

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18111

研究課題名(和文) 生体肝移植術後の血栓性微小血管障害症の病態解明とグラフト肝機能の改善を目指して

研究課題名(英文) Analysis to elucidate the pathogenesis of thrombotic microangiopathy and improve graft function after living donor liver transplantation

研究代表者

種村 彰洋 (Tanemura, Akihiro)

三重大学・医学系研究科・講師

研究者番号：80626242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体肝移植において術後グラフト肝機能不全の原因として血栓性微小血管障害症が注目されている。マウス虚血再還流モデルにおいて、von Willebrand Factorを分解するADAMTS13を投与することにより肝機能改善効果の評価した。しかし有意な効果はみられず、同じく抗凝固因子であるエドキサバン投与による効果を検討した。結果、術後肝障害が軽減された。その作用機序として、抗凝固作用による肝組織の類洞鬱血の改善を認めるのみならず、炎症性サイトカインの抑制や肝組織への炎症細胞浸潤の抑制効果も見られた。さらにアポトーシス抑制効果も見られ、それらが総合的に作用し、肝障害を抑制しているものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦では肝移植の約9割が生体肝移植である。部分肝である生体肝移植では術後肝機能の回復に時間を要する。その中で術後早期のグラフト機能不全は周術期死亡の最も大きな要因である。血栓性微小血管障害症はグラフト肝機能不全となる原因の一つであり、移植肝における微小循環を改善することが命題である。今回われわれは抗凝固因子の一つであるXa阻害薬が肝虚血再還流障害を軽減させることを示した。またその肝保護効果が本来の抗凝固作用のみならず、抗炎症、抗細胞死作用からも示された。これらを臨床応用できれば、早期のグラフト肝不全を防ぎ、生体肝移植の成績を向上させる可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Thrombotic microangiopathy is one of the cause of graft failure after living donor liver transplantation. In mice liver ischemia-reperfusion injury (IRI) model, we evaluated the efficacy of ADAMTS13, which was a cleavage enzyme of von Willebrand Factor, in liver IRI. However, there was no significant efficacy. Therefore, we administered FXa inhibitor, edoxaban, as anticoagulant agent. Postoperative liver injury was alleviated. As anticoagulant effect, sinusoidal congestion was improved in the live tissue. Moreover, inflammatory cytokines and chemokines were reduced, and the infiltration of inflammatory cells into liver tissue was attenuated. Apoptosis of hepatocyte was also prevented. FXa protected liver IRI by these anticoagulant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects.

研究分野：肝胆膵・移植外科学

キーワード：血栓性微小血管障害 生体肝移植 肝虚血再還流障害

1. 研究開始当初の背景

生体肝移植において周術期死亡率は約 10%前後と未だ高率であり、術後早期のグラフト肝機能不全が大きな要因である。近年、移植後肝機能不全の一因として血栓性微小血管障害症 (thrombotic microangiopathy:TMA)が注目されている。移植後肝機能不良例では血小板減少が遷延することが知られており、その原因が TMA であるといわれている。微小血管内で von Willebrand factor (vWF)が血小板と重合体を形成することで微小血栓が生じ、臓器障害へと至る。当科での臨床検体を用いた研究から肝移植術後は vWF 切断酵素である ADAMTS13 が低下することが明らかになっており、特にグラフト機能不全に陥った症例や高齢ドナーグラフトを用いた症例では ADAMTS13 の低下が顕著であった。ADAMTS13 は肝の星細胞のみで産生されることから、肝移植後では TMA 発症に大きく関わっていると考えられる。肝移植術後の TMA は周術期成績を左右する大きな要因であり、TMA を効率的に治療、予防することは術後成績の向上に直結すると考えられた。

