

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591763

研究課題名（和文）

エイジングによる肝再生能の変化と肝幹細胞の役割-肝移植の知見に基づく基礎的検討

研究課題名（英文）

The influence of age on the liver regeneration and hepatic progenitor cell

研究代表者

河地 茂行 (KAWACHI SHIGEYUKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80234079

研究成果の概要（和文）：

慶應義塾大学病院で行われた生体肝移植ドナー手術において、術後1週間・1カ月後の肝再生能力を年齢別に検討した。ドナー手術は、ヒトにおける正常肝の肝再生が観察可能な唯一の臨床モデルであり、若年ドナー（30歳未満）の1週間後の残肝肥大率が、高齢ドナー（50歳以上）に比して有意に高いとの結果を得た。

生体肝移植ドナー肝の生検検体または、切除された転移性肝腫瘍の正常肝組織の一部を患者の同意のもとに採取し、ヒト正常肝の幹細胞マーカーであるThy-1を使って肝幹細胞の分離を試みたところ、高齢になるにつれてThy-1陽性細胞のpopulationが低下する傾向を認めた。

本研究によりヒトの肝再生能力が加齢に伴い有意に低下する事が示され、そのメカニズムにThy-1陽性細胞が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Recent reports suggest that the donor age might have a major impact on the recipient outcome in adult living donor liver transplantation (LDLT), but the reasons underlying this effect remain unclear. The aims of this study were to compare liver regenerations between young and aged living donors, and to evaluate the number of the Thy-1+ cells, which have been reported to be human hepatic progenitor cells.

LDLT donors were divided into 2 groups (Group 0 donor age ≥ 50 years n=6 and Group Y donor age ≤ 30 years n=9). The remnant liver regeneration rates were calculated on the basis of CT volumetry on postoperative days 7 and 30. Liver tissue samples were obtained from donors undergoing routine liver biopsy or patients undergoing partial hepatectomy for metastatic liver tumors. Thy-1+ cells were isolated and counted using immunomagnetic activated cell sorting (MACS) technique.

Donor liver regeneration rate were significantly higher in young donors compared to old donors ($P=0.042$) on postoperative day 7. Regeneration rates were significantly higher after right lobe resection compared to that after left lobe resection. The MACS findings showed that the number of Thy-1+ cells in the human liver consistently tended to decline with age.

Our study revealed that liver regeneration is impaired with age after donor hepatectomy, especially after right lobe resection. The declining hepatic progenitor cell population might be one of the reasons for impaired liver regeneration in aged donors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：エイジング、肝再性能、肝幹細胞、Thy-1、生体肝移植、ドナー年齢

1. 研究開始当初の背景

内科的治療が限界となった末期肝疾患の治療法として、肝臓移植は標準治療としての地位を確立している。我が国の肝臓移植医療の特殊事情として脳死ドナー数の圧倒的不足が挙げられ、「臓器移植に関する法律」の施行後9年半でわずか40例の脳死肝移植が行われたに過ぎず、我が国の肝臓移植のほとんどを生体肝移植に依存しているのが実情である。

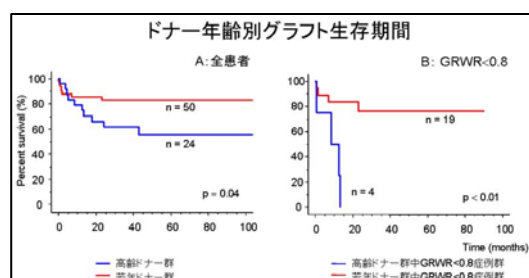
我々は慶應義塾大学一般・消化器外科学教室における肝胆膵・移植班として、これまで一貫して生体肝移植の臨床および研究を担ってきた。1997年～2007年までに施行された成人生体肝移植症例74例に対し、ドナー年齢がレシピエント成績に及ぼす影響について検討した。

レシピエントを若年ドナー群(50歳未満ドナーよりグラフトを得た症例：50例)と高齢ドナー群(50歳以上のドナーからグラフトを得た症例：24例)に分け、全症例でドナー手術開始直後に肝生検(0-biopsy)を行い、病理学的に正常肝で移植ドナーとして適切である事を確認した。術前患者背景の検討では高齢ドナー群において、GRWR (Graft Recipient Weight Ratio)は若年ドナー群に比して大きく、高齢ドナーからのレシピエントのほうが相対的に大きなグラフトを得ており、さらにレシピエントの術前MELD scoreは若年ドナー群に比して高齢ドナー群が低値であり、術前状態は高齢ドナー群のレシピエントの方が良好であった。にもかかわらず、下図の如く、グラフト生存期間は若年ドナー群が高齢ドナー群に比して有意に良好であり(p=0.04)、特に高齢ドナー群で、GRWRが0.8未満を示す、いわゆるsmall for size graftを移植された症例群では、グラフト生存期間が極めて不良であった。

