

## 学位論文題名

Successful Transplantation of Rat Hearts Subjected to  
Extended Cold Preservation with a Novel Preservation Solution

(新規臓器保存液によるラット心臓の長期冷保存の検討)

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】 虚血再灌流障害による心グラフト障害は、現在の臨床における心臓移植医療において重要な問題である。心臓は冷保存に起因する虚血再灌流障害を受けやすい臓器であり、虚血再灌流障害は冷保存時間が長くなるにつれて強くなる。そのため現在、心グラフトの安全な冷保存時間は4-6時間と他の臓器に比べて短い。冷保存後のグラフト障害を軽減し、安全な冷保存時間を延長しうるより強力な臓器保護効果を有する臓器保存液が求められる。そこで、我々は新規臓器保存液 (Dsol) を開発し、その臓器保護効果をラット心長期冷保存/異所性移植モデルを用いて、University of Wisconsin 液(UW)と比較検討した。

【材料と方法】 Dsol は UW を基に、電解質組成を細胞外液型とし、不透性物質としての Raffinose を Mannitol と Sucrose に変更、高浸透圧物質である HES は除外し、溶媒に30%の重水(D<sub>2</sub>O)を加え作成した。Lewis ラットの心臓を UW もしくは Dsol で24時間または36時間、4℃で冷保存した。冷保存後、心グラフトを Lewis ラットの腹部に異所性に移植し、グラフトの生存を7日間観察した。24時間冷保存モデルではさらに、再灌流後24時間のグラフトの梗塞範囲を TTC 染色で、心筋細胞のアポトーシスを TUNEL 染色で、グラフトへの炎症性細胞浸潤(多形核好中球は HE 染色、単球は CD68 免疫染色)を評価した。再灌流24時間後の血中 LDH と AST を測定した。再灌流1時間後の心グラフトのエネルギー状態を評価するために、グラフトの ATP を抽出し、HPLC で測定した。再灌流24時間後の Ca<sup>2+</sup>依存性プロテアーゼの活性を測定するためにグラフトの蛋白を抽出し、Western blotting を用いて Calpain、Caspase3 の活性を測定した。再灌流7日目でのグラフトの線維化を Masson's trichrome 染色で評価した。冷保存中の心筋細胞質内の Ca<sup>2+</sup>濃度の変化を測定するために、H9c2 細胞に Ca<sup>2+</sup>蛍光指示薬である Premo Cameleon Calcium Sensor™ を導入し、UW もしくは Dsol に24時間冷保存し、各々の蛍光強度を測定した。

【結果】 36時間冷保存モデルでは、Dsol 群の7日間グラフト生存率は6/8(75%)と、UW 群 1/7(14%)に比して有意に高かった。24時間冷保存モデルでは、Dsol 群では全例(5/5)で7日間のグラフト生存が認められたが、UW 群では1/5(20%)にグラフトの喪失が認められた。24時間冷保存モデルにおいて、再灌流24時間後の心グラフトの梗塞範囲(Dsol 群 11.7±7.3%、UW 群 67.8±16.5%)、梗塞範囲の辺縁(Area at risk)のアポトーシス心筋細胞数(Dsol 群 5.97±2.44 counts/HPF、UW 群 15.1±1.30 counts/HPF)、炎症性細胞浸潤(多形核好中球; Dsol 群 15.1±1.30 counts/HPF、UW 群 12.4±1.37 counts/HPF、単核球; Dsol 群 9.6±0.87 counts/HPF、UW 群 21.7±1.76 counts/HPF)、血中 LDH 濃度(Dsol 群 516±195 IU/L、UW 群 1282±667 IU/L)、AST 濃度(Dsol 群 463±120 IU/L、UW 群 1144±427 IU/L)、再灌流7日目でのグラフトの線維化範囲(Dsol 群 20.7±11.1%、UW 群 39.5±11.0%)と、何れも Dsol 群で有意に抑制されていた。再灌流1時間後のグラフトの ATP 含有量は、Dsol 群 8.34±2.16 μmol/g dw、UW 群 4.32±2.90 μmol/g dw と、Dsol 群で有意に良好な ATP の回復が見られた。再灌流24時間後、UW 群では Calpain、Caspase3 とともに著明に活性化されていたのに対し、Dsol 群ではこれらの活性化が有意に抑制されていた。In vitro の実験で、UW 群では細胞質の蛍光強度が24時間冷保存後に保存前の37%に上昇したのに対し、Dsol 群では蛍光強度の上昇は140%に有意に抑えられていた。

