

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K24020

研究課題名(和文) 肝移植と機械灌流法を応用した革新的な転移性肝癌に対する体外治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel ex-vivo treatment for metastatic liver cancer based on liver transplantation and machine perfusion

研究代表者

藤好 真人 (Fujiyoshi, Masato)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：90844720

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)：近年機械灌流法は肝移植において、虚血再灌流傷害の軽減および移植前グラフト評価を目的として使用されるようになっており、さらに体外臓器治療への応用も研究されている。本研究では自己肝移植および機械灌流法を基礎とする新規体外癌治療法の開発を行う。この体外癌治療法では自己肝移植の施行が不可避であるため、虚血再灌流傷害を最小限に抑制する必要があるため、我々は無虚血肝移植を用いることとした。本研究で、我々はラットにおける無虚血肝移植手技を確立し、良好な生存率を達成した。そして、このラットモデルに体外癌治療操作(肝切除およびアブレーション)を導入することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の主題である体外癌治療は、多くの癌腫において現行の治療法では根治的治療の得られない進行癌に対する有効な治療法となりうる有望な方法である。我々はこの新規治療法に関し、治療そのものだけでなく、その安全な臨床応用までを視野に入れた治療デザインを描いた上で、その治療過程を忠実に再現するラットモデルを構築した。本研究で確立した無虚血自己肝移植のラットモデルは汎用性の高い体外臓器治療研究モデルであり、将来の研究における有用性は高いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recently machine perfusion has become performed world wide for amelioration of ischemia-reperfusion injury and assessment of the graft viability in liver transplantation. Further, machine perfusion is being developed as an ex-vivo organ treatment method. The current study was conducted to develop a novel ex-vivo cancer treatment based on autotransplantation of the liver and machine perfusion. To minimize the ischemia/reperfusion injury associated with the inevitable autotransplantation procedure, we decided to use the ischemia-free liver transplantation technique in the ex-vivo treatment. We successfully developed the ischemia-free liver transplantation procedure in the rat with a sufficient survival rate. Also we succeeded in introducing ex-vivo liver resection and ablation during machine perfusion in the rat model.

研究分野：肝移植

キーワード：肝移植 機械灌流法 無虚血肝移植 転移性肝癌 体外臓器治療 癌治療

1. 研究開始当初の背景

肝臓は大腸癌、胃癌、膵癌、乳癌など多くの癌種における転移好発臓器である。肝転移に対する治療成績は、肝切除、アブレーション、薬物療法の発達により向上しているが、多発転移や再発など依然問題は多く、治療技術のさらなる進歩が期待されている。

我々は、これまで肝移植における機械灌流法に関する研究を行ってきた。機械灌流法とは、従来の冷温浸漬保存に代わる新しい臓器保存法であり、摘出したグラフトに対し血管系を介した持続的な灌流を行うことにより、血流の途絶えたグラフト組織に対して酸素および代謝基質を送達し、温度を制御することが可能となる。

機械灌流法は、虚血再灌流傷害の軽減し、グラフト不全のリスクを低下させる臓器保存法として開発が進められてきた。従来の冷温浸漬保存では、低温によるエネルギー代謝の抑制と最終電子受容体である酸素の欠乏によりミトコンドリアにおける電子伝達系反応が停止することにより、代謝産物である ATP が減少すると同時にコハク酸などの代謝基質は消費されずに蓄積する。このような代謝基質の不均衡状態に陥ったグラフト組織が、再灌流により急激な復温と酸素化を受けると、多くの ATP 消費性活動が一挙に再活性化され ATP 需要を満たせなくなるとともに、コハク酸の過剰な酸化反応により reverse electron transport を介して ROS が産生され、組織傷害を引き起こされる。そして、これをトリガーとして炎症反応や自然免疫反応が連鎖的に惹起され組織傷害が拡大していく。これに対し hypothermic oxygenated machine perfusion では、酸素化を加えた 4-12 の灌流液を用いて代謝基質の不均衡状態にあるグラフト組織に対し 2 時間程度の低温酸素化を加えることにより、反応速度を抑制したまま徐々に電子伝達系機能を再開させることで、再灌流前に ROS 産生を生じることなく代謝基質の均衡と ATP レベルを回復させ、虚血再灌流傷害の軽減を図ることが可能となる。

