



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウス肝移植モデルにおける機械灌流保存法およびsiRNAを用いた移植前グラフト治療法に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	藤好, 真人
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2190 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11960号
Issue Date	2015-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60060
Type	doctoral thesis
File Information	Masato_Fujiyoshi_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

マウス肝移植モデルにおける機械灌流保存法および siRNA を用いた移植前グラフト
治療法に関する研究

(Studies of machine perfusion preservation and pre-transplant graft therapy using
siRNA in mouse liver transplantation model)

2015年9月
北 海 道 大 学
藤 好 真 人

緒 言

慢性的な臓器提供数の不足は、肝移植における最も重要な課題の一つであり、脳死肝移植の先進国である米国においても、年間約 15%にのぼる移植待機患者が提供臓器の不足のために肝移植の恩恵を享受することなく死亡している。本邦における脳死臓器提供数は、2010 年の臓器移植法改正により増加を示したものの、年間約 40 例と依然として需要をはるかに下回っており、肝移植症例全体の実に 90%が、健常者ドナーからの臓器提供に依存した生体肝移植である。

現在、提供臓器数を拡大させるべく、多くの移植センターがドナー適応基準の拡大に取り組んでおり、高齢者ドナーや脂肪肝ドナーといった従来の適応基準を逸脱したドナー (expanded criteria donor; ECD)、さらには心停止後ドナー (donor after cardiac death; DCD) が潜在的ドナーとして注目され、その安全使用に関する研究が盛んに行われている¹⁻³。ECD および DCD はドナープールの拡大における潜在的ドナーとして有望である一方で、これらのドナーより提供された肝臓グラフトは、虚血再灌流傷害に対して脆弱であり、移植後の primary non function (PNF) および delayed graft function (DGF) の発症リスクを上昇させることが知られている。

虚血再灌流傷害は、虚血状態に曝されたグラフト組織が血流再開に伴う再酸素化を受けることにより惹起される複雑かつ能動的なグラフト傷害であり、炎症反応、細胞性免疫反応、酸化的ストレス等多くの傷害機序が関与している^{4,5}。虚血再灌流傷害では、Interferon regulatory factor-1 (IRF1) や Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) といった再灌流直後より惹起される一連の傷害性遺伝子発現がトリガーとなりそのシグナル伝達の下流に存在する重要な役割を果たしている。IRF-1 は転写レベルで制御される転写因子であり、Interferon alpha/beta (IFN- α/β)、Tumor necrosis factor (TNF- α)、Inducible nitric oxide synthase (iNOS)、Interleukin 6 (IL-6)、Interleukin 12 (IL-12) といった炎症性遺伝子の活性化およびアポトーシスの誘導を介して虚血再灌流傷害を助長する^{6,7}。また、KEAP-1 は Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) に結合し、核内移行を阻害することにより、NRF2 の anti-oxidant response element (ARE) への結合を介した傷害保護遺伝子の発現を抑制している⁸。そして、ノックアウトマウスをドナーとする肝移植実験により、グラフトにおけるこれらの傷害性遺伝子発現の抑制は、虚血再灌流傷害を軽減することが実証されている。

このような虚血再灌流傷害のリスクを軽減し、ドナープールの拡大を安全に進めるための医療技術として、機械灌流保存法が注目されており、冷温浸漬保存法にかわる次世代の臓器保存法として精力的に研究されている⁹⁻¹⁵。機械灌流保存法とは、摘出したグラフトの流入血管から持続的な灌流を行う臓器保存法であり、灌流液を介して

酸素および代謝基質を送達し、傷害性サイトカインや有害代謝産物を除去することによりグラフト傷害を軽減させることが期待されている。さらに、機械灌流法は、持続的な酸素と代謝基質の送達により、保存中のグラフト内におけるエネルギー代謝レベルを高く維持させることから、冷却による代謝抑制をかけない非冷温保存への応用も検討されている。そのため、機械灌流法は、灌流温度を 4 °C 程度とする冷温機械灌流、37 °C 程度とする常温機械灌流、そしてその中間である 20–30 °C とする **sub-normothermic machine perfusion (SNMP)** に分類され、それぞれの特性を生かした医療応用が期待されている¹⁶。現在、冷温機械灌流法は臨床試験の段階に達しており **ECD** および **DCD** 肝移植における臨床的有用性も確認されている^{17–19}。また、常温機械灌流法および **SNMP** 法に関しても、移植非適応となったヒト肝臓グラフトを用いた前臨床研究が行われており、グラフト保護およびグラフト評価における有望性が報告されている^{20,21}。