血液データや術後合併症、死因の詳細な解析を行っても、高齢ドナー群のグラフト成績不良な原因を説明することは困難で、高齢

ドナー群におけるgraft lossがほとんどの症例で移植後早期に起きる事、またsmall for size graftの成績が著しく不良である事、術後の経時的なグラフト volumetry によるグラフト容積の検討で、若年ドナー群のグラフト容量の増加率が良好な事などから、グラフト再生能力の違いが予後に大きな影響を与えている可能性が示唆された。

Agingによる肝臓の諸機能の変化に関しては、高齢の肝臓においてミトコンドリア機能



の低下が惹起されたり、CD4+ regulatory T cellのpopulationやfunctionの低下が認められたり、虚血再灌流障害に対する感受性が増加するなどの報告は見られるものの、肝再生能とagingの関連を明らかにした報告は無く、またagingによる肝再生能力の違いを司るメカニズムについての検討は皆無である。

近年、肝臓領域においても自己複製能と多分化能を持つ肝幹細胞に対する知見が増加しており、種々の肝組織から様々な細胞表面マーカーを用いて肝幹細胞を分離する試みがなされているが、成人の肝細胞から肝幹細胞を同定する事は困難であった。

Thy-1 (CD90)は造血幹細胞マーカーの一つで、ヒトの肝芽腫に発現されている事が知られていたが、成人肝組織の非実質細胞からmagnetic activated cell sorting (MACS)により分離されたThy-1陽性細胞の大部分に肝progenitorマーカーであるCK14, M2PK, OV6、胆管細胞マーカーであるCK19が発現

されており、肝幹細胞の分離に有用である事が報告された。さらに、Thy-1 陽性細胞を免疫不全マウスに経脾的に移植したところ、マウス肝内にヒトの肝組織が生着されることが示された (Weiss TS, et al. Gut, 57: 1129-38, 2008.)。これらの事より、成人肝組織中の肝幹細胞を、Thy-1 を使って評価・分離することが可能であることが初めて示された。肝幹細胞は肝再生と密接に関連していると考えられ、aging による肝再生能の違いのメカニズムとして、肝幹細胞が重要な役割を担っていると予想された。

2. 研究の目的

生体肝移植成績を左右する因子としてドナー年齢が非常に重要であるという事実から、aging による肝再生能力を始めとする機能面の違いを in vivo, in vitro のモデルで明らかにし、これらの aging による機能面の違いを担うメカニズムの一つに、肝幹細胞が重要な役割を担っているとの仮説を確かめるために本研究を立案計画した。

3. 研究の方法

生体肝移植ドナー手術は、ヒトにおける正常肝の肝再生を観察可能な唯一の臨床モデルであり、ヒトの臨床における肝再生を論ずる最適の患者群と言える。

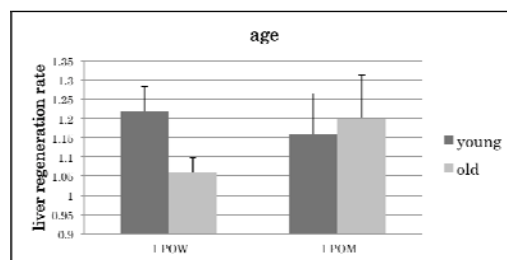
慶應義塾大学病院で施行された生体肝移植ドナー手術において、術後1週間・1ヶ月の肝再生能力を年齢別に検討した。肝再生能力の指標として、肝肥大率 (harvest 直後のグラフト重量と、術後1週間・1ヶ月の時点で施行した CT volumetry によるグラフトサイズの比) を計算した。

また、年齢による肝再生能力の違いに肝幹細胞が関与している事を確かめるために、生体肝移植ドナー肝の 0-biopsy 検体または、転移性肝腫瘍の正常肝組織の一部を患者の同意のもとに採取し (倫理委員会承認済み)、ヒト正常肝の幹細胞マーカーとして有用性が報告されている Thy-1 をマーカーにして肝幹細胞の分離を試みた。肝組織は mince 後 collagenase による消化・分解を行い、その後、実質細胞と非実質細胞に遠心分離し、非実質細胞の細胞数を count し、非実質細胞中に存在するとされる Thy-1 陽性細胞を MACS (magnetic activated cell sorting) にて識別・分離した。年齢別に Thy-1 陽性細胞の population を比較検討した。

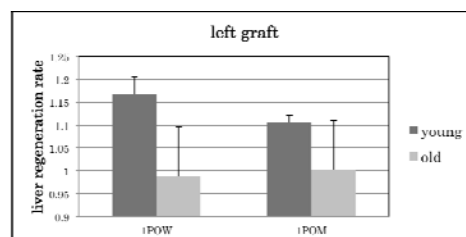
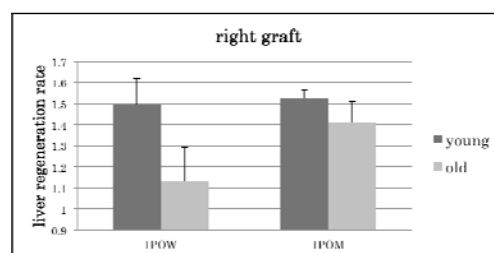
4. 研究成果

