

図 15 膵臓移植後のレシピエント生存率とグラフト生着率 (～2013 年 12 月)

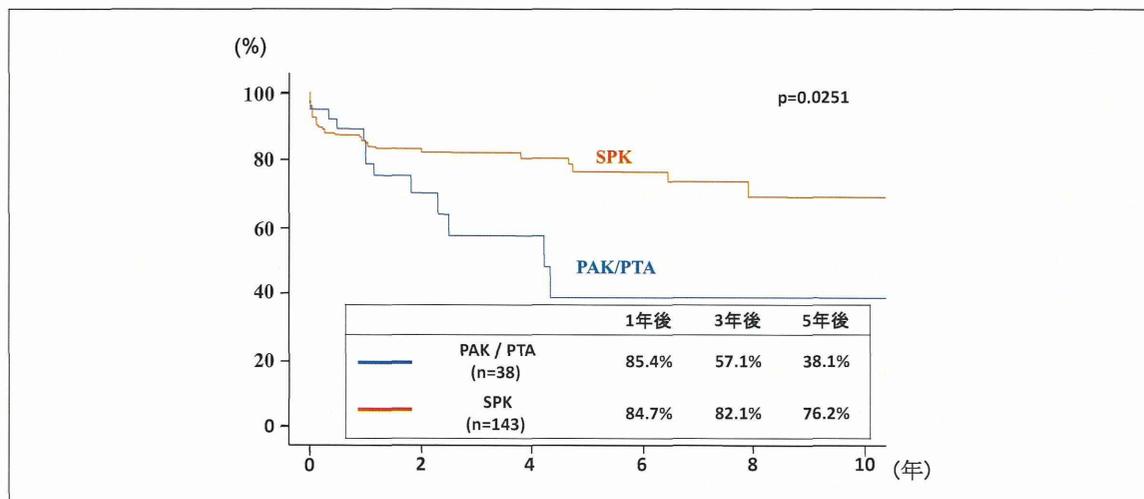


図 16 膵生着率；SPK vs PAK/PTA (～2013 年 12 月)

一方、SPK 症例の移植腎の生着については、143 症例中、1 例は急性拒絶 (POD；51 日) で摘出、non-compliance で 1 例、繰り返す尿路感染 (UTI) で 1 例、他に 6 例がおのおの、6 カ月から 7 年 10 カ月で透析再導入となった。死亡例を除き、計 9 例が機能喪失となった。なお、移植 1 年後に心原性要因で死亡した 1 例は、移植腎機能が発現しなかった PNF (primary non-function) 症例であった。その結果、1 年、3 年、5 年腎生着率はそれぞれ 91.0%、91.0%、87.1% であった。

4. 生体膵臓移植について

生体ドナーから行われた膵臓移植症例 27 例にお

ける上記関連因子について解析した。

ドナーは 21 例が両親のどちらか (母；13 例、父；8 例) からであり、4 例が兄弟から、2 例が姉妹から提供された。多くは父母からの提供であるため、ドナーの平均年齢は 55.8 (27～72) 歳と高齢であった。一方、レシピエントは男性 11 例、女性 16 例で、平均年齢は 35.6 (26～50) 歳であった。カテゴリー別では、SPK が 21 例と最も多く、ついで PTA の 5 例、PAK が 1 例であった。術式別では、脳死・心停止下とは異なり、大半が BD (22 例) であり ED は 5 例であった。免疫抑制療法は脳死・心停止下の場合と同様であった。

移植成績：1例が移植1年後、脳梗塞にて死亡した。これはPAKの1例で、移植膵は機能するも、膵移植後2カ月で移植腎の機能が増悪して透析再導入となった症例であった。SPKの4例で急性期に機能が喪失した。1例はPNFで、3例は血栓症にて移植膵を摘出しインスリン再導入となった。血栓症で摘出となった2症例に対して、後日脳死膵臓移植が行われた。また、慢性期に4例がインスリン再導入となった。なお、PAKやPTAの場合には、膵臓移植前に移植腎の機能を慎重に評価しなければならない。

IV. まとめと今後の展望

以上、2013年末までの膵臓移植症例181例について、その解析結果を報告した。本邦ではmarginal caseが多く、ドナーの条件は良くはないが、移植成績は欧米のそれと比較して、決して遜色のない結果である。なお、2010年7月17日の臓器移植法改正後、2013年12月末までに165例の臓器提供(うち、膵の提供は117例)があり、このうち、多くが家族の承諾であった。今後はさらに、臓器提供の増加が見込まれ、それに向けたスムーズな対応とその体制が必要となる。