摘出前にドナー体内において、グラフトが長時間の温阻血状態に曝される **DCD** 肝移植では、虚血再灌流傷害に加え、全体の 30–50% もの症例で生じる **non-anastomosis biliary stricture (NAS)** と呼ばれる特有の虚血性胆管合併症が、移植後成績を低下させている^{22,23}。この傷害は、胆管上皮前駆細胞のニッチである **Peribiliary gland** を栄養する **Peribiliary vascular plexus** と呼ばれる血管叢の血流傷害に起因する胆管上皮の再生傷害が重要な原因の一つであり、その保護にも機械灌流の有効性が期待されている¹⁰。

このように、臨床応用に向けて機械灌流保存法の研究が加速する一方で、その作用機序には未解明な点が多く、基礎研究の重要性はますます高まっている。機械灌流に関する基礎研究では、グラフト摘出、機械灌流保存、移植といった肝移植における全ての過程が再現された動物実験系が求められ、現在までにブタおよびラットを用いた動物モデルが報告されている^{15,24–27}。しかしながら、マウスを用いた機械灌流保存過程を含む肝移植モデルは未だ報告されていない。そこで、本研究では、機械灌流保存法を導入したマウス肝移植モデルを確立することを目的とした。そして、このマウスモデルを用いて、**SNMP** 法に関する方法論的研究および **DCD** 肝移植における機械灌流法の有用性の検討を行った。

本研究では、**ECD** および **DCD** グラフトの安全性のさらなる向上のため、虚血再灌流傷害のトリガーである傷害性遺伝子の抑制を図るため、**siRNA** による核酸治療を移植前グラフト治療として肝移植に応用するための方法論的検討を行った。**siRNA** はウイルスベクターを使用せずにリポフェクション法による導入が可能で、数週間程度の遺伝子抑制作用を発現した後、ゲノムに取り込まれることなく消耗性に消失する。また、任意の遺伝子を標的として作成することが容易で、一度に複数の遺伝子を標的とすることもできる。これらの特徴から **siRNA** を用いた核酸治療には、臨床応用にお

ける高い安全性と拡張性が期待されている^{28,29}。虚血再灌流傷害は、再灌流後に一過性に惹起される一連の傷害性遺伝子発現に起因するため、siRNAによるRNA干渉作用は、虚血再灌流障害に対する理想的な治療機序のひとつであると考えられる。

本研究では、まず、マウス肝臓の灌流装置を開発と機械灌流保存法を導入したマウス肝移植術式の確立を行い、冷温機械灌流後の肝移植において良好な成績を得た。これに並行し肝臓グラフトへの移植前 siRNA 導入法として、ドナー体内における *in vivo transfection* を用いた方法の検討を行い、移植後にレシピエント体内において遺伝子発現抑制作用を確認することができた。次に、標的臓器に限定した導入とグラフト摘出手術に影響を与えず移送時間を有効に利用した導入が期待される、siRNA の体外導入法を確立するため、冷温浸漬保存下のグラフトへの経門脈投与による導入を試みたが、導入は不可能であった。ここで、冷温による取り込み不良が原因と考えられたため、冷温機械灌流法を SNMP 法に拡張することにより、非冷温保存下のグラフトへの体外導入を試みることにした。そして、灌流装置と灌流プロトコルの最適化により、SNMP 後の肝移植において良好な移植成績を達成した。しかしながら、SNMP 法による 20℃の非冷温状態にあるグラフトへの灌流液を介した投与でも十分な siRNA 導入を成立させることはできなかった。一方、SNMP 法を DCD 肝移植に適用したところ、UW 液を用いた冷温浸漬保存法に比べ有意な移植後生存率の改善が確認された。

