

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月10日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591747

研究課題名（和文）過少グラフトを用いた生体部分肝移植への挑戦と克服

研究課題名（英文）CHALLENGE TO OVERCOME LIVING DONOR LIVER TRANSPLANTATION USING SMALL-FOR-SIZE GRAFT

研究代表者

伊佐地 秀司（ISAJI SHUJI）

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70176121

研究成果の概要（和文）：ラット過少グラフト移植モデルにおいて、保存液に活性型プロテインCを添加すると肝細胞保護作用があり移植後の肝虚血再灌流障害を軽減することが明らかにされた。さらに脾摘は過小グラフト肝の肝障害を軽減させ、その機序として脾臓からの炎症細胞の migration の抑制が示唆された。臨床的には過小グラフトを克服するには門脈圧のコントロールが重要で、術前に脾臓容積とグラフト重量を計測することで脾摘の効果が予測できることが判明した。

研究成果の概要（英文）： Small-for-size liver grafts are a serious obstacle for partial orthotopic liver transplantation. The results using a rat model suggest that a preservation solution containing APC is a potential novel and safe product for small-for-size liver transplantation, alleviating graft injury via anti-inflammatory and antiapoptotic effects and vasorelaxing conditions. Additionally, splenectomy before transplantation inhibited leukocyte infiltrations and pro-inflammatory cytokine synthesis which leads to hepatocellular apoptosis and impaired liver regeneration. Clinically, control of portal venous pressure immediately after living donor liver transplantation using small-for-size liver graft is very important, and preoperative assessment of the recipient's spleen volume and graft volume is very helpful to determine the necessity of splenectomy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

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：生体肝移植、過小グラフト、脾臓、脾摘、肝再生、肝類洞内皮、門脈圧、炎症性サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

生体肝移植術は従来の外科的治療では救命し得なかった末期肝疾患や根治不能な肝疾患に対する唯一の有効な治療法として確

立されている。生体肝移植では、ドナーの安全を最優先することが最も重要であり、成人間の移植では右葉グラフトより左葉グラフトが選択されることが、最近では増えている。

当科でも 2006 年以前は右葉グラフトの占める割合は 70%に及んでいたが、2008 年以降は 30-40%に減少し、左葉グラフトが主流となっている。これにより、グラフト重量が少なくなり、グラフト重量/レシピエント体重比 (GRWR)0.8%以下の過少グラフト症例が増加し、その対策が急務となっている。

過小グラフト肝部分移植では高率にグラフト不全や術後合併症が発生するだけでなく、急性拒絶反応をも高率に発生させると報告されている。その大きな要因としては移植の際の虚血再灌流障害に加えて、過小グラフト移植後の過剰な門脈圧による障害 (shear stress) が原因となり肝再生を障害しているものと考えられる。

われわれ 2008 年に活性型プロテイン C (以 APC) がラット虚血再灌流モデルにおいて細胞接着因子 (P-selection, ICAM-1) の発現を抑制し、白血球の活性化を抑えることにより肝微小循環が改善され、またアポトーシスをも抑制していることを報告した (Kuriyama N, et al *Liver Int.*2008)。そこで、より高濃度で過少グラフト肝内に APC を行き渡らせる目的で、還流液および保存液に APC を添加し、その保存液を用いてグラフト肝の血液を flush し、肝臓全体に APC 入り保存液を浸透させる方法を提案した。実際に 20%ラット過少グラフトモデルを用いて APC を添加した新規保存液でグラフト肝を還流保存したところ予後の有意な改善を認め、門脈圧の低下、微小循環障害の改善肝細胞保護効果と肝再生促進効果を新規保存液が有することが確認できた。

