

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870570

研究課題名(和文)小児肝移植遠隔期におけるグラフト線維化の診断・治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of diagnosis and treatment for graft fibrosis long after pediatric liver transplantation

研究代表者

富田 紘史(Tomita, Hirofumi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：50464954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓病の状態を正確に知るためには、肝生検や内視鏡検査といった苦痛を伴う検査が必要である。今回我々は、肝移植を含む小児慢性肝疾患患者において、患者に負担の少ない超音波検査を用いて肝・脾硬度を測定し、肝生検や内視鏡検査の結果と対比する研究を行った。その結果、肝・脾硬度測定が肝生検における肝線維化や内視鏡検査における食道静脈瘤の予測に役立つことが分かった。

また、原因不明の肝線維化が小児肝移植後に起きることが以前から知られている。今回ドナー(肝臓を提供した人)の協力を得て研究を行い、抗ドナー抗体が肝線維化の原因の一つとなっていることを突き止めることができた。

研究成果の概要(英文)：Invasive examination such as liver biopsy and endoscopic examination is necessary for assessment of liver diseases. In the current study, we performed liver and spleen stiffness measurements using ultrasound apparatus for children with chronic liver disease including liver transplantation and we compared liver and spleen stiffness measurements with the results of liver biopsy and endoscopic examinations. As a result, we found that liver and spleen stiffness measurements were useful for predicting liver fibrosis on liver biopsy examinations and esophageal varices on endoscopic examinations.

In addition, it has been known that unexplained liver fibrosis occurs after pediatric liver transplantation. We conducted a study with the cooperation of the living donor and we could find that the anti-donor specific antibody is one of the causes of liver fibrosis after pediatric liver transplantation.

研究分野：小児外科

キーワード：小児肝移植 肝線維化 抗ドナー抗体 非侵襲的診断 ARFI 肝硬度 脾硬度 門脈圧亢進症

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児肝移植はもはや確立された治療と言っても過言ではなく、短期的には1年生存率90%、5年85%と満足される成績が得られている。しかし術後の遠隔期において血液検査が正常でも、生検組織上は原因不明の慢性肝炎や線維化などの異常をきたしている場合が多いことが明らかとなっている。この組織学的な異常には免疫学的な機序が疑われており、免疫抑制剤の投与方法を決定するために、定期的なプロトコル肝生検を行うことが推奨されている。

我々の施設において、グラフトの線維化を知るための侵襲的な針肝生検の代わりとなる非侵襲的検査として、超音波検査で組織の硬度を計測できるAcoustic radiation force impulse (ARFI)によるグラフト肝硬度の測定を、2011年から臨床研究として開始した。この臨床研究のパイロットデータとして、中等度以上のグラフト線維化の非侵襲的診断方法として有用であることを報告した(図1)。

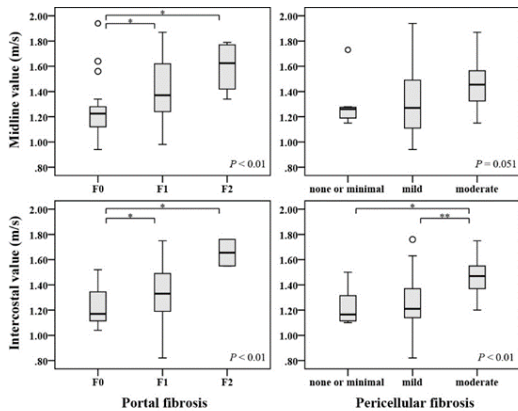


図1. ARFIによる肝硬度測定とグラフト線維化の関係
線維化の進行に伴い、肝硬度測定値は上昇している。

このように横断研究で小児肝移植後における肝硬度測定の有用性を報告したが、同一被験者内での再現性に関するデータが得られておらず、課題として残っていた。また、他の小児肝疾患における肝硬度のデータや、肝・脾硬度と門脈圧亢進症・食道静脈瘤の関連性についても、検討の余地が残っていた。

(2) 遠隔期のグラフトの線維化は、我々の検討でも80%以上の患児に見られる現象であるが、その原因は特定されていない。しかしながら近年、京都大学の移植グループから、抗ドナーHLA抗体とグラフトの線維化が関連していることが初めて報告された²⁾。

肝臓移植術後においては、特に脳死ドナーの場合は生きたドナー細胞が入手困難であることから、これまでの報告では精製HLA抗原に対する抗体を検出するLABScreen法が主に行われており、移植前に行われたドナーHLA型と照合することによって抗ドナーHLA抗体の有無が判定されている(仮想クロスマッチ)。しかし仮想クロスマッチには、HLA型

