

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 25 年 3 月 31 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2009 ～ 2012
 課題番号： 21791279
 研究課題名 (和文) 肝移植医療における脂肪肝過小グラフトの限界と挑戦
 研究課題名 (英文) Study of using small-for-size fatty liver graft for liver transplantation
 研究代表者
 水野 修吾 (MIZUNO SHUGO)
 三重大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号： 70335131

研究成果の概要 (和文) :

脂肪肝モデルラットを用いて、部分肝移植を行い、抗血栓作用の他に、抗炎症作用、抗アポトーシス作用のある APC や TM を投与して脂肪肝過小グラフトの生着向上が証明されつつある。また、細胞レベルでの、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) の探索では、APC と TM の有用性が明らかとなりつつある。肝移植モデルのほかに、肝移植に近い肝大量切除後の虚血再還流モデルを作成し、移植モデルと同様な微小循環障害のメカニズムの解明に努めている。現段階では APC 投与群では生存率は向上し、肝類同内皮障害の軽減と肝細胞実質障害の軽減を認めるところまでは突き止めている。

研究成果の概要 (英文) :

The problems associated with small-for-size liver grafts (ie, high mortality rates, postoperative complications, and acute rejection) remain critical issues in partial orthotopic liver transplantation (OLT). In association with partial OLT, splenectomy (SP) is a procedure used to reduce the portal pressure. However, the precise effects of SP on partial OLT have been unclear. In this study, using small-for-size liver grafts in rats, we examined the cytoprotective effects of SP on OLT. Liver grafts were assigned to 2 groups: a control group (OLT alone) and an SP group (OLT after SP). SP significantly increased animal survival and decreased liver damage. SP exerted the following cytoprotective effects: (1) it improved hepatic microcirculation and prevented increases in the portal pressure after OLT, (2) it suppressed the hepatic infiltration of neutrophils and macrophages through the direct elimination of splenic inflammatory cells before OLT, (3) it decreased the hepatic expression of tumor necrosis factor α and interleukin-6, (4) it attenuated sinusoidal endothelial injury, (5) it decreased plasma endothelin 1 levels and increased hepatic heme oxygenase 1 expression, (6) it suppressed hepatocellular apoptosis through the down-regulation of hepatic caspase-3 and caspase-8 activity, and (7) it increased hepatic regeneration. In conclusion, SP for small-for-size grafts exerts dual cytoprotective effects by preventing excessive portal vein hepatic inflow and eliminating splenic inflammatory cell recruitment into the liver; this in turn inhibits hepatocellular apoptosis and improves liver regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医学

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：肝移植、脂肪肝、過小グラフト

1. 研究開始当初の背景

脳死臓器移植の盛んな欧米諸国においてもドナー不足は深刻であり、いわゆる **marginal donor** の使用が近年行われつつある。**Marginal donor** とは、高齢者ドナー・虚血時間が長い肝臓・脂肪肝 (**macrovesicular steatosis**) 等が代表的なものである。脂肪肝については、組織学的に脂肪変性の形により **microsteatosis** と **macrosteatosis** に分類され、肝移植症例においては、**macrosteatosis** 症例の肝臓は移植後にグラフト肝不全をきたすことが多いといわれている。一方、食の欧米化が進む中、本邦においても肥満人口 (**BMI>25**) は 2300 万人と全人口の 20% 以上であり、健常人においてさえ肝の脂肪化が散見される。生体肝移植が主体の我が国では、生体ドナーになることは可能であるが、軽度の脂肪肝のため、安全性を重視すると、あまり広範囲な容積のグラフトを提供できない場合や、脳死ドナーの脂肪肝症例を **split liver transplantation (SLT)** に用いる場合等、グラフトの選択は今後重要になると考えられる。このような本邦における肝移植医療事情を踏まえると、脂肪肝であり且つ容積が十分でないグラフト肝を有効利用することが出来れば、さらに多くの末期肝疾患患者の命を救うことが可能となる。すなわち、本研究の最終的なゴールは、如何に小さな脂肪肝が移植肝として有用か、また術式の工夫によりそれらの成績の向上が可能かどうかを見極め、さらに、還流液の工夫により脂肪肝過小グラフトを蘇らせることである。

