

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24591861

研究課題名(和文) 薬剤代謝遺伝子 / BOXes / DAMPs 解析による肝移植後薬剤性肝障害診断

研究課題名(英文) Novel diagnostic tool for drug-induced liver injury after liver transplantation

研究代表者

武田 郁央 (Takeda, Ikuo)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：90420033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝移植した患者の周術期に経時的に血液、尿、肝組織検体を採取・保存し、肝組織からDNAを、末梢血からリンパ球RNAを抽出・精製し、SNP (single nucleotide polymorphism) 解析を行った。これにより、薬剤代謝に関わる遺伝子多型を継時的変化を含めて解析することができた。薬剤性肝障害との関連については、サンプル数を蓄積することで今後解析に移ることができるものと考えている。また、サンプル数が十分でないため、BOXesやDAMPs解析には至っていないが、肝移植後の検体採取・保存は問題なく行っており、サンプル数の蓄積とともにこれらの解析も行いたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We collected blood, urine, and liver tissue samples at fixed intervals after liver transplantation. DNA was extracted from frozen liver tissue, and RNA was extracted from lymphocyte cells obtained from blood samples. Using the DNA and RNA, Genetic polymorphism related to drug metabolism was analyzed using SNP (single nucleotide polymorphism) analysis. The association of genetic polymorphism with drug hepatopathy will be assessed when enough number of samples are accumulated.

研究分野：肝臓移植

キーワード：薬剤性肝障害 肝臓移植 遺伝子多型 薬剤代謝遺伝子

1. 研究開始当初の背景

末期的肝疾患に対する肝移植は、本邦において年間約 500 例行われ、技術的発展、新規免疫抑制剤の開発等により成績が年々向上している。我々は、1991 年より生体肝移植を約 150 例に施行し、その 5 年生存率は 80% 強と、他施設と遜色ない成績を挙げている。しかし、免疫抑制療法の進歩により以前は約半数に発生した術後急性拒絶反応は 35% 程に減少している一方で、術後肝機能異常の原因として薬剤性肝障害の頻度が増加してきている。

肝移植術後 1~2 週間は、最も生化学検査所見が変動する時期であり、虚血再灌流障害、薬剤性肝障害、急性拒絶反応、胆道感染症等の鑑別が問題となる。薬剤性肝障害では、肝生検による病理学的所見において、肝細胞に大滴性の脂肪滴が認められる事が多く、一般には原因と考えられる薬剤を中止する事で軽快して行く。その一方で、拒絶反応との鑑別が困難でステロイドパルス療法を施行した後に肝機能の悪化が惹起される症例や、長期にわたり高ビリルビン血症や高トランスアミナーゼ血症を呈する症例が認められる。肝移植術後には、免疫抑制剤の他、感染予防、潰瘍予防、血液製剤等多くの薬剤投与が必要であり、それら薬剤全てが薬剤性肝障害を引き起こす原因になりうる。移植後に不可欠な免疫抑制剤による薬剤性肝障害(シロリムス、アザチオプリン、FK506)も報告されており、薬剤性肝障害を制御・予防する事は、他の合併症が低下傾向にある中、術後管理において重要な位置を占めてきている。

近年、薬剤代謝酵素チトクローム P450 (CYP) の遺伝子多型により薬物代謝に個人差があることが分かってきた。肝移植の分野では、肝グラフト組織よりを分離して、マイクロソーム分画の CYP の代謝能を調べたところ、CYP2C9、CYP2C19 の活性が著しく低下していたグラフトを移植した 2 例のレシピエントにおいて薬剤性肝障害が認められ、オメプラゾール、フルコナゾール、ST 合剤の中止により軽快したとの報告がある。この様な一塩基多型による代謝能力の個人差の他、コピー数多型によっても抗癌剤に対する薬剤感受性に関与しているとの報告もあり、肝移植の分野においても、これまで報告のないコピー数多型と薬剤肝障害発生との関連についても解析する価値があると考えられた。

更に、肝移植に伴い、虚血再灌流障害、拒絶反応、手術侵襲、薬剤等の影響を受け、肝臓の薬物代謝能も変化しているはずである。経時的に肝組織を用いて薬物代謝能を測定する事は困難であるが、末梢血単核球の薬物代謝関連遺伝子の解析をする事により、間接的に把握できる可能性がある。末梢血単核球の

DNA アレイの検討では、薬剤代謝 I・II 相に働く酵素、トランスポーター等は肝細胞と同様に発現している。それらの mRNA を定量的・経時的に測定し、術後レシピエント状態・合併症との関連性、特に薬剤肝障害発症時の変化について検討した報告はない。

