

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24012

研究課題名(和文) 肝移植に伴う虚血再灌流障害を腸内細菌叢の調整により緩和する試み

研究課題名(英文) The alleviation of hepatic ischemia-reperfusion injury by modulating gut microbiota

研究代表者

中村 公治郎 (Nakamura, Kojiro)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：10848203

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)：肝移植前のレシピエントマウスに非吸収性抗生剤であるリファキシミンを投与した群では対照群に比べて、移植6時間後の炎症細胞集積・炎症性サイトカインの発現・肝障害が軽減していた。リファキシミン投与を受けたレシピエントマウスにナイーブマウスの糞便を経口投与した後に肝移植を行うことで、リファキシミン群では軽減されていた肝障害が再燃した。生体肝移植を受けたヒト成人レシピエント患者を後方視的に解析した結果、術前にリファキシミン投与を受けたレシピエントは対照群と比較して移植後成績が良好な傾向にあることも分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝虚血再灌流障害は術後肝不全やグラフト拒絶の要因となるため、その予防は移植医療における重要な課題である。本研究では、非吸収性の抗生剤であり長期間の投与が比較的安全に行えることが報告されているリファキシミンが、マウス肝移植モデルにおいて虚血再灌流障害を緩和することを示した。臨床における肝移植レシピエントは術後に免疫抑制剤による治療を要するため、吸収性の抗生剤を術前のレシピエントに長期間投与することは、耐性菌の出現や難治性感染症を引き起こす可能性が危惧される。そのため、非吸収性で長期間投与が可能なリファキシミンによる肝保護効果が示された本研究は、今後の臨床応用の礎となりうる考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to determine whether rifaximin (RFX) pretreatment for liver transplant recipients alleviates liver ischemia-reperfusion injury. In the experimental arm, livers from BALB/c mice were transplanted to allogeneic C57BL/6 mice after 18 h of cold storage, followed by liver/blood sampling at 6 h post-reperfusion. RFX pretreatment for recipient mice alleviated hepatocellular damage, as evidenced by decreased serum transaminase levels, suppressed frequency of TUNEL-positive dead cells, inhibited hepatic macrophage/neutrophil infiltration, whereas supplemented fecal microbiota transplant diminished hepatoprotective influences of rifaximin pretreatment. In the clinical arm, we retrospectively analyzed 87 living donor liver transplant recipients. Recipients pretreated with RFX prior to liver transplantation exhibited better patient survival, graft survival and rejection-free graft survival.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝虚血再灌流障害 抗生剤 肝移植

## 1 . 研究開始当初の背景

手術手技や周術期管理の進歩に伴って、肝移植は現在末期肝不全患者および進行した肝悪性腫瘍患者に対する標準治療となった。肝虚血再灌流障害は肝移植に伴うグラフトの保存とその後の血流再開によってもたらされる肝障害であり、early allograft dysfunction (EAD)や拒絶にも影響するため、虚血再灌流障害の予防は移植医療における重要な課題である(Zhai et al, Nature reviews Gastroenterology & hepatology. 2013; 10: 79-89)。一方で改正臓器移植法施行後の現在においても本邦における肝移植症例のうち大多数が生体肝移植であり、これは脳死全肝移植が大多数である欧米の肝移植臨床とは対照的である。

腸内細菌叢は 100 兆個以上の片利共生微生物の貯蔵庫として知られており、その数は実に成人ヒト細胞全体の 10 倍以上とされている(Ley et al, Cell. 2006; 124: 837-48)。近年、腸内細菌が炎症性腸疾患のみならず心臓血管疾患(Tang et al, J Clin Invest. 2014; 124: 4204-4211)、肥満(Cani et al, Gut. 2009; 58: 1091-1103)、糖尿病(Cani et al, Diabetes. 2008; 57: 1470-1481)、パーキンソン病(Sampson et al, Cell. 2016; 167 :1469-1480)といった全身性あるいは遠隔臓器の病態生理にも影響するといった研究が報告されている。また動物移植モデルの研究において、抗生剤投与あるいは無菌飼育が皮膚や心臓グラフトの生存を延長することが報告されている(Lei et al, J Clin Invest. 2016; 126: 2736-2744)、(Bromberg et al, JCI insight. 2018;3)。肝移植における腸内細菌の影響については本研究代表者が University of California, Los Angeles (UCLA)において従事した研究成果を発表しており(Nakamura et al, J Clin Invest. 2019; 129: 3420-3434)、その中で以下のことを報告している。