判定が不完全なことによる検査の偽陰性、すなわち抗ドナー抗体の見落としが懸念される。我々は小児生体部分肝移植においては移植後長期間経過後でもドナー細胞が比較的容易に入手可能であることに着目し、抗HLA抗体のドナー特異性をドナーのリンパ球を抗原に用いたクロスマッチ検査(実際のクロスマッチ)によって確認する研究計画を立案した。

2. 研究の目的

(1) 小児肝疾患において、侵襲的な肝生検や消化管内視鏡検査の代替として非侵襲的なARFIによる肝・脾硬度測定の有用性を確立する。

(2) 抗HLAドナー特異的抗体(DSA)をドナーリンパ球とのクロスマッチ(実際のクロスマッチ)を用いてより正確に評価し、小児肝移植後の肝線維化との関連を明らかとする。

3. 研究の方法

(1) 慶應義塾大学医学部小児外科において慢性肝疾患のために診療を行っている患者のうち同意が得られた者を対象として、ARFIを搭載した超音波診断装置(Siemens ACUSON S2000)を用い、肝脾硬度を測定した。肝は右肋間・正中、脾は左肋間からそれぞれにおいて5回硬度を測定し、中央値を採用した。肝・脾硬度の測定結果は、同時期に行なわれた肝生検や上部消化管内視鏡、CTなどの他の検査結果と対比した。

具体的には、小児肝移植後の脾硬度測定結果を門脈・肝静脈狭窄の有無で分けて集計し、脾硬度測定が門脈圧亢進症の指標となり得るかを検討した。また、進行性の肝線維化・門脈圧亢進症を呈することが多い胆道閉鎖症患者において、肝・脾硬度測定による肝線維化・食道静脈瘤の予測診断能を検討した。小児肝移植後の患者においては、肝硬度とグラフト線維化が関連することは既にパイロットデータとして報告済みであり(図1)、同一患者において3年連続で測定した肝硬度を分析して経時的評価としての有用性を検討した。

(2) 小児生体部分肝移植後1年以上経過し、ドナーの協力とプロトコル肝生検の結果が得られる患者を対象として横断研究を行った。抗HLA抗体をFlowPRA法によって検索し、ドナーリンパ球に対する反応性の有無をフローサイトメトリッククロスマッチ(FCXM)によって評価して抗HLA DSAの有無を決定した。抗HLA DSAの有無とプロトコル肝生検における肝線維化の程度を集計し、それらの関連性を検討した。

4. 研究成果

(1) 小児生体部分肝移植後患者62名において脾硬度測定結果と門脈・肝静脈狭窄の有無を検討可能であった。門脈狭窄は3名、肝静脈狭窄は2名に認め、脾硬度測定結果は門脈・

肝静脈狭窄がない患者で中央値2.70m/sであったのに対し、門脈・肝静脈狭窄を認めた患者では4.00m/sと有意に高値を示した(P<0.001、図2)。脾硬度測定の間脈・肝静脈狭窄の診断能は非常に高く、AUROC=0.94、カットオフ値2.93m/s、感度100%、特異度78.9%であった。以上から、脾硬度測定は小児生体部分肝移植後の静脈系合併症を反映する定量的指標として有用である可能性が示唆された。

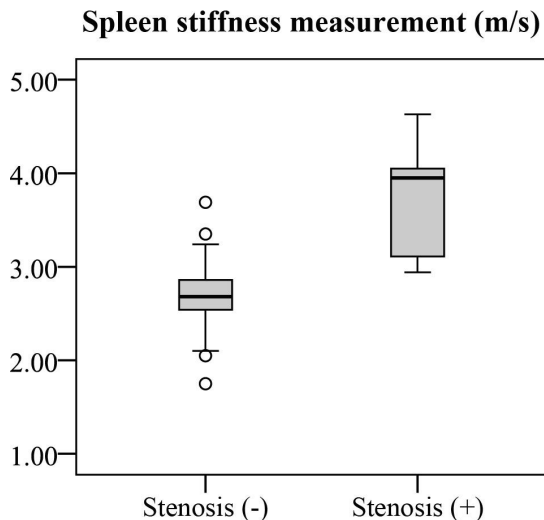


図2. ARFIによる脾硬度測定と門脈・肝静脈狭窄の関係
門脈・肝静脈狭窄による門脈圧亢進症に伴い、脾硬度測定値は上昇している。

一方、胆道閉鎖症患者においては、肝・脾硬度測定結果と肝組織上の線維化との関連を22名で、消化管内視鏡検査上のハイリスク食道静脈瘤の有無との関連を16名の患者で検討した(図3)。肝硬度測定の間脈線維化診断に対するAUROCは、F2で0.83、F3で0.93、F4で0.94であり、特に進行した肝線維化の予測診断能に優れていることが示された。ハイリスク食道静脈瘤の診断には肝硬度と脾硬度を合算した指標が最も鋭敏で、

