

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10522

研究課題名(和文)小児生体肝移植後のテロメア長によるグラフト肝年齢の解明

研究課題名(英文)Analysis of liver allograft age by telomere length after pediatric living donor liver transplantation

研究代表者

眞田 幸弘 (Sanada, Yukihiko)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60406113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：小児肝移植後レシピエントの肝細胞のテロメア長を組織Q-FISH法によって測定し、テロメア長が“移植臓器年齢”や“移植臓器寿命”の指標にできるかを検討することを目的に研究を行った。正常肝のテロメア長の加齢曲線を明らかにした後、拒絶反応症例と非拒絶反応症例において、経時的にテロメア長を測定した。本研究では拒絶反応症例と非拒絶反応症例のいずれにおいてもテロメア長の経時変化に一定の傾向を認めることができなかったが、今後も症例を蓄積し、小児生体肝移植後のテロメア長による移植肝年齢や寿命の解明に迫りたいと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在まで移植肝のテロメア長の短縮率や経時変化を明らかにした報告は国内外において皆無で、小児肝移植後レシピエントにおける移植肝のテロメア長の短縮率や加齢曲線を明らかにすることは、きわめて意義深い。また、テロメアは細胞生物学的な側面より肝予備能を評価することができるため、テロメア長は移植肝の臓器年齢や臓器寿命の指標になる可能性があり、小児移植医療に大きな福音をもたらすと思われる。本研究では拒絶反応症例と非拒絶反応症例のいずれにおいてもテロメア長の経時変化に一定の傾向を認めることができなかったが、今後も症例を蓄積し、小児生体肝移植後のテロメア長による移植肝年齢や寿命の解明に迫りたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, telomere length of hepatocyte in pediatric recipients following liver transplantation was examined by quantitative fluorescence in situ hybridization whether graft liver's age or life is clear by telomere. After the presentation of aging curve of telomere length of hepatocyte in healthy donors, telomere length of hepatocyte with time was examined in both pediatric recipients with acute rejection and without acute rejection. The telomere length of hepatocyte with time cannot be found a certain trend in both pediatric recipients with acute rejection and without acute rejection. However, I think that I want to clear the graft liver's age or life by continued evaluation of outcomes and accumulation of further experience of telomere study.

研究分野：肝移植

キーワード：テロメア 肝移植 組織Q-FISH法 グラフト臓器寿命 拒絶反応

## 様式 F - 19 - 2

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 生体肝移植は胆道閉鎖症に対する根治的治療として 1988 年に始まり、その適応は成人まで拡大され、現在は種々の末期肝疾患における一般的治療として普及している。移植手術手技や術後管理、免疫抑制剤の進歩などにより、移植後短期成績は飛躍的に向上してきたが、生体肝移植の歴史は 30 年に満たないこともあり、長期成績に関しては未だに不明な点が多く、今後の課題である。特に小児肝移植では、小児レシピエントは成人ドナーの部分肝を移植されることになるため、移植臓器と個体年齢の差や部分肝移植という二つの要因が長期成績に影響すると考えられる。また、肝移植後は免疫抑制剤の内服が必要であるため、免疫抑制剤の長期内服に加えて、拒絶反応を含めた免疫性肝機能障害や血管合併症、胆管合併症なども移植後長期成績に影響するため、移植肝の加齢速度は種々の要因によって決定されると思われる。しかしながら、現在まで移植肝年齢に関する確立された客観的指標はなく、免疫抑制剤や種々の術後合併症に対するグラフト肝への影響も不明である。したがって、移植医療において重要な命題である“移植臓器年齢”や“移植臓器寿命”を明らかにすることができれば、移植後長期成績の向上に寄与できると思われる。

(2) ヒト体細胞において、テロメアは染色体の末端に存在する TTAGGG の 6 塩基を単位とする反復配列からなり、染色体内遺伝子の恒常性維持に関与している。また、染色体の安定化や複製に関与している構造物であり、増殖のたびにその長さを短縮することが知られている。つまり、生存するための限界の長さ(6kbp)にまで短縮すると分裂限界に至りアポトーシスにより細胞死を迎えるため、テロメア長の短縮は細胞老化の指標とされている(Harley CB. *Mutat Res.* 1991)。正常肝組織においては、Southern blot 法にて年間 55-100bp 程度の短縮を認めるとの報告がある(Takubo K. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2000)。近年、組織 Q-FISH 法により、組織切片にて正確なテロメア長の測定が可能となった(0' Sullivan JN. *Nat Genet.* 2002, Meeker AK. *Am J Pathol.* 2002)。本法の利点としては、細胞自体のテロメア長を測定することが可能であり、その正確性と有用性は我々グループにより報告されている(Aida J. *Exp Gerontol.* 2008, Kurabayashi R. *Hum Pathol.* 2008, Sanada Y. *World J Surg.* 2012)。