- (a) マウス肝移植モデルにおいてレシピエントに対する抗生剤 (Amoxicillin) 投与が腸管由来の Prostaglandin E2 を増やすことによりグラフト肝の PGE2 受容体 (EP4) の発現を増やし、オートファジーを活性化させ (LC3B 上昇)、小胞体ストレスを減じ (CHOP 減少)、虚血再灌流障害を緩和した。
- (b) UCLA での脳死全肝移植症例を後方視的に検討した結果、術前に 10 日以上の抗生剤 (Abx) 投与を受けたレシピエントは再灌流後の EP4 および LC3B が高く、CHOP が低く (Western blots/免疫染色)、術後の肝障害 (AST/ALT 上昇) が軽度で、early allograft dysfunction (EAD) の頻度が低かった。
- (c) 多変量解析の結果、レシピエントに対する 10 日以上の抗生剤前投与は EAD を回避する独立した予測因子のひとつであった。
- (d) レシピエントに長期間投与された抗生剤のうち大多数はリファキシミン (RFX) であった。

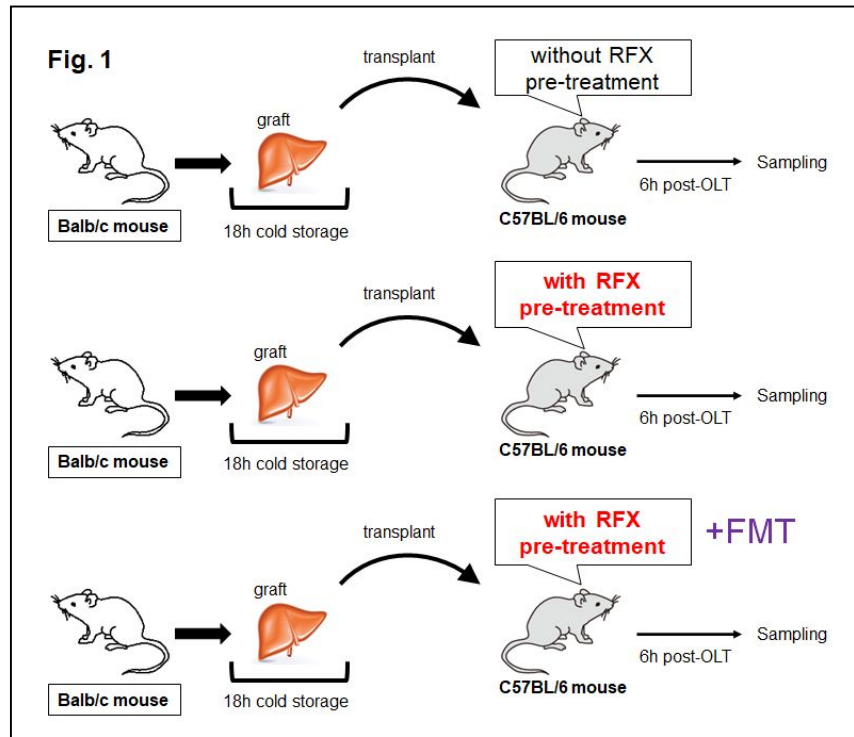
この研究は、レシピエントに対する抗生剤の前投与が肝移植患者のアウトカムを改善する可能性を示唆している。しかし、本邦と米国におけるレシピエントの環境的・人種的背景は異なること、米国と違い本邦においては生体部分肝移植が大多数であることを鑑みると、UCLA における脳死全肝移植症例の解析から得られた上述の知見が本邦の肝移植症例にも当てはまるか否かは分かっていない。また術後に免疫抑制剤治療を要する肝移植レシピエントにとって、術前の長期抗生剤治療による耐性菌出現が難治性感染症をもたらす可能性が危惧されるが、上述の UCLA における肝移植症例においては長期間使用された抗生剤の大多数は RFX であった。RFX は米国でも本邦においても肝性脳症の治療および予防に対して使用されている「非吸収性」の抗生剤であり、耐性菌出現のリスクが低く長期間投与が比較的安全に行える (Bass et al, The New England journal of medicine. 2010;362(12):1071-81)。肝移植症例においても術前の RFX 投与は術後の感染性合併症を増やさないことが報告されている (Esfeh et al. Liver transplantation. 2014;20(5):544-51)。したがって、肝移植レシピエントに対する術前抗生剤治療を企図する場合 RFX は治療薬として有望と考えられるが、RFX が肝移植における虚血再灌流障害を緩和しうるかは解明されていない。

