

平成 30 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19844

研究課題名(和文)肝移植後拒絶反応における類洞血管外血小板凝集関与の解明と新規治療の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the involvement of extravasated platelets aggregation in graft function after liver transplantation

研究代表者

中沼 伸一 (Nakanuma, Shinichi)

金沢大学・附属病院・特任助教

研究者番号：00640921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝移植後早期に血小板減少の継続を認めた症例の治療成績は不良であるが、この病態の解明は不十分である。本研究では、肝移植後早期に肝生検にて得られた肝組織やラット虚血再灌流障害モデルを用いて同病態の解明に取り組んだ。血小板は主に類洞血管外血小板凝集(Extravasated platelets aggregation (EPA))の形態として認められ、同程度が強い症例ほど、血小板数やグラフト機能の低下を認めた。虚血再灌流障害モデルでは、抗血小板作用及び血管平滑筋拡張を要するPDE3阻害剤を虚血処置前に脾臓注入にて経門脈的に投与したところ、肝組織・機能障害、血小板減少および小腸障害の軽減を認めた。

研究成果の概要(英文)：There is increasing evidence that continuous thrombocytopenia soon after liver transplant (LT) is associated with a less favorable prognosis. Few pathophysiological studies have assessed post-LT thrombocytopenia. We elucidated the pathogenesis of thrombocytopenia after LT using the allograft tissue obtained after transplant and rat hepatic ischemic reperfusion injury model. Platelets were found mainly as extravasated platelet aggregates in local microenvironments. Platelet count after surgery and graft function were lower in EPA positive group than these of negative group. Pre-treatment of phosphodiesterase-3 inhibitor, milrinone by intraportal administration using splenic injection reduced hepatic ischemia-reperfusion injury minimizing small intestinal injury and platelet depletion in rats

研究分野：肝移植

キーワード：肝移植 血小板減少 虚血再灌流障害 小腸障害 Milrinone 血栓性微小血管障害 ADAMTS13 von Willebrand factor

1. 研究開始当初の背景

生体肝移植の治療成績は向上を認めるが、1年以内に10~20%の死亡例を認め、術後早期の生存率の改善が急務である。我々は、肝移植後早期に継続する血小板減少を認めた症例の治療成績は不良であることに着目した。自験例において肝移植後にグラフト機能不全に陥った症例では血小板減少を伴っており、また肝組織を用いて血小板表面抗原であるCD42bの免疫組織染色を行ったところ、血小板は主にZone3における類洞血管外に血小板凝集 (Extravasated platelets aggregation: EPA) として観察されることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、肝移植後における血小板凝集・活性化やEPAの病態、同病態の程度が移植肝に与える影響を解明することを目的として実験を開始した。

3. 研究の方法

1) 臨床病理学的研究

肝移植早期に肝生検にて得られた肝組織を用いて、CD42bの免疫組織染色を行い、血小板凝集・活性化やEPAの臨床学的意義を検討した。

(2) 動物モデルを用いた研究

肝移植後状態を各種動物実験モデルにて再現し、組織(肝、脾臓、小腸)や血液を採取し、血小板凝集・活性化やEPAの病態を評価した。

4. 研究成果

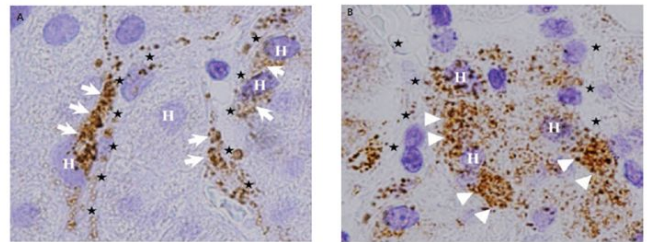
(1) EPAの臨床病理学的意義

生体肝移植後早期に肝生検により得られた20症例の肝組織において、血小板は主にEPAの形態として認められた(Fig1)。肝移植後の虚血再灌流障害、高度手術侵襲、免疫抑制剤や抗がん剤などの薬剤性障害がinitiatorとなり、類洞血管内皮障害が発症し、同内皮剥離・脱落が惹起され、血小板が類洞血管外のDisse腔に漏出して凝集・活性化し

ていると所見から考えられた。EPAは主に小葉中心静脈周囲(Zone3)に存在し、EPAの程度が強い症例ほど、GRWRが低く、術後の血小板数低下や肝機能低下を認め、1年生存率も低下することを確認した。EPAがグラフト機能不全に関与している所見と考えられ、本研究による実験的な証明の必要性を示す結果と考えられた。

Fig1

Histologic Localization of CD42b-Immunoreactivity in Local Liver Microenvironments



Abbreviations: H, hepatocyte

At higher magnification, CD42b was present as aggregates attached to hepatocytes (arrows) along the sinusoid (★) (A, × 1000), and in hepatocyte cytoplasm (arrowheads) (B, × 1000).

