

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04919

研究課題名(和文) 一酸化炭素を用いた脂肪肝グラフトの包括的保存戦略 ～毒ガスを体外で薬に変える～

研究課題名(英文) Innovative Preservation of Steatotic Liver Grafts using Carbon Monoxide

研究代表者

上本 伸二 (Uemoto, Shinji)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：40252449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化炭素COの毒性のため本学動物実験施設では許可が下りず、専用ラボを別途獲得の上実験を開始したが、大型ドラフトと屋上への排気ダクトが必要と指導を受け、最終年度に実験環境が整った。従って、同じく脂肪肝保存に有用性が期待される室温灌流保存SMPの開発を併施、更に無害な水素(H<sub>2</sub>)を用いた研究を行った。

まず高圧環境(~5atm)の肝臓への影響について検討、明らかな圧傷害は認めなかった。低濃度CO+O<sub>2</sub>気相保存(48時間)により胆汁産生を得、有効性が期待された。高濃度COでの検討は企業から技術支援を受け進展させる予定である。更にSMPの脂肪肝保存の有効性とH<sub>2</sub>の保護効果を実証し、それぞれ報告した。

研究成果の概要(英文)：Due to the toxicity of carbon monoxide (CO), the research was not permitted in our animal center, we tried to get our own laboratory, obtained, and started the research. However, we're supposed to equip a powerful draft chamber with exhaust duct to the top of the building, so that the circumstances were ready in the last year of the study period. We obtained promising results in fatty liver preservation by hyperbaric CO+O<sub>2</sub>, however, the time was over before getting significant results. During the preparation of laboratory/ equipments, subnormothermic machine perfusion (SMP) preservation, as well as non-toxic materials were investigated, including hydrogen gas (H<sub>2</sub>), human atrial natriuretic peptide (hANP) and recombinant AT-III. We already published significant protection in preservation of severe steatotic livers by SMP. We also demonstrated the efficacy of H<sub>2</sub> against hepatic ischemia/reperfusion, hANP, and rAT-III in DCD liver grafts, all of which are now ready to publication.

研究分野：肝移植

キーワード：臓器保存 脂肪肝 一酸化炭素 水素 虚血再灌流傷害 Medical Gas 灌流保存

## 1. 研究開始当初の背景

### 本邦の肝移植の現状と脳死肝移植の漸増

肝移植は、末期的肝不全患者に対する救命手段として現在唯一の根本的治療法であり、本邦においても年間400~500例の肝移植が実施される様になった。また本邦においては脳死下臓器提供が進まず、生体肝移植が大部分を占めている。しかしながら、2010年の改正臓器移植法の施行以後、脳死下臓器提供の割合が徐々に増加し、現在ではおよそ1割を占める様になり、脳死下臓器提供・移植は今後さらに増加すると考えられている。

### 破棄される臓器を新たなドナープールに

一方で、日本臓器移植ネットワークによると、相当数の移植用臓器が医学的理由により移植を断念されている。肝臓においては、中等度以上の大滴性脂肪肝が最多の除外要因となっている。生命の危機に瀕した際の急性期(集中)治療によって誘導される急性脂肪肝(Delzenne, *et al.* J Hepatol. 2000; Hata K, *et al.* Liver Transpl. 2007)に加えて、本邦を含む主要先進国における脂肪肝罹患率の著明な増加しており、今後さらに大きな医学的・社会的問題となると予測されている。

中等度以上の大滴性脂肪肝が移植臓器として不適切である理由は、臓器移植に不可避である“冷虚血・温再灌流障害”に非常に脆弱であり、移植後に機能不全(Primary Non-function: PNF; Delayed Graft Function: DGF)に陥るためである。活性酸素による酸化ストレス、微小循環障害、ミトコンドリア機能障害がその主要因であるとされ、脂肪肝はこれらの障害に対して特に脆弱である。