## 2 . 研究の目的

本研究の目的は、非吸収性の抗生剤である RFX のレシピエントに対する術前治療が移植後の肝障害を軽減しうるかを解明することである。具体的には (a) マウス同種同所性肝移植モデルを用いてレシピエントに対する RFX の前治療が虚血再灌流障害を軽減できるか、(b) 京都大学における生体肝移植症例の患者データの解析を通じて、レシピエントに対する RFX の前治療が患者アウトカムと相関するかを検討する。

### 3. 研究の方法

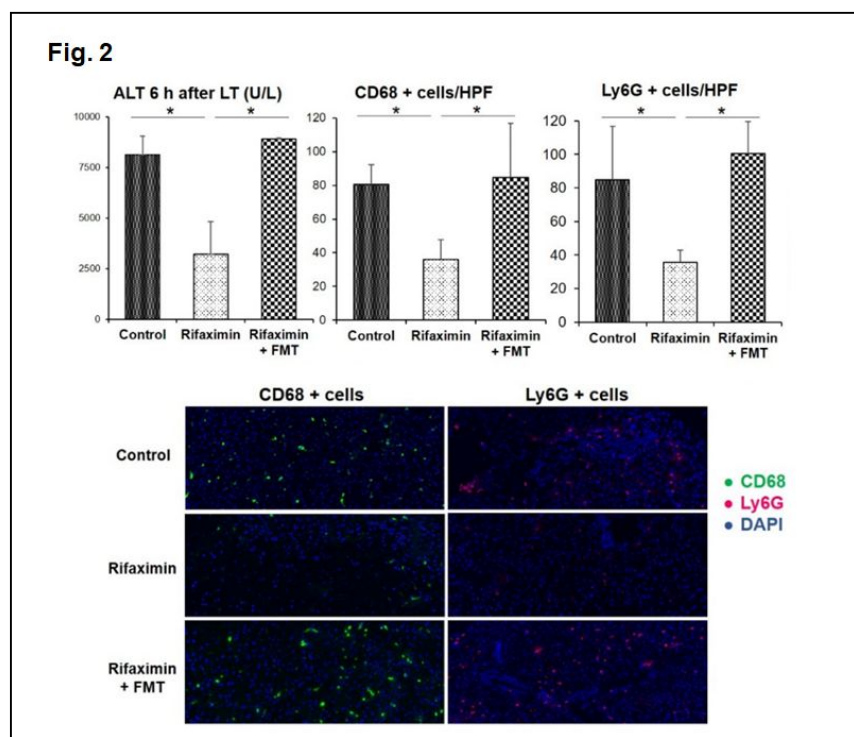
マウス同種同所性肝移植(orthotopic liver transplantation, OLT)モデル: Balb/c マウスから採取した肝グラフトを4の保存液(UW solution)に18時間保存した後, レシピエントマウス(C57BL/6)に移植し, 肝障害がピークに達する再灌流6時間後に血液と肝臓のサンプルを採取した。無介入のレシピエント, RFXにて前治療(10日間)を受けたレシピエント, RFXにて前治療を受けた後に naïve mouse の糞便移植 (fecal microbiota transplantation, FMT) を受けたレシピエントの3群を比較した(Fig. 1)。HE染色による組織学的評価, TUNEL染色による死細胞評価, 血清中の肝逸脱酵素(AST/ALT)測定により虚血再灌流障害を評価した。マクロファージ(CD68)および好中球(Ly6G)の免疫染色, 肝組織のRT-PCR(CXCL1, CXCL2, CXCL10)により肝障害に伴う炎症性サイトカインの発現を評価した。



