

170. 体外灌流下核酸投与による革新的肝グラフト保存法開発

武富 紹信

Key words: 肝移植, 臓器保存, 機械灌流,
グラフト治療, 核酸治療

北海道大学 大学院医学研究科
消化器外科学分野 I

緒言

肝移植における提供臓器数の不足は世界的な問題であり, ドナー選択基準の拡張が試みられてきた. 高齢者ドナーや脂肪肝ドナーなど従来のドナー選択基準を逸脱したドナー由来の臓器グラフトはマージナルグラフトと呼ばれ, マージナルグラフトの受け入れによるドナープールの拡大は, 脳死移植数の増加に大きく寄与すると同時に, その潜在的なリスクの存在も明らかにし, 我々はマージナルグラフトに関連するリスクの克服という新たな課題に直面することとなった. マージナルグラフトは, 臓器保存による虚血再灌流傷害に対し脆弱性を示し, それにより移植後のグラフト機能不全を引き起こすことが知られている. 虚血再灌流傷害に対するグラフト保護には, 保存中の組織傷害性代謝産物の除去および酸素・代謝基質の供給が可能な機械灌流法が有望視されており, 欧米では現在臨床研究の段階にまで至っている^{1,2)}. 我々は機械灌流法を体外グラフト治療へと拡張し, マージナルグラフトの安全性を向上させること目指して研究を進めてきた.

我々は Qian らにより報告されたマウス同所性肝移植術式³⁾を基礎として, 灌流装置の開発と術式の改変を行い, 機械灌流法をマウス肝移植モデルに導入することに世界で初めて成功した(現在投稿準備中). このマウスモデルは, 肝移植の全臨床過程を再現可能であり, 適用可能な生物学的テクノロジーの広範囲であることから, 研究プラットフォームとして優れている.

本研究では, 体外グラフト治療の方法として, siRNA を用いた核酸治療の応用に着目した. 虚血再灌流傷害は, 移植直後より一過性に生じる一連の遺伝子発現に起因する能動的なグラフト傷害反応であり, 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.

そこで本研究では, 肝臓グラフトに対する移植前 siRNA 導入に関する検討を行ったのでこれを報告する.

方法

1. ドナー体内における siRNA 導入

ドナーマウスの陰茎静脈より, 12.5 μ g の siRNA を全身投与した. 導入はリポフェクション法により行った. siRNA を静注後, 導入終了時刻の1時間前よりドナー手術を開始し, 導入終了時刻に門脈遮断を行いグラフトを摘出する.

2. グラフト灌流装置

我々が開発したマウス肝臓用体外灌流装置はグラフトの門脈カフを灌流チューブに挿入し, 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（図1）。