(2) ラット肝移植モデルを用いた研究結果

ラット肝移植拒絶モデルの作成に取り組んだ。手術手技としては遂行可能であったが、モデルの安定性の獲得および実験に十分な個体を確保することは、研究者の effort 内では困難と判断した。移植肝は拒絶のみならず虚血再灌流障害、免疫抑制剤等の薬剤性肝障害、過少グラフト症候群など様々な機序により障害を受けるため、モデルを虚血再灌流障害モデルに変更して研究を進めることとした。

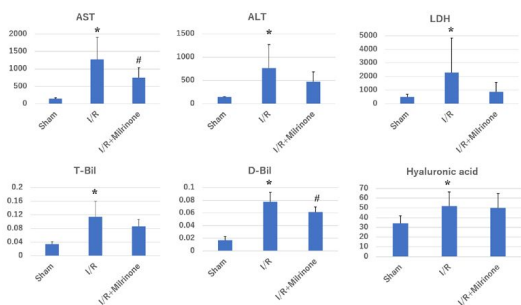
(3) ラット虚血再灌流モデルを用いた研究結果

虚血再灌流障害モデル(肝十二指腸間膜全クランプ、虚血時間30分)(I/R群)を使用し、肝臓、小腸、血液を再灌流5時間後に採取した。I/R群はSham群と比較して、血液検査にて有意な肝障害マーカー(AST、ALT、T-Bil、D-Bil、LDH、HA)の上昇を認め(Fig2)、血小板減少も認めた(Fig3)。HE染色では、I/R群の肝組織において、うっ血及び肝壊死を認め(Fig4)、小腸組織では粘膜障害及び

うっ血を認めた (Fig5)。今後、免疫組織染色にて、肝細胞や類洞内皮細胞障害及び血小板・EPA の病態を Zone 別に評価予定である。

PDEIII 阻害剤のミルリノン (Milrinone) は、血小板凝集抑制作用の他に、cAMP/PKA 活性化や NO 産生の機序による血管平滑筋拡張、血管内皮保護作用による虚血耐性を誘導し、臓器保護作用を持つことが報告されている。同剤を脾臓注入し、経門脈的に虚血処置の前に投与したところ、I/R+Milrinone 群では、血液検査にて肝障害マーカーの改善 (Fig2)、血小板増加を認め (Fig3)、HE 染色では肝組織障害及び小腸粘膜障害及びうっ血の軽減を認めた (Fig6)。今後、免疫組織染色にて肝細胞や類洞内皮細胞障害及び血小板の動態を Zone 別に評価予定である。そして虚血時間 45 分の I/R モデルの実験では、I/R+Milrinone 群において有意な生存率の改善も確認された (Fig7)。

Fig 2

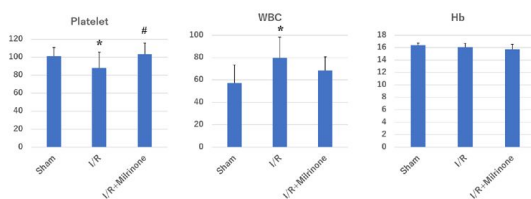


Sham : n = 13 I/R : n = 13 I/R + Milrinone : n = 13

*Significantly (P < 0.05) different from group Sham group.

#Significantly (P < 0.05) different from group I/R group.

Fig 3



Sham : n = 13 I/R : n = 13 I/R + Milrinone : n = 13

*Significantly (P < 0.05) different from group Sham group.

#Significantly (P < 0.05) different from group I/R group.