2. 研究の目的

これまでも肝移植後の TMA に関する研究は散見されるが、その病態の解明には至っていない。また、生体肝移植後の場合、ほぼ全例で術後に血小板が低下し、脾臓摘出を行っても血小板の増加がみられないことから特殊な病態、つまり TMA に類似した状態であると着想した。これまでの報告と違い、肝移植後の TMA 様状態を他の臓器移植後の TMA とは別の特有の病態として捉え、肝移植後に必ず通過するべき病態で、その状態から如何に脱却するかが後の成績を左右する重要な分岐点であると考えた。本研究では臨床的に経験する移植後 TMA 様状態をラットを用いた動物実験で再現し、肝の微小環境で起こっている変化を明らかにする。特にこれまで当科で行なった研究結果から、高齢ドナー肝や過少グラフトなどのいわゆるマージナルグラフトでその変化が顕著であると仮説を立て、それらを実験的に検証する。一方、近年 Recombinant ADAMTS13 (rADAMTS13)が治療薬として開発され、TTP の治療でその効果が報告されており、現在臨床治療が始まっており、今後製品化され臨床応用されていくものと思われる。同様に肝移植後 TMA 様病態に対しても効果を示す可能性があり、実験的に rADAMTS13 の効果を検証する。生体部分肝移植が主流である本邦において、術後早期の肝機能の改善は長年の命題であり、本研究にて効果が示されれば、将来の治療成績の向上に大きく寄与できるものと考えられる。

3. 研究の方法

本研究ではラットを用いた動物実験により、肝移植後の状態を再現し、移植後の TMA 様状態に着目し、肝微小循環、凝固機能の状態、肝障害、肝再生について評価する。さらに rADAMTS13 を移植後に投与することにより肝微小循環を改善し、移植後の肝機能、生存を改善できるかどうかを検証することを計画した。

肝切除モデル、肝流入血行遮断モデル、部分肝移植モデルを予定した。肝障害の評価として肝逸脱酵素 (AST, ALT)、サイトカイン (IL-6, TNF α など)、凝固能、TMA 様状態の評価として血小板値、凝固能 (PT, ATIII) の測定を計画した。また、経時的に ADAMTS13 活性、vWF を ELISA 法にて測定することを計画した。

肝微小循環を改善させる目的での rADAMTS13 を投与した群としなかった群での比較検討を行い、上記肝障害、肝再生、肝微小循環、凝固能の検討に加え生存率について検討することを計画した。

4. 研究成果

本研究はヒトの肝移植、特に生体肝移植を想定した研究であるため、当初、肝移植モデルにおいて微小循環障害を観察することを計画していた。しかしラットの肝臓移植手術が非常に難易度が高く、生存モデルを作成することができず、移植モデルを断念した。そのため、肝移植に近い状態を再現する目的で、肝臓の一部への流入血行を遮断する、虚血再還流モデルを作成し研究を行うこととした。

虚血再還流モデルとなったことから、実験動物をラットからより小型のマウスへと変更し実験を行うこととした。肝臓の 70%の部分への流入血管を 60 分間クランプし、その後 240 分間再還流させるモデルを作成した。虚血時間が肝移植におけるグラフトを採取した状態に相当し、その後血流を再還流している状態が、グラフトを移植し、血流を再開させた状態に類似する。

直接的に肝微小循環を改善するため、血栓性微小血管障害症(thrombotic microangiopathy: TMA)の原因となる von Willebrand Factor: vWF を分解する ADAMTS13 を投与することにより肝障害が軽減できるかを検討した。

マウス虚血再還流モデルにおいて、遺伝子組み換え ADAMTS13 をクランプ解除直後に投与するモデルを作成した。術後の肝障害の評価として、肝逸脱酵素(AST, ALT)を測定した。コントロール群との比較では、いずれも有意差は認めなかった。

ADAMTS13 による肝障害軽減効果を検討したものの、予想に反して有効な肝保護作用は確認できなかったため、同じく抗凝固因子の1つで、Xa 阻害薬であるエドキサバン投与による効果を検討することとした。