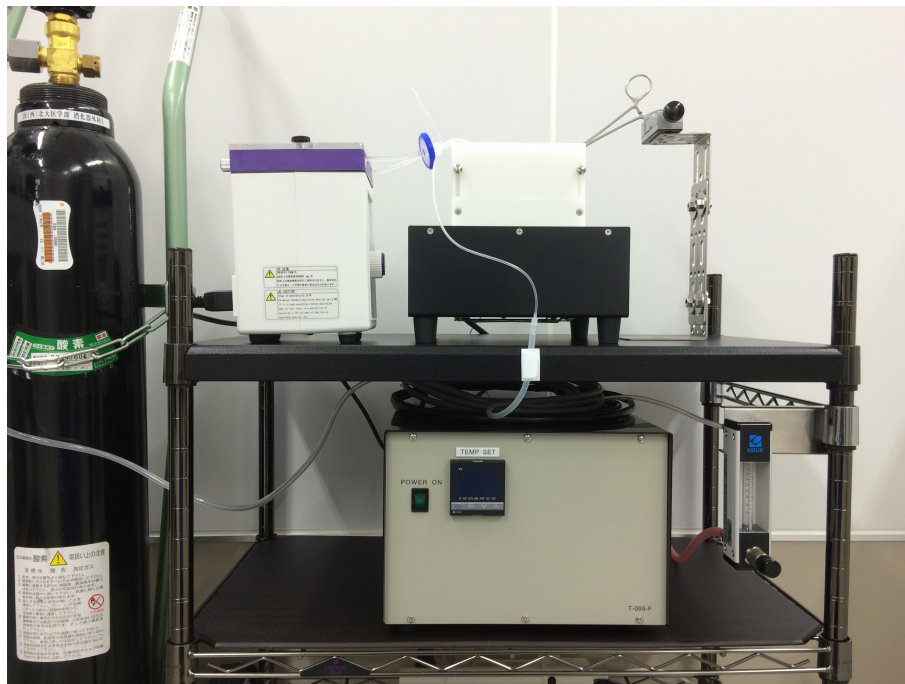


図1. グラフト灌流装置。

本研究で開発したマウス肝臓用体外灌流装置。灌流液は、ローラーポンプにより灌流回路内を循環し、膜型人工肺モジュールにより酸素化される。また、灌流温度は任意に設定可能。

3. 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。

4. 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下に行った。

5. 機械灌流

バックテーブル処理後、肝臓グラフトを灌流装置に接続し灌流を開始した。灌流開始までは灌流装置の温度4℃に設定しておき、灌流開始直後より復温を開始した。復温開始後約20分で灌流温度は20℃に達した。

6. レシピエント手術

レシピエント手術は機械灌流を行ったまま開始した。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。レシピエントの肝全摘出後にグラフトを灌流装置より取り出しレシピエントにプットインした。肝上部下大静脈を縫合法、門脈をカフ法により再建し、再建終了の段階で門脈血流を再開した。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（図2）。

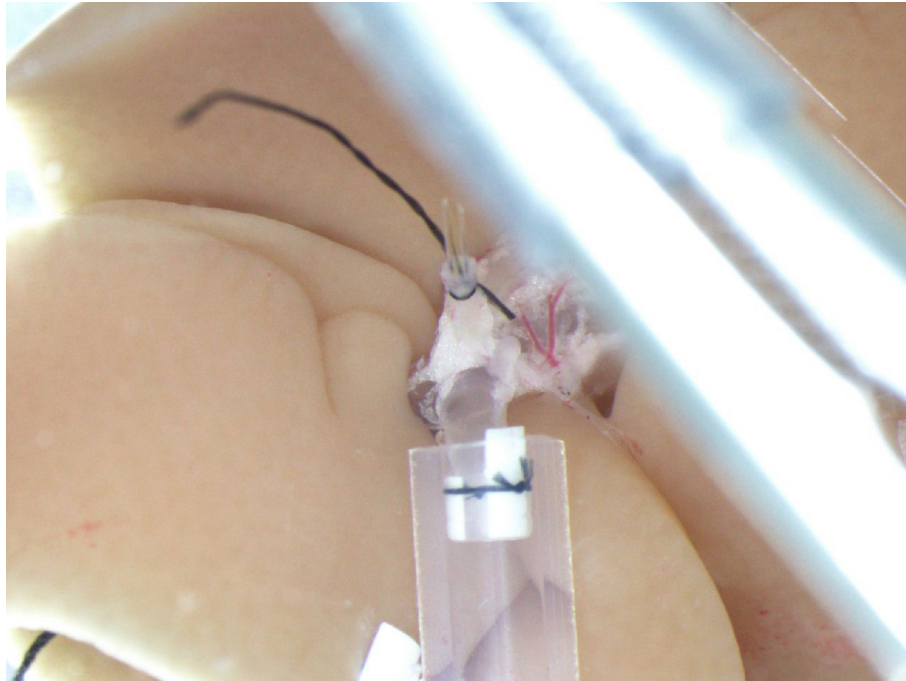


図2. 肝臓グラフトの機械灌流.

肝臓グラフトは門脈カフを灌流チューブに挿入することにより灌流装置に接続される. siRNA は灌流装置上で灌流液内に投与される.