そこで、我々は強力な生理活性を有する一酸化炭素ガス(CO)や、一酸化窒素(NO)や水素(H<sub>2</sub>)などのMedical Gasを臓器保存に応用し、移植肝に生じる冷虚血/温再灌流障害を制御できないかと考えた。

## 2. 研究の目的

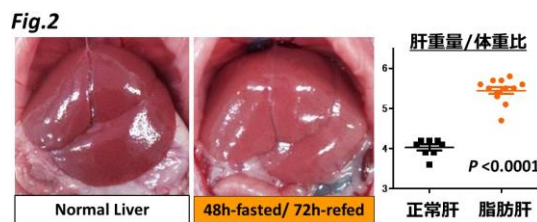
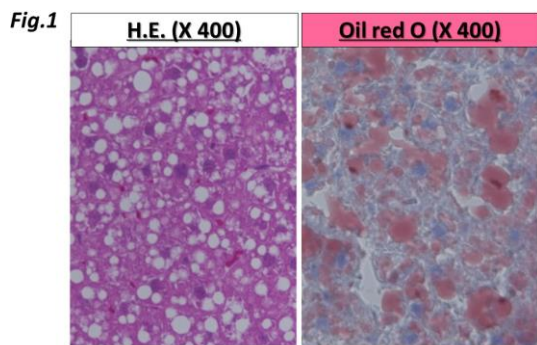
本研究の目的は、移植肝保護効果を発揮しうる低分子ガスマテリアルを探索し、候補となるガス分子の最適な応用(投与)法を模索すること、また通常の単純冷保存法では移植不能な脂肪肝や拡大適応臓器(Extend criteria donors: ECD)を、PNFに陥らせないで保存し得る画期的な保存法やEx vivo Conditioning法を開発することである。

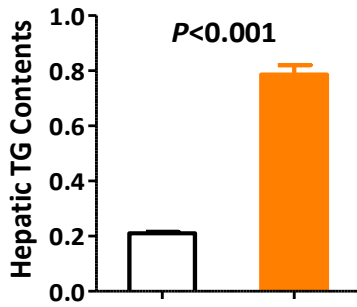
## 3. 研究の方法

### 脂肪肝モデルの作成

脂肪肝動物モデルの作成方法について複数の既報があるが、ヒト脳死患者に生じ得る脂肪肝をよりmimicしたモデルが望ましい。複数の脂肪肝作成法により実際に脂肪肝を作成し、比較した。H.E.染色に加えて、脂肪染色(Oil Red-O染色)を施行し病理学的に診断/評価した(Fig.1)。

2日間の絶食の後に無脂肪高炭水化物食を摂取させる、急性食餌性モデルを用いて50-60%大滴性脂肪肝を誘導した(Delzenne, *et al.* J Hepatol. 2000; Hata K, *et al.* Liver Transpl. 2007)。肝腫大(Fig.2)、トリグリセリド含有量の上昇を確認し、検鏡像と合わせて脂肪肝を証明した。





#### 4. 研究成果

一酸化炭素 CO は、その毒性のため 安全性確保が最重要課題である。本学動物実験施設では許可が下りず、専用ラボを別途獲得の上 実験を開始したが、有効濃度域で研究を行うには 大型ドラフト設置と排気ダクトを屋上へ導く工事が必要との指導を受け、最終年度に実験環境が整った経緯である。

従って、本研究①と並行して、同じく脂肪肝保存に有用性が期待される室温灌流保存法の開発②を併施、更には、同じく医療分野への応用が期待され かつ毒性のない水素ガス(H<sub>2</sub>)を用いた研究③を行った。

① まず 5%CO<sub>2</sub>+95%O<sub>2</sub> 混合ガスを用いて、高圧環境(3~5 atm)の臓器への影響について検討、明らかな圧障害がない事を確認した。低濃度より CO+O<sub>2</sub> で気相保存を開始した。48 時間の超長時間保存条件において、従来の単純冷保存法(Cold Storage: CS)では再灌流そのものが高度の組織浮腫により全く不可能であった。