一方、Normothermic machine perfusion (NMP) は、摘出後もグラフトを生理的状态に維持することで、虚血再灌流傷害の起点となる代謝基質の不均衡を防ぐことを目的とした機械灌流法であり、エネルギー代謝要求を満たす量の酸素および代謝基質の送達することにより、グラフトを生理的温度 (37) に保ち、グラフトにおける代謝活性を生理的レベルに維持することを可能とする。このような作用機序から、NMP では、グラフトの虚血時間はできる限り短くすることが求められるため、NMP はドナー病院において摘出後すぐに機械灌流を開始し、機械灌流を行いながら移植センターまでの輸送を行う preservation NMP と呼ばれる形式の機械灌流法として研究が進められてきた。そして、輸送可能な灌流装置である OrganOx Metra の開発により臨床応用され、Nasralla らの RCT によりその臨床的有効性が証明されるに至った。

しかし、通常の preservation NMP では灌流の前後に冷温阻血下のバックテーブル操作を行わなくてはならず虚血再灌流傷害を完全に排除することはできない。そこで He らは、臓器摘出から移植に至るまでの過程からグラフト虚血時間を完全に排除した無虚血肝移植 (Ischemia free liver transplantation) と呼ばれる肝移植術式を開発した。無虚血肝移植では、ドナー血流を遮断する前に門脈および動脈の側枝に灌流カテーテルを挿入しておき、ドナー血流を遮断すると同時に機械灌流を開始することでグラフトは虚血状態に陥ることなく機械灌流状態に移行する。また、グラフトは機械灌流状態のままレシピエント体内に移され、機械灌流を継続しながら灌流カテーテル挿入部より遠方で血管吻合を行った後、レシピエント血流の再灌流と同時に機械灌流を停止する。これによりグラフトは非生理的状态を経ることなくレシピエントに移植される。この術式にはまだ改善を要する部分が多く残されているが、肝移植手術におけるグラフト傷害をゼロにすることを目指した非常に有望な術式と考えられる。

NMP では、グラフトは生理的状态に維持されているため、灌流装置上においてグラフトが乳酸代謝や胆汁産生をはじめとする様々な臓器機能を発現していることが観察される。このようなグラフトの機能的活動は、移植前に評価可能でありかつ移植後のグラフト機能とよく相関するため、NMP は移植前にグラフトが移植可能かどうかを判定するための方法としても注目されるようになった。こうして機械灌流法は従来の冷温浸漬保存法に代わる新規臓器保存法のみならず、移植前グラフト評価法としてさらなる発展を遂げ、臨床応用されるに至っている。

現在、機械灌流法の応用に関しては、さらに広範な領域への拡大が精力的に研究されている。灌流装置上のグラフトには、体内より自由度の高い手術操作を、出血によるリスクを伴うことなく加えることが可能である。また、機械灌流により血管内循環と胆汁産生が維持されることから、手術操作により生じる血管および胆管の損傷も検出し修復することが可能である。このような精度の高い手術操作を、虚血時間や術者の手によるグラフト温度の上昇を気にせずに行うことができるため、機械灌流は分割間移植における体外グラフト分割手術への応用が研究されている。また、機械灌流法は、臓器特異的に薬剤を送達することが可能な drug delivery system として利用することも可能である。ここでは、通常の薬物療法のみではなく、核酸製剤を用いた遺

伝子発現の修飾についても研究が行われている。

2. 研究の目的

上述のように機械灌流法は臓器保存の範疇を超え、体外臓器治療への発展が進んでいる。機械灌流による体外手術は、担癌肝臓に対する肝切除およびアブレーションへの応用が可能であり、灌流装置における臓器特異的な薬剤送達は、他臓器に悪影響を及ぼすことなく、全身投与では行うことのできない高用量の化学療法を実現できる可能性がある。

