

## 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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659637

研究課題名(和文) 脳死ミニブタドナー肺への間葉系幹細胞移植による新規臓器保護戦略：臨床応用への挑戦

研究課題名(英文) Establishment of a new strategy to improve graft function after lung transplantation from brain-dead donors using mesenchymal stem cells - preclinical study using MHC-inbred CLAWN miniature swine

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) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：脳死状態では、不安定な循環・代謝状態、炎症の活性化など様々な変化が起こる。ドナー拡大および移植成績の更なる向上を目指すドナー臓器保護戦略として、障害部位に集積する走化性を持ち、局所の炎症や免疫反応を抑制作用を持つ間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)に着目し、脳死ドナーへのMSC投与効果を評価する前臨床研究を開始した。その結果、ミニブタ脳死肺移植モデルの確立と特徴を評価し(脳死肺内での炎症亢進とそれに伴う拒絶反応促進)、2)ミニブタMSCの樹立(脂肪・骨髄組織)をはかり、MSCのドナー投与による移植肺虚血再灌流障害抑制と生着延長効果の評価へとつながる結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Physiologic changes at brain death (BD) would affect the organ suitability and outcome of transplantation. We first examined whether donor BD affects early lung function and graft survival using MHC-defined CLAWN miniature swine. Up-regulation of proinflammatory cytokines as early as 6h after BD induction was observed in the BD donor associated with inflammatory cell infiltrates on 2-hour and 2-day biopsies. Moreover, graft survival using BD donor was significantly shorter compared to the non-BD donor (26 days vs 47 days). Next to establish a new strategy to reduce inflammatory change after brain death, we tried to establish porcine mesenchymal stem cells (MSC) derived from bone marrow and adipose tissue, and successfully cultured them. After confirmation of the characteristics of these cells as MSC, we evaluate whether injection of MSC to brain-dead donor contribute to improve graft function and survival using preclinical lung transplant model of miniature swine.

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：移植・再生医療 トランスレーショナルリサーチ 肺移植 間葉系幹細胞 脳死 臓器保護 ミニブタ

### 1. 研究開始当初の背景

臓器移植法改正後に増加傾向を示す脳死移植であるが、ドナー不足は依然深刻である。脳死ドナーにおける肺の利用率は約 60%と米国の 3~4 倍に達するが、80~90%の肝、膵、腎、心臓には及ばない。脳死状態では、不安定な循環・内分泌代謝状態、凝固障害、炎症の活性化など様々な変化が起こるが、特に肺では、感染、肺毛細管の透過性亢進による神経性肺水腫、長期の人工呼吸管理に伴う肺障害などが問題となる。利用率を高めるために条件の悪いドナーへ適応を拡大する際には、虚血再灌流障害 (IRI) による急性臓器不全の危険だけでなく、免疫学的因子の活性化による急性拒絶や慢性拒絶の発生増加が懸念される。従って、ドナー臓器を適切なコンディションに保つことは、肺の利用率増加によるドナー拡大のみならず、肺移植の成績向上に直結する。

間葉系幹細胞 MSC は、骨髄細胞中では造血細胞の支持細胞として働く自己増幅可能な細胞である。MSC は、細胞分化能、抗炎症作用、免疫調節能などの効果が期待され、かつ骨髄や脂肪組織から遺伝子操作なく比較的容易に樹立できるため、心筋梗塞、肝障害、骨・軟骨再生、急性肺障害などで研究が進んでいる。移植領域ではレシピエントへの MSC 投与による IRI や拒絶抑制効果が検討されているが、特に大動物を用いた研究はごくわずかである。脳死状態は組織の炎症前駆物質を活性化し、豊富な血管内皮・上皮細胞や炎症細胞を有する肺では特に障害が強く惹起されうる。MSC は、組織障害部位に集積する走化性を持ち、局所の炎症や免疫反応を抑制する特性を持つことから、ドナーへの MSC 投与は、脳死の際に生ずる肺障害を制御し、ドナー肺の保護作用という観点から有効な治療戦略になるという着想に至り、本研究で、効果および作用機序の解明を目指す。

### 2. 研究の目的

肺は感染だけでなく、豊富な血管内皮・上皮細胞や炎症細胞を有することから、脳死状態で障害が強く惹起されうる。ドナー拡大および移植後成績の更なる向上を目指したドナー臓器保護戦略として、組織障害部位に集積する走化性を持ち、局所の炎症や免疫反応を抑制する性質を持つ間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) に着目し、脳死ドナーへの MSC 投与による効果を明らかにする研究を立案した。

目的 1. ミニブタ脳死ドナーモデルおよび脳死ドナー肺を用いた移植実験系の確立

脳死状態は組織の炎症前駆物質を活性化し、特に、豊富な血管内皮・上皮細胞や炎症細胞を有する肺では障害が強く惹起されると考えられる。本実験は、組織障害部位に集積する走化性を持ち、局所の炎症や免疫反応を抑制する特性を持つ間葉系幹細胞 MSC に着

