

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861087

研究課題名(和文) 遺伝子導入による老化肝若返りによる移植肝の肝再生促進、肝虚血再灌流障害克服

研究課題名(英文) Influence of prevention of ischemic reperfusion and liver regeneration by rejuvinated liver through gene insertion

研究代表者

日高 匡章 (HIDAKA, Masaaki)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：10457541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体肝移植でドナーが老年の場合、生着率が悪い場合、本研究では肝臓の老化を支配する抗老化遺伝子群に着目、虚血再灌流障害に対し、抗老化遺伝子群の発現、制御を検討した。結果：生体肝移植において、肝内マクロファージを測定、若年ドナー(20歳代)と比べると、高齢ドナー(50歳以上)では、マクロファージが少なく、感染症発症を多く認めた。高齢マウスと若年マウスに群別して、虚血再灌流モデルを用いて、肝障害、組織中の抗老化遺伝子発現、炎症性サイトカイン、抗酸化物質を比較検討した。抗酸化物質投与後、高齢群、若年群とも抗老化遺伝子増加は認めなかった。抗酸化物質投与により、肝障害の軽減、抗炎症効果に差を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated that anti-aging gene affected the outcome about the model of ischemic reperfusion on elderly mice because the outcome from elderly donor in living donor liver transplantation (LDLT) was worse than the younger donor. We investigated the expression of macrophage in the donor liver in LDLT and influence of liver macrophage to the outcome after LDLT. There were a few macrophages in elderly donor than in younger donor on the liver biopsy. The infectious complications after LDLT was independently happened in less macrophage group in elderly donor. Multivariate analysis showed that the less macrophage was independent factor of graft loss of LDLT in elderly donor. We investigated the comparison of the expression of anti-aging gene between younger and elderly mice. Also we investigated the expression of anti-aging gene, inflammation cytokine in the ischemic reperfusion model in the rodent. The anti-aging gene was not more expressed in the elderly mice by anti-aging agent.

研究分野：消化器外科

キーワード：老化 肝再生

1. 研究開始当初の背景

肝移植は末期硬変肝、遺伝性肝疾患による肝不全、劇症肝不全などに対する根治的な治療である。欧米では脳死肝移植が行われているが、慢性的なドナー不足であり、本邦では生体肝移植を主に選択されている。脳死肝移植成績を左右する重要な因子としてドナー年齢が挙げられている (Transplantation 79,1445-52,2005)。本邦における生体肝移植でも、ドナー年齢が増加するにつれて、肝移植成績が低下することが報告されている (日本肝移植研究会報告 2012)。ところが、その原因について詳細に検討している報告はこれまでに無い。

生体肝移植における問題点は、グラフトが部分肝であることである。部分肝が再生する過程において、虚血再灌流障害の軽減と門脈血流の調節は、現在、最も重要とされている。門脈血流が過剰である場合、部分肝の再生は遅延、一旦感染症や拒絶反応が起きると、グラフト不全に陥る。高齢ドナーからの肝臓は虚血再灌流障害に弱い可能性がある。高齢ドナーからのグラフト肝には様々な問題が内包されているなかで、本研究ではグラフト肝の老化を支配する因子をコントロールすることにより「若返ったグラフト肝」を調整する発想に至った。そして、肝臓を若返らせる因子として、抗老化遺伝子として知られる Sirtuin 遺伝子 (Sirt) に着目する。Sirt の活性化により合成される蛋白質 Sirtuin は、ヒストン脱アセチル化酵素であり、ヒストンと DNA の結合に作用しエピジェネティックな調整を行うことで加齢調節が行われる。特に、Sirt 1~7 まで存在する Sirt ファミリーのうち、Sirt6 を強制発現させたマウスでは、雄でのみ寿命が延びる事が示されており、作成された二つのトランスジェニックマウスでそれぞれ 15.8%および 13.1%寿命が延長したとされている (Nature 483:218-221,2012)。これらを背景に、肝再生時に発生する虚血再灌流障害のレベルが、果たして抗老化因子 Sirtuin の発現レベルに相関するのかがどうか検証することは重要と考えられる。そこで、本研究では、虚血再灌流障害を誘導した老年ラットを用いて、肝内での Sirt ファミリーをはじめ、Sirtuin と直接結合し細胞や組織の寿命延長に関わる Forkhead 型転写因子である FOXO、ならびに関連する老化遺伝子群の発現レベルを明らかにする。それらの結果から、虚血再灌流障害に影響を受ける老化遺伝子群を特定し、肝切除後の虚血再灌流障害と肝再生モデルを用いて、老年ラットへ遺伝子導入を行い、肝臓を若返らせる。若返った肝臓を用いて、肝移植実験を行い、老化肝における肝再生促進を実証する。