そこで、本研究では、機械灌流の技術を癌治療へと発展させることを目的として、体外臓器治療の開発に向けた動物研究モデルを確立し、その実現可能性を検証する。

3. 研究の方法

本研究の主題は、機械灌流法を応用した転移性肝癌に対する体外臓器治療法の開発である。担癌患者における体外臓器治療のためには、肝臓を一旦患者から摘出して、体外臓器治療を施した後に患者体内に戻す自己肝移植が必須である。したがって、いかに臓器傷害を生じることなく、自己肝移植を行い、体外臓器治療時間を生み出すかが最も重要な課題となる。

そこで我々は自己肝移植に伴う虚血再灌流傷害を最小限に抑制するため、無虚血肝移植導入することとし、無虚血自己肝移植において体外機械灌流中に体外手術や体外化学療法などの体外臓器治療を施す治療デザインとした。本研究では、このような新規治療法の動物研究モデルを構築し、その実現可能性を検証する。

実験動物には近交系ラットを用い、同系統間で無虚血肝移植を行うことにより無虚血自己肝移植を再現する。機械灌流中に行う体外癌治療としては、肝切除、アブレーションおよび化学療法を検討する。

各流入血管の本幹から灌流を行う通常の機械灌流法とは異なり、無虚血肝移植ではドナー体内で肝血流を維持しながら灌流カテーテルを留置し、レシピエント体内で機械灌流を維持しながら血管再建を行う必要があることから、灌流カテーテルは血管吻合部より肝臓側の側枝に留置する必要がある。Heらにより報告された臨床無虚血肝移植では、動脈灌流カテーテルは動脈吻合部となる総肝動脈より末梢で、十分な血管径を有する胃十二指腸動脈に留置されるが、門脈カテーテルは、灌流路として適した門脈枝が存在しないため、肝門部付近の門脈前壁に血管グラフトを吻合して作成した人工的な側枝から挿入される。無虚血肝移植ではドナーおよびレシピエント体内でも機械灌流を継続するため、静脈ドレナージ系も閉鎖回路になっている必要がある。本研究ではラット無虚血自己肝移植モデルを確立し、これに機械灌流下のグラフトに対する癌治療（肝切除、アブレーションおよび化学療法）を導入する。

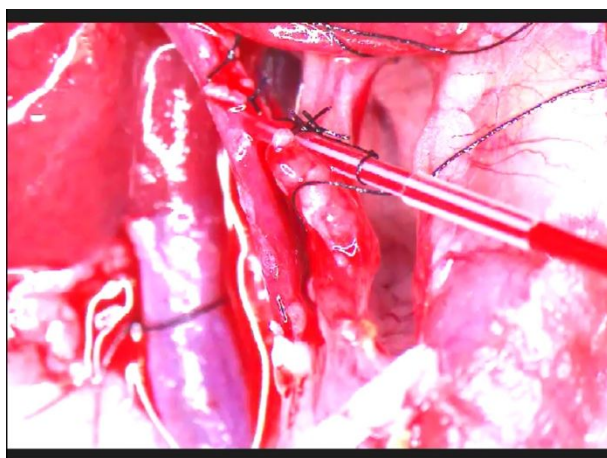
4. 研究成果

【ドナー手術】

我々は、門脈灌流経路としてまず従来のラット肝移植術式における門脈吻合部より肝臓側にある分枝のうち最も血管径の大きい幽門上静脈を選択した。幽門上静脈への安定したカテーテル挿入法を確立し、カテーテル径を最大限まで拡大していったが、それでも得られる灌流速度は門脈灌流には不十分であり、またカテーテル部での抵抗は高く、低圧系である門脈灌流圧のインライン測定は困難であった。

次に我々は、グラフト側の門脈吻合部を上腸間膜静脈レベルとし、門脈灌流カテーテルを脾静脈に留置することとした。脾静脈には22Gプラスチックカテーテルが挿入可能であり、十分な灌流速度と精度の高い門脈圧測定が可能となった。

