

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591995

研究課題名(和文)骨形成蛋白(BMP7)による新たな生体肝移植後過小グラフト対策の開発

研究課題名(英文)Development of a new treatment for small-for-size liver graft injury after living donor liver transplantation by bone morphogenetic protein (BMP)-7.

研究代表者

高屋敷 吏(TAKAYASHIKI, TSUKASA)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30456024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではラット過小グラフト(small-for-size:SFS)肝移植モデルを用いて、近年組織修復や再生への関与が明らかにされてきている骨形成蛋白bone morphogenetic protein (BMP)-7がSFS肝障害軽減作用を持つことを明らかにした。これらの結果からさらなるBMP-7の作用機序解明が生体肝移植における門脈血流modulationを用いない新規SFS対策に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed that bone morphogenetic protein (BMP)-7 has protective effect for small-for-size (SFS) liver graft injury in rat SFS liver transplantation. Our data and further elucidation of a mechanism of BMP-7 function contribute to a new treatment for small-for-size liver graft injury after living donor liver transplantation without portal inflow modulation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肝臓病学 移植・再生医療

1. 研究開始当初の背景

(1). 成人生体肝移植における過小グラフト (Small-for-size: SFS)とはグラフトがレシピエント標準肝容積の40%未満, レシピエント体重比0.8未満となることを指し, SFSにより肝細胞障害, 胆汁鬱滞さらには長期に渡るコントロール困難な腹水貯留などを引き起こす病態は SFS syndrome と定義される. SFS syndrome は入院治療の長期化から患者 QOL の低下, 医療費の増大をもたらすのみならず, 肝不全からグラフトロスにも陥ることや予後不良因子となることも明らかにされてきている生体肝移植後の最も重要な合併症の一つである.

(2). SFS syndrome 発症機序としてはグラフトに相対的に過剰な門脈血が流入にすることによる門脈圧亢進と share stress による類洞内皮障害がその主因であり, 臨床における現行対策としては脾臓摘出術, 脾動脈結紮, 門脈一下大静脈シャント形成などの門脈血流 modulation が施行されている. しかし, 門脈血流 modulation は門脈血栓症, 脾摘後重症感染症, portal-flow stealing phenomenon など重篤かつ致死性の併症が起りえることがあり, また, 門脈血流そのものは当然生体に必須であり適度な門脈 share stress は肝再生促進因子であることから, 門脈血流の必要以上の減少は肝臓における正常な肝再生を妨げる可能性もある.さらには, 末期肝硬変などで側副血行路が発達し脾腫がある症例では上記手技は必ずしも容易ではなく, 手術時間の延長や出血量の増多を引き起こし侵襲の増大を引き起こすこともある.したがって, 生体肝移植成績向上に向けた門脈血流 modulation を用いない安全かつより効果の高いSFS対策の開発が求められている.

(3).骨形成蛋白 bone morphogenetic protein (BMP)-7 は TGF- β スーパーファミリーに属し, 骨や歯牙形成に重要な因子としてすでに治療薬として研究報告されている.また, 腎臓に強発現していることも知られ, 腎の修復, 再生因子としても期待されている. BMP-7 は特発性門脈圧亢進の TGF- β 1/Smad を介した内皮間葉転換に対して antagonist として働く.また, 肝線維化抑制効果もあることから, 門脈圧亢進抑制によるSFS肝移植後肝不全に対する治療効果が期待できる.さらに BMP-7 は腎臓や骨から分泌される内因性因子として肝再生と肝機能維持に作用することから, SFS 本来の原因である肝容量不足そのものを解消し門脈還流域の増大により門脈圧低下にも作用することが期待できる.これらの BMP-7 特有の特徴から, SFS 肝障害に対して門脈圧を直接的に下げのではなく, 門脈圧上昇に抑制・調節的に働き, 門脈血流を必要以上に低下させることなく肝再生に必要な

適度な share stress を保ちながら, 肝臓における homeostasis の維持に働くことにより肝不全を改善し得るものと推測される.

2. 研究の目的

(1). BMP-7 がラット SFS 肝移植モデルにおいて SFS 肝不全抑制効果があることを門脈圧変化, 生化学データ, 肝再生, 生存率などにより明らかにする.

(2). 臨床応用に向けて肝での特異性を高めて作用増強を図るために SFS グラフト肝組織における BMP-7 およびその作用と拮抗する TGF- 1 を介した肝不全抑制機序を解明する.

(3). 生体肝移植患者の臨床検体を用いて human での BMP-7 およびそのレセプター発現測定を行い臨床応用へ向けた基礎的データを明らかにする.

3. 研究の方法

(1). Lewis (LEW) ラット (雄性, 体重 150-200g 程度) をドナーおよびレシピエントに用いて, 肝グラフトの左葉, 中葉および尾状葉を ligation technique にて切除し (グラフト容量比中央値 31.8%), 残存した右葉のみを動脈, 門脈, 下大静脈, 胆管をカフと 8-0, 10-0 縫合糸を用いて顕微鏡下にマイクロサージェリーテクニックを応用して移植することにより SFS 肝移植モデルを作成する.

(2). SFS 肝移植モデル血清中 BMP-7 を ELISA 法にて肝移植前後わたり経時的に測定する. グラフト肝組織における BMP-7 のレセプター-BMPRI (ALK3), BMPRII の発現およびその局在を免疫組織染色法にて肝移植前後で測定する.