2. 研究の目的

高齢ドナーグラフト肝内の免疫環境
高齢ドナーにおける肝移植成績が低下して

いる原因を探るべく、ドナー肝内のマクロファージ発現が肝移植後の成績に与える影響について、検討する。

虚血再灌流障害により発現制御を受ける抗老化遺伝子の特定

老年、若年ラットで、2/3 肝切除 + 肝虚血再灌流障害モデルを作成し、虚血再灌流障害後の肝再生時において、老年ラットでの具体的な抗老化遺伝子群 (Sirt ファミリー、FOXO など) の発現低下を検証する。また、肝細胞内のヒストン脱アセチル化酵素発現、肝再生促進因子 (HGF, TGF- β) 発現の違いについて、虚血再灌流障害が老化肝にどのような影響を与えるかを明らかにする。さらに、老年ラットで虚血再灌流障害を引き起こしている特異的な遺伝子群の網羅的解析を行い、抗老化に関連する遺伝子群をリストアップする。

グラフト肝の若返り誘導と肝再生への効果の定性的解析

a) 抗老化遺伝子導入による若返りの試み
網羅的遺伝子解析で判明した抗老化遺伝子を、HVJ-liposome 法にてラット肝へ遺伝子導入し、老年ラット肝移植モデルでの肝再生促進、虚血再灌流障害軽減を明らかにする。評価のパラメータとして、サイトカイン (IL-6、TNF) 発現レベル、肝再生促進因子 (HGF、TGF- β) 発現レベル、肝内の抗老化遺伝子 (Sirt ファミリー、FOXO) の発現レベル、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 発現レベルを明らかにする。

b) 抗老化遺伝子発現促進剤による若返りの試み

老年、若年ラットのグラフト肝で部分肝移植を行う。肝移植前に Sirt 活性促進剤 (レスベラトロール) を用いることで、老年ラットで虚血移植後の肝再生が促進するか、上述 a) と同様の評価手法で明らかにする。

3. 研究の方法

生体肝移植症例中、50 歳以上ドナー (高齢ドナー) からの肝移植は 49 例施行した。肝移植に与える成績として、グラフト不全発症の因子を解析した。また、ドナー肝ゼロ生検を用いて、肝内マクロファージ (CD68 陽性細胞) を測定した。さらに、高齢ドナー群において、グラフト不全の因子を解析、マクロファージ発現の影響について、検討を行った。

高齢マウスと若年マウスに群別して、虚血再灌流モデルを用いて、A. 肝切除のみ、B. 虚血再灌流 + 肝切除において、肝障害、組織中の Sirt1 発現、炎症性サイトカイン (TNF, IL-6, IL-1 β)、抗酸化 (HO-1) を比較検討した。

