

令和 5 年 4 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17581

研究課題名（和文）エベロリムスが部分肝移植後の肝再生に与える影響に関する研究

研究課題名（英文）Impact of everolimus on liver regeneration after partial liver transplantation

研究代表者

園田 真理（Sonoda, Mari）

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：40534235

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：肝移植後早期のエベロリムス（EVR）の導入が移植後のアウトカムに与える影響をラット肝移植モデルを用いて検討した。部分肝移植直後から EVR とタクロリムス（TAC）を導入すると肝再生が遅延し、拒絶と感染症を共に抑制できず生存率が低下した。全肝移植直後から EVR と TAC を導入しても生存に影響しなかった。生体肝移植直後から EVR を導入する場合は、移植前にサイズの大きなグラフトを選択するとともに、移植後の綿密な EVR と TAC の投与量調整が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本結果により、実臨床において生体部分肝移植直後からエベロリムス（EVR）を導入する際に注意が必要であることが明らかとなった。同時に脳死全肝移植直後からの EVR の導入の臨床応用の可能性も明らかとなった。また、肝再生を抑制する薬物を投与した場合の部分肝移植後の転帰も示され今後の肝移植後の肝再生研究の参考となる。結果として肝移植後の免疫抑制戦略の発展に寄与するところが多い。

研究成果の概要（英文）：The impact of very early introduction of everolimus (EVR) on post liver transplant outcomes was investigated using a rat liver transplant model. Very early introduction of EVR and tacrolimus (TAC) after partial liver transplantation delayed liver regeneration, failed to suppress both rejection and infection, and decreased survival. Very early introduction of EVR and TAC after whole liver transplantation did not affect survival. If EVR is introduced immediately after living-donor liver transplantation, a larger graft size should be selected before transplantation, and careful EVR and TAC dosage adjustment after transplantation is necessary.

研究分野：移植外科

キーワード：エベロリムス 生体部分肝移植 肝再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

mTOR 阻害薬であるエベロリムス (EVR) は、本邦では免疫抑制剤として心臓、腎臓移植を経て、2018 年 2 月に肝移植への適応が保険承認された。EVR には、抗腫瘍効果、移植臓器の線維化抑制効果、抗ウイルス効果など、免疫抑制効果以外にも様々な効果があるとされる。今日まで、免疫抑制剤のキードラッグはカルシニューリン阻害薬 (CNI) であるが、副作用として腎機能障害が問題視されてきた。しかし、EVR を併用することで、拒絶を制御しながら、CNI の減量や休薬が可能になり、結果として腎毒性の低下につながる事が判明してきた。現在、肝移植への EVR の使用は、移植後 4 週以降とされているが、これは、移植後早期の使用では拒絶の制御が不透明であること、副作用として創傷治癒遅延などが指摘されていることが理由にある。しかし、移植前より腎障害を有する肝移植患者や、肝細胞癌に対する肝移植患者など、移植後早期より EVR を導入することでその効果が期待できる患者も存在する。実際、腎移植では移植後早期から EVR を投与するプロトコルが開始されており、拒絶、創傷治癒遅延を含めた副作用に問題はなかったと報告されている (Cortazar et al, *Am J Transplant*, 2012)。そこで、肝移植においても EVR を移植後早期から投与することはできないかとの問いに至った。そのためには、本邦で主となる生体部分肝移植後の移植肝の再生に対する影響の検証が必須であるため、本研究課題の提案に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、部分肝移植直後からの EVR の導入による肝再生、生存、腎機能、拒絶への影響を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) LEW ラット 70%肝切除モデルを用いて、EVR が肝再生に及ぼす影響を検討した。また、EVR、TAC のトラフ測定を行い、実臨床での目標値と比較し投与量が至適かどうかを検討した。

全身麻酔下に、右葉と尾状葉を残肝とした 70%肝切除を施行し、EVR (1.3mg/kg/day) 投与群、EVR (2.5mg/kg/day) 投与群、TAC (6.5mg/kg/day) 投与群、EVR (1.3mg/kg/day) + TAC (3.0mg/kg/day) 投与群、EVR (0.8mg/kg/day) + TAC (1.5mg/kg/day) 投与群、蒸留水投与群 (control) を作成した。EVR と TAC は、手術直後から 1 日 1 回生食に溶解し 1mL 経口投与した。犠牲剖検にて手術後 1 日、3 日、7 日、14 日に下大静脈より採血を行う。AST、ALT、Bil、BUN、Cre、EVR と TAC の血中濃度を測定する。また上記の犠牲剖検時に肝の生検を行う。移植肝の再生を評価するために移植肝重量、Ki67 labeling index を解析する。

(2) ラット同種 30%部分肝移植モデル (ドナー : DA、レシピエント : LEW) を用いて肝再生、生存、腎機能、拒絶への影響を検討した。

全身麻酔下にドナーラットから全肝を摘出し、バックテーブルで右葉と尾状葉のみを残した 30%部分肝グラフトとした。グラフトは HTK 保存液に 3 時間冷保存し迅速にレシピエントラットに移植した。EVR (2.5mg/kg/day) 投与群、TAC (6.5mg/kg/day) 投与群、EVR (1.3mg/kg/day) + TAC (3.0mg/kg/day) 投与群、EVR (0.8mg/kg/day) + TAC (1.5mg/kg/day) 投与群、蒸留水投与群 (control) を作成した。

14 日間の生存実験を行い、EVR と TAC は、手術直後から 1 日 1 回生食に溶解し 1mL 経口投与する。犠牲剖検にて手術後 3 日、5 日、14 日に下大静脈より採血を行う。AST、ALT、Bil、BUN、