エドキサバンを経口投与し、60分後にマウス肝の70%の肝を60分間クランプするモデルを作成し、薬剤を投与しないコントロールと比較検討した (Fig. 1)。

In vivo study

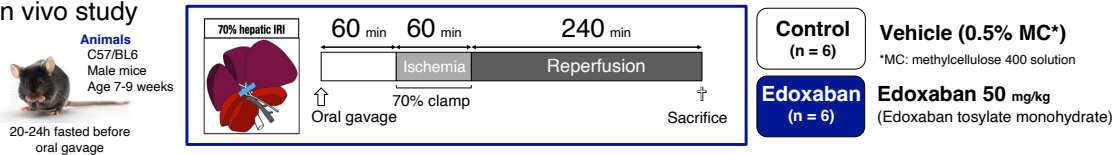


Fig.1

肝逸脱酵素(AST, ALT)を測定したところ、コントロール群、投与群でそれぞれ AST: 4613 (3303-5452), 572 (379-701) IU/L ($p=0.002$), ALT: 2087 (1676-2718), 313 (170-375) IU/L ($p=0.002$) であり、有意な肝逸脱酵素の減少が得られた (Fig. 2)。肝組織を比較検討したところ、コントロール群では類洞の鬱血、肝細胞癌の変性、壊死などがグリソン領域、中心静脈領域にみられたものの、投与群ではそれらの組織学的肝障害が軽度であった (Fig. 3)。肝組織における抗凝固作用を評価するため、Western blot 解析により組織中のフィブリンを測定したところ、投与群では有意にフィブリン形成が抑制されていた (0.95 (0.43-1.36) vs 0.28 (0.25-0.36), $p=0.026$) (Fig. 4)。

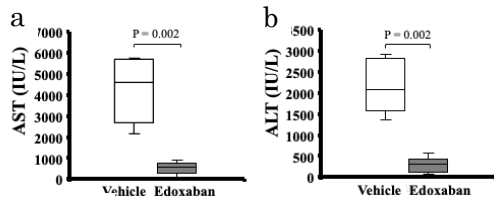


Fig.2

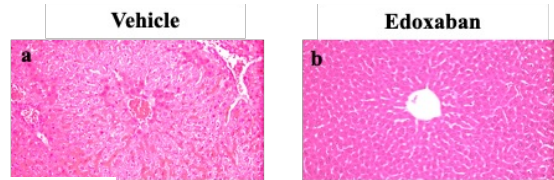


Fig.3

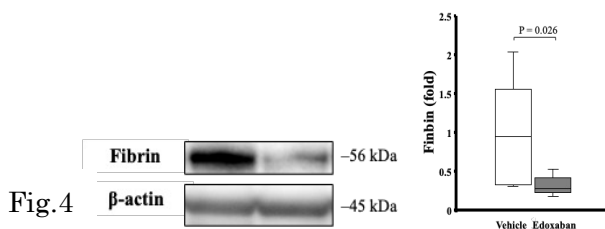
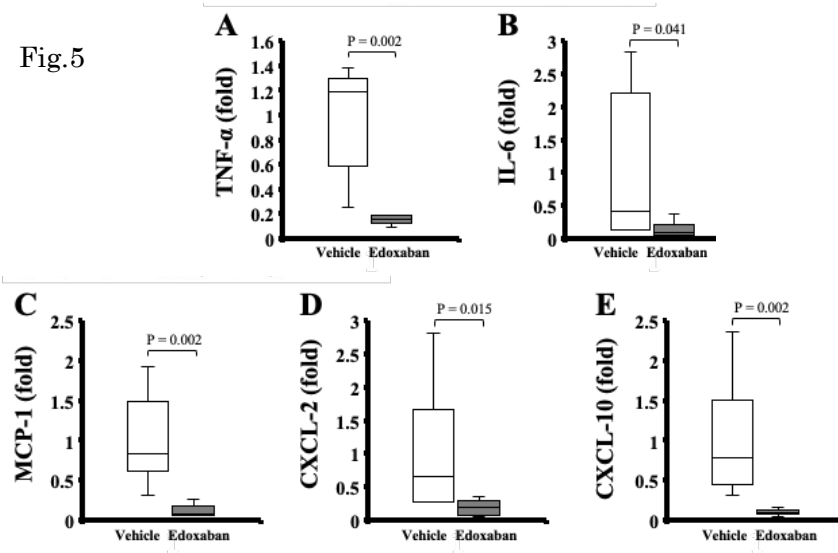