一方、脾摘に関しても、われわれは肝移植時に門脈圧が高値な症例には積極的に脾摘を行っており、生体肝移植術における門脈圧と血中肝細胞増殖因子や血管内皮細胞増殖因子などの再生因子の関係について検討し、門脈圧と肝再生の関連を報告した (Yagi S, et al. *Liver Transpl* 2005)。またわれわれはラット過少グラフトモデルを用いた実験においても脾摘を併施することで移植後の生存率や肝障害が有意に改善することが確認できた。特に脾摘を肝移植と併施する上で注目すべきところは、コントロール群において、移植後グラフト肝にはただちに炎症性細胞が集積するが、逆に脾臓において炎症性細胞数は移植後減少し、徐々に回復すること、脾摘群 (脾摘後に肝全摘移植を行う) では移植直後の炎症細胞集積が軽減されることを突き止めており、脾臓からグラフト肝への炎症細胞の migration が示唆された。われわれが知る限り、このような現象の報告は今までになく、非常に興味深いものであった。

## 2. 研究の目的

本研究は通常では適応外となる過小グラ

フト肝を用いた移植の克服と適応拡大にむけて、未だ解明されていない過少グラフト移植後の虚血再灌流障害や過剰門脈圧による類洞内皮障害などの基礎的な問題を解決し、ラット過少グラフト移植モデルにおいてわれわれが開発した APC を添加した新規保存液や脾臓摘出 (脾摘) 手技を用い、いかにしてこれらの障害を軽減するかを目的としている。最終的にはこれらの保存液や手技を臨床応用へと展開するための研究基盤を確立することが目標である。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット過小グラフト移植モデル

20%過少グラフト移植のみのコントロール群、保存液内に APC を添加する過少グラフト+APC 群、20%過少グラフト移植に脾摘を併施する過少グラフト+脾摘群の 3 群を作成。

コントロール群ではドナーラットより 20%グラフトを摘出し、その後、実際の臨床現場と同様に HTK solution にて還流、冷保存した。保存時間は 6 時間とし、ラット 20%部分肝移植は Kamada 法を参考として施行し、胆汁は体外に誘導した。移植後経時的に採血、胆汁排出量を測定。その後開腹し、肝血流動態を解析後、肝組織を採取した。APC は過少グラフト+APC 群の HTK solution 内に 100nM の濃度で添加した。一方、脾摘はレシピエントの肝全摘を施行する前に行った。

各グループにおいて抗炎症作用、抗アポトーシス作用、抗肝微小循環障害作用、肝再生作用の 4 点を中心に、経時的 (2h, 4h, 24h) に採取した血漿、肝組織を用いて行った。肝組織からは total RNA を回収し、各種因子の遺伝子発現動態を Real-time PCR 法を用いて検討した。また血漿中や肝組織中の各種因子の蛋白発現を ELISA 法、Western blotting 法、免疫染色法を用い活性化動態を検討した。また Laser-Doppler flowmeter を用いて肝微小循環の血流を経時的に測定した。7 日間の生存率については Kaplan-Meier log-rank analysis を用いて比較した。

### (2) ラット虚血再灌流モデル

肝虚血再灌流 (IRI) の発生機序における脾臓の新しい役割を明らかにするためにラット 70%肝虚血再灌流モデルを用いて、IRI のみと IRI 施行前に脾摘を行った脾摘群で比較検討した。

### (3) 過小グラフト生体肝移植例での検討

臨床例で 70 例の成人間生体肝移植症例を対象に術前の脾臓容積とグラフト再灌流後の門脈圧との関係を、A 群: 過小グラフト (GRWR0.8 未満) 16 例と、B 群: 非過小グラフト群 (GRWR0.8 以上) 54 例に分けて検討した。なお、脾摘は再灌流後の門脈圧が 20mmHg 以上で行った。

## 4. 研究成果

### (1) ラット過小グラフト移植モデル

保存的に APC を添加することが過小グラフト肝の細胞保護効果があることは以下の結果から証明された。すなわち、7 日間生存率がコントロール群に比べて有意に改善されたこと、移植後の門脈圧の低下と肝微小循環障害が軽減され、肝虚血再灌流障害が軽減されたこと、肝組織における好中球、単球などの炎症細胞浸潤が軽減され、肝組織中の TNF $\alpha$ 、IL-6 の発現が有意に低下したこと、血清中ヒアルロン酸値が有意に低下、肝組織中 NO 産生の低下、肝細胞アポトーシスが有意に軽減されたことである。以上より、過小グラフトの保存液に APC を添加することは、肝細胞保護作用があり移植後の肝虚血再灌流障害を軽減することが明らかにされた (Liver Transpl, 2010)。