生体肝移植ドナー手術後の肝肥大率の検討では、30歳以下の若年群 (Group Y) と 50歳以上の高齢群 (Group O) を比較すると、若年群の術後1週間の肝肥大率が有意に高齢群より高値を示した。術後1ヶ月では、両群

間に有意差を認めなかった (下図)。



グラフト別の検討でも、左葉グラフト、右葉グラフトどちらの術後においても、術後1週間の肝肥大率に年齢による有意な違いを認めた (下図)。

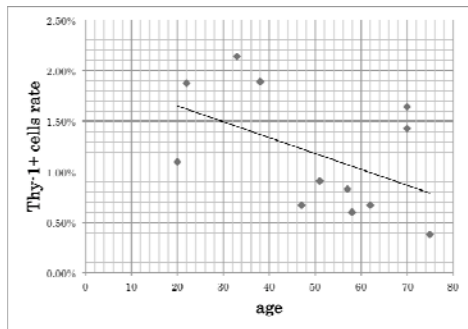


残肝の小さい右葉グラフト採取後1週間の肝肥大率は、左葉グラフト採取後の肝肥大率より有意に高値を示した。

肝機能を表す AST/ALT 値、総ビリルビン値、プロトロンビン時間を経時的に検討したが、若年群・高齢群の間に全く差異を認めず、肝肥大率の変化は臨床的なパラメーターに影響を及ぼさない程度の変化であることが確認された。

生体肝移植ドナーでルーチンに施行している肝生検 (0-biopsy) 検体の一部、もしくは肝切除した転移性肝腫瘍検体の正常肝の一部を採取し、Thy-1 をマーカーとして肝幹細胞の分離を行った。肝組織は collagenase による消化・分解を行った後、非実質細胞から MACS を用いて Thy-1+細胞を分離した。

Thy-1+細胞の population を年齢別に比較したところ、年齢が上がるにつれ、Thy-1+細胞の数が減少する傾向を認めた (次ページ図)。



本結果によりヒトの肝再生能力が加齢に伴い有意に低下する事が示され、そのメカニズムにThy-1陽性細胞が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Ono Y, Kawachi S, Hayashida T, Wakui M, Tanabe M, 他 8 名. The influence of donor age on liver regeneration and hepatic progenitor cell populations. 査読有 Surgery 150, 2011, 154-61

[学会発表] (計9件)

- ① Kawachi S, 他 8 名. The influence of donor age on the outcome and graft regeneration in adult living donor liver transplantation. 12th Congress of the Asian society of transplantation. 2011 年 9 月 27 日, Seoul, Korea
- ② Ono Y, Kawachi S, 他 7 名. The influence of donor age on liver regeneration and hepatic progenitor cells population. 6th Annual Academic Surgical Congress, 2011 年 2 月 1 日, Huntington Beach, USA
- ③ Ono Y, Kawachi S, 他 6 名. Liver regeneration and hepatic progenitor cells population are influenced by donor age. The 8th Japan-Korea Transplantation Forum, 2010 年 10 月 20 日, 京都
- ④ 小野嘉大, 河地茂行, 他 8 名. 肝再生能力の加齢による違いと肝前駆細胞の関わりについての検討. 第 65 回日本消化器外科学会総会, 2010 年 7 月 15 日, 下関
- ⑤ 河地茂行, 他 10 名. ドナー年齢を考慮したグラフト容量設定の必要性. 第 28 回日本肝移植研究会, 2010 年 7 月 1 日, 広島

- ⑥ Kawachi S, Tanabe M, 他 7 名. The impact of donor age on the outcome and graft regeneration in adult living donor liver transplantation. ILTS 16th Annual International Congress, 2010 年 6 月 17 日, Hong Kong, China.

- ⑦ Ono Y, Kawachi S, 他 6 名. The influence of donor age on liver regeneration and hepatic progenitor cells population of donor liver. ILTS 16th Annual International Congress, 2010 年 6 月 17 日, Hong Kong, China

- ⑧ 小野嘉大, 河地茂行, 他. 生体肝移植ドナー年齢による術後肝再生能力の検討. 日本移植学会総会, 2009 年 9 月 17 日, 東京

- ⑨ 河地茂行, 他. 成人生体肝移植成績とグラフト再生に及ぼすドナー年齢の影響. 日本肝胆膵外科学会, 2009 年 6 月 10 日, 名古屋

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河地 茂行 (KAWACHI SHIGEYUKI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：80234079

(2) 研究分担者

涌井 昌俊 (WAKUI MASATOSHI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：90240465

林田 哲 (HAYASHIDA TETSU)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：80327543

小野 嘉大 (ONO YOSHIHIRO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20445381

(3) 連携研究者

なし