

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22791247

研究課題名(和文) 脂肪肝による肝移植への挑戦 - 虚血再還流障害から移植を炎症と凝固を礎として

研究課題名(英文) The challenge to the liver transplantation by a fatty liver.- Treatment strategy for inflammation and coagulation by ischemia reperfusion injury.

研究代表者

岸和田 昌之 (KISHIWADA, MASASHI)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40501961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 肝左葉グラフトを想定したラット肝虚血再還流実験モデルにて、組み換えヒト可溶性トロンボモジュリン(rhsTM)の肝保護効果について検討した。rhsTM群にて、肝障害を示す血中肝酵素、肝組織にて炎症細胞浸潤を示すED-1免疫染色、アポトーシスを示すTUNEL染色、肝再生率を示すPCNA免疫染色にて対照群と比較して効果を認めた。

(2) ヒト生体肝移植例における凝固・抗凝固因子が周術期での変化と予後を検討した。脾臓摘出の有無にかかわらず、手術後の血小板低値(10万以下)が継続は予後不良因子であった。類洞内皮細胞障害によるADAMTS13の減少と肝細胞傷害による低TPOの関与もした。

研究成果の概要(英文)：1) In the rat liver ischemia reperfusion model, the hepatic protection effect of recombination human soluble thrombomodulin (rhsTM) was examined. In the rhsTM group, liver enzymes, serum, ED-1, TUNEL, and PCNA immunostaining reveal effect of rhsTM administration.

2) We examined coagulation and anti-coagulation factor in living donor liver transplantation patient. The blood platelet low value (100,000 or less) of continuation was a prognostic factor after liver transplantation. To determine risk factors associated with prolonged thrombocytopenia following LDLT, with a focus on the activity of ADAMTS13 (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motifs member 13) and the influence of splenectomy. Prolonged thrombocytopenia after LDLT was associated with not only a decrease in ADAMTS13 due to sinusoidal endothelial cell injury, but also low TPO production due to hepatocyte dysfunction, irrespective of history of splenectomy.

研究分野：肝胆膵外科

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：凝固・抗凝固因子 肝虚血再環流障害 生体肝移植 マージナルドナー ADAMTS13 TPO 血小板 可溶性トロンボモジュリン(rhsTM)

1. 研究開始当初の背景

日本だけでなく世界中で移植手術を上回る肝移植待機患者が発生しており、2008年5月の国際移植学会でも脳死肝移植の慢性的不足は問題となり、各国がそれぞれ「自給自足」にて移植を行い、ドナー拡大に向け生体肝移植を推進していた。日本においては、9割以上が生体肝移植であるが、ドナー条件として夫婦もしくは4親等以内程度とされるため血再還流障害と炎症・凝固の機序に関しては未だに明らかではなく、その関連の解明や治療法の開発が急務である。

岸和田(報告者)はプロテインC制御系分野の研究において、凝固と炎症、肝切除、虚血再還流障害についての研究活動に従事してきた。研究内容としては、各モデルラットにて、肝細胞と類洞内皮細胞を単離培養することにより、抗凝固因子であるプロテインS(PS)やC4BPの発現レベルの変化を報告し、個々の細胞レベルでの炎症と凝固の機序について解明してきた。

さらに、最近では病態の解明とともに治療法の開発も探求しており、世界中の研究者により、抗血栓作用の他に、抗炎症作用、抗アポトーシス作用、傷害時の血管新生作用のあることが報告されているPC制御系の中心因子である活性化プロテインC(APC)を虚血再還流モデルラットおよび肝移植モデルに使用し、肝障害の軽減とともに生存率の上昇につながることも報告してきた。

2. 研究の目的

正常肝および脂肪肝における虚血再還流障害についても、細胞単離レベルでの研究と凝固と炎症に関する知見をもとにすすめていけば、ドナー適応の拡大と、加えて境界域のドナー脂肪肝の安全な肝移植が可能となり、多くの移植機会が増える道を拓くことが十分可能になると思われる。本研究では研究期間内に、脂肪肝モデルラットを用いて、虚血再還流障害・肝移植における個々の細胞を単離培養することにより、細胞レベルにて固有の生物活性(抗血栓、抗炎症、アポトーシス制御、血管新生制御作用など)の探索とその分子機構を解析する予定であった。

しかし、実際に実験を開始してみると、正常肝や硬変肝では細胞単離、細胞培養実験が行えていたが、脂肪肝モデルにおいては単離状況が安定しなかったため、モデル変更を行った。

(1)肝移植において肝虚血再還流障害は術後肝機能の回復、術後経過に影響を及ぼすため、虚血再還流障害の制御は重要な問題である。生体肝移植の左葉グラフトを想定して、ラットを用いた動物モデルにてその軽減を目的として実験を行った。抗凝固因子である、トロンボモジュリンはその抗凝固作用に加えて抗炎症作用を有するため、両面から肝保

護効果が期待されるため、その点に着目した。

(2)臨床症例において凝固・抗凝固因子が生体肝移植の周術期での変化と予後に及ぼす影響や因子を、von Willebrand factor(VWF)とその特異的切断酵素である a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motifs member 13(ADAMS13)や血小板に注目して解析を行った。

3. 研究の方法

(1)左葉グラフトを想定して、Wistarラット(12週齢)を用いて、70%肝切除を行った直後に、残肝(30%肝)への流入血行遮断を20分間行い、再還流を行った。rhsTMの効果の評価するために、手術の30分前にrhsTMを1mg/kgにて静脈投与を行い、対照群として生理食塩水を投与した。評価項目は、術後の生存率、肝障害、肝再生について両群間で比較検討した。

