

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006 ～2008
 課題番号：18591522
 研究課題名 (和文) 肝移植における VWF 切断酵素の役割と新たな拒絶反応診断マーカーの開発
 研究課題名 (英文) Clinical relevance of VWF cleaving protease as a new diagnostic marker in liver transplant recipients
 研究代表者 高 濟峯 (KO SAIHO)
 奈良県立医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：80305713

研究成果の概要：Von Willebrand factor (VWF)は血管内皮細胞障害の際に発現が増強しするが、その重合体 UL-VWFm は病的血小板凝集を引き起こす。ADAMTS13 は UL-VWFm の分解酵素であるが、肝移植後に高頻度に ADAMTS13 活性の低下がみられ、特に急性拒絶反応や虚血再灌流障害時に著しいことを世界で初めて見出した。また、ADAMTS13 低下時の血小板輸血の危険性を指摘し、肝移植の国際専門雑誌に論文を掲載し、国内外の学会にて発表した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,700,000	0	1,700,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：消化器外科学、移植外科学、肝臓外科学、血液凝固学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝移植、ADAMTS13、von Willebrand 因子、拒絶反応、虚血再灌流 障害

1. 研究開始当初の背景

(1) Von Willebrand factor (以下 VWF) は、血管内皮細胞で合成され、血管内皮障害部位において血小板凝集を促して修復する働きをもつ。種々の原因による血管内皮障害の際に VWF 産生が亢進することが知られており、特に、多くの VWF がつながりあって超高分子量重合体となった unusually large VWF multimer (UL-VWFm) は非常に強い血小板凝集活性を有している。

(2) 最近の研究により、VWF の切断酵素である ADAMTS13 が欠乏すると UL-VWFm が異常

に増加して細小血管内での病的血栓形成を惹起し、諸臓器における微小循環障害をきたして腎機能障害、神経・精神症状など重篤な病態を呈する血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の原因となることが明らかにされた。

(3) 肝移植における急性拒絶反応は、通常、AST、ALT の血液生化学的指標の上昇等で気づかれるが、特異的な血液マーカーが存在せず、肝生検による確定診断を要すること多い。このため、簡便な診断マーカーの確立が強く求められている。

(4) 急性拒絶反応の病理所見で血管内皮炎が特徴的であるように、急性拒絶反応時のアロ反応性リンパ球による攻撃の主たるターゲットは血管内皮細胞である。したがって、血管内皮細胞障害をとらえることが急性拒絶反応の診断につながる可能性がある。

(5) 研究代表者らは、生体肝移植患者において、移植後に種々の程度の血小板減少が観察されることから、肝移植という血管内皮障害を伴いやすいイベントに際し、TTP と類似した反応が移植臓器の血管内皮で起きているのではないかと推察するに至った。

2. 研究の目的

(1) パイロットスタディーとして、数例の生体肝移植患者の術前後で血中 ADAMTS13 活性を測定したところ、高頻度に ADAMTS13 活性が著しく低下する現象が認められた。これに UL-VWFM の動態も関連させて、肝移植術後の移植肝グラフト内の血管内皮細胞障害時の病態を明らかにする。

(2) 肝移植後の拒絶反応などの種々の病態における ADAMTS13 活性ならびに UL-VWFM の変動について検討し、グラフト肝機能障害時における診断マーカーとしての意義を検討する

(3) 臓器移植の動物実験モデルにおいて上記病態を検討する。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者らが行っている生体肝移植において、生体肝移植を受けた患者さんの移植前後の ADAMTS13 活性ならびに UL-VWFM 発現を経時的に測定し、移植後の各種病態との関連を検討する。

(2) Plasma ADAMTS13 活性は、Furlanらの方法 (Blood 1997; 89: 3097-310328) に準じて行う。この方法では、アガロースゲルでの電気泳動やウェスタンブロットの手順を含み、測定に時間を要するため、臨床における迅速性を考え、独自に開発した ELISA による方法でも同時に測定する。この方法は、研究分担者の藤村らが独自に開発した切断されたペプチドの切断部位を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いた方法で約 3 時間で結果を得ることができ、非常に実用的な方法である。

