遮断し、腎 IRI を誘導する。

硫化水素投与方法：H₂S 供与体として知られる硫化ナトリウム(Sodium sulfide: Na₂S)を再灌流 10 分前から再灌流 30 分後にかけて計 40 分間にわたり持続投与を行う。

実験群：H₂S 治療を行わない対照群、頸静脈から全身性に Na₂S を持続投与した群、虚血腎に対し、腎臓選択的に Na₂S を持続投

与した群の 3 群に分けて、投与効果と投与経路による効果を検証する。

腎 IRI 評価：経時的な血清 Cr、腎生検による腎機能評価、および血清サイトカインあるいは腎臓内での炎症性サイトカイン発現をもとに、H₂S による効果と作用機序を検討する。

Study 3：炎症惹起因子 HMGB1 の制御による腎 IRI 抑制効果評価および臨床腎移植での HMGB1 評価の有用性の検討

HMGB1 は壊死細胞や損傷細胞、マクロファージや単球から受動的に放出され、周辺細胞からの炎症性サイトカインの放出を誘導し、この働きにより IRI が惹起される。120 分温阻血心臓死モデルで、HMGB1 の早期放出が他の炎症性サイトカイン(IL-1 β 、TNF- α)上昇に先立ち、IRI 病変進展の鍵となることを示し、更に抗 HMGB1 抗体投与(1mg/kg)が IRI を抑制すること(部分効果)を、大動物モデルによって初めて示し論文報告した(Transplantation 2014)ことに基づき、移植モデルに対する HMGB1 の有効性について、ミニプタ移植モデルおよび臨床検体を用いた評価を行った。

実験モデル：24 時間冷保存腎を用いた腎移植時に対し、移植腎の血流再開直前に HMGB1 中和抗体を 1mg/dl 静脈投与し、術後早期の血清 Cre 値に及ぼす影響を評価する。

臨床検体を用いた HMGB1 のバイオマーカーとしての評価：生体腎移植および献腎移植の移植前後の血清 HMGB1 を測定し、バイオマーカーとしての可能性を評価する。

目的 2. ドナー臓器への直接投与を可能とする移植前臓器の常温灌流による臓器保存法(Normothermic Machine Perfusion: NMP 法)の確立とドナー臓器治療への応用

現在、ドナー臓器保存は、臓器の代謝抑制を目的とする浸漬冷却保存法が主体である。浸漬保存に対し、生理的条件下で保存液の持続灌流を行う常温灌流保存(NMP: normothermic MP)法は、保存臓器に対し、機能評価、機能回復、機能向上(薬物・遺伝子投与)、保存時間延長などを行える可能性があり、条件の悪い臓器を用いる際の術前評価や治療の可能性から注目を浴びている。マージナルドナー臓器を生体臓器に匹敵しうる状態に修復・回復する戦略を大動物モデルで確立することを目的とする本実験において、そのスタートとして NMP 法の確立をはかる。

実験方法：塩化カリウム静脈投与による心停止後に、大動脈・下大静脈付きで両腎を摘出し、2 時間 37℃におき強い温虚血を惹起する(温度条件一定化のため 37℃に調整)。摘出両腎の片方の腎動脈、静脈、尿管にカニューレーションを行い(対側は摘出)、遠心ポンプを用いた体外循環回路に接続する。120

分灌流を行い後述の指標を評価する。また120分後に確立した手法により腎移植を行う。

NMPの設定：ヘパリン化リンゲル液をベースとする灌流液を用いて、37℃、平均動脈圧を85 mmHgに設定し灌流する。

灌流液：ヘパリン化リンゲル液に、MHCが一致する全血から分離した新鮮赤血球を添加する。また糖やビタミンなどの栄養剤や、ステロイド、血管拡張剤などを設定量添加する。さらに灌流液を随時検査し、その測定結果に応じ、灌流液のpHや血糖を生理的範囲に調整する。

灌流中測定データ：経時的な灌流圧や灌流流量、尿量、動脈・静脈採血の酸素化や組織酸素消費量、電解質・糖・生化学検査（腎機能や、ALTやLDHなど組織障害指標）など測定する。