本研究にて確立された機械灌流法を導入したマウス肝移植モデルは、高い有用性と拡張性を有しており、肝移植における機械灌流保存法および移植前グラフト治療法の発展に貢献し、ドナー適応の拡大に寄与することが期待される。

実 験 方 法

1 動物実験に関する事項

本研究は北海道大学倫理委員会の承認（実験計画番号 12-0109）を受け、北海道大学動物実験に関する規定および北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に則って遂行された。

2 マウス肝移植モデル

本研究においてマウス肝移植術は、Qian らの報告³⁰に準じて行った。

3 灌流装置および灌流液

本研究では、室温環境においてグラフト温度を任意に制御しながらマウス肝臓グラフトの酸素化灌流を行うことが可能な新規灌流装置を開発した。

灌流液は、Berendsen らの報告³¹に基づいて調製した。

4 機械灌流操作

機械灌流は、バックテーブル操作終了後に開始し、レシピエントの肝全摘が終了した段階で、グラフトを灌流装置から取り出し、レシピエントへ移植した。

5 DCD グラフトの摘出操作

DCD 肝移植モデルの場合には、横隔膜切開によりドナーマウスの心肺停止を誘導し、循環停止 30 分間後にグラフトの摘出を行った。

6 ドナー体内における siRNA 導入およびサンプリング

siRNA の in vivo 導入には Invivofectamine 2.0® (Life Technologies) を用いたりポフェクション法を用いた。siRNA 機能評価のため、移植後レシピエントより移植後グラフトおよび血液検体を採取した。

7 移植後レシピエントにおける siRNA の機能評価

siRNA の標的分子を凝固第 VII 因子とし、リアルタイム RT-PCR 法および血中凝固第 VII 因子活性の測定により評価を行った。

8 統計解析

本研究における統計処理およびグラフ作成には、R version 3.0.2 (<http://www.r-project.org/>) を用いた。

実 験 結 果

1 機械灌流保存法を導入したマウス肝移植モデルの確立

1-1) 機械灌流法導入のためのドナー術式およびグラフト操作法の確立

マウス肝移植モデルへの機械灌流保存法の導入を行うにあたり、我々はまず、グラフトと灌流装置の接続方法の確立およびそのためのドナー術式の改変を行った。これらの方法を用いて、グラフトを摘出し、灌流装置に接続したところ、灌流液の流入および流出ともに良好であり、過剰なグラフトの膨大等の所見は認められなかった。グラフトを灌流装置から取り外した後は、十分な長さの肝上部下大静脈を温存しながら、横隔膜を切除することにより、グラフトを移植可能な状態に回復することが可能であった。

1-2) マウス肝移植モデルにおける冷温機械灌流法の確立

前項で確立したグラフト接続方法を用いた灌流装置を作成し、実際に冷温機械灌流を施した肝臓グラフトをレシピエントマウスに移植した。その結果、グラフトは問題なくレシピエントマウスに移植され、移植後成績は良好であった。

1-3) 循環灌流の導入による灌流時間の延長

続いて、循環型冷温灌流の導入および灌流液の変更により、長時間の機械灌流を実現し、良好な移植後成績を得た。

2 SNMP への拡張

2-1) 温度制御システムおよび酸素化モジュールの導入

SNMP を行うため、我々は灌流装置に、灌流温度制御システム、灌流液の酸素化モジュール、および赤血球含有灌流液を導入した。温度コントロールおよび灌流液の酸素化は良好であったが、移植後成績は不良であった。

2-2) マウス肝移植における SNMP の確立

赤血球含有灌流液の使用をやめ、灌流形式を Acellular SNMP 法に変更したところ、移植後成績の改善が認められた。

2-3) 機械灌流法の改良による SNMP 肝移植の成績向上

移植後成績をさらに向上させるため、灌流装置および灌流術式の改変により、移植直前まで機械灌流の継続、および残留ドナー血球による灌流液の汚染の防止を図った。これらにより移植後成績は著明に改善した。