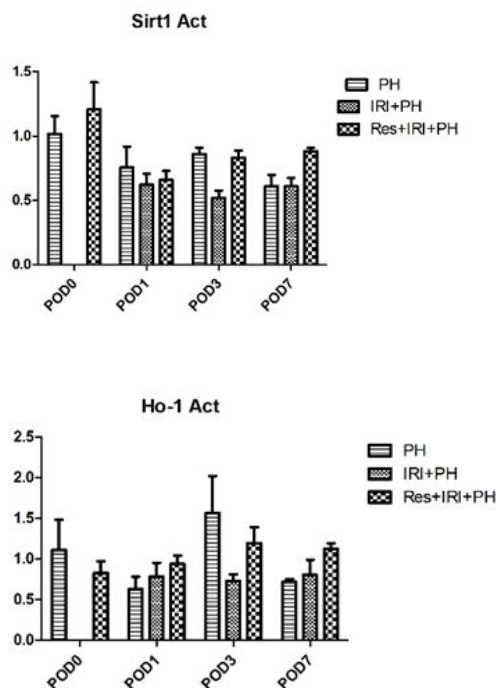
HVJ-liposome 法にてラット肝へ遺伝子導入、導入効率を検討した。

また、Sirt 活性促進剤 (レスベラトロール) 投与により、虚血再灌流障害の軽減につながるか、検討を行った。

4. 研究成果

生体肝移植症例中、50歳以上ドナー(高齢ドナー)からの肝移植は49例施行した。肝移植後のグラフト不全に影響を与える因子は、高齢ドナー、糖尿病あり、術後菌血症発症であった。そこで、ドナー肝ゼロ生検を用いて、肝内マクロファージ(CD68陽性細胞)を測定した。若年ドナー(20歳代)と比べると、高齢ドナー(50歳以上)では、CD68陽性細胞は有意に数が少なかった。菌血症に対するROC曲線を測定、CD68陽性細胞12個をカットオフと設定された。生存率を比較すると、ドナー年齢50歳以上の群(n=49)では、CD68陽性細胞11個以下の群(n=17)で、1年生存率55%であり、一方、CD68陽性細胞12個以上の群(n=32)では、1年生存率91%と、有意に保たれていた。高齢ドナー群でのグラフト不全に関わる因子解析(多変量解析)では、ドナー肝内CD68陽性細胞12未満であった。

2. 高齢マウスと若年マウスに群別して、虚血再灌流モデルを用いて、A.肝切除のみ、B.虚血再灌流+肝切除で肝障害、組織中のSirt1発現、炎症性サイトカイン(TNF, IL-6, IL-1)、抗酸化(HO-1)を比較検討した。高齢群、若年群とも、術後肝機能に差は認めず、術後7日目までのSirt1増加は認めなかった。



3. HVJ-liposome法にてラット肝へSirt1遺伝子導入を行ったが、導入効率が10%前後と低く、断念せざるを得なかった。そこで、抗老化物質であるレスベラトロール投与による虚血-再灌流傷害の軽減について、検討を行った。

レスベラトロール投与後、肝虚血再灌流障

害+70%肝切除を行った。レスベラトロール投与により、肝障害の軽減、抗炎症効果に差を認めなかった。レスベラトロール投与を行い、虚血-再灌流傷害、肝切除を施行した群で、明らかな炎症性サイトカインの改善は、認めなかった。

今回の検討では、高齢ラットの週数が50週と、やや短いラットでもあったためか、期待されるような結果が出なかった。今後、老化に伴う肝内の変化について、検討を重ねていきたい。

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 18件)

Imamura H, Hidaka M, Soyama A, Kitasato A, Adachi T, Ono S, Natsuda K, Hara T, Kugiyama T, Baimakhanov Z, Okada S, Fujita F, Kanetaka K, Takatsuki M, Kuroki T, Eguchi S. A Donor Age-Based and Graft Volume-Based Analysis for Living Donor Liver Transplantation in Elderly Recipients. *Transplant Direct*. 2017 Jun 6;3(7):e168. doi: 10.1097/TXD.0000000000000688.

eCollection 2017 Jul. 査読あり

Wang K, Eguchi S, Hidaka M, Jin T, Soyama A, Kuroki T, Huang M, Wu L, Zou S, Shao J. Comparison of the outcomes of hepatocellular carcinoma after hepatectomy between two regional medical centers in China and Japan. *Asian J Surg*. 2017 Sep;40(5):380-388. doi:10.1016/j.asjsur.2016.03.002. 査読あり

Hidaka M, Eguchi S, Takatsuki M, Soyama A, Ono S, Adachi T, Natsuda K, Kugiyama T, Hara T, Okada S, Imamura H, Miyaaki H. The kupffer cell number affects the outcome of living donor liver transplantation from elderly donors. *Transplantation Direct* 2016;2(8): e94; doi: 10.1097/TXD.0000000000000608. 査読あり

Kobayashi S, Soyama A, Takatsuki M, Hidaka M, Adachi T, Kitasato A, Kinoshita A, Hara T, Kanetaka K, Fujita F, Kuroki T, Eguchi S. Relationship between immune function recovery and infectious complications in patients following living donor liver transplantation. *Hepatol Res*. 2016 Aug;46(9):908-15. doi: 10.1111/hepr.12635. 査読あり