(3) 我々グループは、これまで小児生体肝移植後移植肝において、テロメア長を組織 Q-FISH 法にて測定し、術後拒絶反応症例においてテロメア長に短縮傾向があること、免疫抑制剤離脱症例においてテロメア長に長い傾向があることを報告し(Kawano Y. *PLoS One.* 2014)、免疫抑制療法や術後合併症によってテロメア長が変化しうることを確認した。したがって、今回の研究では、ドナー年齢や移植後経過年数とテロメア長の関係を明らかにし、また、術後免疫抑制状態や術後合併症がテロメア長に与える影響を明らかにすることによって、テロメア長が“移植臓器年齢”や“移植臓器寿命”の指標になりうるかを検討することが研究意義となる。

### 2. 研究の目的

本研究は、小児肝移植後レシピエントの定期肝生検の肝組織を用いて、肝細胞のテロメア長を組織 Q-FISH 法によって測定し、テロメア長を“移植臓器年齢”や“移植臓器寿命”の指標にできるかを検討することが目的である。そのためには、移植肝のテロメア長の経時的変化を明らかにすることが必要であり、同一症例において、経時的にテロメア長の測定を行う。また、術後免疫抑制状態や術後合併症が移植肝のテロメア長に与える影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

テロメア長が移植臓器年齢や臓器寿命の指標になるかを検討するために、以下の研究を行った。

- (1) 正常コントロールのテロメア長の短縮率を解明するために、各年齢別の正常肝組織を用いて、肝細胞のテロメア長を組織 Q-FISH 法によって明らかにした。
- (2) 移植後年度別の移植肝のテロメア長を測定し、テロメア長の短縮率と加齢曲線を明らかにし、術後免疫抑制状態や術後合併症が移植肝のテロメア長に及ぼす影響を解析した。

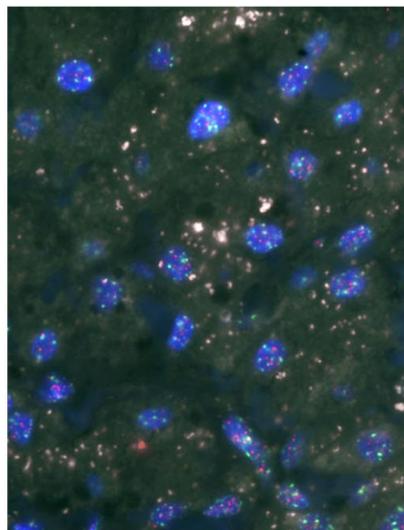
#### 材料：

当科における生体肝移植後レシピエントに対する定期肝生検は、16G Monopty 針にて 1 本採取され、その一部(1-2mm 長)を研究用とし、研究用標本は、直ちに - 80 に凍結保存した。また、肝移植時の肝組織は右葉か左葉より 5mm 四方の肝組織を採取し、- 80 に凍結保存した(自治医科大学倫理委員会承認済)。

#### 方法：

テロメア長の測定は組織 Q-FISH 法を用いて東京都健康長寿医療センター研究所老年病理学チームのもと研究代表者が行った。肝組織は 2 $\mu$ m の厚さに薄切し、テロメアでラベルされた Peptide Nucleic Acid(PNA)プローブ(telo C Cy3 probe: 5' -CCCTAACCTAACCTAA-3', Fasmac, Atsugi City, Kanagawa, Japan) (Cy3; 0.32  $\mu$ mol/L in final concentration)とセントロメアでラベルされた PNA プローブ(Cemp1 probe: 5' -CTTCGTTGGAAACGGGGT-3', Fasmac) (FITC; 0.12  $\mu$ mol/L in final concentration)を用いて組織切片をハイブリダイズしたのち、プレパ