AUROC=0.92、カットオフ値5.13m/s、感度100%、特異度84.6%であった。これらの良好な診断能から、肝脾硬度測定をスクリーニング検査として用いることで、肝生検や消化管内視鏡検査といった侵襲的で特に小児患者においては手間やコストが大きな検査を減らすことは十分可能と考えられた。

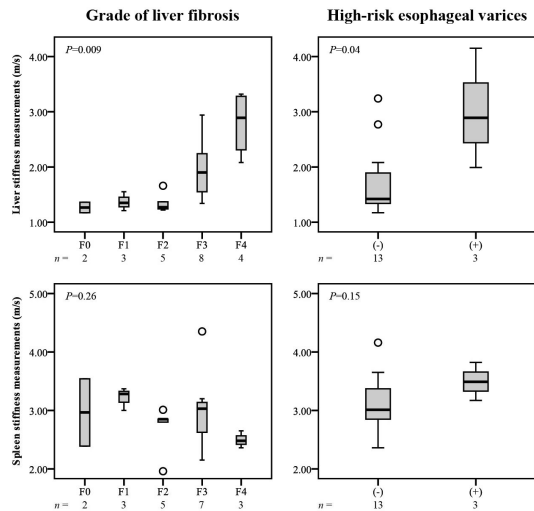


図3. 胆道閉鎖症患者における肝・脾硬度測定と肝線維化・食道静脈瘤

小児肝移植後の経時的な肝硬度の変化は、43名の患者で3年間の結果を観察し得た。複数年の肝生検における肝線維化の変化により患者を不変(線維化なし)、不変(線維化あり)、増悪、改善の群に分け、肝硬度の経時的な推移を検討した(図4)。各群において一貫した傾向は認めず、同一患者における経時的な肝硬度測定は肝線維化の微細な変化を捉えきくことは現時点で困難であると結論付けた。経時的な観察が難しいことは今回参照パラメーターとした肝生検の結果にも言えることであり、線維化の原因へのアプローチも含めた他の指標を引き続き探索し続ける必要があると考えられた。

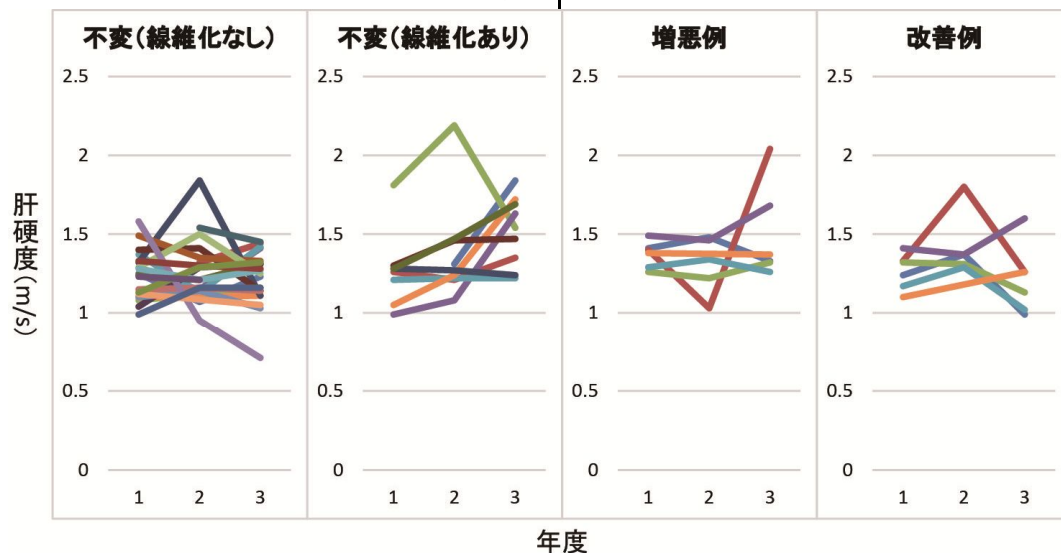


図4. 肝移植後患者における肝線維化変化別の、肝硬度測定値の経時的推移
線維化が不変・増悪・改善の各群において一貫した傾向は認められなかった。

(2)小児生体部分肝移植後の患者 47 名を対象として検討を行った。抗 HLA クラス I およびクラス II 抗体は、それぞれ 16 名 (34.0%) および 31 名 (66.0%) の患者で検出された。FCXM によりドナー T 細胞もしくは B 細胞への反応性が確認され、抗 HLA クラス I DSA が 14 名 (29.8%)、抗 HLA クラス II DSA が 28 名 (59.6%) で陽性と判定された。

