

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390313

研究課題名(和文) 肝移植/臓器移植における凝固・線溶系異常の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Towards Elucidation of a novel mechanism for Pathogenesis of coagulation and fibrinolysis abnormalities in liver transplantation

研究代表者

上本 伸二 (Uemoto, Shinji)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40252449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：2006年4月より2013年3月にかけて当院で施行した290例の成人部分肝移植患者を対象とし、肝移植における凝固・線溶系因子の発現解析から、肝局所及び全身循環におけるTMAの発症機序・病態解明を目指すと同時に、新たなる予防・治療戦略の考案を目指した。成人生体部分肝移植においては程度の差こそあれ、ほぼ全例でADAMTS13活性が著減し、類洞/血管内皮障害による微小循環障害が生じている事、TMA重症例では類洞に特異的な補体の沈着を認める事が明らかとなった。ADAMTS13補充による血小板血栓形成の抑制もしくは抗補体抗体投与による補体活性化のコントロールにより肝移植後TMAを軽減出来る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Thrombotic microangiopathy (TMA) is one of the life threatening diseases, which characterized by aggregation of platelets in systemic circulation, and therefore multiple organ dysfunction. The purpose of this study is to clarify the clinical characteristics and prognostic factors of TMA after liver transplantation (LTx). A total of 290 LTx patients from April 2006 to March 2013 were evaluated. We elucidated that the ADAMTS13 activity decreased by more than half in all patients and that TMA is an inevitable process after LTx because of cold-ischemia/warm-reperfusion (CI/WR) during graft preservation. Pathological Confirmation revealed that sinusoidal injury after CI/WR activated complement system, thus regulation of complement activation could be the target to improve the early outcome after LTx.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：肝移植 血栓性微小血管症 ADAMTS13 補体 血小板減少

### 1. 研究開始当初の背景

生命発生の起源である海から陸上へと進化してきた生物は、その体内に“母なる海”を封じ込める“閉鎖循環系”を構築することで高等生物へと進化してきた。しかし、この複雑な循環系の維持には、血管破綻時の即時的な止血/修復と、血管内血栓形成時の速やかな線溶という、相反する2つの複雑な生理機能が必須である。こうした“凝固・線溶系のimbalance”に起因する病態は、近年の分子生物学の進歩と相まって飛躍的に解明されつつあるが、臓器移植、特に肝移植領域ではほとんど理解が進んでいない。

肝移植は末期肝不全患者に対する救命手段として定着し、本邦でも年間500例に及ぶ生体肝移植が施行されるまでになった。本年の改正臓器移植法の施行以来、既に2ヶ月で14件の脳死肝移植が施行され、今後益々その割合が増加していくと予想されている。凝固・線溶の観点から見れば、“巨大な血管の塊”である肝臓の移植とは、“冷保存/温再灌流により障害された、他人の(HLAの異なる)巨大な血管床が、ある日突然に閉鎖循環系の中に入ってくる状態”であると云えよう。以前から、肝移植後早期(7~10日以内)に血小板減少がみられ、この程度が高度な程移植予後が不良であることが相次いで報告されている。すなわち肝移植後早期においては、血小板減少がグラフト機能不全やレシピエント予後の規定因子となるのである。

この機序は依然不明のままであるが、その成因の一つとして、我々は血栓性微小血管障害(thrombotic microangiopathy; TMA)に注目している。これは血管内皮細胞で合成される止血因子 von Willebrand 因子マルチマー(vWF)と、その特異的切断酵素である ADAMTS13 とのバランスが崩れた結果、血小板が過剰凝集し、微小循環障害から多臓器不全を引き起こす疾患であるとされるが、特に臓器移植後 TMA 発症におけるその詳細なメカニズムは解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、肝移植におけるこれら凝固・線溶系因子の発現解析から、肝局所及び全身循環における TMA の発症機序・病態解明を目指すと同時に、新たなる予防・治療戦略を考案することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 基礎研究

Wistar 系ラットを用いて、当院で作成した Isolated Perfused Rat Liver (IPRL) 装置(図1)による生体部分肝移植を模した評価系を確立し、肝保存時に必然的に生じる冷虚血温再灌流が肝グラフト、特に類洞に与える影響およびそのメカニズムを解析した。

#### (2) 臨床研究

2006年4月より2013年3月までに当院で施行した肝移植429症例のうち成人初回部分

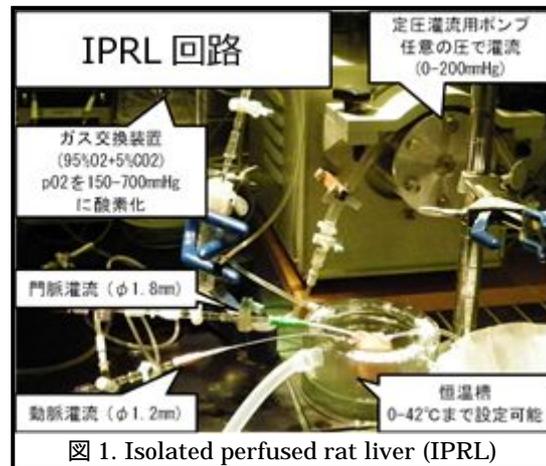


図1. Isolated perfused rat liver (IPRL)

