

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16277

研究課題名（和文）難治疾患の肝VODにおけるTMA病態関与の解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the association between TMA and VOD, and development of novel therapy for VOD from a viewpoint of TMA treatment

研究代表者

中沼 伸一（Nakanuma, Shinichi）

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：00640921

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：肝類洞閉塞症候群（VOD）および血栓性微小血管障害（TMA）は、ともに進行すると臓器機能不全に陥り予後不良となる。両疾患の関連性に着目した研究は行われていない。本研究では、マウスVODモデルを作成し、TMA病態の評価を行った。VODの肝組織では、類洞に沿って血小板凝集を認め、von Willebrand factor（vWF）凝集も認めた。血中のADAMTS13活性はVOD初期より低下するのに対し、vWFは経過で濃度上昇を認めた。本研究結果よりVODの肝組織にTMA病態が確認され、血漿中のADAMTS13活性やvWF濃度の変化は、VODのバイオマーカーや早期治療介入の指標となると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝類洞閉塞症候群（VOD）および血栓性微小血管障害（TMA）は、ともに移植医療や化学療法（造血幹細胞移植の前処置、消化器悪性腫瘍に対して使用されるオキサリプラチンなど）における合併症や副作用として認められ、進行すると臓器不全に進展する予後不良な疾患である。本研究により、両疾患の病態には関連性があることが基礎実験により明らかになった。特に血漿中に認められたADAMTS13活性やvWF濃度の変化は、VODのバイオマーカーや早期治療介入の指標となると考えられた。今後、本研究結果がエビデンスとなり、両疾患に関連した研究が継続され、有効な治療法や予防対策の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Hepatic sinusoidal obstruction syndrome (VOD) and thrombotic microangiopathy (TMA), if advanced, develop organ dysfunction and poor prognosis. No studies have focused on the relationship between the two diseases. In this study, mouse model of VOD was used and evaluated for TMA pathogenesis; platelet aggregation along sinusoids and von Willebrand factor (vWF) aggregation were observed in the liver tissue of VOD. In plasma, ADAMTS13 activity decreased from the early stage of VOD, whereas vWF concentration continued to increase. This study confirmed TMA pathology in the liver tissue of VOD and suggested that the changes of ADAMTS13 activity and vWF concentration in plasma may be useful as biomarkers of VOD.

研究分野：肝臓外科

キーワード：肝類洞閉塞症候群 血栓性微小血管障害 von Willebrand factor ADAMTS13 血小板減少 VOD TMA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝類洞閉塞症候群 (veno-occlusive disease : VOD) は、肝類洞内皮障害を始めとして小葉中心静脈周囲 (Zone3) の肝細胞壊死や線維化を認め、進行すると門脈圧亢進症そして肝不全に進展する予後不良な疾患である。また血栓性微小血管障害 (Thrombotic microangiopathy: TMA) は、臨床では血栓性血小板減少性紫斑病 (Thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP) として溶血性貧血、血小板減少、腎機能障害、発熱、精神神経障害の古典的 5 徴候を認め、難治性にて致死的になることもある。しかし、その病態解明は不十分である。発生機序の 1 つとして、様々な原因により誘発された血管内皮障害により血管内皮細胞から Unusually large-von Willebrand factor (UL-vWF) が産生され、その特異的切断酵素 A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type I motifs 13 (ADAMTS13) が著減していると UL-vWF が切断されず血中に蓄積し、微小血管内血小板血栓が形成され、組織血流障害から臓器不全に陥ることが知られている。難治性疾患である肝類洞閉塞症候群 (VOD) および血栓性微小血管障害 (TMA) は、ともに血管内皮障害が誘発因子であり、血小板減少を伴う凝固系異常を認め、進行すると臓器機能不全を認めることが知られている。両疾患の関連性に関する実験的な解明はあまり進んでいない。

2. 研究の目的

重篤な VOD に陥ってから治療を開始しても治療抵抗性であり、先制的治療 (preemptive therapy) にて病態の重篤化を防止することが重要と考えられる。本研究により VOD 病態解明が TMA の観点から進めば、TMA 領域の新規治療が VOD においても応用できる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 臨床病理学的研究

肝移植後の肝生検で得られた肝組織を用いて、TMA の病態を評価し、同病態と肝組織障害の関連性および臨床成績に与える影響を評価する。

(2) 動物モデルを用いた研究

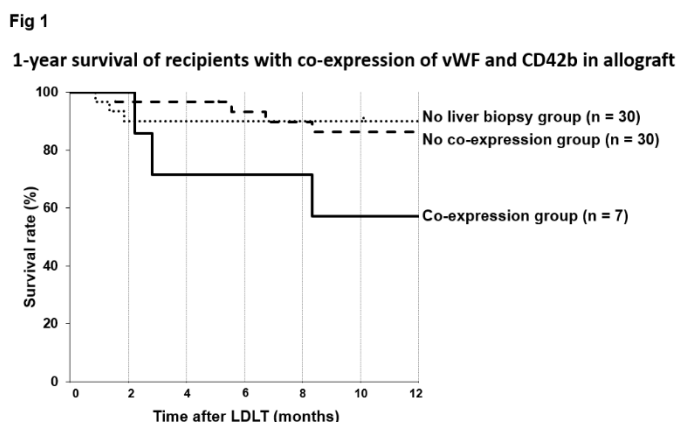
VOD 動物モデルを用いて肝組織における TMA 病態を評価し、同病態が VOD の誘発・進行に与える影響を検証する。TMA の新規治療としてリコンビナントトロンボモジュリン (rTM) の有用性が報告され、また最近では UL-vWF の切断酵素である ADAMTS13 が実験的に使用可能となった。本研究では、両薬剤を使用し、TMA 治療を介した VOD 抑制効果を検討する。