(3) Plasma UL-VWFM は agarose gel electrophoresis を用いて行う。

4. 研究成果

(1) 生体肝移植症例における検討
生体肝移植後には、ADAMTS13 に急激かつ高度の低下が高頻度に起きており、その低下は急性拒絶反応や虚血再灌流障害と連動していた。同時に UL-VWFM の発現が観察された。ADAMTS13 は生体肝移植後の急性拒絶反応時に急激に低下し、拒絶反応の治療によって回復した。ADAMTS13 の低下は生化学的な肝機能障害の発現に先行しており、新たな拒絶反応診断マーカーとしての意義が示された。肝移植後に TTP や TMA と関係なし ADAMTS13 や UL-VWFM が変動する現象を明らかにしたのは世界で初めてで、国際学術雑誌に論文が掲載され、国際学会でも発表した。

(2) 血小板減少
ADAMTS13 低下時には原因不明の血小板減少を伴っていることが多いが、通常の TTP で見られるような精神症状や腎機能は認められず、肝機能障害のみ認められた。特に、虚血再灌流障害がおりやすいとされる脂肪肝グラフトの移植において、移植直後に ADAMTS13 が特に著しい減少を示した。移植後比較的早期に起こった急性拒絶反応の際には、血小板数の減少とともに、ADAMTS13 の著明な低下と、UL-VWFM の出現が観察された。これらは、グラフトの血管内皮障害に伴い、局所的に血小板凝集が起きている病態で、局所的 TTP 現象 (Local TTP like phenomenon) といえる。ADAMTS13 低下時には TTP の場合と同様血小板輸血は禁忌であり、肝移植患者における血小板輸血の危険性について世界で初めて論文と学会で報告した。微小血栓形成によるグラフトの循環障害からグラフト機能不全に陥りやすいことを明らかにした。また対策として新鮮凍結血漿投与により ADAMTS13 活性を 20% 以上に保つ必要があり、その為には ADAMTS13 活性の経時的モニタリングが重要であることも発表した。

(3) 通常の肝切除症例における検討
肝移植症例との比較を目的に、移植を伴わない通常の肝切除症例においても術後の ADAMTS13 活性の変動を検討したところ、肝切除症例での ADAMTS13 活性は、肝移植症例に比べると軽度ではあるが、大量肝切除で低下しやすい傾向が認められた。

(4) UL-VWFM の評価法
当初、アガロースゲル電気泳動法による UL-VWFM の評価は、手技的に電気泳動の像が不安定であったが、ゲルの種類や手順を改良することにより、再現性の高い安定した結

果が得られるようになった。

(5) 実験移植モデル

動物実験にて急性拒絶反応と ADAMTS13 活性の関連を調べるため、ラット小腸移植モデルにおける免疫寛容の系を確立した。肝移植、心移植、脾ランゲルハンス島移植モデルにおいても検討する準備を整えた。

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 5 件)

1. 藤村吉博、ほか. 動脈血栓症の制圧—VWF-GP1b 軸依存性血小板血栓形成を調節する ADAMTS13 の基礎・臨床病態解析 (第 45 回 2008 年度ベルツ賞論文). 最新医学 6: 290-321, 2009(査読有)
2. Ko S, et al. Induction of small bowel allograft tolerance by donor specific bone marrow transplantation. The Journal of Nara Medical Association (査読有); 59:113-117, 2008
3. Matsumoto M, et al. Prophylactic fresh frozen plasma may prevent development of hepatic VOD after stem cell transplantation via ADAMTS13-mediated restoration of von Willebrand factor plasma levels (査読有). Bone Marrow Transplantation;40:251-259, 2007
4. Ko S, Okano E, et al. Plasma ADAMTS13 activity may predict early adverse events in living donor liver transplantation: Observations in three cases. Liver Transplantation 12:859-869,2006(査読有)
5. Kobayashi T, Ko S, et al. Survival of microencapsulated Islet at 400 days posttransplantation in the omental pouch of NOD mice. Cell Transplantation 15: 359-365,2006(査読有)

[学会発表] (計 21 件)

1. Ko S, et al. Potential risk of platelet transfusion in view of significant decrease of ADAMTS13 activity after liver transplantation. The XXIIth International Congress of the Transplantation Society. 2008 年 8 月 13 日シドニー
2. Okano E, Ko S, et al. Significant decrease of

plasma ADAMTS13 activity during adverse events after liver transplantation. The XXIIth International Congress of the Transplantation Society. 2008 年 8 月 13 日シドニー