肝移植症例290例を対象とし、術後60日以内に移植後TMAの診断基準である1)血小板数低下、2)溶血性貧血、3)LDH上昇、4)破砕赤血球の出現、の各項目を満たす頻度と予後について検討した。更に移植後周術期の肝生検標本を用いて補体染色を行い、特異的な補体沈着の有無を確認した。

### 4. 研究成果

(1) Wistar系ラットの全肝を摘出し、3時間の単純冷保存、冷灌流保存、および常温灌流保存後に、3ml/min/g-liverという高い門脈流量下でIPRLを120分施行する、生体部分肝移植(small-for-size)を模したモデルを作成し、各々の保存条件下での門脈圧、酸素消費量、肝逸脱酵素、胆汁産生量、免疫染色/電子顕微鏡像を比較検討したところ、以下が明らかとなった

IPRL後の肝組織中のADAMTS13活性をFRET法で測定した所、単純冷保存(Cold storage; CS)群および冷灌流保存(Hypothermic perfusion preservation; H-PP)群においてADAMTS13活性が著明に低下していた(図2)。

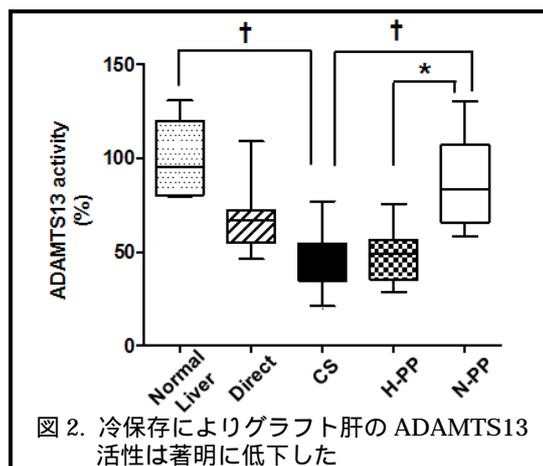


図2. 冷保存によりグラフト肝のADAMTS13活性は著明に低下した

走査型電子顕微鏡でIPRL後の肝類洞を観察したところ、冷保存群において、類洞内皮の篩板構造が破壊され、肝細胞が類洞内に露出していた(図3)。低温での保存が類洞内皮をはじめとする非実質細胞を傷害し、肝微小循環障害の原因となっている可能性が示唆された。

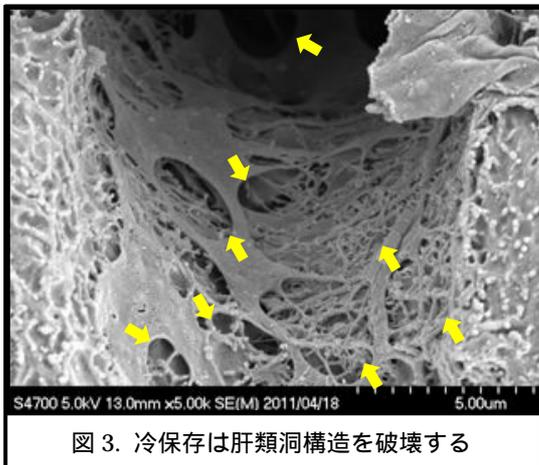


図 3. 冷保存は肝類洞構造を破壊する

(2) 基礎実験より、冷保存する事を避け得ない肝移植の現状においては、程度の差こそあれ全例で潜在的な微小循環障害にあるのではないかという仮説に基づき、肝移植後 TMA 様病態 (TMA-like syndrome; TMALS) のスコア化を試みた。

TMA の各診断基準を満たす頻度は極めて高率であり、特に TMA に特異的とされる破碎赤血球 (Schistocyte) の出現頻度は 70.7% であった (図 4-A)。これらの出現頻度を積み付けせず単純に足し合わせたものを TMALS スコアとして算出したところ、95%以上の症例が 2 点以上であり、4 点の症例も 38.6%存在した (図 4-B)。