Inoue Y, Soyama A, Takatsuki M, Hidaka M, Kinoshita A, Natsuda K, Baimakhanov Z, Kugiyama T, Adachi T, Kitasato A, Kuroki T, Eguchi S. Does the development of chronic kidney disease and acute kidney injury affect the prognosis after living

donor liver transplantation? Clin Transplant. 2016 May;30(5):518-27. doi: 10.1111/ctr.12715. 査読あり

Baimakhanov Z, Yamanouchi K, Sakai Y, Koike M, Soyama A, Hidaka M, Takatsuki M, Fujita F, Kanetaka K, Kuroki T, Eguchi S. Efficacy of Multilayered Hepatocyte Sheet Transplantation for Radiation-Induced Liver Damage and Partial Hepatectomy in a Rat Model. Cell Transplant. 2016;25(3):549-58. doi: 10.3727/096368915X688669.

Natsuda K, Eguchi S, Takatsuki M, Soyama A, Hidaka M, Hara T, Kugiyama T, Baimakhanov Z, Ono S, Kitasato A, Fujita F, Kanetaka K, Kuroki T. CD4 T lymphocyte counts in patients undergoing splenectomy during living donor liver transplantation. Transpl Immunol. 2016 Feb;34:50-3. doi: 10.1016/j.trim.2015.11.004. 査読あり

Matsushima H, Kuroki T, Adachi T, Kitasato A, Ono S, Tanaka T, Hirabaru M, Kuroshima N, Hirayama T, Sakai Y, Soyama A, Hidaka M, Takatsuki M, Kin T, Shapiro J, Eguchi S. Human fibroblast sheet promotes human pancreatic islet survival and function in vitro. Cell Transplant. 2016;25(8):1525-37. doi: 10.3727/096368916X690854.

Zhang S, Li TS, Soyama A, Tanaka T, Yan C, Sakai Y, Hidaka M, Kinoshita A, Natsuda K, Fujii M, Kugiyama T, Baimakhanov Z, Kuroki T, Gu W, Eguchi S. Up-regulated extracellular matrix components and inflammatory chemokines may impair the regeneration of cholestatic liver. Sci Rep. 2016 May 26;6:26540. doi: 10.1038/srep26540. 査読あり

Miuma S, Ichikawa T, Miyaaki H, Haraguchi M, Tamada Y, Shibata H, Taura N, Soyama A, Hidaka M, Takatsuki M, Eguchi S, Nakao K. Efficacy and Tolerability of Pegylated Interferon and Ribavirin in Combination with Simeprevir to Treat Hepatitis C Virus Infections After Living Donor Liver Transplantation. J Interferon Cytokine Res. 2016 Jun;36(6):358-66. doi: 10.1089/jir.2015.0147. 査読あり

Kugiyama T, Hidaka M, Soyama A, Takatsuki M, Natsuda K, Kinoshita A, Carpenter I, Adachi T, Kitasato A, Kuroki T, Eguchi S. E-cadherin expression in hepatocellular carcinoma treated with previous local treatment in patients undergoing living donor liver transplantation. Transplant Proc. 2015 Apr;47(3):700-2. doi: 10.1016/j.transproceed.2015.02.017. 査読あり

Soyama A, Takatsuki M, Hidaka M, Imamura

H, Kuroki T, Eguchi S. Acute and chronic postsurgical pain after living liver donation: Incidence and predictors. Liver Transpl. 2015 Aug;21(8):1109. doi: 10.1002/lt.24125. 査読あり

Takatsuki M, Soyama A, Hidaka M, Kinoshita A, Baimakhanov Z, Kugiyama T, Adachi T, Kitasato A, Kuroki T, Eguchi S. Technical refinement of hepatic vein reconstruction in living donor liver transplantation using left liver graft. Ann Transplant. 2015 May 25;20:290-6. doi: 10.12659/AOT.893136. 査読あり

Hirabaru M, Kuroki T, Adachi T, Kitasato A, Ono S, Tanaka T, Matsushima H, Sakai Y, Soyama A, Hidaka M, Yamanouchi K, Takatsuki M, Okano T, Eguchi S. A Method for Performing Islet Transplantation Using Tissue-Engineered Sheets of Islets and Mesenchymal Stem Cells. Tissue Eng Part C Methods. 2015 Dec;21(12):1205-15. doi: 10.1089/ten.TEC.2015.0035. 査読あり