3. 岡野永嗣、高 濟峯、ほか. 肝切除における血中 ADAMTS13 活性モニタリングの意義. 日本外科学会定期学術集会、2008/05/15、長崎
4. 高 濟峯、ほか. 術中肝動脈損傷時の血行再建の適応判断と再建法. 日本外科学会定期学術集会、2008/05/15、長崎
5. 高 濟峯、ほか. 門脈合併切除と胆道再建を伴う肝 3 区域切除を行った S 状結腸癌同時性肝転移症例. 日本肝胆膵外科学会・学術集会 2008/05/28、山形
6. 岡野永嗣、高 濟峯、ほか. 肝切除における ADAMTS13 活性測定および UL-VWFM モニタリングの意義. 日本肝胆膵外科学会・学術集会 2008/05/28、山形
7. 高 濟峯、ほか. 摘出固定肝の解剖学的検討から得られた Cantlie 線ならびに尾状葉に関する知見. 日本肝胆膵外科学会・学術集会 2008/05/28、山形
8. 高 濟峯、ほか. 頻回の IVR 治療と長期の抗菌投与により軽快を得た生体肝移植後壊死性胆管炎の 1 例. 日本移植研究会、2008/06/19、横浜
9. 高 濟峯、ほか. 巨大肝癌切除における注意点と工夫. 日本消化器外科学会、2008/07/17、札幌
10. 岡野永嗣、高 濟峯、ほか. 術後肝不全予測因子としての血中 ADAMTS13 活性測定. 日本消化器外科学会、2008/07/17、札幌
11. 高 濟峯、ほか. Mini microabscess syndrome との診断後の経過観察中に胆管—胆管吻合部の屈曲性狭窄が明らかとなり ERBD チューブ留置が有効であった生体肝移植. 日本移植学会、2008/09/21、大阪
12. 岡野永嗣、高 濟峯、ほか. 成人型シトルリン血症に対し APOLT を行った症例における温存自己肝の経時的変化. 日本移植学会、2008/09/21、大阪

13. Ko S, et al. Approaches for resection of large primary hepatic tumors. The 3rd Scientific Meeting of the International Forum of Liver Surgery April 14, 2007, Kobe, Japan
14. Okano E, Ko S, et al. Relevance of plasma ADAMTS13 activity to adverse events after liver transplantation. The 3rd Scientific Meeting of the International Forum of Liver Surgery, April 15, 2007 Kobe, Japan
15. 高 濟峯、ほか. ミラノ基準と肝障害度からみた切除可能肝細胞癌症例における肝移植適応. 日本外科学会. 2007/04/11, 大阪市
16. 岡野永嗣、高 濟峯、ほか. 生体部分肝移植における ADAMTS13 活性測定と UL-VWFM モニタリングの臨床的意義, 日本外科学会, 2007/04/11, 大阪市
17. 高 濟峯、ほか. 併存慢性肝炎の繊維化スコアと肝障害度による残肝再発予測ならびに肝移植適応患者の選定. 日本消化器外科学会, 2007/07/18, 東京
18. 岡野永嗣、高 濟峯、ほか. 肝切除における ADAMTS13 活性測定と UL-VWFM モニタリングの意義. 日本消化器外科学会, 2007/07/18, 東京
19. 高 濟峯、ほか. 移植後 2 か月目にグラフト肝内門脈枝に血栓症をきたした原発性胆汁性肝硬変に対するクロスマッチ陽性生体肝移植レシピエントの 1 例. 日本移植学会, 2007/11/24, 仙台市
20. 岡野永嗣、高 濟峯、ほか. 生体肝移植術後の急性拒絶反応の時の ADAMTS13 活性の変動. 日本移植学会, 2007/11/24, 仙台市
21. 岡野永嗣、高 濟峯、ほか. 生体部分肝移植における ADAMTS13 活性測定と UL-VWFM モニタリングの臨床的意義. 日本肝移植研究会, 2007/07/05, 東京

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高 濟峯 (KO SAIHO)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80305713

(2) 研究分担者

中島 祥介 (NAKAJIMA YOSHIYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00142381

藤村 吉博 (FUJIMURA YOCHIHIRO)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80118033

松本 雅則 (MATSUMOTO MASANORI)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60316081

(3) 連携研究者