薬物性肝障害の機序は、肝細胞内薬物代謝の過程で、Phase I 酵素(チトクローム P450、CYP)により oxidation を受けた代謝産物が肝細胞障害の中心として働いている。Radical としての性格を持つ中間代謝物の蓄積は、細胞内タンパク質と結合する事により様々な細胞機能(エネルギー産生、イオン交換等)の障害、細胞骨格の破壊、免疫反応の惹起、引いてはアポトーシスの誘導へと繋がる(中毒型薬剤性肝障害)。肝細胞では、ビリルビン代謝が行われており、肝細胞内で酸化物質が増加すれば、肝細胞内に豊富に存在し、抗酸化作用を持つビリルビンがまず酸化反応を受け、肝細胞の破綻により血中に放出されるであろう事は想像に難くない。ビリルビン酸化物質(BOXes)は、脂質過酸化反応を来す病態において主に尿中の解析においてその有用性が検討されている。我々は、肝移植後合併症の鑑別診断に胆汁中及び血中ビリルビン分画の HPLC による測定の有用性を報告してきており、BOXes の HPLC による詳細な分析が肝細胞での脂質過酸化反応を鋭敏にとらえられるのではないかと予想した。又、障害を受けた細胞より放出された DAMPs が様々な炎症反応の引き金となり、薬剤性肝障害においても重要な役割を果たしている事が報告されている。そこで、BOXes や DAMPs の測定が薬剤性肝障害の診断の一助となるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

薬剤代謝関連酵素・トランスポーター等の解析及び血液・尿の DAMPs の測定により薬剤性肝障害の早期発見・予防・診断に寄与できるか否かを検討する。更に、肝移植後薬物投与のテーラーメイド化の可能性についても検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 本研究における前提条件

本研究は、これまでの薬物投与方法、診断手順、治療方針を変更せずに行う。すなわち、使用する免疫抑制剤は、メチルプレドニゾロン、抗 IL-2 レセプター抗体、シクロスポリンあるいは FK506、ミコフェノールモフェティル、ストレス潰瘍又はステロイド潰瘍予防のために H2 ブロッカーあるいはプロトンポンプ阻害剤、感染予防のために、抗細菌薬、抗真菌薬、抗ウイルス薬、抗カリニ薬(ST 合剤)を投与、肝血流保持、末梢循環改善を目的に DOA (3~5 µg/Kg/min)、プロスタグラ

ンジン E1 (10~20ng/Kg/min)、FOY (30~40mg/Kg/day) を2~3週間投与。

当施設では年間10~15例の生体及び脳死肝移植が施行されている。それら全例についてインフォームドコンセントを得た上で症例を登録し、各種解析を行う。投与薬剤、生化学的肝機能検査、病理組織所見、遺伝子解析等を総合的に評価する。

(2) 検体採取

肝組織採取；肝グラフト及びレシピエント肝より手術時に採取。また、移植後肝機能異常時の肝生検施行時に採取。

・病理診断；炎症、線維化、脂肪肝等グラフトとして適切か否かの検討、術後肝機能異常の鑑別

・遺伝子、タンパク質解析；液体窒素にて急速凍結し、-80℃に保存

・電子顕微鏡；2%グルタルアルデヒド、2%パラフォルムアルデヒド、0.1M カコジル酸緩衝液

末梢血リンパ球

術前、術直後、3、7病日、以後一週間毎。リンパ球は、比重遠心により分離。

(3) 遺伝子解析

肝組織及びリンパ球からのDNA及びmRNA分離はMicro Smash MS-100 (組織・細胞破碎装置、トミー精工)、QuickGene810 (富士フィルム、今回申請物品)を用いる。CYP等の薬剤代謝関連遺伝子のタイピングは、グラフト及びレシピエント固有肝組織よりDNAを抽出してTaqMan® Drug Metabolism Assays キットを用いて、また、コピー数多型はTaqMan® copy number Assays キットを用いてリアルタイムPCR (東北大学医学部共同実験施設に既存のABI StepOnePlusを使用)にて測定する。リンパ球における薬剤代謝関連遺伝子mRNA発現量の定量はリアルタイムRT-PCRで行なう。