ヒト生体肝移植症例の研究: 京都大学における生体肝移植症例を後方視的に解析し, レシピエントに対する術前のRFXの使用が臨床アウトカムに影響するかを評価した。

### 4. 研究成果

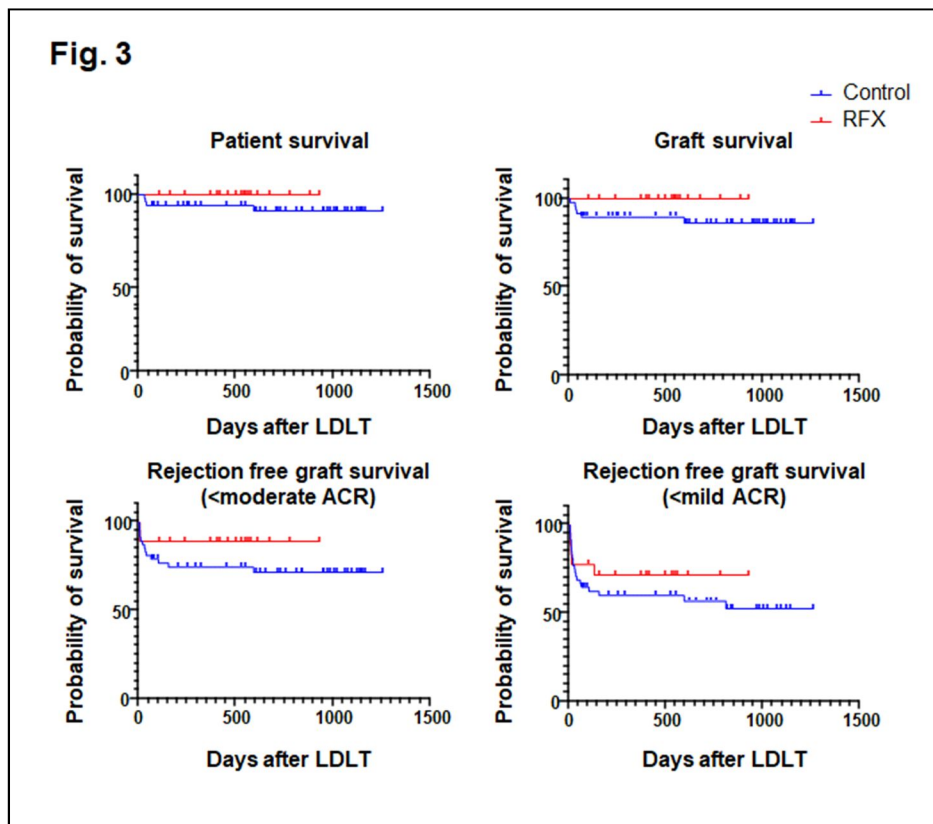
Balb/c マウスから採取した肝グラフトを18時間の冷保存の後にC57BL/6マウスに移植した。肝移植前のレシピエントマウスにRFXを投与した群では対照群に比べて, 移植6時間後の血清中肝逸脱酵素の値が低く, 組織学的IRIスコアが低く, TUNEL陽性の死細胞数が少なく, マクロファージ(CD68)と好中球(Ly6G)の肝内への集積が緩和されており, 炎症性サイトカイン(CXCL1, CXCL2, CXCL10)の発現も軽減されていた。RFX投与を受けたレシピエントマウスにナীব mouseの糞便を経口投与した後に肝移植を行うことで, RFX群では軽減されていた肝障害・炎症細胞集積・炎症性サイトカインの発現を再燃させることができ, RFXによる肝虚血再灌流障害の軽減が腸内細菌



を調整することによりもたらされることが分かった (Fig. 2)。抗生剤投与を受けたマウスの腸内細菌叢を網羅的に検討した結果、抗生剤投与は腸内細菌の個体数・豊富度・多様性を減少させ、Akkermansia と Bacteroides の割合を増やすことが分かり、これらの腸内細菌が移植に伴う肝虚血再灌流障害に影響しうる可能性が示唆された。

2017年11月～2020年4月までに京都大学肝胆膵・移植外科にて生体肝移植 (living donor liver transplantation, LDLT) を受けた成人レシピエント患者 87 症例を後方視的に解析した。生体肝移植前に RFX 投与を受けたレシピエント (RFX 群) と対照群 (Control 群) を比較すると、ドナー・グラフト

因子 (年齢, 性別, BMI, 冷阻血時間), レシピエント因子 (年齢, 性別, BMI, 原疾患, ABO 適合性) に有意な差は認められなかった。RFX の投与を術前に受けたレシピエントは対照群に比べて移植後の patient survival ( $p=0.2511$ ), graft survival ( $p=0.1443$ ), rejection-free graft survival (<moderate ACR,  $p=0.2747$ ; <mild ACR,  $p=0.3855$ ) が良好な傾向にあることが分かった。