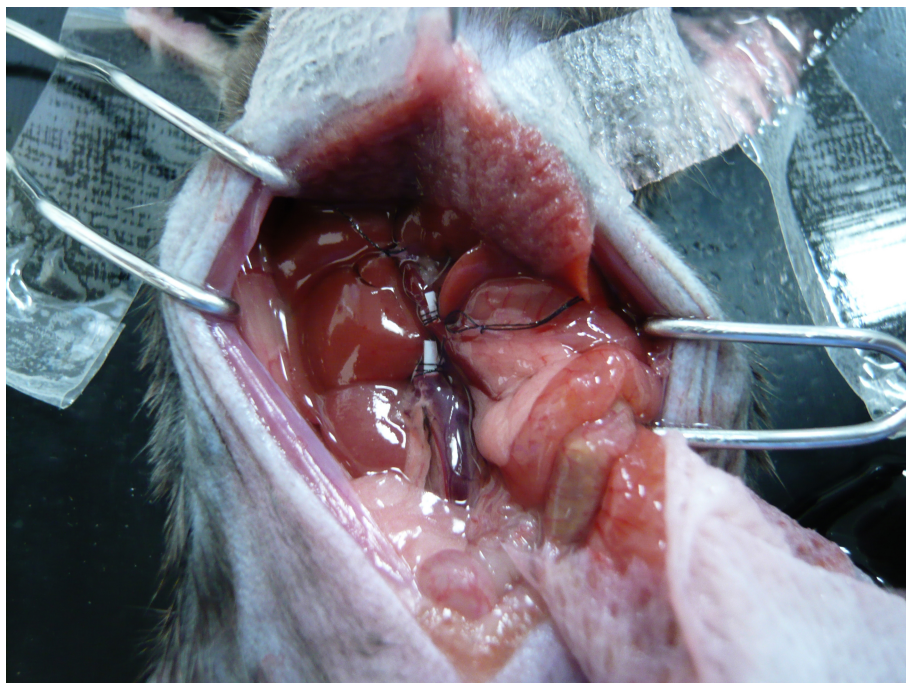


図3. マウス肝移植手術.

血行再建後のレシピエント手術術中所見. 肝上部下大静脈は縫合法, 門脈, 肝下部下大静脈はカフ法により吻合する.

7. 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℃）より回路内への siRNA-Invivofectamine complex の投与を行った。siRNA 投与量は 50 μ g/liver とした（図 3）。

8. siRNA の効果判定

siRNA の標的遺伝子には、肝臓特異的に発現する凝固第 7 因子を用いた。siRNA による遺伝子抑制効果の評価は、移植 72 時間後のレシピエントマウスの血清における凝固第 7 因子活性を測定することにより行った。活性値は各測定毎に同時に測定した健常マウスの血清における測定値の平均に対する比として定量化した。

結 果

1. 肝臓への siRNA 最短取込み時間の検討

正常な肝臓が必要十分量の siRNA を細胞内に取込むために要する時間は、当研究の最重要指標である。導入時間を 24, 12, 4, 2, 1 時間としてドナー体内で siRNA 導入を行った肝臓グラフトを用いた移植実験（各群 N=2）では、導入時間を 24, 12, 4, 2 時間とした各群では、全てのレシピエントマウスにおいて凝固第 VII 因子活性が正常マウスの 20% 未満に抑制されていた。一方、導入時間を 1 時間とした群では、正常マウスの 70.7% および 114.6% と抑制効果は急激に低下した（図 4）。