移植後の腎機能や生検評価等は、目的1の実験に準じて行う。

4. 研究成果

目的1：脳死ならびに心停止ドナー腎の移植前臓器保護・機能回復戦略の開発（炎症性innate immunityの制御によるマージナル臓器の更なる機能回復促進効果）

Study 1：脳死ミニブタドナーへの一酸化炭素CO投与による腎移植虚血再灌流障害IRI抑制および移植臓器生着延長効果の検討

脳死後3時間を経たドナーに対し3時間CO吸入（血中COHb濃度は15-20%に維持）を行った移植症例では、CO吸入を行わない移植症例と比べ、術後早期のクレアチン値の比較において明らかな改善を認めなかった。我々が行った同様の条件での肺移植実験では、このCO投与方法により有意な移植肺生着延長効果が見られたことと相反する結果であった。臓器間での効果の相違という結果から、肺移植に比べ腎移植では脳死後6時間での臓器内炎症性サイトカイン発現が低値でありCOによる有効な抗炎症効果が働かなかった可能性、腎臓と肺での抗原提示細胞数の違い、臓器間での有効なCO投与方法や投与量が異なる可能性など、本モデルでは有効な効果が得られなかったことに対する考察点が挙げられたため、その発展研究として、Study 2として新たに硫化水素H₂Sの腎IRI抑制効果を検証する実験を行った。

Study 2：腎IRIに対する硫化水素H₂Sの障害抑制効果の検討

頸静脈から全身性Na₂Sを投与した群、あるいは腎臓選択的にNa₂Sを投与した群のいずれにおいても、無治療の対照群と比較して、120分腎温虚血/再灌流後の血清クレアチン上昇は抑制された。特に腎臓選択的にNa₂S治療を行った群では、無治療群に対し有意なCre低下を認めた（再灌流3日後のCreが無治療群では9.47 ± 1.12 mg/dlであるのに対し、腎臓選択的Na₂S投与群では

5.99 ± 1.07 mg/dlと有意に抑制。同様に再灌流4日後でも無治療群の8.64 ± 1.57 mg/dlは腎選択的治療群で4.43 ± 0.79 mg/dlと有意に低下）。

病理学的にも、無治療群でみられた尿細管障害を主体とする腎IRI像は治療により改善し、特に腎臓選択的にNa₂Sを行った群ではこの効果が顕著であった。更に腎臓選択的および全身性のNa₂Sの投与効果が異なる機序を解明するために血清および組織での炎症性サイトカインの評価を行ったところ、再灌流2時間後の血清HMGB1やTNF-αの上昇が腎臓選択的投与によって抑制されること、かつ腎生検組織中の再灌流2時間後の炎症性サイトカイン（IL-18）産生が有意に抑制されたことが明らかとなった。

なお、この実験において、循環動態や麻酔からの覚醒を始め、明らかな副作用は認めなかった。

これらの結果は腎IRIに対し、H₂Sが安全性を備えた有効な新規治療薬になる可能性を示すとともに、腎臓への局所的な投与がより有効であったという結果から、今後ドナー腎臓への周術期H₂S投与の有効性が期待される結果であると考えられる。