本研究により、非吸収性の抗生剤である RFX がマウス肝移植モデルにおいて虚血再灌流障害を緩和しうるということが分かった。また、ヒト生体肝移植においてもレシピエントに対する術前 RFX 投与が肝移植後成績を改善しうる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kojiro Nakamura, Shoichi Kageyama, Jerzy W Kupiec-Weglinski	4. 巻 6
2. 論文標題 The Evolving Role of Neutrophils in Liver Transplant Ischemia-Reperfusion Injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Transplant Rep	6. 最初と最後の頁 78-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s40472-019-0230-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kojiro Nakamura, Shoichi Kageyama, Jerzy W Kupiec-Weglinski	4. 巻 24
2. 論文標題 Innate immunity in ischemia-reperfusion injury and graft rejection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Review Curr Opin Organ Transplant	6. 最初と最後の頁 687-693
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MOT.0000000000000709	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hidenobu Kojima, Kojiro Nakamura, Jerzy W Kupiec-Weglinski	4. 巻 24
2. 論文標題 Therapeutic targets for liver regeneration after acute severe injury: a preclinical overview	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Review Expert Opin Ther Targets	6. 最初と最後の頁 13-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14728222.2020.1712361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kojiro Nakamura, Shoichi Kageyama, Fady M Kaldas, Hirofumi Hirao, Takahiro Ito, Kentaro Kadono, Kenneth J Dery, Hidenobu Kojima, David W Gjertson, Rebecca A Sosa, Maciej Kujawski, Ronald W Busuttill, Elaine F Reed, Jerzy W Kupiec-Weglinski	4. 巻 130
2. 論文標題 Hepatic CEACAM1 expression indicates donor liver quality and prevents early transplantation injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Invest	6. 最初と最後の頁 2689-2704
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI133142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirofumi Hirao, Kenneth J Dery, Shoichi Kageyama, Kojiro Nakamura, Jerzy W Kupiec-Weglinski	4. 巻 157
2. 論文標題 Heme Oxygenase-1 in liver transplant ischemia-reperfusion injury: From bench-to bedside	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Review Free Radic Biol Med	6. 最初と最後の頁 75-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.012	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 -

1. 著者名 Junichi Yoshikawa, Koichiro Hata, Kojiro Nakamura, Yusuke Okamura, Shinji Uemoto	4. 巻 6
2. 論文標題 The Impact of Biliary Reconstruction Methods on Small Partial Liver Grafts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplant Direct	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TXD.0000000000000966	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masayuki Okuno, Etsuro Hatano, Rei Toda, Hiroto Nishino, Kojiro Nakamura, Takamichi Ishii, Satoru Seo, Kojiro Taura, et al	4. 巻 27
2. 論文標題 Conversion to complete resection with mFOLFFOX6 with bevacizumab or cetuximab based on K-RAS status for unresectable colorectal liver metastasis (BECK study): Long-term results of survival	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Hepatobiliary Pancreat Sci	6. 最初と最後の頁 496-509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.747	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 -

1. 著者名 Shoichi Kageyama, Kentaro Kadono, Hirofumi Hirao, Kojiro Nakamura, Takahiro Ito, David W Gjertson, Rebecca A Sosa, Elaine F Reed, Fady M Kaldas, Ronald W Busuttil, Jerzy W Kupiec-Weglinski, Yuan Zhai	4. 巻 10
2. 論文標題 Ischemia-Reperfusion Injury in Allogeneic Liver Transplantation: A Role of CD4 T Cells in Early Allograft Injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TP.00000000000003488	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中村 公治郎、岩崎 純治、飯田 拓
2. 発表標題 レシピエントに対する術前抗生剤投与はPGE2/EP4経路を介してヒトおよびマウスの移植後肝障害を緩和する
3. 学会等名 第43回 日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kojiro Nakamura, Shoichi Kageyama, Takahiro Ito, Hirofumi Hirao, Kentaro Kadono, Kenneth Dery, Hidenobu Kojima, Keiji Nagata, Masato Matsuura, Tetsuya Shiota, Jyunji Iwasaki, Taku Iida, Atsushi Itami, Takahisa Kyogoku, Jerzy Kupiec-Weglinski
2. 発表標題 Recipient antibiotics pretreatment alleviates transplanted liver damage in mice and humans
3. 学会等名 55th Congress of the European Society for Surgical Research (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究協力者	影山 詔一  (Kageyama Shoichi)  (60707545)	京都大学・大学院医学研究科・助教   (14301)	
研究協力者	瀬尾 智  (Seo Satoru)  (70646546)	京都大学・大学院医学研究科・講師   (14301)	
研究協力者	内田 洋一郎  (Uchida Yoichiro)  (30597745)	京都大学・大学院医学研究科・助教   (14301)	

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
---------	---------