ラートに散布し、核は DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR) にて染色した。その後、蛍光顕微鏡 (80i, Nikon, Tokyo, Japan) で撮影し、これらをテロメア解析ソフト (Image-Pro Plus: version 5.0, Media Cybernetics Co Ltd, Silver Spring, MD) で解析し、個々の細胞のテロメア、セントロメアの蛍光光度を測定し、テロメアとセントロメアの蛍光光度比 (TCR : telomere centromere ratio) を求めた。そして、スライド作製に伴うサンプル間の誤差をなくすために、同一切片上にセルブロックとしてヒト胎児肺由来線維芽細胞 (TIG-1:34 集団倍加レベル、8.6 kbp) の 2 $\mu$ m のパラフィン切片を載せ、各細胞の TCR をセルブロックの TCR で除して NTCR (Normalized TCR) を求めた。NTCR の中央値をテロメア長とした。なお、テロメア解析ソフトは東京都健康長寿医療センター研究所老年病理学研究チームより貸し出され、時間、場所を選ばず、研究代表者により測定することができた。

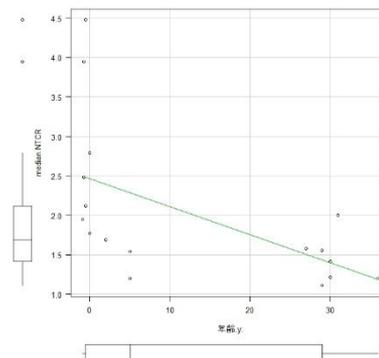


#### 4. 研究成果

##### (1) 非肝疾患剖検例と肝移植ドナーのテロメア長

非肝疾患剖検例として 0-5 才の 10 例の肝臓と、肝移植時に移植肝として使用せずに残ったドナー肝臓 (27-36 才) の 7 例をコントロールとした。これらの 17 例において組織 Q-FISH 法を行い、肝細胞のテロメア長を測定した。また、これらのデータを基に、正常肝のテロメア長の加齢曲線を明らかにした。

非肝疾患剖検例のテロメア長		ドナー肝臓のテロメア長	
年齢 (才)	Median-NTCR	年齢 (才)	Median-NTCR
-0.85	1.95	27	1.58
-0.73	3.95	29	1.11
-0.70	2.48	29	1.60
-0.53	2.12	30	1.23
-0.53	4.48	30	1.40
0	1.77	31	2.00
0	2.79	36	1.20
2	1.69		
5	1.54		
5	1.20		



年齢 (胎生) と NTCR の関係についてピアソンの積率相関分析を行うと (正常コントロールの加齢曲線)  $r = -0.564$ 、信頼区間  $-0.822 \sim -0.115$ 、 $p = 0.0183$  であった。

##### (2) 移植後拒絶反応症例を非拒絶反応症例における経時的テロメア長変化

###### 【拒絶反応症例の経時的テロメア長変化】

胆道閉鎖症 (1 才、ドナー年齢 : 35 才)		
肝生検日	年齢	Median-NTCR
移植時	1 才	0.58
移植後 1 カ月	1 才	0.50
移植後 2 年	3 才	0.51

胆道閉鎖症 (2 才、ドナー年齢 : 27 才)		
肝生検日	年齢	Median-NTCR
移植時	2 才	0.62
移植後 1 カ月	2 才	0.93
移植後 2 年	4 才	0.85

胆道閉鎖症 (1 才、ドナー年齢 : 39 才)		
肝生検日	年齢	Median-NTCR
移植時	1 才	0.43
移植後 1 カ月	1 才	0.35
移植後 5 年	6 才	0.59

胆道閉鎖症 22 才、ドナー年齢 : 31 才)		
肝生検日	年齢	Median-NTCR
移植時	2 才	0.86
移植後 1 カ月	2 才	1.39
移植後 5 年	7 才	0.66

###### 【非拒絶反応症例の経時的テロメア長変化】

胆道閉鎖症 (0.8 才、ドナー年齢 : 39 才)		
肝生検日	年齢	Median-NTCR
移植時	0.8 才	1.71
移植後 2 年	2 才	0.83
移植後 5 年	5 才	2.36
移植後 10 年	10 才	0.87

胆道閉鎖症 (0.9 才、ドナー年齢 : 32 才)		
肝生検日	年齢	Median-NTCR
移植時	0.9 才	1.31
移植後 2 年	2 才	0.64
移植後 5 年	5 才	0.70
移植後 10 年	10 才	1.58

胆道閉鎖症(0.8才、ドナー年齢:32才)		
肝生検日	年齢	Median-NTCR
移植時	0.8才	0.86
移植後2年	2才	1.85
移植後5年	5才	1.30
移植後10年	10才	1.11