一方、CO+O<sub>2</sub>による高圧気相保存では、胆汁産生を得、長時間保存における気相保存の効果が期待されたが、単純冷保存(従来法)に比して有意性を示すには至らなかった。より高濃度の CO 濃度で検討していくに当たり、本邦最大手の CO 製造企業から技術支援を受け、今後の研究/開発を進展させる予定である。

② 脂肪肝保存における室温灌流保存の成果については、論文 2, 3 を参照されたい。

③ 強力な抗酸化作用を有し かつ無害である H<sub>2</sub>は、臓器移植/保存における永遠の命題、虚血再灌流障害 IRI を制御する革新的技術となる可能性を秘めているが、その臨床応用には H<sub>2</sub>の持つ”高い物質/組織透過性”、”難溶性”、”可燃性”という障壁を克服する必要がある。我々は、ラット肝を用いて 冷保存前、中、後(移植前)でその保護効果を検討し、冷保存後に 1 ppm H<sub>2</sub>溶液を直接血管内注入する HyFACS (Hydrogen Flush After Cold Storage) 法が、IRI を有意に軽減させる事を解明し得た。この結果は、ヨーロッパ移植学会(ESOT 2017)をはじめ複数の学会において発表し、現在論文投稿中である。

CO や H<sub>2</sub>に代表される 幾多の生理活性を有するガス分子は、医療応用の可能性と共に 解決すべき複数の課題を有している。山積する障壁を個々に解決しながら、将来の臨床応用へと繋げたい。

また、CO 実験の環境整備を進める間に、“既に臨床使用実績があり、かつ強力な薬理作用を有する、しかしながら体内動態や全身への副作用の点から肝移植周術期に使用しづらい” 薬剤を候補にあげ、これらを用いて *Ex vivo* Reconditioning を実施した。

ラット全肝グラフト体外灌流モデルを用いて、ヒト心房性利尿ペプチド(hANP)や遺伝子組み換え Antithrombin-III(rAT-III)を用いた *Ex vivo* Reconditioning を実施し、その保護効果を確認し得た。これらの結果は、日本肝移植研究会、日本臓器保存学会(2017)、米国移植学会(ATC: American Transplant Congress, 2018)において成果発表し、現在論文投稿中である。

## 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 4 件)

1. Okamura Y, Hata K, Uemoto S. Reply to "Representing Subnormothermic Machine Perfusion in Fatty Livers: The Complete Picture?" Am J Transplant. 2017 May;17(5):1423-1424. doi: 10.1111/ajt.14254. Epub 2017 Mar 27. PubMed PMID: 28251800.
2. Okamura Y, Hata K, Tanaka H, Hirao H, Kubota T, Inamoto O, Kageyama S, Tamaki I, Yermek N, Yoshikawa J, Uemoto S. Impact of Subnormothermic Machine Perfusion Preservation in Severely Steatotic Rat Livers: A Detailed Assessment in an Isolated Setting. Am J Transplant. 2017 May; 17(5): 1204-1215. doi: 10.1111/ajt. 14110. Epub 2016 Dec 19. PubMed PMID: 27860296.
3. Okamura Y, Hata K, Inamoto O, Kubota T, Hirao H, Tanaka H, Fujimoto Y, Ogawa K, Mori A, Okajima H, Kaido T, Uemoto S. Influence of hepatorenal syndrome on outcome of living donor liver transplantation: A single-center experience in 357 patients. Hepatol Res. 2017 Apr;47(5): 425-434. doi: 10.1111/hepr.12764. Epub 2016 Jul 19. PubMed PMID: 27323334.
4. 境界グラフトの健全性維持と機能再生を目指した移植肝臓器保存戦略 京都大学の取り組み、Author: 秦浩一郎, 岡村裕輔, 玉木一路, 後藤徹, Yermek Nigmet, 日下部治郎, 吉川潤一, 田嶋哲也, 稲本道, 久保田豊成, 平尾浩史, 影山詔一, 田中宏和, 上本伸二 Organ Biology(1340-5152) 24 巻 2 号 Page 61- 67 (2017.07)