(2)生体肝移植を行った臨床例の血液サンプルの採血を行って、血小板値、VWFとADAMS13に注目して、生体肝移植の周術期での変化と予後を解析した。生体肝移植術後の14日目の値に注目して解析を行った。生体肝移植後の14日目の血小板の値が10万/ μ L以上(HP群)と10万未満(LP群)の二群に分類した。血漿中のADAMTS13活性とVWFの値は65人の患者にて測定した。

4. 研究成果

(1)術後7日目の生存率には両群間には有意差を認めなかったが、rhsTM投与群において、血清トランスアミナーゼの値は、術後6時間で差が顕著であり、12・24時間後もいずれも対照群に比較して有意に低値であった。術後6時間の肝組織におけるED-1免疫染色では、ED-1陽性細胞はrhsTM投与群で有意に少なく、肝へのマクロファージおよび単球浸潤の減少が示唆された。24時間後の肝組織におけるTUNEL assayではrhsTM投与群にてTUNEL陽性細胞は有意に少なく、apoptosisを軽減させた。肝再生率を術後7日目の摘出肝重量から測定するも両群間で差を認めなかったが、術12時間後の肝組織のPCNA免疫染色では、rhsTM投与群で分裂周期を示すPCNA陽性肝細胞数を多く認めた。これらのことより、rhsTMは肝切除後、虚血再還流障害において肝細胞保護作用、抗炎症作用を有し、肝再生を促す可能性が示唆された。

(2)ヒト生体肝移植症例において、術後6ヵ月後の生存率はLP群(n=36)は61.1%とHP群(n=62)の93.5%に比較して有意に不良であった。ADAMTS13活性は、LP group(n=23)と比較してHP群(n=42)にて

低値であった。VWF/ADAMTS13 の比をとると、LP 群が HP 群より有意に高値であった。術後 14 日目の血小板の値が術前の AT 値と術後 14 日目の ADAMTS13 の独立因子となった。術後 14 日目の TPO 値は HP 群に比較して LP 群で有意に高値であったが、LP 群の 28 日目では血小板値が低値にも関わらず、有意に減少していた。LP 群における血小板値と ADAMTS13 活性は術後 28 日目まで低値であった。

以上のことより、生体肝移植後に血小板低値が継続することは、類洞内皮細胞障害による ADAMTS13 の減少だけでなく、肝細胞傷害による低 TPO によるものも関与することが示唆された。

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 2 件)

1. Tanemura A, Kuriyama N, Azumi Y, Ohsawa I, Kishiwada M, Mizuno S, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Isaji S. Thrombomodulin administration attenuates ischemia-reperfusion injury of the remnant liver after 70% hepatectomy in rats: simulated model of small-for-size graft in living donor liver transplantation. *Transplant Proc.*; 46:1107-1111. 2014. (査読有り)

2. Nobuoka Y, Wada H, Mizuno S, Kishiwada M, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Kobayashi T, Nobori T, Uemoto S, Isaji S. Prolonged thrombocytopenia after living donor liver transplantation is a strong prognostic predictor irrespective of history of splenectomy: the significance of ADAMTS13 and graft function. *Int J Hematol.* 99 :418-428. 2014. (査読有り)

[学会発表](計 5 件)

1. Tanemura A, Kuriyama N, Azumi Y, Ohsawa I, Kishiwada M, Mizuno S, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Isaji S. Thrombomodulin administration attenuates ischemia-reperfusion injury of the remnant liver after 70% hepatectomy in rats: simulated model of small-for-size graft in living donor liver transplantation. (第 13 回アジア移植学会議、2013 年 9 月 4 日、京都)

2. 高橋直樹、臼井 正信、種村 彰洋、栗山直久、水野 修吾、安積良紀、岸和田 昌之、大澤 一郎、櫻井 洋至、田端 正己、伊佐地 秀司、和田英夫、吉田利通
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生体肝移植における予後予測—ADAMTS13、VWFpp、TM、Tenascin-C に着目して、微小循環障害と予後の観点から

(第 31 回 日本肝移植研究会 2013 年 7 月 4 日、熊本)

3. Takahashi N, Wada H, Usui M, Iizawa Y, Sato R, Fujii T, Tanemura A, Kuriyama N, Azumi Y, Osawa I, Kishiwada M, Mizuno S, Sakurai H, Tabata M, Isaji S. Behavior of ADAMTS13 and Von Willebrand factor levels in patients after living donor liver transplantation (American transplant congress 2013 年 5 月 20 日、シアトル、アメリカ)

4. 種村 彰洋、栗山 直久、安積 良紀、大澤 一郎、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。生体肝移植を想定した、ラット肝切除後残存肝虚血再還流障害におけるトロンボモジュリンの肝保護効果について(第 113 回日本外科学会、2013 年 3 月 5 日、福岡)

5. 種村 彰洋、水野 修吾、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。生体肝移植において高齢ドナー肝がドナー、レシピエントに与える影響 ~ 術後肝再生、ADAMTS13 の推移 ~ (第 67 回日本消化器外科学会集会 2012 年 7 月 18 日、富山)

6. 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" (第 23 回日本肝胆膵外科学会 2011 年 6 月 9 日、東京)。

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸和田 昌之 (KISHIWADA, Masashi)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40501961

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：