このように小児生体部分肝移植後に抗 HLA 抗体を有する患者の約 90% が、実際のクロスマッチ検査によって DSA を有することが確認された。これまでいくつか報告されている仮想クロスマッチを用いたデータのいずれよりも高い値となっており、本研究ではより正確に DSA を検出できたものと考えられた。

肝線維化との関連については、抗 HLA クラス II DSA 陽性患者では中等度以上の肝細胞周囲性線維化が有意に多く認められ (P=0.04、図 5)、移植時年齢が有意に低かった (P=0.03)。抗 HLA クラス I DSA や門脈域線維化に関しては、有意な関連性が認められなかった。以上から、抗 HLA クラス II DSA は、グラフト肝における肝細胞周囲性線維化の原因の 1 つであることが示唆された。

これらの結果から、今後の小児肝移植術後のフォローアッププログラムとして、術前のドナー HLA class II 抗原型を従来よりも詳しく判定しておくこと、術後の抗 HLA class II 抗原抗体の有無を定期的にチェックしていくこと、などが移植肝の異常を早期にかつ非侵襲的に感知できる可能性があると考えられた。今後も新たな研究を立案し、検討を継続していく必要がある。

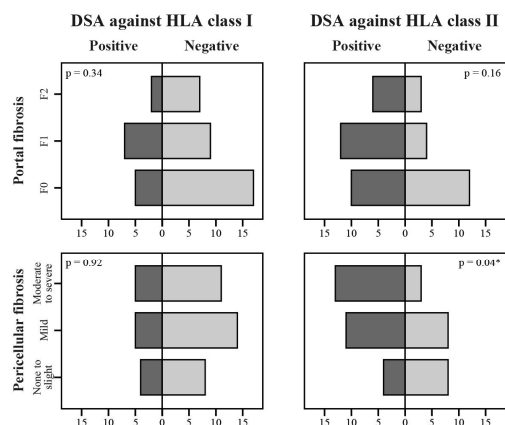


図5. 抗HLAドナー特異的抗体と肝線維化との関連性
抗HLA class II DSAと肝細胞周囲性線維化との間にも、有意な関連を認める (右下のパネル)。

< 引用文献 >

- Tomita H, Hoshino K, Fuchimoto Y, Ebinuma H, Ohkuma K, Tanami Y et al. Acoustic radiation force impulse imaging for assessing graft fibrosis after pediatric living donor liver transplantation: A pilot study. *Liver Transpl* 2013;19(11):1202-1213.
- Miyagawa-Hayashino A, Yoshizawa A, Uchida Y, Egawa H, Yurugi K, Masuda S

et al. Progressive graft fibrosis and donor-specific human leukocyte antigen antibodies in pediatric late liver allografts. *Liver Transpl* 2012;18(11):1333-1342.

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)

- Tomita H, Ohkuma K, Masugi Y, Hosoe N, Hoshino K, Fuchimoto Y, Fujino A, et al. Diagnosing native liver fibrosis and esophageal varices using liver and spleen stiffness measurements in biliary atresia: a pilot study. *Pediatr Radiol* 2016;46:1409-1417. 査読あり
doi:10.1007/s00247-016-3637-4
- Tomita H, Fuchimoto Y, Ohkuma K, Hoshino K, Fujino A, Kato M, Fujimura T, et al. Spleen stiffness measurements by acoustic radiation force impulse imaging after living donor liver transplantation in children: a potential quantitative index for venous complications. *Pediatr Radiol* 2015;45:658-666. 査読あり
doi:10.1007/s00247-014-3215-6

[学会発表](計 5 件)

- 富田紘史、清水隆弘、他、小児生体部分肝移植後の抗ヒト白血球抗原ドナー特異的抗体と肝線維化との関連性、第 35 回日本肝移植研究会、2017 年 6 月 2 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
- 森禎三郎、富田紘史、他、小児肝移植後におけるグラフト線維化・肝硬度の経時的評価-3 年間での検討-、第 54 回日本小児外科学会、2017 年 5 月 13 日、仙台国際センター (宮城県仙台市)
- 清水隆弘、星野健、山田洋平、富田紘史、他、小児生体部分肝移植術後遠隔器における抗ドナー抗体とグラフト線維化の検討、第 53 回日本小児外科学会、2016 年 5 月 24 日、ヒルトン福岡シーホーク (福岡県福岡市)
- 富田紘史、星野健、他、胆道閉鎖症における肝・脾硬度測定による食道静脈瘤の予測診断能、第 41 回日本胆道閉鎖症研究会、2014 年 11 月 15 日、熊本医師会館 (熊本県熊本市)
- 富田紘史、星野健、他、胆道閉鎖症術後における自己肝線維化・門脈圧亢進症の肝脾硬度測定による非侵襲的評価、第 51 回日本小児外科学会、2014 年 5 月 9 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 紘史 (Hirofumi Tomita)
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号：50464954

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし