

令和元年6月12日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10432

研究課題名(和文) 肝移植における虚血再灌流障害に対する水素水の効果と細胞動態イメージング評価

研究課題名(英文) The efficacy of hydrogen-rich solution in ischemia-reperfusion injury and intravital imaging of neutrophil recruitment in liver transplantation

研究代表者

阪本 靖介 (Sakamoto, Seisuke)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・臓器移植センター・医長

研究者番号：00378689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：臓器移植領域での虚血再灌流障害に対する有効性が示されている水素をラット肝臓移植に応用した。既存の臓器保存液に水素を含有させグラフト保存に使用し、その効果を検討した。水素水使用群では肝移植6時間後において肝逸脱酵素上昇の抑制、病理組織学的に虚血再灌流障害の抑制を認めた、また、肝組織中の炎症性マーカーに関連するサイトカイン上昇は低値を示し、酸化ストレスに関連する血清マーカー、肝組織中の変化を抑制している所見が得られた。さらに脂肪肝グラフトを用いて水素水の効果を検討したが、水素水群と未使用群で有意差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2010年7月の改正脳死法案以後、脳死臓器提供数が増加傾向にある。一方、何らかの理由にて脳死肝移植に至らずに破棄された脳死肝臓は少なからず存在する。これらの破棄された脳死肝臓をより良い状態へと回復し肝臓移植術へと繋げる努力が急務である。抗酸化作用のある水素水はラット肝移植モデルにて虚血再灌流障害を軽減する可能性がある。水素水含有臓器保存液開発へと本研究が結び付けば、より多様なグラフトの選択につながり、脳死・生体肝移植ドナー候補の増加、またさらなる肝移植治療成績の向上が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The efficacy of hydrogen-rich solution in ischemia-reperfusion injury in solid organ transplantation has been already reported. In this study we evaluated the efficacy of hydrogen-rich solution in ischemia-reperfusion injury by using rat liver transplantation model. University of Wisconsin solution containing hydrogen was used as preservation solution.

In the group by using hydrogen-rich solution, the increase of liver enzymes and histopathological liver damage related to ischemia-reperfusion injury were suppressed 6 hours after reperfusion. Moreover, cytokines profiles related to inflammatory changes and oxidative damage in liver tissues were also attenuated.

We went forward to evaluate the efficacy of hydrogen-rich solution in ischemia-reperfusion injury by using steatotic hepatic graft model in liver transplantation; however, its efficacy could not be proven in the same approach as described above.

研究分野：肝移植

キーワード：肝移植 虚血再灌流障害 水素水

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における肝移植において、生体ドナーに臓器提供を依存している現況は、生体ドナーに対する安全性を考慮すると望ましいとは言えない。2010年7月の改正脳死法案以後、脳死臓器提供数が増加傾向にある。一方、何らかの理由にて脳死肝移植に至らずに破棄された脳死肝臓は少なからず存在する。これらの破棄された脳死肝臓をより良い状態へと回復し肝臓移植術へと繋げる努力が急務であり、その一つの方策として新たなグラフト臓器保存方法・虚血再灌流障害抑制方法の開発が必要である。近年、治療的医学ガスの一つとして水素の抗酸化作用が知られるようになり、臓器移植領域においても腎、小腸、心移植領域での虚血再灌流障害に対する水素の有効性を示した報告がある。しかし肝移植領域での有効性を示した報告はなく、また臨床応用もされておらず、他臓器での成績を鑑みるに、十分肝移植領域でも応用できる可能性があると考えられる。臓器虚血再灌流障害のメカニズムとして、活性酸素による直接の細胞障害や炎症細胞の活性化、各種サイトカイン産生が要因として示されており、なかでも、遊走し組織に浸潤する免疫細胞、特に好中球が重要な役割を果たすことが知られている。しかし、その生体内での動態に関しては不明な点が多い。近年、光学機器の開発が進み、共焦点レーザー顕微鏡等の改良によって様々な組織で生体内蛍光イメージングが可能となっており、特に低侵襲で深部組織の観察に適した2光子励起レーザー顕微鏡を用いて各臓器移植後の血球動態を評価した報告が心臓、肺、腎臓で示された。しかし、肝移植後虚血再灌流障害の病態の様子を観察した報告はこれまでにない。

2. 研究の目的

本邦における肝移植は生体ドナーが主であり、脳死ドナーは依然として少ない。臓器虚血再灌流障害を改善する新たな手法が開発されれば、より多様なグラフトの選択につながり、脳死・生体肝移植ドナー候補の増加、またさらなる肝移植治療成績の向上が期待できる。我々は腎、小腸、心移植領域での虚血再灌流障害に対する有効性が示されている水素を肝臓移植にも応用できないかと考え、ラットでの実験モデルを確立した。また我々がマウスで行ってきた2光子励起レーザー顕微鏡を用いた虚血再灌流時の血球動態評価方法をラット肝移植モデルに対して用い、水素の効果を調査するのみでなく、別の側面からの虚血再灌流障害の評価・解析を行い、メカニズムのさらなる病態解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

ラットモデルとして、220~300gの雄Lewisラットを用い、肝移植術は、主な血管吻合にカフ法を用いるKamada法に準じて行った。グラフト肝の灌流は冷University of Wisconsin (UW)液を用いて行った。

・同種ラット肝移植モデルにおける水素水の有効性の検討(正常肝)

同種モデル(Lewis-Lewis)の肝移植モデル群を以下の3群に分ける。1. Sham operation群(移植未施行)、2. コントロール群(移植施行+UW保存液) 3. 水素水群: UW保存液に水素含有させたものを使用。冷阻血時間は6時間とした。3群間において、虚血再灌流6時間後に検体サンプリングを行い、以下の検討項目について比較検討した。

・血液検査: 血清AST, ALT, LDH

・肝病理組織学的検査: HE染色を用いて虚血再灌流障害の程度(Suzuki分類)、免疫染色(好中球 Naphthol AS-D chloroacetate Esterase staining, マクロファージ ED-1 staining, TUNEL染色)

・肝組織中のサイトカイン定量的リアルPCR検査: Chemokine ligand 2 (CCL2), High mobility group box chromosomal protein (HMGB)-1, Heme oxygenase (HO)-1, Sirtuin (SIRT)-1,

Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1

・肝組織中のウエスタンブロット法による解析：H0-1

・血液中および肝組織中の酸化ストレス測定：血清Malondialdehyde (MDA), 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) レベル、肝組織4-hydroxyl-nonenal 染色
当初、2 光子レーザー励起顕微鏡下での肝移植時の血球動態評価を目的としたが、熊本地震の影響にて研究を実施することが不可能となった。そのため、ラット肝移植モデルにおける水素水の有効性の検討において、マージナルグラフトとして脂肪肝を作成し水素水の有効性について追加検討を行った。

・同種ラット肝移植モデルにおける水素水の有効性の検討（脂肪肝）

低脂肪飼料をモデル作成前に、ドナーラットに2~3日投与し脂肪肝を作成した。脂肪肝評価はモデル作成時にドナーグラフト肝より採取した肝組織を用いて oil-red 染色にて病理組織学的に。大滴性脂肪の比率に応じて、軽度（5~33%）・中等度（33~66%）・高度（66%以上）と評価した。肝移植モデルの作成、水素水保存液、検討項目は上記（ ）に準じた。

4. 研究成果

・同種ラット肝移植モデルにおける水素水の有効性の検討（正常肝）

血液検査では、AST, ALT, LDH とともに水素水群において有意に低値であった。また、病理組織学的検査においても、水素水群において、出血壊死、肝組織構築の破壊、肝細胞膨化等の虚血再灌流障害所見は有意に抑制されており、Sham operation 群と同等の所見であった。また、免疫染色による検討では好中球浸潤・マクロファージ浸潤は水素水群において有意に軽度であり、また TUNEL 陽性細胞も低値であった。肝組織中のサイトカインの解析では、CCL2, ICAM-1, VCAM-1 は水素水群において低い傾向にあり、H0-1, SIRT-1 は水素水群において高い傾向にあった。ウエスタンブロット解析では水素水群において肝組織中の H0-1 レベルは著明に上昇していた。血清 MDA レベルは水素水群において有意に低く、肝組織中の 4-hydroxyl-nonenal 陽性細胞は少ない傾向にあった。

以上より、水素水含有保存液はラット肝移植モデルにおいて H0-1 レベルのアップレギュレーションを介して虚血再灌流障害を抑制する効果があると考えられた。

・同種ラット肝移植モデルにおける水素水の有効性の検討（脂肪肝）

冷阻血時間6時間とし、水素水群と未使用群にて血清学的データ（AST, ALT, LDH）を比較検討を行ったが、脂肪肝中等度・高度において有意差を認めなかった。また冷阻血時間を12時間に延長し同様に血清学的データ（AST, ALT, LDH）を比較検討したが、水素水群と未使用群で有意差を認めず、またこのモデルにおいては手術症例の半数以上が死亡する結果となった。また、肉眼的に外側葉を中心とし、変色域が散在している症例が多く還流不良と考えられた。以上より脂肪肝に対する水素水含有保存液の有効性を証明することが不可能であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Hydrogen-rich solution attenuates cold ischemia-reperfusion injury in rat liver transplantation

BMC Gastroenterology 2019 19; 1-9

〔学会発表〕(計1件)

Hydrogen rich solution attenuates cold ischemia-reperfusion injury in rat liver transplantation

2017 Transplantation Science Symposium

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：猪股 裕紀洋

ローマ字氏名：Inomata Yukihiro

所属研究機関名：熊本大学

部局名：大学院生命科学研究部

職名：教授

研究者番号（8桁）：50193628

研究分担者氏名：李 小康

ローマ字氏名：Li Xiao-Kang

所属研究機関名：国立成育医療研究センター

部局名：移植免疫研究室

職名：室長

研究者番号（8桁）：60321890

(2)研究協力者

研究協力者氏名：宇戸 啓一

ローマ字氏名：Uto Keiichi