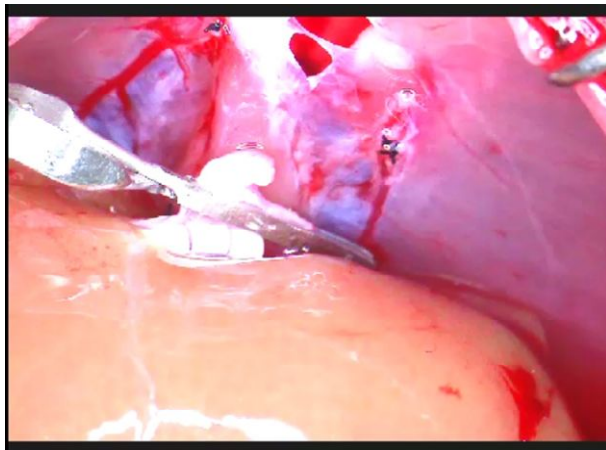
ドナー肝臓の血管剥離を脾頭部のレベルまで行い、左胃静脈および下腸間膜静脈を結紮牽引しながら脾静脈を固定し、仮結紮の上カットダウン法にて門脈灌流カテーテルを脾静脈に挿入・固定する。



安定した静脈ドレナージ法の確立は、このラット無虚血肝移植モデル開発において最も困難な課題であった。無虚血肝移植では閉鎖回路形式の静脈ドレナージを行うため、肝上部下大静脈をクランプする必要がある。まず、我々はラットの肝上部下大静脈を血管吻合のためのマージンを確保しながらクランプできるように、クランプ幅が細くかつ遮断力の強い血管クリップを作成し、クランプをかけながら肝上部下大静脈を吻合することに成功した。

しかし、肝上部下大静脈は非常に短いため、クランプ部よりグラフト側の血管長に余裕がなく、肝静脈の下大静脈への流入部を広く取ることが困難な上に、通常の体外機械灌流と異なり IFLT では機械灌流中に手術操作により肝臓の向きや角度を動かさなくてはならないため、クランプ部を起点とした肝静脈の屈曲が生じやすく、重篤な Outflow block が容易に生じた。特にラットの肝臓は高度に分葉しているため、移植操作中における肝静脈系の屈曲が生じやすかった。

そこで、我々は肝下部下大静脈から挿入し、肝上部下大静脈のクランプ部に到達すると曲がって先端が肝静脈に入っていく静脈ドレナージカテーテルを作成した。このカテーテルにより、静脈系の屈曲閉塞の好発部位に対するステント効果が得られ、ドナーおよびレシピエント体内での Outflow block が改善された。



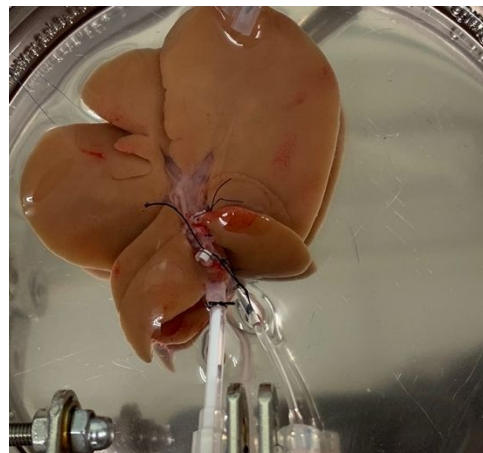
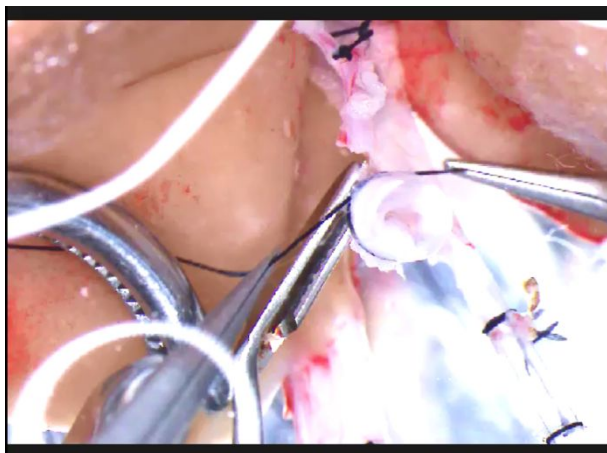
【機械灌流および体外臓器治療】