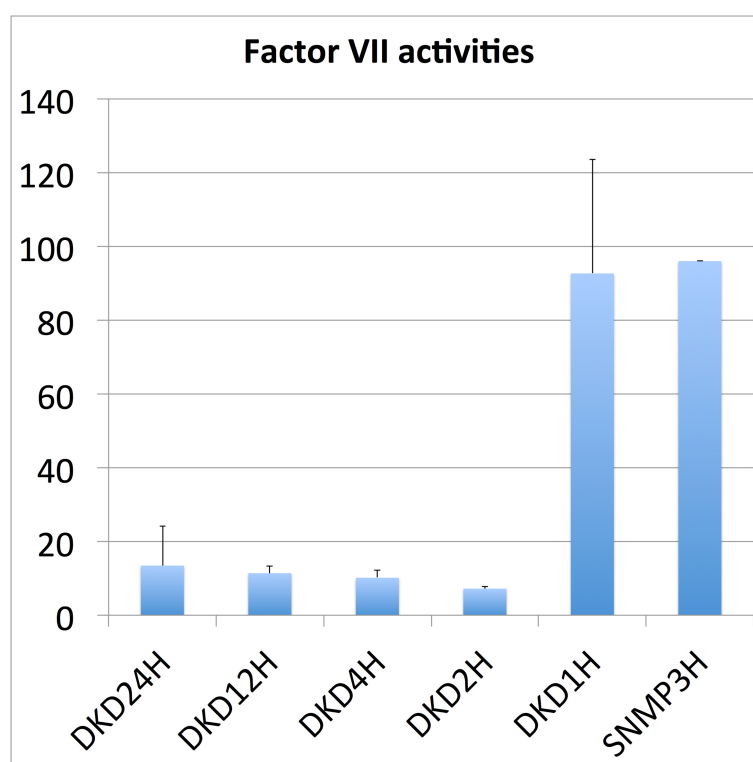


図 4. ドナー体内導入および体外導入における siRNA による移植後遺伝子抑制効果。

導入時間を 12, 12, 4, 2, 1 時間としたドナー体内トランスフェクション法により siRNA を導入した肝臓グラフト (DKD24H, DKD12H, DKD4H, DKD2H, DKD1H) および 3 時間の sub-normothermic machine perfusion 施行中に体外 siRNA 投与を行った肝臓グラフト (SNMP3H) を用いた肝移植 72 時間後のレシピエント血清における凝固第 7 因子活性。活性値は対正常マウス比をパーセント表示している。

2. 非冷温保存に関する条件検討

我々は、冷温浸漬保存中のグラフトに対し経門脈的に siRNA を投与した前実験において、冷温条件下では siRNA の取り込みが困難であるという実験結果を得ていたため、機械灌流法を導入したマウス肝移植モデルにおいて、Subnormothermic oxygenated machine perfusion を行った。灌流条件の改良の末、血液成分を含まない灌流液を用いて、20℃、180 分の非冷温期を確保した術式において、100%の移植後 72 時間レシピエント生存率を達成した。

3. 体外 siRNA 導入に関する条件検討

灌流温度を 20℃とする非冷温機械灌流条件下の肝臓グラフトに対し、灌流液を介した 180 分の体外 siRNA 導入実験 (N=1) を行ったところ、非冷温機械灌流のみで siRNA 導入を行わなかったグラフトを移植したコントロール群ではレシピエントマウスにおける凝固第 VII 因子活性は 96.0%で、体外 siRNA 導入群では 107.6%であり、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 (図 4)。

考 察

肝臓への siRNA 導入ではエンドサイトーシスが重要であるため、siRNA の体外導入を実現するためには、十分な酸素およびエネルギー源の供給下に保存温度を上昇させ、グラフトにおける代謝活性を上げることが必要であると考えられるが、冷温による代謝抑制は臓器保存におけるグラフト保護作用の根幹を成しており、安全な臓器保存と効率のよい siRNA 体外導入の両立は難易度の高い課題である。

本研究では、ドナー体内における siRNA 導入では、siRNA 静注後すぐに開腹し、グラフト温度が室温程度に低下する導入時間 1 時間群で急激な導入効率の低下を示すことおよび 20℃の非冷温機械灌流下では、ドナー体内導入で十分と考えられた 180 分間では、siRNA の導入が成立しないことが示され、20℃前後のグラフト温度は siRNA の取り込みに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、灌流温度を 37℃とする normothermic oxygenated machine perfusion を確立し、体外 siRNA 導入法の開発を継続する。

共同研究者

本研究の共同研究者は北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I の藤好真人である。本稿を終えるにあたり、本研究に御支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Guarrera, J. V., Henry, S. D., Samstein, B., Odeh-Ramadan, R., Kinkhabwala, M., Goldstein, M. J., Ratner, L. E., Renz, J. F., Lee, H. T., Brown, R. S. & Emond, J. C. : Hypothermic machine preservation in human liver transplantation: the first clinical series. *Am. J. Transplant.*, **10** : 372-381, 2010.
- 2) Dutkowski, P., Schlegel, A., de Oliveira, M., Müllhaupt, B., Neff, F. & Clavien, P. A. : HOPE for human liver grafts obtained from donors after cardiac death. *J. Hepatol.*, **60** : 765-772, 2014.
- 3) 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.