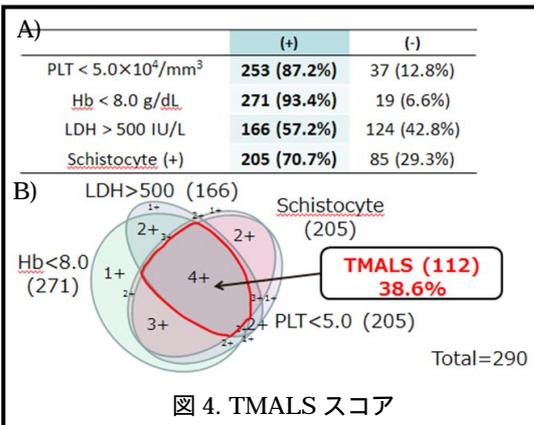


図 4. TMALS スコア

TMALS スコア毎の生存曲線を比較したところ (図 5)、スコアの上昇と共に予後が増悪し

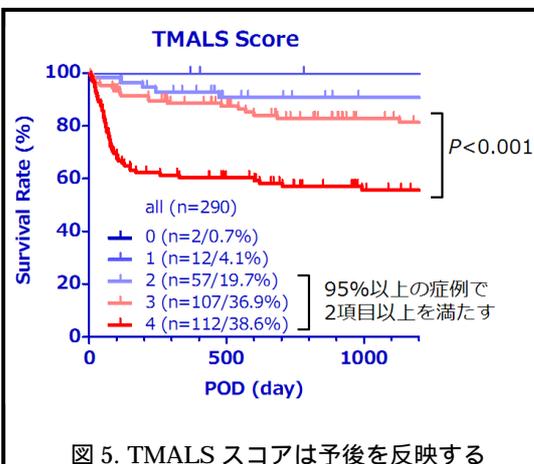


図 5. TMALS スコアは予後を反映する

ており、TMALS スコアが肝移植の予後を反映している可能性が示唆された。

これらの症例のうち、術後 2 週間にわたり ADAMTS13 活性を継続的に測定し得た 61 例に対して解析を行ったところ、ADAMTS13 活性は肝移植直後に半減する事、TMALS 症例では術後早期より ADAMTS13 活性が低下している事が示された (図 6)

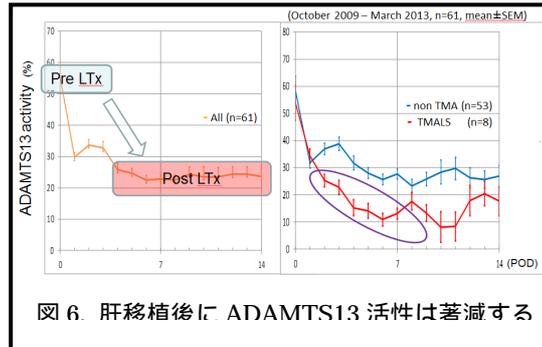


図 6. 肝移植後に ADAMTS13 活性は著減する

当院では以前より ABO 不適合症例に対する液性拒絶 (AMR) との関連で補体系の免疫染色を施行しており、今回、TMALS 症例に対しても補体染色を試みたところ、TMALS 症例において類洞に特異的な補体 C4d の沈着を認めた (図 7)。

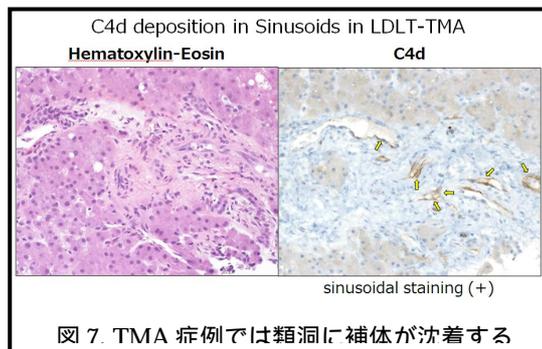


図 7. TMA 症例では類洞に補体が沈着する

ドナーの安全性を考え、より小さいグラフトサイズでの移植手術が試みられるにつれ、TMA の発症頻度は今後一層増加する事が予想される。本研究により、単純冷保存が TMA 発症の最初のトリガーとなる可能性があり、血小板血栓形成の抑制として ADAMTS13 の補充療法が有効である可能性が示唆された。また近年、夜間発作性ヘモグロビン症 (PNH) や非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) といった TMA の亜系において補体系の強い関与が示唆され、これに対する特異的な抗体療法が著効するとの報告もあり、今後、当科でも治療を含めた臨床研究を進めて行く予定である。

## 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 19 件)

Hori T, Uemoto S, et al. Pretreatment of

Small-for-Size Grafts In Vivo by -Aminobutyric Acid Receptor Regulation against Oxidative Stress-Induced Injury in Rat Split Orthotopic Liver Transplantation. *Int J Hepatol.* 2013; 149123.

Raut V, Alikhanov R, Uemoto S, et al. Review of the surgical approach to prevent small-for-size syndrome in recipients after left lobe adult LDLT. *Surg Today.* 2013 Aug 1.

Yoshizawa A, Egawa H, Uemoto S, et al. Significance of semiquantitative assessment of preformed donor-specific antibody using luminex single bead assay in living related liver transplantation. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:972705.