2-4) DCD 肝移植への SNMP の応用

確立された SNMP 法を、DCD 肝移植に適用したところ、冷温浸漬保存法に比べ、有意な移植後成績の改善効果が確認された。

3 移植前 siRNA 導入のグラフト治療への応用

3-1) 移植前 siRNA 導入の有効性

本研究では、高リスクグラフトの安全性向上へのさらなる技術開発を目指し、肝臓グラフトへの移植前 siRNA 導入による遺伝子抑制作用をグラフト治療法へ応用するための検討も行った。摘出前にドナー体内において siRNA 導入を施した肝臓グラフトの移植を行ったところ、移植後にレシピエント体内において遺伝子抑制作用が確認され、グラフト治療法としての有用性が示唆された。

3-2) siRNA 導入時間の検討

ドナー体内導入では、投与 2 時間後に摘出した肝臓グラフトにおいても十分な遺伝子発現抑制作用が確認された。しかしながら、導入時間を 1 時間とすると、抑制作用は大幅に低下した。

3-3) 冷温浸漬保存下グラフトへの siRNA 体外導入

冷温浸漬保存下グラフトに対する siRNA の経門脈投与による体外導入では、十分な導入効率を得ることはできなかった。

4 SNMP を介した siRNA 体外導入

SNMP 法を介した、グラフトの siRNA 取り込み活性を維持した状態での体外導入では、移植後の遺伝子発現にやや抑制傾向を認めるが、ドナー体内導入と比較するとその抑制作用ははるかに小さく、siRNA 導入効率は非常に低いものと考えられた。

総括および結論

- 機械灌流保存法のマウス肝移植モデルへの導入は技術的に可能であり、冷温機械灌流のみならず SNMP においても良好な成績を実現できた。
- SNMP は、冷温浸漬保存と比較して DCD 肝移植モデルにおける移植後生存期間を著明に延長した。
- ドナー体内における肝臓への siRNA 導入は2時間以内に成立し、グラフトに取り込まれた siRNA は、移植後にレシピエント体内において RNA 干渉作用を発現した。
- Hypothermic ~ Sub-normothermic temperature の温度条件下では、肝臓グラフトへの siRNA 体外導入による導入効率は非常に低かった。

引用文献

1. Braat, a E. *et al.* The Eurotransplant donor risk index in liver transplantation: ET-DRI. *Am J Transplant* **12**, 2789–96 (2012).
2. Cameron, A. M. *et al.* Optimal utilization of donor grafts with extended criteria: a single-center experience in over 1000 liver transplants. *Ann Surg* **243**, 748–753; discussion 753–755 (2006).
3. Dubbeld, J. *et al.* Similar liver transplantation survival with selected cardiac death donors and brain death donors. *Br J Surg* **97**, 744–753 (2010).
4. Gracia-Sancho, J., Casillas-Ramírez, A. & Peralta, C. Molecular pathways in protecting the liver from ischaemia/reperfusion injury: a 2015 update. *Clin Sci* **129**, 345–362 (2015).
5. Peralta, C., Jiménez-Castro, M. B. & Gracia-Sancho, J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: Effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol* **59**, 1094–1106 (2013).
6. Ueki, S. *et al.* Critical role of interferon regulatory factor-1 in murine liver transplant ischemia reperfusion injury. *Hepatology* **51**, 1692–701 (2010).
7. Tsung, A. *et al.* The transcription factor interferon regulatory factor-1 mediates liver damage during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**, G1261–G1268 (2006).
8. Ke, B. *et al.* KEAP1-NRF2 complex in ischemia-induced hepatocellular damage of mouse liver transplants. *J Hepatol* **59**, 1200–1207 (2013).
9. Graham, J. a & Guarrera, J. V. ‘Resuscitation’ of marginal liver allografts for transplantation with machine perfusion technology. *J Hepatol* **61**, 418–31 (2014).