目した検討であることから、まず至適実験モデルの確立として、脳死状態で、ドナー臓器内で実際に炎症状態・組織障害が生じているのか、またそのようなドナー肺を用いた場合、移植肺の生着が阻害されるのかという点について評価を行う。

目的 2: 主要組織適合性抗原 MHC 確立クラウンミニブタ間葉系幹細胞の樹立と、脳死ドナーへの MSC 投与による肺移植後虚血再灌流傷害 IRI 抑制および生着延長効果の検討

移植拒絶反応に重要である MHC が確立した動物を用いた大動物実験は、その結果を臨床に直結しうる前臨床実験として非常に有用である。そこで本研究ではまず MHC 確立クラウンミニブタの MSC 樹立を試み、次いで樹立した MSC を脳死ドナーに投与することによって、移植後の肺 IRI が抑制されるか、また移植肺生着延長効果が得られるかという点について評価を行う。

### 3. 研究の方法

(1) ミニブタ脳死ドナーモデルおよび脳死ドナー肺を用いた移植実験系の確立 (目的 1)

移植動物として、主要組織適合性抗原 MHC が完全に異なる組み合わせであるクラウンミニブタ C1 をドナー、C2 をレシピエントとして用いる。この組み合わせで、既に申請者の研究室で確立した左同所性肺移植を行う。硬膜外バルーンカテーテル拡張による脳死誘導・確認 6 時間後に臓器を摘出し移植を行う。免疫抑制療法として、12 日間の持続タクロリムス投与 (血中濃度: 35-45 ng/ml) を唯一の免疫抑制療法として用い、移植臓器生存を画像、グラフト肺静脈血ガス分析、定期的な生検を行い評価する。グラフト生検は、移植後 2 時間、2、7、14、28 日、以後 4 週毎に行い、H&E 染色、Masson Trichrome 染色 (線維化病変)、Elastica-Masson 染色 (血管病変) による顕微鏡評価、凍結材料での IgG、IgM、C3c、C4d、5b-9 免疫染色により抗体依存性拒絶反応を評価する。またグラフト mRNA の RT-PCR で炎症性 (IL-1 /IL-6/TNF- /HMGB1) 抗炎症性 (IL-10/IL-1ra/TGF- ) サイトカイン、接着因子やケモカイン等の発現を評価する。サイトカインについては血清を用いた検査も同様に行う。

(2) 組織適合性抗原 MHC 確立ミニブタ間葉系幹細胞の樹立および MSC 投与による移植肺 IRI 抑制と生着延長効果の評価 (目的 2)

骨髄/脂肪からの MSC 細胞樹立

骨髄の採取は腸骨稜からの骨髄吸引、あるいは犠牲死させた個体からの骨髄搔爬により行う。あるいは腹壁脂肪を採取し、MSC 細胞樹立に用いる。コラゲナーゼ処理、遠心分離によって目的とする MSC の選別を行った後、継体培養し細胞数を増やす。適当な細胞数が得られた時点で、MSC の陽性マーカーである CD90・CD29・CD44、および造血幹細胞マーカー

ーであり、MSC では陰性になるとされる CD34・CD45・CD117・Class II を FACS により解析する。さらに採取した細胞の分化能評価として、骨芽細胞 (von Kossa 染色) 脂肪細胞 (Oil-red O 染色) 軟骨細胞 (Alcian blue 染色) への分化誘導を評価する。

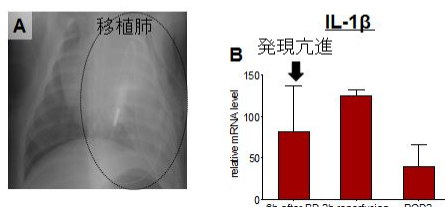
脳死度ドナーへの MSC 投与による治療効果 MHC 完全不適合クラウンプタ C1 をドナー、C2 をレシピエントとする。脳死誘導 3 時間後に、ドナータイプ C1 の MSC を投与する。MSC 投与 3 時間後 (脳死 6 時間後) に臓器を摘出後に、左肺移植を行い、以後目的 1 と同様の方法で移植肺の機能評価を行う。

#### 4. 研究成果

(1) ミニプタ脳死ドナーモデルの確立および脳死ドナー肺移植によるドナー肺内の炎症反応亢進と拒絶促進

硬膜外でバルーンを拡張することにより脳死を誘導した。バルーン拡張後、血圧上昇・脈拍増加などの Cushing 反応を生じることを確認し、更に、瞳孔散大・無呼吸・アトロピンテスト陰性などの確認を脳死の定義とした。6 例に対しこの手技により脳死を誘導したところ、全例同一の経過をたどり脳死が確認された。更に脳死誘導後 3 時間後には、IL-1、TNF- $\alpha$  を代表とする炎症性サイトカインの RT-PCR による mRNA 発現上昇が肺内で起こることが確認された (図 1)。