Sakai Y, Yamanouchi K, Ohashi K, Koike M, Utoh R, Hasegawa H, Muraoka I, Suematsu T, Soyama A, Hidaka M, Takatsuki M, Kuroki T, Eguchi S. Vascularized subcutaneous human liver tissue from engineered hepatocyte/fibroblast sheets in mice. Biomaterials. 2015 Oct;65:66-75. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.06.046. 査読あり

Matsushima H, Kuroki T, Kitasato A, Adachi T, Tanaka T, Hirabaru M, Hirayama T, Kuroshima N, Hidaka M, Soyama A, Takatsuki M, Kinoshita N, Sano K, Nishida N, Eguchi S. Sox9 expression in carcinogenesis and its clinical significance in intrahepatic cholangiocarcinoma. Dig Liver Dis. 2015 Dec;47(12):1067-75. doi: 10.1016/j.dld.2015.08.003. 査読あり

Sakai Y, Koike M, Soyama A, Hidaka M, Kuroki T, Eguchi S. Rapid production of engineered human primary hepatocyte/fibroblast sheets. Data Brief. 2015 Oct 9;5:498-501. doi: 10.1016/j.dib.2015.09.044. eCollection 2015 Dec 査読あり

13. Miyaaki H, Ichikawa T, Taura N, Miuma S, Honda T, Shibata H, Soyama A, Hidaka M, Takatsuki M, Eguchi S, Nakao K. Impact of Donor and Recipient Single Nucleotide Polymorphisms in Living Liver Donor Transplantation for Hepatitis C. Transplant Proc. 2015 Dec;47(10):2916-9. doi: 10.1016/j.transproceed.2015.10.044. 査読あり

〔学会発表〕(計 5件)

1. 第 117 回日本外科学会定期学術集会

2017年4月27-29日 横浜 考える外科学
高齢ドナーが生体肝移植の成績に与える影
響 - クッパー細胞からの検討 - **日高匡章**
日高匡章 曾山明彦 足立智彦 大野慎一郎 夏
田孔史 原 貴信 今村一步 岡田怜美
濱田隆志 山之内孝彰 小林和真 藤田文
彦 金高賢悟 高槻光寿 江口 晋

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

2. 第33回 日本肝移植研究会 2015年5
月28,29日 神戸シンポジウム 当科にお
ける高齢レシピエントの成績 -ドナー年齢、
グラフト重量からの検討- **日高匡章** 高槻
光寿 曾山明彦 足立智彦 北里 周 田
中貴之 木下綾華 夏田孔史 釘山統太
今村一步 Zhassulan Baimakhanov 黒木
保 江口 晋

(4)研究協力者

なし

3. 第31回日本肝移植研究会 平成25年7
月4-5日 熊本 シンポジウム 生体肝移植
における高齢ドナーグラフトの治療成績
日高匡章 高槻光寿 曾山明彦 足立智彦
北里 周 木下綾華 夏田孔史 藤田文彦
南 恵樹 金高賢悟 黒木 保 江口 晋

4. CAST 2013 Kyoto 2013/9/2-5 poster The
outcome of elderly donor for living donor
liver transplantation -In the light of
Kupffer cell- **Masaaki Hidaka**, Mitsuhisa
Takatsuki, Akihiko Soyama, Tomohiko
Adachi, Amane Kitasato, Ayaka Kinoshita,
Koji Natsuda, Fumihiko Fujita, Kengo
Kanetaka, Tamotsu Kuroki, Susumu Eguchi

5. 第102回日本消化器病学会九州支部例会
宮崎 2013/11/8-9 シンポジウム 80歳以上の
肝細胞癌症例に対する肝切除の安全性と問
題点 - E-PASS を用いた評価 - **日高匡章** 高
槻光寿 夏田孔史 曾山明彦 北里 周
足立智彦 山下万平 森田 道 釘山統太
米田 晃 虎島泰洋 藤田文彦 金高賢悟
南 恵樹 黒木 保 江口 晋

〔図書〕(計 0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

なし

取得状況(計 0件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

日高 匡章 (HIDAKA, Masaaki)

長崎大学, 病院(医学系)・助教

研究者番号: 10457541