【考察】 ラットの心臓の安全冷保存時間はヒトのそれよりも長く、12時間とされている。しかし、24時間をこえる冷保存はラットにおいても心グラフトの喪失を引き起こしうると

される。本研究においても、UWでの24時間冷保存はグラフトに広範な梗塞を引き起こし、一部のグラフトの喪失を招いた。一方で、Dsolはグラフトの梗塞を大幅に抑制し、グラフト喪失を完全に防いだ。36時間冷保存モデルでのDsolの優位性はより顕著であった。心グラフトの梗塞にはネクロシスと、その周辺で起こるアポトーシスが重要な役割を果たしている。UWでは長期冷保存/再灌流後のグラフトのネクロシスを防ぐことができなかったが、Dsolはこれを大幅に抑制した。心筋のネクロシスは炎症性細胞を誘導し、これらの炎症性細胞によりさらにグラフト障害は増幅される。Dsolでは炎症性細胞浸潤も強く抑制されており、このこともグラフト障害抑制の一因であろう。Dsolは心筋細胞のネクロシスのみならず、アポトーシスも有意に抑制した。冷保存中の細胞質内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇と、これにより引き起こされる再灌流後のCa<sup>2+</sup>依存性プロテアーゼの活性化は、心筋のネクロシスやアポトーシスの誘導に重要な役割を果たしている。Ca<sup>2+</sup>依存性プロテアーゼであるCalpainは細胞質内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇により活性化され、細胞骨格タンパク質を分解し、ネクロシスを引き起こすのみならず、Caspase3を活性化しアポトーシスを引き起こす。重水には細胞質内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を抑制する作用があると報告されており、この重水の作用によりDsolは冷保存中の細胞質内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を抑制し、その後のプロテアーゼの活性化とそれに続く心筋細胞のネクロシス、アポトーシスを抑制したと考えられる。細胞内液型の組成や、HESは冷保存中の細胞の膨化の抑制作用があるとされるが、一方では血管を障害し、臓器の梗塞を起こす可能性も示唆されている。そのため、我々は本保存液では細胞外液型の組成を採用し、HESを除外した。これによる膨化の抑制作用の減弱を補うため、本保存液では不透性物質をmannitolとsucroseに変更した。これらの物質は不透性物質として作用するのみでなく、それ自身が細胞保護作用や抗酸化作用を有しているとされており、これらの作用も臓器保護作用の要因となっている可能性がある。また、重水は細胞質内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を抑えるのみでなく、細胞膜や細胞骨格、幕結合タンパクの安定化作用を有すると報告されており、これらの作用も臓器保存においては有用であろう。

【結論】Dsolは冷保存中の細胞質内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を抑え、再灌流後のCa<sup>2+</sup>依存性プロテアーゼの活性化を抑制することにより、長期冷保存/再灌流後の心筋障害を抑制し、グラフトの生存率を改善した。DsolはUWにかわるより強力な臓器保存液として、心臓移植医療の成績の改善に寄与することが期待される。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	松居喜郎
副査	教授	野々村克也
副査	教授	武富紹信
副査	准教授	神山俊哉

## 学位論文題名

### Successful Transplantation of Rat Hearts Subjected to Extended Cold Preservation with a Novel Preservation Solution

(新規臓器保存液によるラット心臓の長期冷保存の検討)

申請者らは、新規臓器保存液 Dsol を用いて、ラット心移植モデルでのその臓器保護効果を検証した。Dsol は 36 時間心冷保存モデルにおいて、7 日間グラフト生存率を 75%と、UW(14%)に比して有意に改善した。24 時間冷保存モデルにおいては、Dsol は 100%のグラフト生存をもたらしたが、UW は 20%のグラフトの喪失をもたらした。また Dsol は、24 時間冷保存モデルにおいて、再灌流 24 時間後の心グラフトの梗塞範囲、梗塞範囲の周囲のアポトーシス心筋細胞数、炎症性細胞浸潤、血中 LDH 濃度、AST 濃度、再灌流 7 日目のグラフトの線維化を有意に抑制した。また、再灌流 1 時間後のグラフトの ATP 含有量は Dsol 冷保存群で有意に高値で、Calpain、Caspase3 の活性化も有意に抑制されていた。H9c2 心筋細胞株を用いた In vitro の実験で、Dsol は冷保存中の細胞内カルシウム濃度の上昇を有意に抑制した。本研究において、新規臓器保存液 Dsol は、既存の保存液である UW と比較して、冷保存中の細胞内カルシウム濃度上昇を抑制し、カルシウム依存性プロテアーゼの活性化を抑えることにより、より強いグラフト保護効果をもたらすことが示された。今実験の結果は、新規臓器保存液 Dsol が臨床での心臓移植におけるグラフトの保存液として有用であることを示唆している。