Fig 4

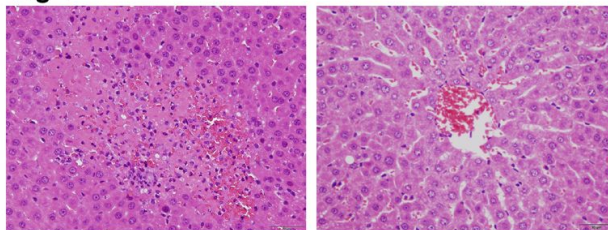


Fig 5

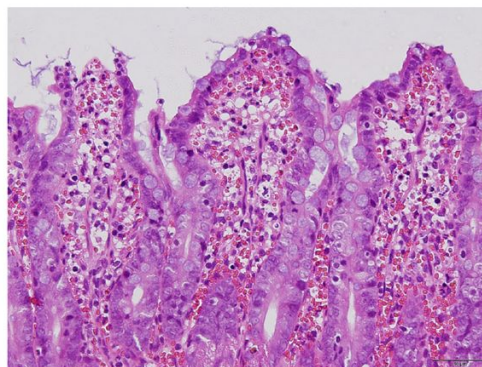
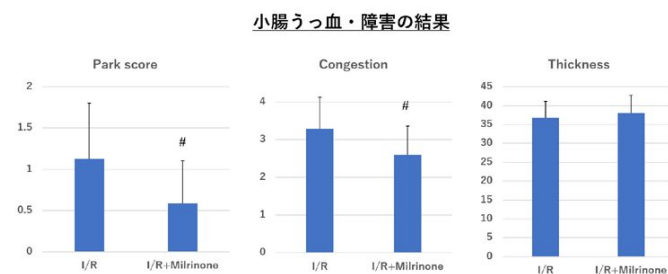


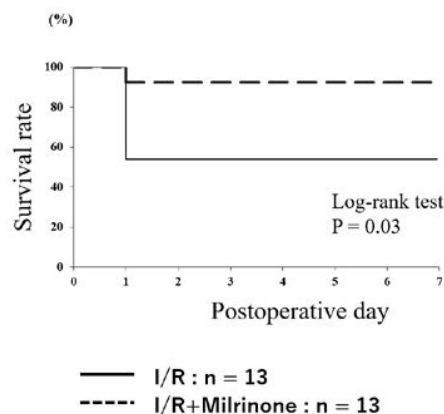
Fig 6



I/R : n = 13 I/R + Milrinone : n = 13

#Significantly (P < 0.05) different from group I/R group.

Fig 7



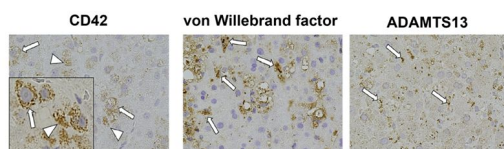
(4) 血栓性微小血管障害における EPA

血栓性微小血管障害 (Thrombotic)

microangiopathy: TMA)は、臨床では血栓性血小板減少性紫斑病(Thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP)として溶血性貧血、血小板減少、腎機能障害、発熱、精神神経障害の古典的5徴候を認め、難治性にて致死になることもある。肝移植後にもTMAが合併症として報告されているが、移植肝組織におけるTMAの病態は不明である。

血小板減少を特徴とするTMAでは、類洞内皮障害それに続くEPAが関与していると推測した。生体肝移植後にTMAを発症した症例の肝組織を用いて、免疫組織染色にてその解明を進めた。その結果、血管内皮障害により血管内皮細胞のUnusually large-von Willebrand factor von Willebrand factor (UL-vWF)の過剰産生および沈着、EPA、そしてUL-vWFの分解酵素であるADAMTS-13の消費を確認した(Fig8)。肝移植後にTMAを発症した症例では、移植肝組織においてTMA様病態が関連していることが確認された。

Fig 8



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, Nakanuma S, Miyashita T, Hayashi H, et al. Von Willebrand Factor Deposition and ADAMTS-13 Consumption in Allograft Tissue of Thrombotic Microangiopathy-like Disorder After Living Donor Liver Transplantation: A Case Report. Transplant Proc. 2017;49(7):1596-1603.

2, Nakanuma S, Miyashita T, Hayashi H, et al. Extravasated Platelet Aggregation in Liver Zone 3 Is Associated With Thrombocytopenia and Deterioration of Graft Function After

Living-Donor Liver Transplant. Exp Clin Transplant. 2015;13(6):556-62.

〔学会発表〕(計 2件)

1、中沼伸一，高村博之，他：移植肝微小環境より考えるTMAの治療戦略、第53回日本移植学会総会、2017年9月

2、中沼伸一，高村博之，他：成人生体肝移植術後早期における中心静脈周囲炎の臨床病理学的検討、第116回日本外科学会総会、2016年4月

〔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
<http://surg2.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
中沼伸一 (NAKANUMA SHINICHI)
金沢大学・附属病院・特任助教
研究者番号：00640921

(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:

(4)研究協力者

なし()