Cre、EVR と TAC の血中濃度を測定する。また上記の犠牲剖検時に肝の生検を行う。移植肝の再生を評価するために移植肝重量、Ki67 labeling index を解析する。移植肝組織を HE 染色し、Banff Working Group on Liver Allograft Pathology による診断基準 (Demetris et al, *Am J Transplant*, 2016) を参照し、拒絶の評価を行う。

(3) ラット同種全肝移植モデル (ドナー: DA、レシピエント: LEW) を用いて(2)と同様に生存、拒絶への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 70%肝切除モデル

トラフ値から EVR1.3mg/kg を TAC と併用する際の投与量として、EVR2.5mg/kg を EVR 単剤としての投与量とした。また、TAC6.5mg/kg を標準量 TAC 単剤としての投与量とした。EVR1.3 と TAC3.0 の併用では目標トラフに近かった一方で、EVR0.8 と TAC1.5 の併用では目標トラフより低かった。これら投与量で肝再生を評価した。EVR を含む群では、切除後 3 日目では、肝再生率はコントロール群や標準量 TAC 群よりも下回っていた。しかし、14 日目には EVR 単剤ではコントロール群と同等まで至っており、EVR と減量 TAC 併用群においても 14 日目には標準量 TAC と同等まで追いついた。以上の結果から、EVR は肝切除後の残肝重量の回復を、抑制し続けるわけではないものの、遅延させることが判明した。Ki-67 index は、切除後 1 日目において EVR を含む群では、index がコントロール群や標準量 TAC 群よりも低かった。EVR が肝細胞の増殖を抑制していることが示唆された。

(2) 30%部分肝移植モデル

EVR の肝細胞増殖抑制が部分肝移植ではどのような影響を及ぼすのかを検証した。つまり、EVR 導入による免疫細胞の増殖抑制つまり拒絶の抑制や腎機能保護効果というメリットと、グラフト肝の細胞増殖抑制というデメリットのバランスを評価した。

生存率は、免疫抑制効果のないコントロールでは 10 日前後で全例、拒絶で死亡したが、TAC6.5 群、EVR2.5 の単剤群では全例が生存した。一方で、EVR1.3 と TAC3.0 の併用群では 20%と低かった。TAC6.5 では、目標トラフに近く、感染も拒絶も認めず標準量 TAC として至適投与量とした。一方で、EVR2.5 ではトラフ高値にも関わらず全例が中等度以上の拒絶を認め、EVR 単剤での導入は免疫抑制効果の弱さから困難と考えられた。生存率の低かった EVR1.3 と TAC3.0 の併用群の死因は感染で、EVR、TAC とともにトラフ高値で 50%を超える例で感染を認めた。そこで EVR1.3+TAC3.0 から減量したが、EVR0.8+TAC1.5 ではトラフは目標値に近くなったにも関わらず、まだ完全には感染を抑制することができなかった。一方で、同じ投与量にも関わらず、拒絶を発症したラットが存在した。これ以上の投与量の減量は困難で EVR と減量 TAC の併用においては、感染と拒絶を共に抑制することが難しかった。EVR0.8+TAC1.5 の生存率は 75%にとどまった。肝再生率については、標準量 TAC は、14 日目で 90%以上回復するのに対し、EVR と減量 TAC の併用では、標準量 TAC よりも移植後 3 日目のグラフト肝重量の回復が遅延した。Ki-67 index は、移植後 3 日目において、EVR+減量 TAC では標準量 TAC 群よりも低い傾向にあり肝細胞の増殖が抑制されていることが示唆された。一方で、腎機能については、拒絶も感染もなく生存したラットでは移植後 14 日目の BUN、Cre は標準量 TAC よりも低く腎障害は軽減された。

(3) 全肝移植モデル

全肝移植では部分肝移植で生存率の低かった投与量の EVR+減量 TAC が投与されたが、トラフは目標域で、感染、拒絶ともに抑制でき全例が生存した。

以上から、グラフトサイズが小さな移植において、移植直後から（併用）EVR+減量 TAC を導入すると、肝再生が遅延し、感染と拒絶を共に抑制することが難しいということが判明した。一方で、感染と拒絶を抑制できた場合には腎保護効果があった。そしてグラフトサイズが大きいと、感染と拒絶を共に抑制することが容易になることも示唆された。

本結果を実臨床へ応用するにあたっては、EVR を生体部分肝移植直後から導入する際には、移植前にサイズの大きなグラフトを選択することに加え、感染と拒絶を共に抑制できる投与量の幅が狭かったという結果から、移植後は綿密な投与量調整を行う必要があると考えられた。さらに抗生剤を含めた治療介入やトラフに基づく経時的な投与量調整を実臨床では行うことで、より安全性が高まる可能性がある。

一方で、グラフトの大きな脳死全肝移植ではより高い安全性をもって導入できることも示唆された。しかし、本実験におけるレシピエントラットは健常で、移植前に肝障害や腎障害がある場合における検討は今後必要である。また、グラフトサイズがどの程度大きければ安全なのかといった課題は残る。

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 Hirata Masaaki, Yagi Shintaro, Ito Takashi, Masano Yuki, Miyachi Yosuke, Yao Siyuan, Sonoda Mari, Masuda Satoshi, Haga Hironori, Hatano Etsuro	4. 巻 -
2. 論文標題 Impact of very early introduction of everolimus on liver regeneration after partial liver transplantation in rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jhbp.1310	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
研究協力者	平田 真章 (Hirata Masaaki) (60980448)		

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