体外機械灌流中は、グラフトを温度制御された保存液中に置くことにより、体積の小さいラット肝臓に対する精度の高い灌流温度制御を可能とすると同時に、浮力により血管の屈曲などを生じない良好なグラフト位置を維持できるようにした。

本術式における門脈再建は下腸間膜静脈の根部付近でのカフ法で行うこととした。ドナー体内での体内機械灌流開始時には愛護的な血管クリップで下腸間膜静脈をクランプし、体外機械灌流装置に移した後、血管クリップを外してアライメントを確認しながらカフを装着し、すぐにカフ直上で仮結紮により閉鎖した。これにより灌流カテーテル吻合部側の血行遮断が結紮による仮結紮で可能となること、および吻合操作が簡略化されることから、吻合操作中の灌流経路の制御が可能となり安定した体内機械灌流が可能となった。

この灌流装置上での機械灌流中に、本研究における体外治療として想定されている肝切除、アブレーションおよび化学療法を実験的に再現する操作を加えた。化学療法は灌流液に抗癌剤を添加することにより再現可能なため、ここでは肝部分切除とアブレーションを検討した。

肝切除モデルでは熱メスを用いて肝部分切除を行った後、顕微鏡下に血管からの灌流液の漏出の有無を観察し、血管破綻部付近の肝実質を縫合した。アブレーションモデルでは、同様に熱メスで肝実質を焼灼後、血管破綻部を修復した。



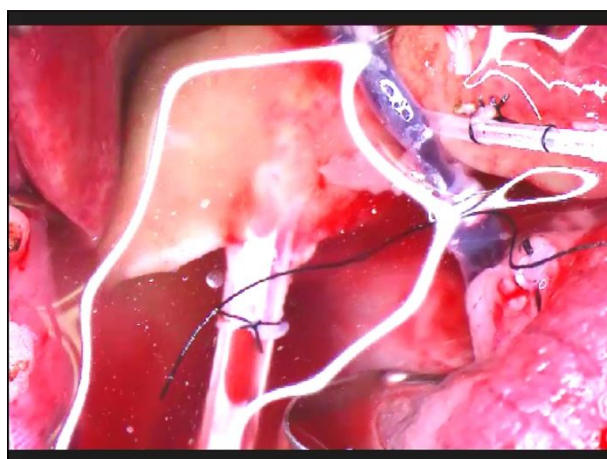
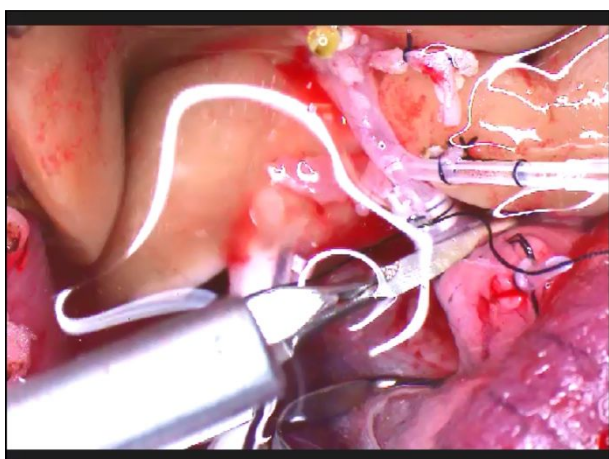
【レシピエント手術】

