

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18100

研究課題名(和文) ADAMTS13関連因子を軸とした肝虚血再灌流障害に対する新規治療戦略

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for hepatic ischemia-reperfusion injury based on ADAMTS13-related factors

研究代表者

吉川 高宏 (Yoshikawa, Takahiro)

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：80773275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Von Willebrand Factor (VWF) は、血管内皮細胞において合成され、unusually large VWF multimers (UL-VWFMs) として血中に放出される。UL-VWFMsは強い血小板凝集能を有し、UL-VWFMsの増加は血栓形成の一因となる。一方、肝臓手術におけるPringle法による虚血再灌流傷害の主要な標的が血管内皮細胞であることは知られている。本研究においてPringle法による虚血再灌流障害と肝切除後のUL-VWFMs発現の関連性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で肝切除中のPringle法が血管内皮細胞傷害を惹起し、VWFマルチマーが増加することで、肝内に病的血栓が形成され易い状態にあることが示された。今まで虚血再灌流障害に対する治療法として、肝切除とADAMTS13関連因子に着目した検討は、国内外において報告がない。本研究はADAMTS13関連因子という観点から、術中Pringle法による虚血再灌流障害のメカニズムを解明することで、肝切除後肝不全に対する新たな治療戦略を創生することを目的とし、今後研究がすすめば、新たな肝切除後肝不全治療戦略となる可能性がある。

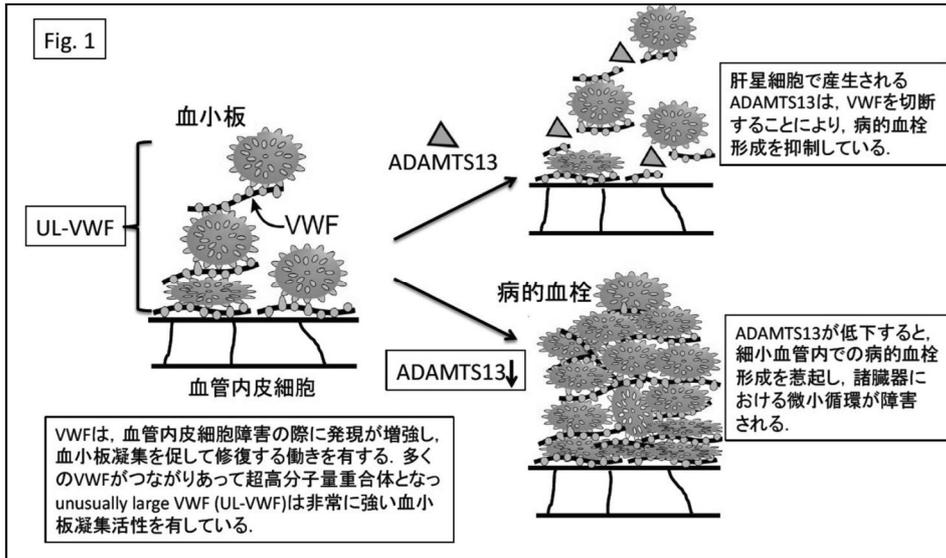
研究成果の概要(英文)：Introduction：von Willebrand factor (VWF) is synthesised in vascular endothelial cells and released into the plasma as unusually large VWF multimers (UL-VWFMs). Sinusoidal endothelial cells are a major target of ischaemia reperfusion injury due to liver surgery. This study aimed to clarify the effect of hepatectomy on ULVWFMs. Results：By multivariable analysis, Pringle's maneuver duration was significantly associated with increased UL-VWFMs level after hepatectomy[odds ratio 1.049, p=0.043]. UL-VWFMs index was significantly correlated with Pringle's maneuver duration (r=0.444, p=0.017). Conclusions：Plasma UL-VWFMs levels increased after hepatectomy due to ischaemia reperfusion injury with Pringle's maneuver.