脂肪肝過小グラフトには、過小グラフトによる **small-for-size graft syndrome (SFSS)** と脂肪肝グラフトによるグラフト機能不全という二つの大きな障壁が存在する。**SFSS** に対しては、申請者である水野らが、現在まで 100 例以上の生体肝移植症例を経験した三重大学肝胆膵・移植外科において、過小グラフトに対する門脈圧が、術後の肝再生に影響を

及ぼし、抹消血・門脈血中の **HGF** や **VEGF** が関与していることを明らかにし、門脈圧を調節するために、門脈・下大静脈シャントを作成することが考えられ、大動物であるブタで同じ研究グループが広範肝切除モデルでその有用性を証明した。しかし、ブタの脂肪肝モデルはごく最近になって確立されたため、ブタ脂肪肝過小グラフト肝移植モデルにおけるシャントの有用性は未だ証明されていない。また、脂肪肝においては、脂肪肝のグラフト機能不全の要因に肝虚血再還流障害が考えられているが、申請者らは、米国 **University of Florida** での研究により、**BMI 35%** 以上のドナーからの肝移植が可能であることを臨床的に証明し、実験的には肝切除後肝虚血再還流障害によって生じる類洞内皮細胞傷害と **PAF** をはじめとする各種 **メディエーター** との関連を、生理活性脂質の研究において世界的権威の一人である群馬大学医学系研究科・機能分子生化学分野・和泉 孝志教授との共同研究にて、細胞単離技術を用いて証明した(4)。その技術と業績を引き継ぐべく、肝虚血再還流障害による微少循環障害の原因の 1 つである肝類洞内微小血栓に関する研究を、同じ研究グループが報告している。すなわち、ラット硬変肝切除時には類洞内皮細胞での **プロテイン S** の産生が破綻し微少血栓が生じて微少循環障害が発生することを報告し、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、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 **プロテイン C** 制御系の中心因子である活性化 **プロテイン C (APC)** を投与することにより、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(5)。しかしながら、脂肪肝における肝移植後グラフト機能不全と炎症・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。

2. 研究の目的

早期に臨床応用可能な大動物であるブタ脂肪肝過小グラフトモデルを用いて、門脈下大静脈シャントを作成することにより、耐術可能なグラフトの限界を明らかにする。その後、将来、脂肪肝グラフトを利用可能とするブレイクスルーになりうる実験として、Zucker Rat などの脂肪肝モデルラットを用いて、部分肝移植を行い、抗血栓作用の他に、抗炎症作用、抗アポトーシス作用のある APC や TM を投与して脂肪肝過小グラフトの生着向上を実証したい。その際、肝移植後虚血再還流障害において、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し、臨床応用への布石とする。

3. 研究の方法

ラット実験「脂肪肝過小グラフト肝移植に対するブレイクスルー」

脂肪肝ラットは四塩化炭素（2 mL/kg、皮下注）によって誘導する。ラット肝移植過小グラフトモデルを作成し APC or TM を投与する肝障害、微小循環障害、アポトーシス、肝細胞及び類洞内皮細胞、Kupffer 細胞における各炎症・凝固因子などを生化学的、病理学的に評価する。

①ラット肝移植過小グラフトモデルの作製及び APC or TM の投与：ドナーラットを摘出後、肝左葉と中葉を切除して 30% グラフト肝を作成し、レシピエントラットに移植するモデルを作成する。還流液に APC or TM を加えて、再還流時には血中 APC or TM 値をピークとするように設定する。