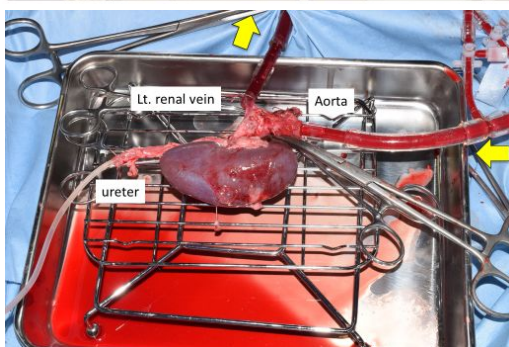
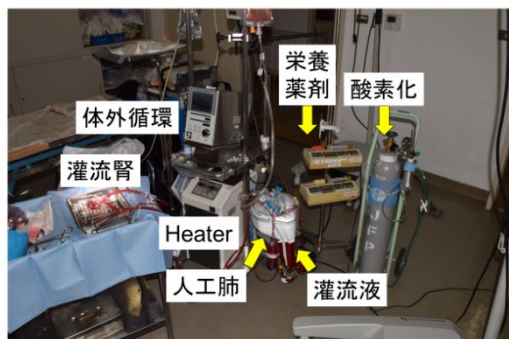
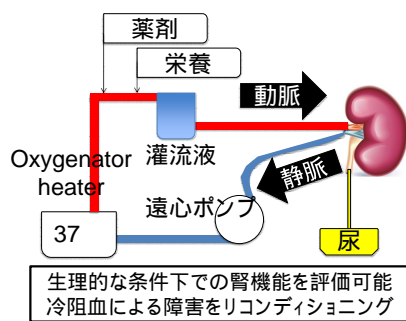
Study 3：炎症惹起因子HMGB1の制御による腎IRI抑制効果評価および臨床腎移植でのHMGB1評価の有用性の検討

ミニブタ移植モデルによる評価：120分温阻血心臓死モデルで、HMGB1の早期放出がIRI病変進展の鍵となること、更に再灌流前の抗HMGB1抗体投与（1mg/kg）がIRIを抑制するというこれまでの結果を受けて、MHC適合移植モデルを用いた検討を行った。24時間冷保存腎を用いた腎移植の際に、移植腎の血流再開（再灌流）直前にHMGB1中和抗体を1mg/dl静脈投与し、術後早期の血清Cre値に及ぼす影響を評価した。この結果、中和抗体投与例では、術後Cre値が3.91（POD1）、6.01（POD2）と、抗体非投与例の4.92（POD1）、8.34（POD2）と比較し、著明な術後腎機能の上昇抑制効果が得られた。高度障害腎を用いた移植の際にHMGB1の制御が重要となることを示唆する結果であると考え得る。

臨床検体を用いた評価：血清HMGB1の移植後の経時的変化が移植腎予後に関するバイオマーカーとなりうるかの評価を行った。移植前の血清HMGB1（ng/ml）は4.3 ± 0.5であった。生体腎移植（LD）では移植後の変化が移植直後の5.8 ± 0.6からPOD1では5.2 ± 0.4とゆるやかな上昇であったのに対して、献腎移植では移植直後が9.0 ± 1.0、POD1では6.9 ± 0.9と移植直後に著しい上昇を示すことが明らかとなった。これらは、HMGB1が移植後の腎予後に与える影響およびHMGB1制御の重要性が示唆される結果であると考えている。

目的 2 . ドナー臓器への直接投与を可能とする移植前臓器の常温灌流による臓器保存法 (Normothermic Machine Perfusion: NMP 法) の確立とドナー臓器治療への応用

既存の体外循環回路を用いて、NMP 法の確立に成功した。下図に示すような概念のもとに、設定条件で摘出臓器の灌流を行ったところ、120 分安定して体外循環回路を回すことが可能であることが明らかとなった。



灌流開始時

灌流2時間後



常温体外灌流による腎臓全体に良好な血流所見

さらに灌流中の様々な指標 (肉眼的色調、灌流圧、灌流流量、尿量、腎血管抵抗、酸素消費量、回路中の動脈・静脈血液ガス分析、AST や LDH などの組織障害指標など) と術後機能の相関を示す結果が得られており、評価系としての NMP 法の有用性が示唆される結果であった。

現在、この NMP 法により臓器灌流を行う際に薬物を投与することにより、障害腎が修

復されるか、あるいは移植後の腎機能回復が得られるかという点を明らかにする実験を進めている。

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)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Miura K, Sahara H, Sekijima M, Kawai A, Waki S, Nishimura H, Setoyama K, Clayman ES, Shimizu A, Yamada K. Protective effect of neutralization of the extracellular high-mobility group box-1 on renal ischemia-reperfusion injury in miniature swine. Transplantation. Nov 15;98(9) 2014. 937-943

掲載確定・査読有
オープンアクセス無

DOI: 10.1097/TP.0000000000000358.