研究分野：肝臓外科

キーワード：ADAMTS13 肝切除

1. 研究開始当初の背景

肝臓外科手術において、出血量軽減のために、流入血行である肝動脈・門脈を遮断する Pringle 法が、古くから用いられてきた。Pringle 法の demerit として、Pringle 法施行中、肝臓は虚血状態に陥り、特に長時間になると術後肝不全の危険性が増加する。原因として虚血再灌流障害が考えられているが、その機序は明らかになっていない。また有効な治療法も開発されていない。一方、血管内皮障害の際に発現が増強する von Willebrand factor (VWF) は、超高分子量重合体となった unusually large VWF (UL-VWF) マルチマーとして血中に放出される。近年、肝星細胞で産生される VWF 特異的切断酵素 (ADAMTS13) が、注目されている。本酵素が欠乏すると UL-VWF マルチマーが切断されず、UL-VWF マルチマーの存在は、血小板凝集を促し、微小血管内で病的



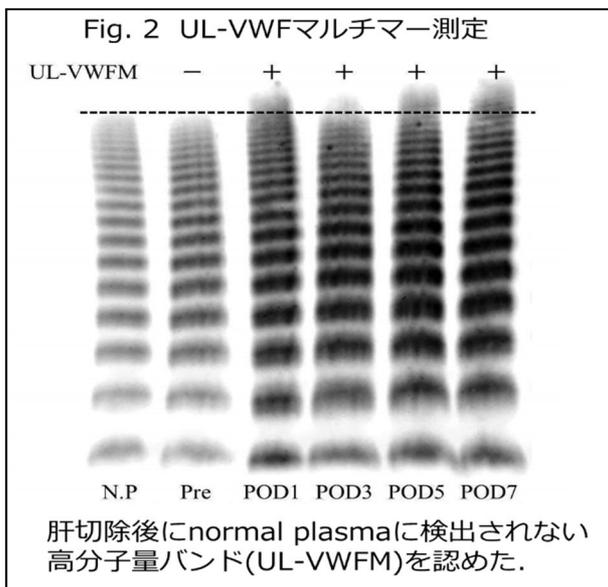
血栓が形成される (Fig. 1)。結果として諸臓器における微小循環障害をきたし、主要臓器障害を惹起することが知られている。したがって肝星細胞で産生される ADAMTS13 が欠乏すると、強い血小板凝集能をもつ UL-VWF マルチマーが増加し、主要諸臓

器において微小循環障害が惹起される。ADAMTS13 関連因子を軸とした肝微小循環障害という新たな観点から、肝切除における虚血再灌流障害について解明し、新規治療法の基盤となる研究を行う。

2. 研究の目的

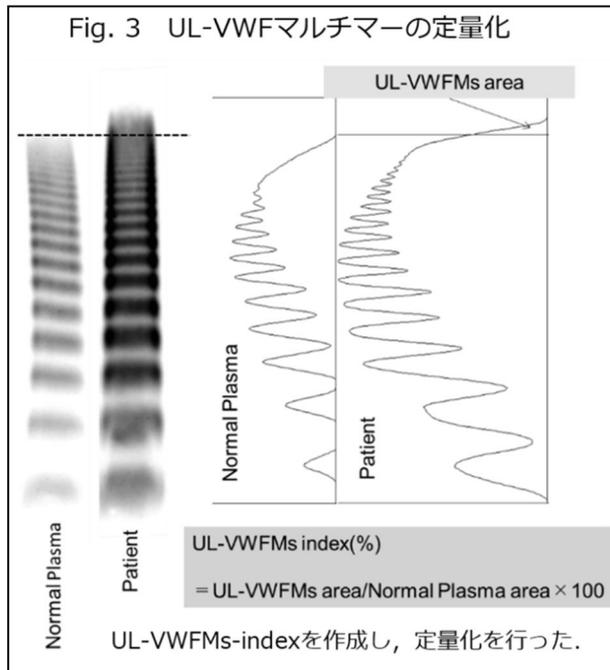
上記背景より、肝切除時での Pringle 法による虚血再灌流障害の機序として、消費性の ADAMTS13 活性の低下と、内皮細胞障害による UL-VWF マルチマーの産生増加により、肝内の微小血管に病的血栓が形成され、肝微小循環障害をひき起こし、肝障害・肝不全へと進展させるというプロセスを経ることが予想される。研究の目的・特色は、ADAMTS13 を軸に、肝切除後の ADAMTS13 活性の低下と ULVWF マルチマー出現による病的血栓の形成、肝の微小循環障害から虚血再灌流障害に至るといった新しい観点から病態形成を見直すことにある。肝切除、特に術中 Pringle 法による虚血再灌流障害における ADAMTS13 関連因子の意義を明らかにすることに独自性がある。