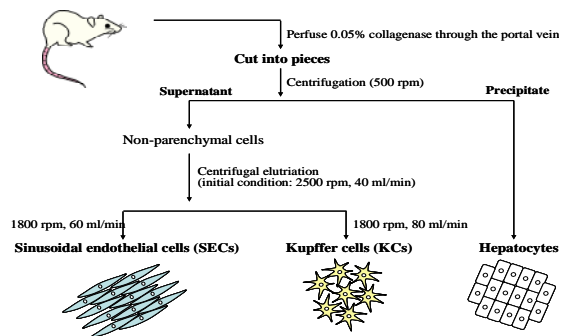
②過小グラフトによる類洞内血栓形成に対する APC or TM の保護効果の評価：APC or TM の血栓形成抑制作用は、免疫染色による類洞内フィブリン沈着、血清 FDP 濃度および肝血流をレーザードップラーを用いて測定し評価する。免疫染色により caspase-3 などの抗アポトーシス作用の評価を行う。

③過小グラフトによる肝細胞および類洞内皮細胞障害に対する APC or TM の保護効果の

評価

APC or TM の肝障害に対する保護効果は、血漿 AST 及び ALT 濃度を指標に、類洞内皮細胞障害に対する保護効果は血漿ヒアルロン酸濃度を指標に評価する。特に、APC or TM の過小グラフトからの shear stress により引き起こされる肝細胞や類洞内皮細胞障害及び炎症に対する保護効果を評価するため、虚血再還流後、肝細胞、及び類洞内皮細胞や Kupffer 細胞を、コラゲナーゼ還流法、及びそれに続きエルトリエーションロータを用いて単離し、肝細胞及び類洞内皮細胞の PS 発現量、及び Kupffer 細胞によるサイトカイン発現量を指標に評価する

Isolation and Culture of Hepatocytes, SECs and KCs of Rats



4. 研究成果

生体肝移植では、脂肪肝であり且つ容積が十分でないグラフト肝を有効利用することが出来れば、さらに多くの末期肝疾患患者の命を救うことが可能となるために、今回の研究が開始された。最近ではドナーの安全性を重視し、過去に盛んに行われた右葉グラフトよりもグラフト容積の小さな左葉グラフトを用いることが多い。また、人口の高齢化に伴い、比較的年齢の高い親族がドナーとなることも多くなってきた。高齢・過小グラフトが臨床においては直面した課題である。

当施設の臨床研究においては、高齢ドナーの肝臓は脂肪肝の割合が多いことが明らかとなり、脂肪肝グラフトの限界を解明する重要性も高まってきた。本研究の最終的なゴールは、如何に小さな脂肪肝が移植肝として有用か、また術式の工夫によりそれらの成績の向上が可能かどうかを見極め、さらに、還流液の工夫により脂肪肝過小グラフトを蘇らせ

ることである。

同時に、脂肪肝モデルラットを用いて、部分肝移植を行い、抗血栓作用の他に、抗炎症作用、抗アポトーシス作用のある APC や TM を投与して脂肪肝過小グラフトの生着向上が証明されつつある。また、細胞レベルでの、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）の探索では、APC と TM の有用性が明らかとなりつつある。肝移植モデルのほかに、肝移植に近い肝大量切除後の虚血再還流モデルを作成し、移植モデルと同様な微小循環障害のメカニズムの解明に努めている。現段階では APC 投与群では生存率は向上し、肝類同内皮障害の軽減と肝細胞実質障害の軽減を認めるところまでは突き止めている。

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. Kuriyama N, Isaji S, Kishiwada M, Ohsawa I, Hamada T, Mizuno S, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Yamada T. Dual cytoprotective effects of splenectomy for small-for-size liver transplantation in rats. *Liver Transpl.* 2012 Nov; 18 (11): 1361-70. (査読あり)
2. 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 Journal of Surgery* 2012 May;36(5):1102-11. (査読あり)

6. 研究組織

(1)研究代表者

水野 修吾 (MIZUNO SHUGO)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号： 70335131