佐原寿史, 関島光裕, 山田和彦 . 特集「毒ガス? いいえ治療薬です」. 【新たな治療薬としての一酸化炭素への期待】. 臨床麻酔 . 2015;39(6):855-864. 掲載確定・査読無
オープンアクセス無
DOI: なし

Kusaka M, Sugimoto M, Fukami N, Sasaki H, Takenaka M, Anraku T, Ito T, Kenmochi T, Shiroki R, Hoshinaga K. Initial experience with a tailor-made simulation and navigation program using a 3-D printer model of kidney transplantation surgery. Transplant Proc. 2015 47(3):596-9.

掲載確定・査読有
オープンアクセス無

DOI: 10.1016/j.transproceed.2014.12.045.

Kusaka M, Kubota Y, Sasaki H, Fukami N, Fujita T, Hirose Y, Takahashi H, Kenmochi T, Shiroki R, Hoshinaga K. Combined predictive value of the expanded donor criteria for long-term graft survival of kidneys from donors after cardiac death: A single-center experience over three decades. Int J Urol. 2016 23(4):319-24.

掲載確定・査読有
オープンアクセス無

DOI: doi: 10.1111/iju.13045.

Kusaka M, Okamoto M, Takenaka M, Sasaki H, Fukami N, Kataoka K, Ito T, Kenmochi T, Hoshinaga K, Shiroki R. Gene expression profiling of peripheral blood from kidney transplant recipients for the early detection of digestive system cancer . Transplant Proc. (2017 in press)

掲載確定・査読有

オープンアクセス無
DOI:10.1016/j.transproceed.2017.03.059

〔学会発表〕(計 6 件)

佐原寿史

MHC 確立クラウンミニブタによる新規治療・医療機器開発を目指す前臨床試験．BIOtech 2014 アカデミーフォーラム．2014.5.14-16 (16)．東京(東京ビッグサイト)

佐原寿史、山田和彦

「医用ミニブタを用いた前臨床研究」．クラウンミニブタを用いた移植モデルと Medical Gas ．第 3 回公開シンポジウム先進医用ミニブタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクト．2015.3.25. 鹿児島市(鹿児島大学)

山田和彦

シンポジウム 2「実験用ブタ施設の現状と今後の動向」高度前臨床移植実験：医用ミニブタを用いた大動物実験として果たすべき役割と課題 第 3 回日本先進医工学ブタ研究会．2015.10.16-17 (16)．東京(日本大学会館)

佐原寿史、関島光裕、岩永健裕、市成ゆりか、

山田和彦

シンポジウム 5「実験用ブタを用いた各種応用研究」Medical Gas を用いた新たな移植医療：硫化水素の有用性．第 3 回日本先進医工学ブタ研究会．2015.10.16-17 (17)．東京(日本大学会館)

Sahara H, Iwanaga T, Sekijima M, Waki S, Ichinari Y, Shimizu A, Yamada K

MHC-inbred CLAWN miniature swine as preclinical large animal model for transplantation. The 14th Congress of the Asian Society of Transplantation. 2015.8.23-26 (26). Singapore, Singapore

有吉勇一、佐原寿史、関島光裕、室川剛廣、岩永健裕、市成ゆりか、山田和彦．

温虚血腎に対する移植前常温持続灌流の有用性 - MHC 確立クラウン系ミニブタを用いた慢性腎移植．第 4 回日本先進医工学ブタ研究会．2016.10.17-18 (18)．三島市(東レ総合研修センター)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~xenotx/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

日下 守 (KUSAKA, Mamoru)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号： 40309141

(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

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

(3)連携研究者

星長 清隆 (HOSHINAGA, Kiyotaka)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号： 30229174

(4)研究協力者

三浦 宏平 (MIURA, Kouhei)

河合 彰浩 (KAWAI, Akihiro)

脇 詩織 (WAKI, Shiori)