4. 研究成果

(1) 移植肝組織における TMA 病態の臨床病理学的意義

肝移植を受けた成人症例の術後早期の肝生検組織を使用し、免疫染色を行った。その結果、類洞に沿って von Willebrand factor (vWF) は凝集塊様に発現し、ADAMTS13 は明確なドット様に発現し、CD42b は凝集様または肝細胞内に点状に発現する血管外血小板凝集の発

現として確認された。これらは主に Zone 2 および 3 に認められた。また vWF と CD42b 発現強度は、Zone3 において有意な正の相関を認め、Zone3 の領域に TMA 病態が発生しやすいことが証明された。また同所見を認めた症例の肝移植後短期成績は不良であることが確認された (Fig 1)。



(2) VOD モデルにおける TMA 病態の評価

マウスにモノクロタリン(MCT)を投与して VOD モデルを作成した。VOD 群と Sham 群の比較として、12~48 時間の経過において経時的な変化を組織学的や血漿中の濃度を測定し、評価を行った。

H.E 染色では、VOD 群において、経時的にうっ血の増悪を認めた (Fig 2A)。血小板と反応する CD42b および vWF の免疫組織学染色では、Zone3 を中心に発現が観察され、時間の経過とともに発現が増強することが確認された (Fig 2B, 2C)。ADAMTS13 の免疫組織学染色では、モノクロタリン注入後の 48 時間後に初めて発現が確認された (Fig 2D)。

血中の血小板数は、VOD 群において経時的に有意な減少を認めた (Fig 3A)。また血漿中の vWF を ELISA 法で測定した結果、Sham 群と比較して VOD 群では血漿 vWF (A2) が MCT 投与後 12 時間後に増加し、48 時間後まで増加が継続した (Fig 3B)。また血漿中の ADAMTS13 活性は、モノクロタリン注入後、VOD 群で投与 12 時間後に有意に低下し、48 時間後でも有意な低下を認め、Sham 群と比較し、1/3 までの同活性の低下を認めた (Fig 3C)。

本研究により VOD の肝組織では、類洞において血管外の血小板の凝集に伴って vWF 凝集が悪化し、ADAMTS13 が消費されること、また同組織病態に伴って VOD 発症初期に血漿中の ADAMTS13 活性が低下するのに対し、vWF 濃度は徐々に上昇する変動が確認された (Fig 4)。血中 ADAMTS13 活性や vWF 濃度は、VOD の早期バイオマーカーとなると考えられ、VOD の早期発見や治療介入のための有用な指標となりうる可能性がある。

(3) VOD モデルにおける TMA 病態に対する先制治療の実験結果

VOD モデルにおける TMA 病態に対するリコンビナント ADAMTS13 (rADAMTS13) の有用性の評価を行った。予備実験で、rADAMTS13 をマウスに皮下投与すると、48 時間の経過で、血中 ADAMTS13 活性が上昇することが確認された。

次にマウス VOD モデルにおいて、MCT 投与前に rADAMTS13 を皮下投与し、TMA 病態の抑制を介した VOD 軽減効果の有無を評価した。VOD 群および VOD+rADAMTS13 群を作成し、血液、血漿、肝臓を採取した。その結果、血小板数に有意差な変動を認めなかった。また、HE 染色による VOD 所見では、VOD の抑制効果を認めず、rADAMTS13 単独での VOD 抑制効果は確認されなかった。