公開発表後、副査の野々村教授から①論文は現在 in press なのか②心移植ではどの程度の梗塞までなら Graft の生着は可能か③今回の実験モデルでは rejection は考えなくてよいモデルで、炎症の惹起により炎症細胞が浸潤するが、Dsol の効果は抗炎症効果なのか心筋細胞の壊死を抑えるのが主なのか④Dsol の臨床応用に関しては作成・安定性や安全性はどうか、について質問があった。それらに対し①すでに accept されており、電子版では公開されている。②本モデルは腹部に移植する Non-function モデルなので、グラフトの壁の動きのみで評価しているため、わずかに震える程度でも生着と判断している。これらのグラフトは心機能の観点からはグラフトロスととらえるべきであろうが、本モデルは Non function model であるため、評価は困難である。論文によっては 30%の梗塞でグラフトロスが認められるとの報告もある。UW 群での梗塞範囲は、致命的なものであると考えてよいだろう。③心筋細胞の壊死を抑えることで 2 次的に炎症を抑えると考えている。④重水は元素としては安定であるので薬品としての保存は可能である。重水は体重の 40%を飲むと毒性を示すが、臓器の保存液として使用する分には安全であると考えている、と回答した。

副査の武富教授からは①重水の入手先について②梗塞とネクロシスは同義であるのか③ネクロシスを起こした部分は左室優位とかいうようなパターンはあるのか④Ca<sup>2+</sup> overload を抑制する機序の詳細について質問があった。これらに対し申請者は、①重水は現在カナダと中国で製造されている。本実験では試薬として入手可能なカナダ製のものを用いた②TTC 染色により評価できるのはミトコンドリアの生理活性であり、その点では厳密にネクロシスとアポトーシスを区別はできないが、再灌流 24 時間の時点での TUNEL 染

色の結果からも分かるように、この時点ではアポトーシスによる細胞死は完成していない。この時点で TTC 染色で認められる梗塞は主にネクロシスによるものであると考えている。③ネクロシスは spot 状の集塊の連続として認められる。ネクロシスは様々な原因で起こるが、このようなパターンを示す背景には血管の閉塞などが影響しているものと考えてい

る④重水の作用として L type  $\text{Ca}^{2+}$  channel を通して細胞外から内への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入の抑制と筋

小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  流出の抑制の経路が報告されているが、今回の効果の機序は筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  流出の抑制と考えている、と回答した。

副査の神山准教授からは①各実験群のモデルの数②背景で重水の効果の一つとして細胞膜の安定性を保つとあったが、本実験で評価しているか③心グラフトの機能の評価は④Dsol はネクロシスと炎症細胞浸潤を両方抑制するののかとの質問があった。これらに対して申請者は、①n=6。②本実験では細胞膜の安定化に関しては検討していない。In vivo での評価は難しいと考えられるが、in vitro で膜の安定化作用に関する報告はある。③グラフトの収縮を本モデルで US を用いて評価はしている。UW 群では、コントロール群の FS の 20%のところ、Dsol では 60%と良好であった。ただしあくまで本実験で用いたモデルは Non-function モデルであるため、正確な評価には Functional モデルを用いた検討が必要である。④ネクロシスと炎症は密接に関連するのでネクロシスの抑制が炎症の抑制につながると考える、と回答した。

最後に主査の松居教授からは① $\text{Ca}^{2+}$  overload を抑制することで心臓の収縮が抑制される可能性があるが、どうか②冷保存中のグラフトの変化については検討したか。③本保存液は、冷保存中、再灌流時何れの時点で作用するのかとの質問があった。これらに対して申請者は、①過去の重水による細胞内カルシウム濃度上昇の抑制に関する報告では、この作用は通常の水の環境に戻されると速やかに消失することが報告されている。再灌流後の心機能を抑制する可能性は低いと考えている。②冷保存終了時には ATP 含有量や組織学的変化などには差がなかった。両群での差は、再灌流後に明らかになるものであった。③冷保存中の  $\text{Ca}^{2+}$  overload を抑制することで、再灌流時の Burst を抑えると考えている。冷保存中、再灌流時何れにも作用しているといえる、と回答した。

本論文は、新規臓器保存液 Dsol がラット心冷保存移植実験で有用であることを示し、今後の臨床応用が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。