図1. 脳死ドナー肺を用いた際の移植肺含気不良 (A: 術後2日目)および臓器内での炎症性サイトカイン亢進(B)



更に、脳死臓器内での炎症反応亢進が移植後成績に及ぼす影響を評価するため脳死 6 時間を経たドナー臓器を用いて MHC 完全不適合肺移植を、短期間の免疫抑制剤投与下に行ったところ (n=3) 移植後急性期の著しい虚血再灌流障害を呈するとともに (図 2) 非脳死ドナーでの平均移植肺生着期間 47 日に対し、脳死ドナー肺移植では生着期間が 26 日と有意に拒絶反応が促進されることが示された (図 3)。

このように、脳死後に生じる炎症反応亢進が移植予後に及ぼす影響が明らかとなったため、この脳死ドナーで生じる炎症反応を標的とする治療法によって、移植成績の改善に結びつく可能性が示された。

#### (2) 間葉系幹細胞の確立

##### 脂肪組織からの MSC 樹立

3 頭のブタから各々脂肪を採取し、裁断後にコラゲナーゼ処理、遠心分離によって目的

図2. 脳死ドナー肺を用いた際の虚血再灌流障害 (術後2時間Bから2日Cにかけて肺内出血、浮腫、細胞浸潤が進展)

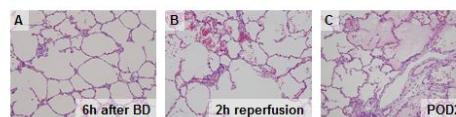
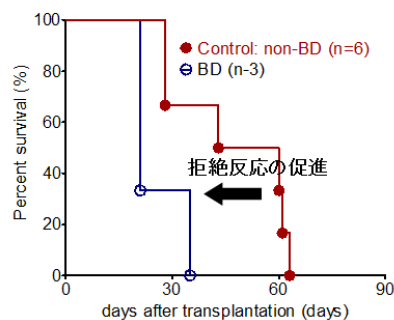


図3. 脳死ドナー肺移植による拒絶反応促進



とする MSC (脂肪組織由来 MSC) の選別を行った。しかし、十分な細胞数が得られず、かつ細胞の増殖も遅いことから、in vivo 実験に用いるだけの細胞を得ることができなかった。原因として、脂肪組織の裁断が十分でないことに起因するものと考えられたため、3 頭目については脂肪組織裁断方法の変更を行った。しかし手技が煩雑であり結果的にコンタミを生じる結果となり、MSC の樹立に至らなかった。現在、質が高くかつ分量の MSC を得るための脂肪裁断方法の確立をはかっている。

##### 骨髄からの MSC 樹立

脂肪からの MSC 樹立が困難であったため、まず文献に準じ、腸骨稜からの骨髄吸引を試みた。しかし穿刺が難しいうえに十分な骨髄を得ることができなかったため、ブタを犠牲死させ、一個体から可能な限りの骨髄を掻爬し回収を試みた。1 例目は 8 ヶ月齢とやや高齢であったため、骨髄が脂肪化し黄骨髄となっていたため十分な量の骨髄が採取できなかった。残り 2 例については、培養が進み継代培養による増殖をはかっている。現在この細胞を継代培養し細胞数を増やしており、適当な細胞数が得られた時点で、MSC の陽性マーカーである CD90・CD29・CD44、および造血幹細胞マーカーであり、MSC では陰性になるとされる CD34・CD45・CD117・Class II を FACS により解析する方針である。さらに採取した細胞の分化能評価として、骨芽細胞 (von Kossa 染色) 脂肪細胞 (Oil-red O 染色) 軟骨細胞 (Alcian blue 染色) への分化誘導を評価する方針である。これらの各種検査により MSC の樹立が達成された後、MSC 細胞の脳死ドナーへの投与による移植肺虚血再灌流障害抑制効果と移植肺生着延長効果を評価する in vivo 投与実験を開始する方針である。

## 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3件)

佐原寿史、岩永健裕、山田和彦 . シンポジウム 2 「各系統実験用ブタ紹介」MHC 確立クラウン系ミニブタを用いた同種移植実験 . 第 1 回日本先進医工学ブタ研究会 . 2013.11.12. 大阪市

Miura K, Sahara H, Waki S, Kawai A, Shimizu A, Yamada K. Beneficial effects of inhaled carbon monoxide (CO) to brain-dead (BD) donors on prolonging pulmonary allograft survival in MHC-inbred CLAWN miniature swine. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation. 2013.9.3-6 (4). Kyoto, Japan

Sahara H, Miura K, Kawai A, Waki S, Sekijima M, Shimizu A, Yamada K. Carbon monoxide (CO) inhalation prolongs survival of the fully MHC-disparate lung graft from brain death donors in miniature swine. International Society for Heart and Lung Transplantation 33rd Annual Meeting. 2013.4.24-27 (24). Montreal, Canada

[その他]

ホームページ等

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

## 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