(4) 解析遺伝子

DCT2；類洞側トランスポーター

発現；薬剤による誘導(?) 細胞内薬物濃度上昇 代謝負荷 細胞障害性中間代謝物

CYP1A2、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4；第一相反応酵素で、酸化、還元等により官能基導入。代謝産物は、反応性の高い物質に変化。薬剤は、それらの基質であるだけでなく、阻害薬あるいは誘導薬にもなりうる。

薬剤等がCYPに及ぼす影響；i)オメプラゾールはCYP2C19の基質であり阻害薬、CYP1A2の誘導薬、ii)メチルプレドニゾロンは、CYP3A4の基質であり阻害薬、iii)Ca拮抗剤はCYP3A4を阻害、iv)抗IL2レセプター抗体やTNF

は、CYPの発現を抑制。特に、CYP3A4は免疫抑制剤代謝の中心であり、その動態は解析の中心となる。

UDP-グルクロン酸包合酵素；第二相反応酵素で、抱合反応により主に水溶性の物質に転換する。サイクロスポリンやFK506により阻害される。酵素量・酵素活性 細胞障害性中間代謝物

MRP2、P-glycoprotein；胆管側トランスポーター

サイクロスポリンはMRP2を阻害し、TNFは、P-glycoprotein発現を減少するとされ細胞障害性中間代謝物の細胞内濃度の上昇をもたらす。

(5) その他の検射項目

生化学的肝機能検査、FK506又はサイクロスポリン血中濃度、Dグルカン、プロカルシトニン、エンドトキシン等の感染症マーカーは、移植術後ルーティン検査として当院検査部にて測定する。

血中サイトカイン、肝組織中サイトカインmRNA測定；サイトカイン(TNF、IL1等)がP450の発現量に影響する事から、血中サイトカインはELISAにて、肝組織中サイトカインはリアルタイムRT-PCRにて測定する。

血中BOXes (Bilirubin oxidation products)をHPLCにて経時的に解析し、肝細胞での脂質過酸化反応を間接的に捉え、薬剤性肝障害との関連を検討

DAMPs (HMGB1、Cyclophilin A)；HMGB1、Cyclophilin Aはアセトアミノフェンによる肝障害でそれぞれ血中、尿中に増加するDAMPsと報告されている。いずれも、ELISAキットを用いて測定する。

病理学的検討は、移植肝グラフトであることからさまざまな修飾がなされており、困難が予想されるが、肝細胞のballooning、浸潤リンパ球の部位・様式等、小葉中心の肝細胞脱落、うっ血等について検討する。特に、虚血再還流障害、急性拒絶反応との鑑別を念頭に置き観察する。

電顕では、肝細胞膜、ミトコンドリアなどの小器官等について検討する。特にミトコンドリアの形態(オートファジー、断片化等)に注目する。

4. 研究成果

研究期間を通して、当施設において肝臓移植を施行した患者の周術期の血液・尿サンプルを経時的に採取・保存し、解析を行った。し

かし、適格なドナーがない、もしくは術前の感染症などにより肝臓移植の件数が当初予定した件数に満たず、見込まれたサンプル数を収集することはできなかった。肝組織DNAを用いた薬剤性代謝遺伝子のSNP (single nucleotide polymorphism) の解析は、採取・保存したグラフト肝およびレシピエント肝からのDNA精製およびRT-PCR法による薬剤性代謝遺伝子の解析に至るまで、安定した解析を行うことができた。移植後経時的なレシピエントのリンパ球における薬剤性代謝遺伝子のmRNA解析に関しては、末梢血リンパ球より精製したRNAを用いて行っていたが、移植時に使用する抗CD25モノクローナル抗体の影響などにより、リンパ球が高度に抑制され、末梢血リンパ球のRNAは極めて限られた量しか精製されず、十分な解析を行うことが困難であった。

肝移植後経時的に採取・保存した血清・尿サンプルを用いたビリルビン酸化物質の解析による肝細胞障害の評価については、サンプル数の蓄積状況を考慮し、未実施となっている。

臨床経過の指標となる肝移植前後における生化学的肝機能検査、免疫抑制剤（タクロリムスまたはサイクロスポリン）の血中濃度、プロカルシトニン、D-グルカン、エンドキシンなどの測定を継続して行ったが、全体のサンプル数が限られているため、詳細な解析を行うまでには至っていない。今後、十分なサンプル数が蓄積された時点で詳細な解析に移る予定である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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

武田 郁央 (TAKEDA, Ikuo)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：90420033

(2)研究分担者

川岸 直樹 (KAWAGISHI, Naoki)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号：00333807

戸子台 和哲 (TOKODAI, Kazuaki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50581641

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()