

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 藤好 真人

### 学位論文題名

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)

#### 【背景と目的】

ドナー不足は、肝移植における喫緊の課題あり、ECD および DCD グラフトの安全性向上による安全なドナー適応基準の拡大が求められている。そのための技術として現在、機械灌流保存法が注目され精力的な研究が行われている。機械灌流法を導入した肝移植研究モデルとしては現在までにブタおよびラットモデルが報告されているが、マウスモデルはまだ確立されていない。そこで我々は、機械灌流法を導入したマウス肝移植モデルを確立し、そのモデル上で、非冷温機械灌流保存法の確立および機械灌流法の DCD 肝移植への適用を行うことを目的として本研究を遂行した。

さらに我々は、siRNA による核酸治療を虚血再灌流障害に対する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。

#### 【材料と方法】

本研究で用いた灌流装置は、臓器保存容器、灌流回路、ローラーポンプ、酸素供給システム、温度制御システムから構成され、灌流回路には灌流液濾過フィルターと酸素化モジュールが組み込まれている。灌流液には、Williams Medium E にインスリン、ヒドロコルチゾン、L-グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシンおよびヘパリンを添加した sWME を用いた。この灌流システムでは、任意の灌流温度におけるマウス肝臓の酸素化灌流が可能である。

機械灌流法を導入したマウス肝移植術では、ドナーマウスよりグラフトを摘出し、バックテーブルにて肝下部大静脈および門脈への血管カフの装着とグラフト洗浄を行った後、門脈カフを臓器保存容器内の注液ポートに挿入することによりグラフトを灌流装置に接続し機械灌流を開始した。なお、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 分後にグラフトを摘出した。機械灌流はレシピエント手術開始後も継続し、肝全摘終了後にグラフトを灌流装置から離脱させ、そのまま移植した。肝上部大静脈は縫合法、門脈および肝下部大静脈はカフ法、胆管はステント法により再建した。

グラフトへの移植前 siRNA 導入の検討には、凝固第 VII 因子を標的遺伝子とし、グラフト組織を用いたリアルタイム RT-PCR 法と血漿検体における凝固第 VII 因子活性の測定により導入評価を行う siRNA の導入評価を用いた。

#### 【結果】

本研究では、機械灌流操作をマウス肝移植に組み込み、非循環型灌流装置を用いた乳酸リンゲル液による短時間の冷温機械灌流を実現した。そして、循環型灌流装置を用いた sWME による数時間にわたる冷温機械灌流にまで拡張し、良好な移植成績を得た。続いて、非冷温機械灌流保存のため温度制御システム、酸素化モジュールおよび赤血球含有灌流液の導入を行った。

このシステムでは、灌流温度の上昇に伴うグラフト酸素消費量の増加と酸素化モジュールの良好な酸素化能が確認することができたが、25°Cでの sub-normothermic machine perfusion (SNMP) では全てのレシピエントが移植直後に死亡した。同システムによる冷温機械灌流においても結果は同様であったため、我々は赤血球含有灌流液の使用を中止し、sWME を用いた Acellular SNMP (以降 SNMP と記載) に灌流形式を変更した。この方法でもグラフトへの十分な酸素供給が可能であり、これにより移植後生存率は 5 日目で 50%、28 日目で 37.5%まで改善した。さらに、移植直前まで機械灌流を継続できるよう灌流装置と術式を改変し、灌流液の濾過方法の工夫により残留ドナー血球による灌流液の汚染を防止したところ、移植後生存率は 5 日目で 100%、28 日目で 87.5%にまで向上し、移植後 28 日目の肝機能検査および組織学的所見は正常であった。この SNMP を DCD 肝移植に適用すると、冷温浸漬保存法に比べ移植後生存を有意に延長させた。

本研究において我々は、高リスクグラフトのさらなる安全性向上に向けて、siRNA による RNA 干渉作用を応用した移植前グラフト治療法の開発研究も行った。肝臓グラフトへの siRNA 導入方法としてドナー体内における in vivo lipofection 法を用いた検討では、良好な導入効率を得られ、移植前にグラフトに取り込まれた siRNA は、移植後にレシピエントで遺伝子抑制作用を発現した。この導入方法では、導入時間を 2 時間まで短縮しても十分な siRNA 導入が可能であったが、導入時間を 1 時間とすると導入効率は大幅に低下した。摘出後グラフトへの体外導入に関しても検討を行ったが、冷温浸漬保存中の経門脈投与では siRNA は導入されず、SNMP 上で 20°C、3 時間の経灌流液投与を行っても、導入効率は非常に低かった。

#### 【考察】

本研究において我々は、マウス肝移植モデルに機械灌流法を導入することに世界で初めて成功した。現在、機械灌流法は次世代の臓器保存法として世界的に大きな注目を集めており、多くの先進的な研究技術の適用が可能であるマウスを用いた我々の動物実験系は、その開発の最先端における探索的研究に大きく貢献できるものと考えられる。さらに我々は、このマウスモデル上で SNMP 法の確立にも成功した。SNMP は不十分な条件下で行われた場合には重篤なグラフト傷害につながる難易度の高い臓器保存法であるが、安全性が確立されれば、保存中の代謝活動レベルの維持により、高いグラフト保護効果とグラフト診断における有用性が期待されるため今後さらなる開発研究の活性化が見込まれている。

本研究では、虚血再灌流傷害を軽減するための治療機序として、siRNA による RNA 干渉作用に着目し、移植前グラフト治療への応用に向けた方法論的な検討も行った。虚血再灌流障害では、移植後早期の一過性の傷害性遺伝子発現が重要な役割を果たしているため、siRNA を用いた核酸治療の良い適応と考えられる。本研究において、ドナーに対する siRNA 投与により、肝臓グラフトに siRNA が導入され、取り込まれた siRNA が移植後にレシピエント体内で RNA 干渉作用を発現したこと、そしてその導入時間を 2 時間まで短縮しても十分な siRNA 導入が可能であったことは、この治療法の臨床的有用性とドナー治療としての方法論的可能性を示唆する重要な知見である。一方で摘出後グラフトに対する体外導入については、冷温～20°C 前後の温度条件下では困難であることが予想され、常温機械灌流の適用を含むさらなる技術改良が必要と考えられた。

#### 【結論】

機械灌流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可能であった。そして、SNMP は DCD 肝移植モデルにおいて、冷温浸漬保存と比較して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。しかし、冷温および 20°C における肝臓グラフトへの siRNA 体外導入では導入効率が非常に低かった。