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Koichiro Hata1, Hirokazu Tanaka1, Kayoko Endo2, Jiro Kusakabe1, Ichiro Tamaki1, Tetsuya Tajima1, Toru Goto1, Junichi Yoshikawa1, Takashi Ito1, Atsushi Yoshizawa1, Shintaro Yagi1, Hideaki

Okajima1, Toshimi Kaido1, Akira Shimizu2, and Shinji Uemoto1. Postoperative Thrombocytopenia (< 2 weeks) Determines the Fate of Adult LDLT: Proposal of "LTx-TMA". The 9th Meeting of 5 Asian LDLT Centers, 21<sup>st</sup> Oct. 2017, Kyoto, Japan.

2. Ichiro Tamaki, Koichiro Hata, Yusuke Okamura, Nigmet Yermek, Hirofumi Hirao, Toyonari Kubota, Osamu Inamoto, Jiro Kusakabe, Junichi Yoshikawa, Tetsuya Tajima, Toru Goto, and Shinji Uemoto. Hydrogen Perfusion after Cold Storage; A New, Simple, and Non-invasive Graft Conditioning for Ameliorating Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury? The 18<sup>th</sup> Congress of the European Society for Organ Transplantation (ESOT), 24-27 Sep. 2017, Barcelona, Spain.
3. Ichiro Tamaki, Koichiro Hata, Yusuke Okamura, Nigmet Yermek, Hirofumi Hirao, Toyonari Kubota, Osamu Inamoto, Jiro Kusakabe, Junichi Yoshikawa, Hirokazu Tanaka, Shoichi Kageyama, Tetsuya Tajima, Toru Goto, and Shinji Uemoto. Hydrogen Perfusion after Cold Storage; A New, Simple, and Non-invasive Post-Conditioning for Ameliorating Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury? The 52nd meeting of the European Society for Surgical Research (ESSR), 14-17 June 2017, Amsterdam, the Netherlands.
4. TANAKA Hirokazu, Doorschodt BMD, Fukushima FK, Assar AMAM, Kadaba Srinivasan, Pawlowsky KP, Hata KH, Tolba RT. Efficacy of the novel Preservation Solution, Ecosol, in a rat liver transplantation model. The 52nd meeting of the European Society for Surgical Research (ESSR), 14-17 June 2017, Amsterdam, the Netherlands.
5. Koichiro Hata, Tetsuya Tajima, Takayuki Anazawa, Atsushi Yoshizawa, Shintaro Yagi, Hideaki Okajima, Toshimi Kaido, and Shinji Uemoto. V5 & V8 Reconstruction in Right-lobe Living-Donor Liver Transplantation; Our Standardized Procedures and