今回の研究では拒絶反応症例と非拒絶反応症例においてテロメア長の経時的変化に一定の傾向を認めることができなかった。本年度で研究は終了になるが、今後は症例をさらに蓄積するとともに、移植時乳児症例と移植時学童症例の移植後年度別(移植時、2年、5年時、10年時のペア)に採取された肝生検の肝組織を用いて、肝細胞のテロメア長の測定を行いたいと考えている。最終的には小児生体肝移植後の移植肝年齢や寿命の解明に迫りたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sanada Y, Sakuma Y, Onishi Y, Okada N, Yamada N, Hirata Y, Miyahara G, Katano T, Horiuchi T, Onameuda T, Ogaki K, Otomo S, Lefor AK, Sata N.	4. 巻 25
2. 論文標題 Ultrasonographically guided percutaneous transhepatic liver biopsy after pediatric liver transplantation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Transplantation.	6. 最初と最後の頁 e13997
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ptr.13997. Epub 2021 Mar 11.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 眞田幸弘, 片野匠, 岡田憲樹, 山田直也, 井原欣幸, 水田耕一
2. 発表標題 小児肝移植後経皮的肝針生検は安全に施行できるか？
3. 学会等名 第44回日本小児栄養消化器肝臓学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 眞田幸弘, 佐久間康成, 大西康晴, 岡田憲樹, 山田直也, 平田雄大, 宮原豪, 片野匠, 藤原エリ, 吉田幸世, 佐田尚宏
2. 発表標題 青年期症例に対する生体肝移植の長期予後.
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞田幸弘, 佐久間康成, 大西康晴, 岡田憲樹, 山田直也, 平田雄大, 宮原豪, 片野匠, 大豆生田尚彦, 藤原エリ, 吉田幸世, 水田耕一, 佐田尚宏
2. 発表標題 青年期胆道閉鎖症症例に対する生体肝移植の長期予後.
3. 学会等名 第46回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞田幸弘, 佐久間康成, 大西康晴, 岡田憲樹, 平田雄大, 佐田尚宏
2. 発表標題 小児肝移植後経皮的肝針生検の安全性と注意点.
3. 学会等名 第47回日本小児栄養消化器肝臓学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 眞田幸弘, 佐久間康成, 大西康晴, 岡田憲樹, 山田直也, 平田雄大, 宮原豪, 片野匠, 大豆生田尚彦, 大柿景子, 大友慎也, 関谷菜津美, 吉田幸世, 佐田尚宏
2. 発表標題 胆道閉鎖症における生体肝移植の長期予後と問題点.
3. 学会等名 第47回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 眞田幸弘, 佐久間康成, 大西康晴, 岡田憲樹, 平田雄大, 堀内俊男, 大豆生田尚彦, 佐田尚宏
2. 発表標題 胆道閉鎖症トランジション症例に対する肝移植の適応と治療成績.
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 眞田幸弘, 佐久間康成, 大西康晴
2. 発表標題 肝移植後胆道閉鎖症における長期予後と移行期医療.
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 眞田幸弘, 佐久間康成, 大西康晴, 岡田憲樹, 山田直也, 平田雄大, 宮原豪, 片野匠, 堀内俊男, 大豆生田尚彦, 大柿景子, 大友慎也, 関谷菜津美, 吉田幸世, 佐田尚宏
2. 発表標題 胆道閉鎖症に対する肝移植の適応と課題.
3. 学会等名 第57回日本移植学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 眞田幸弘, 佐久間康成, 大西康晴, 岡田憲樹, 山田直也, 平田雄大, 宮原豪, 片野匠, 堀内俊男, 大豆生田尚彦, 佐田尚宏
2. 発表標題 胆道閉鎖症に対する肝移植の適応と治療成績.
3. 学会等名 第48回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 眞田幸弘, 佐久間康成, 大西康晴, 岡田憲樹, 山田直也, 平田雄大, 宮原豪, 片野匠, 堀内俊男, 大豆生田尚彦, 佐田尚宏
2. 発表標題 小児肝移植後難治性拒絶反応に対する治療と長期予後.
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 眞田幸弘, 佐久間康成, 大西康晴, 岡田憲樹, 平田雄大, 堀内俊男, 大豆生田尚彦, 佐田尚宏
2. 発表標題 当科における小児肝疾患に対する肝生検の経験.
3. 学会等名 第38回日本小児肝臓研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------