次いで recombinant human BMP-7 (rhBMP-7) を SFS 肝移植術後に経静脈的に全身投与し, 門脈圧の測定, 血清中 AST, ALT, 総ビリルビン値の測定, 動物実験用 CT (ALOKA 社ラシータ LCT-200) による CT volumetry により, グラフト容量を肝移植後経時的に測定する. さらに肝移植後の生存率を測定する.

(3). rhBMP-7 投与群, 非投与群, control 群に対して SFS 肝移植前後に Smad1, Smad5 の転写活性を Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)法にて測定する. BMP-7 の target gene である -SMA を免疫組織染色法・Western blot 法にて測定する.

さらに, BMP-7 の antagonist である血清中 TGF- 1 を ELISA 法にて測定し, SFS グラフト肝組織における T RI (ALK5), T RII 発現を免疫組織染色法にて測定する. SFS グラフト肝組織における Smad2, Smad3 も EMSA 法にて測定する.

(4). 臨床応用に向けて生体肝移植レシピエント血清中の BMP-7 を ELISA 法により移植前後に経時的に測定し、肝移植後肝生検組織中の BMP-7 のレセプター-BMPRII (ALK3)発現を免疫組織染色法により測定する。

4. 研究成果

(1). rhBMP-7 を SFS 肝移植術後に経静脈的に全身投与すると、血清中 AST, ALT, 総ビリルビン値は有意に低下を示した。

また、SFS 肝移植後肝不全の指標である生存率においても有意差をもって改善をみることができた。

一方、動物実験用 CT による CT volumetry ではグラフト肝容量の有意な増大は認められなかった。術後の浮腫の影響などにより予想されたような画像上明らかになるような増大そのものを測定することは困難であることが明らかになった。

さらに、SFS 肝移植術後に測定した門脈圧もごく軽度の減少にとどまり、個体間の差も大きく、その有意差を示すことができなかった。

(2). 経静脈投与による結果を受けて肝組織中への投与量の増大を期待して、rhBMP-7 投与経路を経門脈的経路に変更すると、同様に血清中 AST, ALT, 総ビリルビン値は有意に低下を示し、SFS 肝移植後肝不全の指標である生存率においても有意差をもって改善をみることができた。しかし、投与経路の違いでは血清中 AST, ALT, 総ビリルビン値および生存率ともに有意差をみることがなかった。

一方、グラフト肝容量、門脈圧には SFS 肝移植前後で同様に有意差が認められず、投与経路変更による効果は認められなかった。

(3). グラフト肝組織における BMPRII (ALK3), BMPRII 発現を免疫染色法にて測定したが、発現そのものは確認できたものの SFS 肝移植前後で有意な変化は認められなかった。また、TGF- β 1 の関与の検討目的に T_{RI} (ALK5), T_{RII}, さらに -SMA の肝組織中での発現も免疫染色法で検討したが、同様に有意な変化は認められなかった。

シグナル伝達機構の解明のため SFS 肝移植前後に Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 の転写活性を EMSA 法にて測定したが、有意差を認めなかった。BMP-7 の antagonist である血清中 TGF- β 1 を ELISA 法にて測定したが、これにも有意差は認められなかった。

(4). rhBMP-7 を SFS 肝移植術後に投与することにより、経静脈による全身投与、あるいは門脈への局所投与といった投与経路に関わらず、SFS 肝障害軽減作用があるこ

とが明らかになった。

しかし、想定したような肝組織中のレセプター発現変化や antagonist の変化を捉えることはできなかった。門脈圧測定などの dynamic study や画像解析などでも有意差を認めないことから測定方法そのものの再検討に加えて、これまで明らかにされていないメカニズムの関与なども示唆された。

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1件)

Yoichi T, Takayashiki T, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Kuboki S, Okamura D, Suzuki D, Nakajima M, Miyazaki M. Protective effects of simultaneous splenectomy on small-for-size liver graft injury in rat liver transplantation. *Transpl Int*. 27, 2014, 106-113, doi: 10.1111/tri.12223. 査読あり

〔学会発表〕(計2件)

肝移植時の阻血障害肝における CXCR1 と CXCR2 発現の意義及びグラフト肝障害抑制・再生促進を目指した治療への応用 第114回日本外科学会定期学術集会 2014年4月4日 発表者：久保木知，清水宏明，大塚将之，加藤厚，吉富秀幸，古川勝規，高屋敷史，岡村大樹，鈴木大亮，酒井望，中島正之，宮崎勝 場所：国立京都国際会館（京都府・京都市）

拡大肝切除及び肝移植術後の阻血障害肝再生抑制に伴う肝不全発生機序の解明及びその対策 第112回日本外科学会定期学術集会 2012年4月13日 発表者：久保木知，木村文夫，清水宏明，吉留博之，大塚将之，加藤厚，吉富秀幸，古川勝規，竹内男，高屋敷史，鈴木大亮，中島正之，宮崎勝 場所：幕張メッセ（千葉県・千葉市）

6. 研究組織

(1)研究代表者

高屋敷 史 (TAKAYASHIKI, Tsukasa)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30456024

(2)研究分担者

1.吉富 秀幸 (YOSHITOMI, Hideyuki)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60375631

2.加藤 厚 (KATO, Atsushi)

千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：70344984

3. 清水 宏明 (SHIMIZU, Hiroaki)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：80272318

4. 宮崎 勝 (MIYAZAKI, Masaru)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：70166156