文責：日本膵・膵島移植研究会
膵臓移植症例登録委員会事務局
伊藤壽記

文 献

- 1) 膵・膵島移植研究会膵臓移植班. 本邦膵移植症例登録報告(2007). 移植 2007; 42: 433-438.
- 2) 膵・膵島移植研究会膵臓移植班. 本邦膵移植症例登録報告(2008). 移植 2008; 43: 477-481.
- 3) 膵・膵島移植研究会膵臓移植班. 本邦膵移植症例登録報告(2009). 移植 2009; 44: 579-584.
- 4) 日本膵・膵島移植研究会膵臓移植班. 本邦膵移植症例登録報告(2010). 移植 2010; 45: 641-646.
- 5) 日本膵・膵島移植研究会膵臓移植班. 本邦膵移植症例登録報告(2011). 移植 2011; 46: 546-551.
- 6) 日本膵・膵島移植研究会膵臓移植班. 本邦膵移植症例登録報告(2012). 移植 2012; 47: 437-442.
- 7) 日本膵・膵島移植研究会膵臓移植班. 本邦膵移植症例登録報告(2013). 移植 2013; 48: 378-383.
- 8) 膵・膵島移植研究会編. 膵臓移植に関する実施要綱2010年版. 東京: 膵・膵島移植研究会, 2010. 12月改訂.
- 9) Kapur SC, Bonham CA, Dodson SF, et al. Strategies to expand the donor pool for pancreas transplantation. Transplantation 67; 284-290, 1999.

脂肪由来間葉系幹細胞を用いた細胞療法の 膵島移植への応用

CD90high 脂肪由来間葉系幹細胞亜分画の有効性

川本弘一^{*1)}, 今野雅允^{*2)}, 石井秀始^{*2)}, 富丸慶人^{*1)}, 濱 直樹^{*1)},
 和田浩志^{*1)}, 小林省吾^{*1)}, 江口英利^{*1)}, 種村匡弘^{*3)}, 伊藤壽記^{*4)},
 森 正樹^{*1)}, 土岐祐一郎^{*1)}, 永野浩昭^{*1)}

REVIEW ARTICLE

Possible application of adipose-derived mesenchymal stem cells to islet transplantation—potential of CD90 high-expression cells

[Abstract] Mesenchymal stem cells (MSCs), including adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ADSC), are multipotent and can differentiate into various cell types possessing unique immunomodulatory features. Several clinical trials have demonstrated the safety and possible efficacy of MSCs in organ transplantation. Thus, stem cell therapy is promising for tolerance induction. In this study, we assessed the reprogramming capacity of murine ADSCs and found that CD90 (Thy-1), originally discovered as a thymocyte antigen, could be a useful marker for cell therapy. Murine ADSCs were isolated from B6 mice, sorted by selection of CD90Hi or CD90Lo, and then transduced with four standard factors (Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc). Among unsorted, CD90Hi-, and CD90Lo- murine ADSCs, reprogrammed CD90Hi ADSCs showed increased numbers of alkaline phosphatase-positive colonies compared with reprogrammed CD90Lo ADSCs. The relative reprogramming efficiencies of unsorted, CD90Hi-sorted, and CD90Lo-sorted ADSCs were 100%, 116.5%, and 74.7%, respectively. CD90Hi cells were more responsive to reprogramming. CD90Hi ADSCs had greater reprogramming capacity than CD90Lo ADSCs, suggesting that ADSCs have heterogeneous subpopulations. Thus, CD90Hi selection presents an effective strategy to isolate a highly suppressive subpopulation for stem cell-based tolerance induction therapy.

key words: CD90, ADSC, reprogramming
 (CD90, 脂肪由来間葉系幹細胞, リプログラミング)

Koichi Kawamoto^{*1)}, Masamitsu Konno^{*2)}, Hideshi Ishii^{*2)}, Yoshito Tomimaru^{*1)}, Naoki Hama^{*1)},
 Hiroshi Wada^{*1)}, Shogo Kobayashi^{*1)}, Hidetoshi Eguchi^{*1)}, Masahiro Tanemura^{*3)},
 Toshinori Ito^{*4)}, Yuichiro Doki^{*1)}, Masaki Mori^{*1)}, Hiroaki Nagano^{*1)}

1 型糖尿病に対する β 細胞代替療法

1 型糖尿病の本体は、自己免疫を原因とするインスリン産生細胞 (β 細胞) の破壊であり、最終的

には自己反応性 T 細胞により β 細胞は全滅し、内服治療は無効である。したがって、1 型糖尿病に対する標準療法はインスリン強化療法となる。インスリン強化療法は、糖尿病性合併症の進行を抑制可能であるが、時として低血糖発作が頻発し、致命的になることもある。このことは、1 型糖尿病に対するインスリン治療の限界を示している。

インスリン強化療法に対して、24 時間連続的に血糖値をモニターしつつ、それに対して必要十分なインスリンを分泌させる機能を有する細胞を患者に移植することで、完璧な血糖コントロールを回復させることを目的とした治療法が β 細胞代