脾摘群では、コントロール群に比べて 7 日生存率が有意に改善 (50% から 100%) し、肝障害の軽減、肝組織における好炎症細胞浸潤の軽減、肝組織中の TNF $\alpha$ 、IL-6 の発現が有意に低下し、さらに肝細胞アポトーシスが有意に軽減された。以上より、脾摘は過小グラフト肝の肝障害を軽減させることが明らかにされたが、その機序のひとつとして、脾臓からの炎症細胞の migration の抑制とサイトカイン産生の抑制が示唆された。

### (2) ラット虚血再灌流モデル

IRI 前に脾摘 (SPN) を施行した SPN+IRI 群では脾摘を行わない IRI alone 群に比し肝機能や組織所見において有意に改善されていた。障害肝へ浸潤細胞は免疫染色でマクロファージのみが優位に抑制されていた。さらに SPN+IRI 群の肝組織において Th-2 系抗炎症性サイトカインマーカーである IL-10 の mRNA が IRI alone 群に比し著増しており、また門脈中の IL-10 濃度も上昇していた。一方、IRI alone 群では、Th1 系サイトカインでマクロファージ活性化因子である IL-2 の門脈中濃度が著増し、脾臓で IL-2 の mRNA の発現が亢進していた。以上より、肝臓が虚血され再度灌流されると脾臓が Th1 優位の免疫応答し、肝臓におけるマクロファージを活性化し臓器障害を引き起こしていた。一方、虚血前に脾摘術を行うことによりこの Th1 誘導免疫応答が脾臓で引き起こされず結果として肝臓内は Th2 優位となりマクロファージの活性化が抑制され、臓器障害が軽減されると考えられた。

### (3) 過小グラフト生体肝移植例での検討

20mmHg 以上の高門脈は A 群 (過小グラフト) 43.7%、B 群 (非過小グラフト) 20.4% にみられ、脾摘により両群とも門脈圧は 20mmHg 以下に低下した。その結果、過小グラフト症候群の発生頻度は A 群 12.5%、B 群 9.6% と差はなかった。再灌流後の門脈圧は、脾臓容積と有意の正の相関を示し、グラフト重量とは有

意の負の相関を示した。門脈圧が 20mmHg 以上となるカットオフは脾臓容積 500 cm<sup>3</sup>、グラフト重量 575g で、特にグラフト重量/脾臓容積比 1.6 以下が門脈圧上昇に寄与することが判明した。以上より、過小グラフト症候群を克服するには門脈圧のコントロールが重要であるが、術前に脾臓容積とグラフト重量を把握し、その比を求めることにより、脾摘の効果が予測できることが判明した。

### 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 10 件)

- ① Okanami Y, Tsujimura K, Mizuno S, Tabata M, Isaji S, Akatsuka Y, Kuzushima K, Takahashi T, Uemoto S. Intracellular interferon- $\gamma$  staining analysis of donor-specific T-cell responses in liver transplant recipients. Transplant Proc. 2012 Mar;44(2):548-54. (査読有り)
- ② Mizuno S, Murata Y, Kuriyama N, Ohsawa I, Kishiwada M, Hamada T, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Isaji S. Living donor liver transplantation for the patients with portal vein thrombosis: use of an interpositional venous graft passed posteriorly to the pancreatic parenchyma without using jump graft. Transplant Proc. 2012 Mar;44(2):356-9. (査読有り)
- ③ Kumamoto K, Mizuno S, Kuriyama N, Ohsawa I, Kishiwada M, Hamada T, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Isaji S. Postoperative liver dysfunction in living donors after left-sided graft hepatectomy: portal venous occlusion of the medial segment after lateral segmentectomy and hepatic venous congestion after left lobe hepatectomy. Transplant Proc. 2012 Mar;44(2):332-7. (査読有り)
- ④ Tanemura A, Mizuno S, Wada H, Yamada T, Nobori T, Isaji S. Donor age affects liver regeneration during early period in the graft liver and late period in the remnant liver after living donor liver transplantation. World J Surg. 2012 May;36(5):1102-11. (査読有り)
- ⑤ Usui M, Kato H, Kuriyama N, Azumi Y, Kishiwada M, Mizuno S, Sakurai H, Tabata M, Hayashi T, Suzuki K, Isaji S. Effect of a prostaglandin I(2) analog on the expression of thrombomodulin in liver and spleen