Hori T, Ogura Y, Uemoto S, et al. How Do Transplant Surgeons Accomplish Optimal Portal Venous Flow During Living-Donor Liver Transplantation? Noninvasive Measurement of Indocyanine Green Elimination Rate. *Surg Innov.* 2013 May 22

田中 宏和、秦 浩一郎、上本 伸二. 肝移植における ADAMTS13 活性測定-周術期における ADAMTS13 活性モニタリングの意義. *臨床検査.* 2013;57(5):567-574

Nagai K, Yagi S, Uemoto S, et al. Surgical procedures for a rat model of partial orthotopic liver transplantation with hepatic arterial reconstruction. *J Vis Exp.* 2013 Mar 7;(73):e4376.

Okamoto T, Okamoto S, Uemoto S et al. Suppression of acute rejection by administration of prostaglandin E2 receptor subtype 4 agonist in rat organ transplantation models. *J Surg Res.* 2013 Aug;183(2):852-9.

Takahashi N, Wada H, Uemoto S, et al. Behavior of ADAMTS13 and Von Willebrand factor levels in patients after living donor liver transplantation. *Thromb Res.* 2013 Mar;131(3):225-9.

Yagi S, Nagai K, Uemoto S, et al. A novel organ preservation for small partial liver transplantations in rats: venous systemic oxygen persufflation with nitric oxide gas. *Am J Transplant.* 2013 Jan;13(1):222-8.

Takada Y, Suzukamo Y, Uemoto S, et al. Long-term quality of life of donors after living donor liver transplantation. *Liver Transpl.* 2012 Nov;18(11):1343-52.

Hori T, Ohashi N, Uemoto S, et al. Simple and reproducible hepatectomy in the mouse using the clip technique. *World J Gastroenterol.* 2012 Jun 14;18(22):2767-74.

Abdelaziz O, Hosny K, Uemoto S, et al. Endovascular management of early hepatic

artery thrombosis after living donor liver transplantation. *Transpl Int.* 2012 Aug;25(8):847-56.

Hori T, Ogura Y, Uemoto S, et al. How transplant surgeons can overcome the inevitable insufficiency of allograft size during adult living-donor liver transplantation: strategy for donor safety with a smaller-size graft and excellent recipient results. *Clin Transplant.* 2012 May-Jun;26(3):E324-34.

Yagi S, Iida T, Uemoto S, et al. Effect of portal haemodynamics on liver graft and intestinal mucosa after small-for-size liver transplantation in swine. *Eur Surg Res.* 2012;48(3):163-70.

Hori T, Gardner LB, Uemoto S, et al. Hepatic arterial reconstruction for orthotopic liver transplantation in the rat. *J Surg Res.* 2012 Dec;178(2):907-14.

Shigeta T, Matsuno N, Uemoto S, et al. Functional recovery of donation after cardiac death liver graft by continuous machine perfusion preservation in pigs. *Transplant Proc.* 2012 May;44(4):946-7.

Shigeta T, Matsuno N, Uemoto S, et al. A basic consideration for porcine liver preservation using a novel continuous machine perfusion device. *Transplant Proc.* 2012 May;44(4):942-5.

Ohe H, Waki K, Uemoto S, et al. Factors affecting operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation: impact of early post-transplant events and HLA match. *Transpl Int.* 2012 Jan;25(1):97-106.

Hori T, Hata K, Uemoto S, et al. Thrombotic microangiopathy-like disorder after living-donor liver transplantation: a single-center experience in Japan. *World J Gastroenterol.* 2011 Apr 14;17(14):1848-57.

〔図書〕(計4件)

田中 宏和、秦 浩一郎、森 章、上本 伸二. 肝移植後微小血管障害における抗体医薬を用いた新たな治療戦略. *分子細胞治療フロンティア* 2015

秦 浩一郎、田中 宏和、久保田 豊成、上本 伸二. 連載「TMA 関連の診断と治療」第4回 肝移植後 TMA の病態と治療. *Thrombosis Medicine* 2014, 9月号, in press

秦 浩一郎、田中 宏和、上本 伸二. 特集「消化器外科領域における DIC」8. “肝移植周術期における DIC”. *Thrombosis Medicine* 2014, 6月号, in press

秦 浩一郎、上本 伸二. 生体肝移植レシピエント術後の門脈血栓症 ~臨床的側面と凝固異常の観点から~ *Thrombosis Medicine* 2012 vol.2, no.3. p219-225

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上本 伸二 (UEMOTO Shinji)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号： 40252449

### (2) 研究分担者

小倉 靖弘 (OGURA Yasuhiro)

名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授

研究者番号：20335251

秦 浩一郎 (HATA Koichiro)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90523118

### (3) 連携研究者