無虚血肝移植では、全肝摘出を行った後、機械灌流を維持しながらグラフトをレシピエント体内に移動し、血管吻合を行う。レシピエント体内での血管吻合は、無虚血肝移植において最も灌流トラブルの発生リスクの高い過程である。我々は灌流カテーテルの支持器を作成し、安定した機械灌流を維持しながら血管吻合を行うことに成功した。

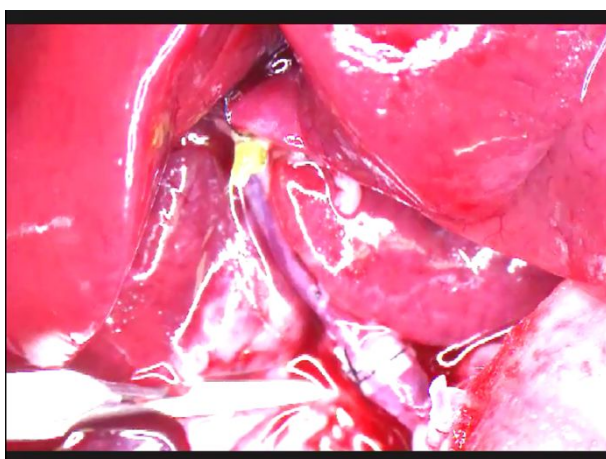
血管吻合は肝上部下大静脈の縫合から開始する。この吻合は Outflow block のリスクが最も高い操作となるので、吻合支持系をかけて吻合部の位置調整をおこなってから、カテーテル支持器により灌流カテーテルの位置を3次的に再度調整し、グラフトの各葉を血管系にストレスのかからない位置においた上で、肝静脈の状態を観察し、Outflow block に最大限の配慮をしながら吻合を行う。吻合はレシピエント側およびグラフト側ともに血管クリップをかけて行うが、縫合が終了したらグラフト側の血管クリップを外すことが可能となり、Outflow block のリスクを低減させることができる。肝門部側の血管および胆管吻合は従来のラット肝移植術式に準じて行う。

下左図は無虚血肝移植における門脈再建中の写真である。カフ付近の下腸間膜静脈レベルで仮結紮により血行遮断され、遮断部の頭側では機械灌流が維持され、尾側ではカフ吻合が行われている。無虚血肝移植では、再灌流前のグラフトにおいても機械灌流により代謝活性が維持されており、血管再建中も胆汁が産生されていることがわかる。

血管吻合が終了したら、下右図のように機械灌流を停止すると同時にレシピエント血流を再開させる。



レシピエント血流が再開すると、グラフトは下図のように均一に再灌流される。本術式ではドナー血流遮断前から機械灌流を経てレシピエント血流再灌流に至るまで途絶えることなく胆汁が産生されていることが確認され、グラフトへの十分な酸素および代謝基質の送達によりグラフトにおいて生理的代謝が維持されているものと考えられる。



上述のモデルにおいてレシピエントラットの安定した生存を達成した。

【結論】

本研究において、我々は、新規体外癌治療として考案した無虚血自己肝移植 + 体外臓器治療を再現するラットモデルの構築に成功した。この研究モデルは汎用性が高く、今後の体外臓器治療開発に有用であると考えられる。

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 1件）

1. 著者名 Shimada Shingo, Fukai Moto, Shibata Kengo, Sakamoto Sodai, Wakayama Kenji, Ishikawa Takahisa, Kawamura Norio, Fujiyoshi Masato, Shimamura Tsuyoshi, Taketomi Akinobu	4. 巻 8
2. 論文標題 Heavy Water (D2O) Containing Preservation Solution Reduces Hepatic Cold Preservation and Reperfusion Injury in an Isolated Perfused Rat Liver (IPRL) Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1818 ~ 1829
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm8111818	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深井原, 柴田賢吾, 坂本聡大, 島田慎吾, 小林希, 石川隆壽, 若山顕治, 藤好真人, 川村典生, 嶋村剛, 武富紹信
2. 発表標題 生存シグナル増強を目指した機械灌流による肝グラフトの薬剤性コンディショニング法の探索
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会, 大阪国際会議場
4. 発表年 2019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
---------	---------