endothelial cells after an extensive hepatectomy. Surg Today. 2011 Feb;41(2):230-6. (査読有り)

- ⑥ Mizuno S, Yokoi H, Shiraki K, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Sugimoto K, Takei Y, Yamakado K, Takeda K, Uemoto S, Isaji S. Prospective study on the outcome of patients with hepatocellular carcinoma registered for living donor liver transplantation: how long can they wait? Transplantation. 2010 Mar 27;89(6):650-4. (査読有り)
- ⑦ Kuriyama N, Isaji S, Hamada T, Kishiwada M, Ohsawa I, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Hayashi T, Suzuki K. The cytoprotective effects of addition of activated protein C into preservation solution on small-for-size grafts in rats. Transplantation. 2010 Mar 27;89(6):650-4. (査読有り)

[学会発表] (計 25 件)

- ① 水野修吾, 村田泰洋, 熊本幸司, 栗山直久, 大澤一郎, 岸和田昌之, 濱田賢司, 臼井正信, 櫻井洋至, 田端正己, 伊佐地秀司: 移植後胆道狭窄に対する治療の長期成績 胆管胆管吻合を施行した生体肝移植症例における術後胆道合併症の検討. 日本移植学会 2011 年 10 月 5 日, 仙台
- ② 堯天一亨, 水野修吾, 信岡祐, 栗山直久, 大澤一郎, 岸和田昌之, 濱田賢司, 臼井正信, 櫻井洋至, 田端正己, 伊佐地秀司: 生体肝移植術後の門脈圧上昇には術前脾容量が関与する. 日本移植学会 2011 年 10 月 5 日, 仙台
- ③ 信岡祐, 水野修吾, 和田秀夫, 大澤一郎, 岸和田昌之, 濱田賢司, 臼井正信, 櫻井洋至, 田端正己, 伊佐地秀司: 生体肝移植術後血小板値はなぜ低下するのか? ADAMTS13 の変動から見たグラフト肝微小循環障害と予後の観点から. 日本肝胆膵外科学会 2011 年 6 月 9 日, 東京
- ④ 水野修吾, 服部可奈, 濱田賢司, 大澤一郎, 岸和田昌之, 臼井正信, 櫻井洋至, 田端正己, 伊佐地秀司: 生体肝移植術後免疫抑制療法における CD4 陽性リンパ球 ATP 活性の有用性 特に CYP3A5 遺伝子多型との関連性について. 日本移植学会 2010 年 10 月 21 日, 京都
- ⑤ 加藤宏之, 濱田賢司, 村田泰洋, 信岡祐, 安積良紀, 岸和田昌之, 水野修吾, 臼井正信, 櫻井洋至, 田端正己, 伊佐地秀司: 脾臓は肝虚血再灌流障害後の免疫反応を調節する 脾臓の新しい機能と肝臓外科における摘脾術の意義の再考. 日本

肝胆膵外科学会 2010 年 5 月 27 日, 仙台

[その他]

ホームページ等

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/hbpt/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊佐地 秀司 (ISAJI SHUJI)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 70176121

### (2) 研究分担者

田端 正己 (TABATA MASAMI)

三重大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 90291418