Fig 2A Hematoxylin & eosin staining

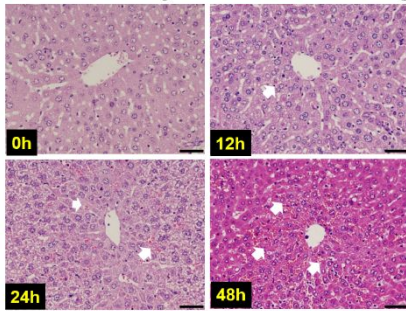


Fig 2B CD42b

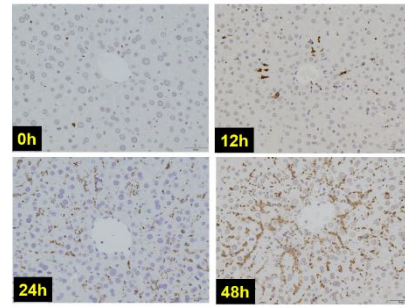


Fig 2C von Willebrand factor

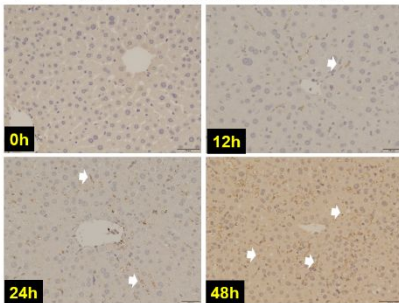


Fig 2D ADAMTS13

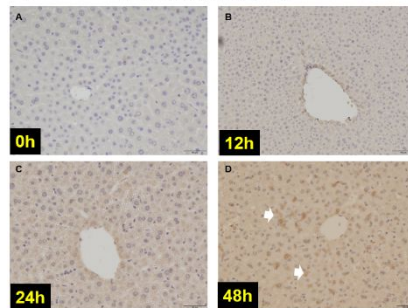


Fig 3A VOD群における血小板数

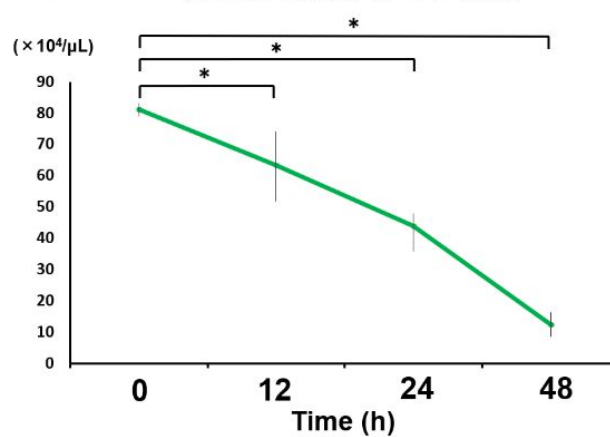


Fig 3B

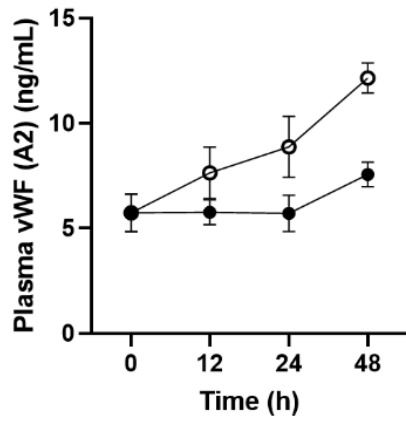


Fig 3C

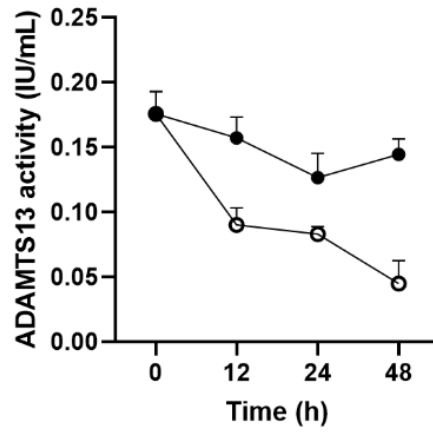
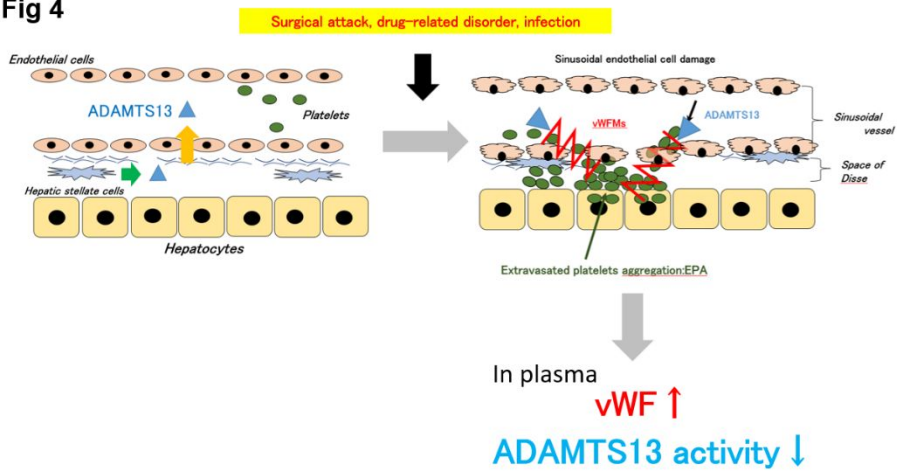


Fig 4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐伯昌一、田島秀浩、蒲田亮介、岡崎充善、大畠慶直、中沼伸一、牧野勇、太田哲生、八木真太郎
2. 発表標題 肝類洞閉塞症候群(SOS)の早期発見のためのバイオマーカーの同定
3. 学会等名 第27回外科侵襲とサイトカイン研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masakazu Saeki, Seiichi Munosue, Hidehiro Tajima, Yuri Higashi, Tetsuo Ohta, Shintaro Yagi, Yasuhiko Yamamoto
2. 発表標題 Plasma biomarkers for early detection of sinusoidal obstruction syndrome
3. 学会等名 日本・ロシア 医学シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------