10. Weeder, P. D., van Rijn, R. & Porte, R. J. Machine perfusion in liver transplantation as a tool to prevent non-anastomotic biliary strictures: Rationale, current evidence and future directions. *J Hepatol* **xxx**, (2015).
11. Schlegel, A., Rougemont, O. De, Graf, R., Clavien, P.-A. & Dutkowski, P. Protective mechanisms of end-ischemic cold machine perfusion in DCD liver grafts. *J Hepatol* **58**, 278–86 (2013).
12. De Rougemont, O. *et al.* One hour hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) protects nonviable liver allografts donated after cardiac death. *Ann Surg* **250**, 674–83 (2009).
13. Dutkowski, P., Graf, R. & Clavien, P. a. Rescue of the cold preserved rat liver by hypothermic oxygenated machine perfusion. *Am J Transplant* **6**, 903–12 (2006).
14. Dutkowski, P., Furrer, K., Tian, Y., Graf, R. & Clavien, P.-A. Novel short-term hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) system prevents injury in rat liver graft from non-heart beating donor. *Ann Surg* **244**, 968–76; discussion 976–7 (2006).
15. Schlegel, A., Graf, R., Clavien, P.-A. & Dutkowski, P. Hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) protects from biliary injury in a rodent model of DCD liver transplantation. *J Hepatol* **59**, 984–91 (2013).
16. Matton, A. P. M. & Porte, R. J. Opportunities for scientific expansion of the deceased donor pool in liver transplantation. *Liver Transplant* **20**, E1–E5 (2014).
17. Guarrera, J. V *et al.* Hypothermic machine preservation in human liver transplantation: the first clinical series. *Am J Transplant* **10**, 372–81 (2010).
18. Guarrera, J. V *et al.* Hypothermic Machine Preservation Facilitates Successful Transplantation of ‘Orphan’ Extended Criteria Donor Livers. *Am J Transplant* **15**, 161–169 (2015).

19. Dutkowski, P. *et al.* HOPE for human liver grafts obtained from donors after cardiac death. *J Hepatol* **60**, 765–72 (2014).
20. Bruinsma, B. G. *et al.* Subnormothermic machine perfusion for ex vivo preservation and recovery of the human liver for transplantation. *Am J Transplant* **14**, 1400–9 (2014).
21. op den Dries, S. *et al.* Ex vivo normothermic machine perfusion and viability testing of discarded human donor livers. *Am J Transplant* **13**, 1327–35 (2013).
22. Op Den Dries, S. *et al.* Injury to peribiliary glands and vascular plexus before liver transplantation predicts formation of non-anastomotic biliary strictures. *J Hepatol* **60**, 1172–1179 (2014).
23. Hashimoto, K. *et al.* Use of tissue plasminogen activator in liver transplantation from donation after cardiac death donors. *Am J Transplant* **10**, 2665–72 (2010).
24. Tolboom, H. *et al.* Recovery of warm ischemic rat liver grafts by normothermic extracorporeal perfusion. *Transplantation* **87**, 170–7 (2009).
25. Fondevila, C. *et al.* Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion in Porcine Donation After Circulatory Determination of Death Liver Transplant. *Transplantation* **94**, 22–29 (2012).
26. Brockmann, J. *et al.* Normothermic perfusion: a new paradigm for organ preservation. *Ann Surg* **250**, 1–6 (2009).
27. Tolboom, H. *et al.* A model for normothermic preservation of the rat liver. *Tissue Eng* **13**, 2143–51 (2007).
28. Williford, J.-M. *et al.* Recent Advances in Nanoparticle-Mediated siRNA Delivery. *Annu Rev Biomed Eng* **16**, 347–70 (2014).

29. Ozcan, G., Ozpolat, B., Coleman, R. L., Sood, A. K. & Lopez-Berestein, G. Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* (2015). doi:10.1016/j.addr.2015.01.007
30. Qian, S. G., Fung, J. J., Demetris, A. V, Ildstad, S. T. & Starzl, T. E. Orthotopic liver transplantation in the mouse. *Transplantation* **52**, 562–564 (1991).
31. Berendsen, T. A. *et al.* A simplified subnormothermic machine perfusion system restores ischemically damaged liver grafts in a rat model of orthotopic liver transplantation. *Transplant Res* **1**, 6 (2012).