3. 研究の方法



肝切除患者の術前・術中・術後の血清を用いて、ELISA 法等による分子生物学的方法を用いて、ヒトにおける ADAMTS13 を中心とした Pringle 法による虚血再灌流障害のメカニズムを包括的に解明する。

肝切除症例において、術前・術中 (各 Pringle 間)・術後 (術後 1, 3, 5, 7 日) の ADAMTS13 活性、VWF 抗原量、UL-VWF マルチマー発現を経時的に測定し、術中 Pringle 法との関連を検討する。血漿 ADAMTS13 活性は ADAMTS13-act-ELISA キット、血漿 VWF 抗原量は ELISA (DAKO, Kyoto, Japan) にて測定。血漿 UL-VWF マルチマーは vertical SDS-1.0% agarose gel electrophoresis を用いることで、超高分子量の重合体に対しても安定的に western blot 解析が可能となる。また UL-VWF マルチマーの定義を正常血漿には検出されない高分子量バンドと定義する (Fig. 2)。



さらにマルチマー解析については、従来困難とされてきた定量化が NIH ImageJ software を用いて、UL-VWF マルチマー index を作成することで、可能となった (Fig. 3). これらの測定技術については奈良医大において定型化が既になされている。

また、実際の術前化学療法症例や肝硬変症例の切除前後の ADAMTS13 活性, VWF 抗原, UL-VWF マルチマー発現, GOT, GPT, T-bil 値を測定することにより、術前化学療法や肝硬変等のハイリスク症例における ADAMTS13 関連因子の動態を解析し、ADAMTS13 関連因子が術後肝不全予測マーカーになり得るかどうかについても検討する。以上の観点から、実臨床における ADAMTS13 関連因子と肝切除の関係性を明らかにする。

4. 研究成果

当科にて肝切除を施行した 35 例を対象とした。術前・術後に血液をサンプリングし、ADAMTS13 活性・VWF 抗原量測定と UL-VWF 分析を行った。normal plasma に検出されない高分子量バンドを UL-VWF と定義し、UL-VWF index (UL-VWF/normal plasma) として UL-VWF の定量化を行った。

ADAMTS13 活性は術後有意に低下し ($p < 0.001$)、VWF 抗原量は術後有意に増加した ($p < 0.001$)。UL-VWF index は術前値 0.2% (0.0-7.8) から術後 7 日目に 4.2% (0.1-16.3) と有意に増加した ($p < 0.001$)。術後 UL-VWF positive 群は 22 例、negative 群は 7 例であった。術前因子は 2 群間に有意差は認めなかった。手術因子では、UL-VWF positive 群において Pringle 時間は有意に長く ($p = 0.001$)、出血量は有意に多かった ($p = 0.003$)。多変量解析では、Pringle 時間が術後 UL-VWF 出現に関する独立した規定因子であった ($p = 0.043$)。さらに UL-VWF index は、Pringle 時間と正の相関を示した ($r = 0.444$, $p = 0.017$)。

したがって Pringle 法に伴う虚血再灌流傷害が UL-VWF を誘導し、肝切除後は VWF 依存性に血小板凝集亢進状態にある可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahiro Yoshikawa	4. 巻 183
2. 論文標題 Ischaemia-reperfusion Injury With Pringle's Maneuver Induces Unusually Large Von Willebrand Factor Multimers After Hepatectomy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 20-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.thromres.2019.09.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------