Fig.4

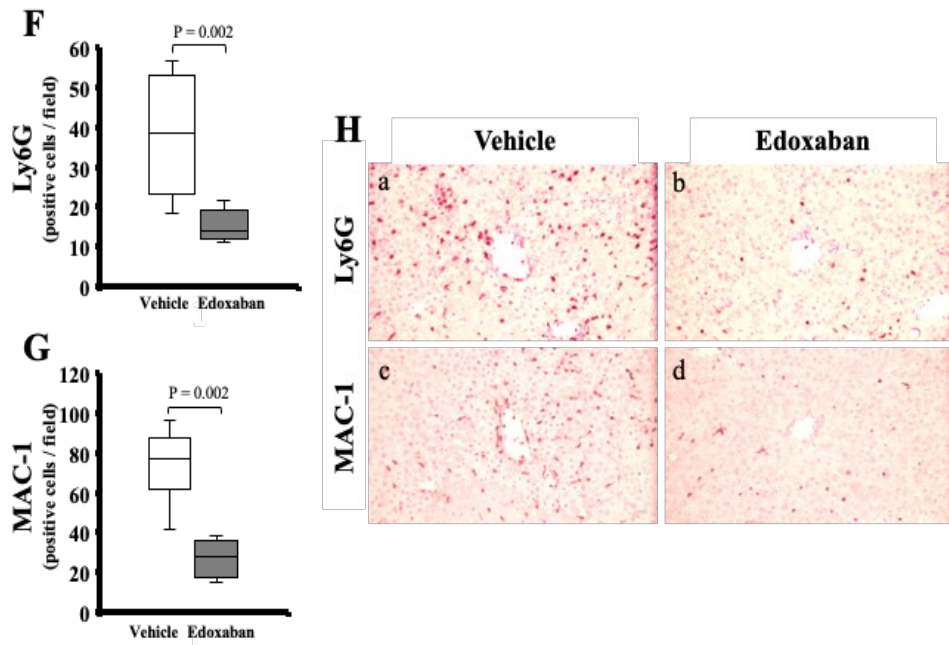
エドキサバンによる抗凝固作用だけでなく、抗炎症作用も評価するため、炎症性サイトカインとして血中の TNF- α 、IL-6 を PCR にて測定した。コントロール群、投与群でそれぞれ、TNF- α / β -actin: 1.2 (0.8-1.3) vs 0.2 (0.1-0.2) ($p=0.002$), IL-6/ β -actin: 0.43 (0.18-1.66) vs 0.09 (0.07-0.15) ($p=0.041$) であり、投与群で有意に炎症性サイトカインの減少が得られた。また白血球遊走を引き起こすケモカインである MCP-1, CXCL-2, CXCL-10 についても同様に比較したところ、MCP-1/ β -actin: 0.8 (0.7-1.2) vs 0.1 (0.1-0.1) ($p=0.002$), CXCL-2/ β -actin: 0.7 (0.4-1.1) vs 0.2 (0.1-0.3) ($p=0.015$), CXCL-10/ β -actin: 0.8 (0.6-1.1) vs 0.1 (0.1-0.1) ($p=0.002$) であり、いずれも投与群で有意にケモカインの減少が得られた (Fig. 5)。

Fig.5



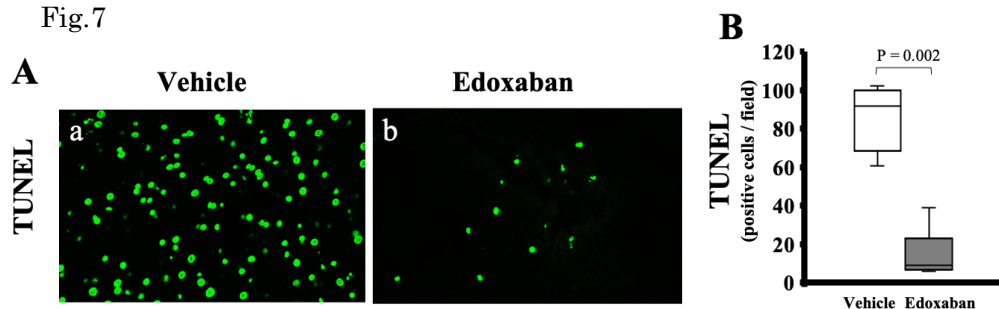
肝組織における好中球、マクロファージの炎症細胞浸潤を Ly6G、MAC-1 免疫染色で観察したところ、Ly6G、MAC-1 陽性細胞はエドキサバン投与群で有意に減少していた (Fig. 6)。

Fig.6



肝細胞のアポトーシスを評価する目的で肝組織の TUNEL 蛍光染色を行った。TUNEL 陽性細胞はコントロール群で 91.6 (75.3-98.2)、エドキサバン投与群で 9.0 (7.5-15.6) でエドキサバン投与群で有意に減少しており (p=0.002)、アポトーシス抑制効果が確認できた (Fig. 7)。

Fig.7



以上の結果から、当初予定していた rADAMTS13 による肝保護作用は確認できなかったものの、同じく抗凝固作用をもつエドキサバンの投与により、虚血再還流障害に対し、抗凝固作用、抗炎症作用、アポトーシス抑制の方向から肝保護作用を確認することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------