- Recent Modification of “half-circumferential anastomosis”. The 6th Biennial Congress of the Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association, 7-10, June 2017, Yokohama, Japan.
6. Jiro Kusakabe, Koichiro Hata, Yusuke Okamura, Ichiro Tamaki, Nigmat Yermek, Junichi Yoshikawa, Tetsuya Tajima, Toru Goto, Hirokazu Tanaka, Hideaki Okajima, Toshimi Kaido, and Shinji Uemoto. Post operative Low Platelet Count and Elevated Total Bilirubin Impact the Mortality and Morbidity in Living-donor Liver Transplantation. 15th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST), 27-30 November 2017, Cebu, Philippines
  7. Tetsuya Tajima, Koichiro Hata, Hideaki Okajima, Ken Fukumitsu, Atsushi Yoshizawa, Ichiro Tamaki, Nigmat Yermek, Jiro Kusakabe, Junichi Yoshikawa, Toru Goto and Shinji Uemoto Bortezomib against Post-operative Antibody-Mediated Rejection in ABO-incompatible Living-Donor Liver Transplantation: Report of a Successful Case. 15th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST), 27-30 November 2017, Cebu, Philippines.
  8. Koichiro Hata, Hirokazu Tanaka, Kayoko Endo, Hirofumi Hirao, Yusuke Okamura, Toyonari Kubota, Osamu Inamoto, Ichiro Tamaki, Yermek Nigmat, Hideaki Okajima, Toshimi Kaido, Akira Shimizu, and Shinji Uemoto. Post-operative thrombocytopenia determines the fate of adult-to-adult living donor partial liver transplantation; Proposal of “Thrombotic Microangiopathy (LTx-TMA) Score”. 26th The Transplant Society (TTS) Congress, August 19-23, 2016, Hong Kong.
  9. Yusuke Okamura, Koichiro Hata, Ichiro Tamaki, Yermek Nigmat, Osamu Inamoto, Toyonari Kubota, Hirofumi Hirao, Shintaro Yagi, Atsushi Yoshizawa, Hideaki Okajima, Toshimi Kaido, and Shinji Uemoto. Impact of Hepatorenal Syndrome on Outcome of Living Donor Liver Transplantation: A Single-Center Experience in 357 Patients. 26th The Transplant Society (TTS) Congress, August 19-23, 2016, Hong Kong.
  10. Yusuke OKAMURA, Koichiro HATA, Hirokazu TANAKA, Hirofumi HIRAO, Toyonari KUBOTA, Osamu INAMOTO, Kentaro KADONO, Shoichi KAGEYAMA, Benedict M Doorschodt, Rene H Tolba, and Shinji UEMOTO. Subnormothermic Machine Perfusion Preservation of >30% Macrosteatotic Livers; A New Means to Expand the Donor Pool? 17th Congress of the European Society for Organ Transplantation (ESOT), 13-16 September 2015, Brussels, Belgium
  11. Toyonari Kubota, Koichiro Hata, Takashi Sozu, Hirokazu Tanaka, Hirofumi Hirao, Yusuke Okamura, Osamu Inamoto, Kohei Ogawa, Yasuhiro Fujimoto, Akira Mori, Hideaki Okajima, Toshimi Kaido, and Shinji Uemoto. Impact of Donor Age on Patients' Survival of Adult Living Donor Partial Liver Transplantation: Single-Center Experience in 316 Patients. 17th Congress of the European Society for Organ Transplantation (ESOT), 13-16 September 2015, Brussels, Belgium, *won the Young Investigator Award*
  12. Hirofumi Hirao, Koichiro Hata, Hirokazu Tanaka, Shoichi Kageyama, Yusuke Okamura, Toyonari Kubota, Osamu Inamoto, Kentaro Kadono, and Shinji Uemoto. Impact of ADAMTS13, von Willebrand factor-cleaving protease, on hepatic ischemia/reperfusion injury. 17th Congress of the European Society for Organ Transplantation (ESOT), 13-16 September 2015, Brussels, Belgium
  13. Hirokazu Tanaka, Koichiro Hata, Hirofumi Hirao, Yusuke Okamura, Toyonari Kubota, Osamu Inamoto, Shoichi Kageyama, Kohei Ogawa, Yasuhiro Fujimoto, Akira Mori, Hideaki Okajima, Toshimi Kaido, and Shinji Uemoto. Post-operative thrombocytopenia may determine the fate of adult-to-adult living donor partial liver transplantation; Proposal of “Thrombotic Microangiopathy (LTx-TMA) Score”. 17th

Congress of the European Society for Organ Transplantation (ESOT), 13-16 September 2015, Brussels, Belgium

14. Yusuke OKAMURA, Koichiro HATA, Hirokazu TANAKA, Hirofumi HIRAO, Toyonari KUBOTA, Osamu INAMOTO, Kentaro KADONO, Shoichi KAGEYAMA, Benedict M Doorschodt, Rene H Tolba, and Shinji UEMOTO Subnormothermic Machine Perfusion Preservation of >30% Macrosteatotic Livers; A New Means to Expand the Donor Pool? The 50th Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), Liverpool, UK, 10-13th June, 2015, *nominated the Walter Brendel Award*

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔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

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