^{*1)} Department of Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University; 大阪大学大学院医学系研究科消化器外科

^{*2)} Department of Frontier Science for Cancer and Chemotherapy, Graduate School of Medicine, Osaka University; 大阪大学大学院医学系研究科消化器癌先進化学療法開発学

^{*3)} Department of Surgery and Institute for Clinical Research, National Hospital Organization Kure Medical Center and Chugoku Cancer Center; 独立行政法人国立病院機構呉医療センター中国がんセンター外科

^{*4)} Department of Complementary and Alternative Medicine, Graduate School of Medicine, Osaka University; 大阪大学大学院医学系研究科生体機能補完医学

替療法である。このβ細胞代替療法としては、膵臓移植および膵島移植といった移植医療がある。膵臓移植は、現時点において長期インスリン離脱率が最も高い治療法であり、生命予後改善効果も確認されているが、手術侵襲が高度である点が問題となる。

これに対し膵島移植は、膵臓移植と比較して、IVR 手技を用いて局所麻酔下に完了する非常に低侵襲な治療法である。その一方で、膵臓移植と比較すると長期インスリン離脱率はいまだ不十分で、免疫抑制プロトコルのさらなる改善を要する。さらに、膵島移植のもう一つの問題点として、膵島分離法は確立したものの、分離時および移植直後の細胞喪失が多く、複数のドナーを必要とするケースが多い。加えて、欧米では、膵島収量が多く見込める肥満ドナーを用いているのに対し、本邦では肥満ドナーはごくわずかであるため、欧米の成績を本邦で再現するときのハードルとなっている。これらは、特に脳死および心停止ドナー提供数の少ない本邦において解決すべき問題である。

さて、この問題点を解決するために注目される一つの可能性として、脂肪由来間葉系幹細胞 (adipose-derived mesenchymal stem cell, ADSC) がある。ADSC は、皮下脂肪などの脂肪組織より簡単に調製可能な幹細胞で、臨床膵島移植の成績を改善する可能性を有していることが報告されている。筆者らのグループでも、ADSC と膵島を共移植することで、移植に必要な膵島数を減量可能であることをマウスモデルで報告した¹⁾。そこで、さらに膵島収量を増やすことを目的として、この ADSC に対してリプログラミング手技を応用することを考えた。

リプログラミング効率と幹細胞療法

人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS 細胞) は、2006 年に京都大学の山中らのグループが最初に報告した多能性幹細胞で、再生医療を実現するための重要なツールとして研究が進んでいる²⁾。体細胞に数種類の遺伝子等を導入し、特定の条件下で培養することで得られる。以降 iPS 細胞の基礎医学・創薬への応用が期待されている。

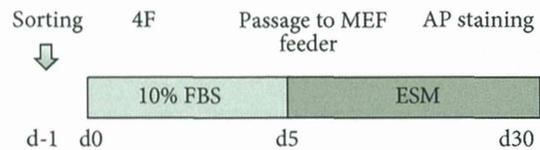


図1 プロトコール

(Kawamoto K et al. Disease Markers 35: 573-579, 2013⁶⁾より)

血液幹細胞における研究において、未分化な細胞であるほど、リプログラミング効率にすぐれることが報告された³⁾。これらの知見に加えて、筆者らが膵島移植効率を高めるために応用しようと考えているヒト ADSC においても、CD90^{high} 分画が分化誘導効率に関与するとの報告もある⁴⁾。この CD90(Thy-1) は、GPI アンカーの膜蛋白であり、当初は胸腺細胞の抗原として同定された。つづいて、幹細胞でも発現していることが報告された。このことは、リプログラミング効率にすぐれる分画が、幹細胞療法に適した分画であることを示唆している⁵⁾。そこで筆者らは、CD90^{high} 分画がリプログラミング効率にすぐれるか解析した⁶⁾。

研究の概要

8~12 週齢の C57BL/6 マウスの皮下脂肪より、通常法を用いて ADSC を分離した。分離当日に FACS アリアセルソーターを用いて、ADSC を CD90^{high} 分画および CD90^{low} 分画にソートした⁷⁾。ソート後に 6 ウェルプレートに播種した。翌日、レンチウイルスベクターを用いて、山中 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を導入した。導入 5 日目に、1,000 個の細胞を、マイトマイシン C で処理したマウス胎生線維芽細胞 (MEF) のフィーダーに移し、以降は ES メディウムで合計 30 日間培養した。リプログラミング効率はアルカリフォスファターゼ染色 (AP 染色) を用いて解析した。また免疫細胞染色にて、未分化マーカーの発現を確認した。

本研究における実験プロトコルを図 1 に示す。通常の単層培養条件下においてマウス ADSC では、コロニー形成は認めず、また AP 染色においても陰性であった。一方、ADSC に山中 4 因子

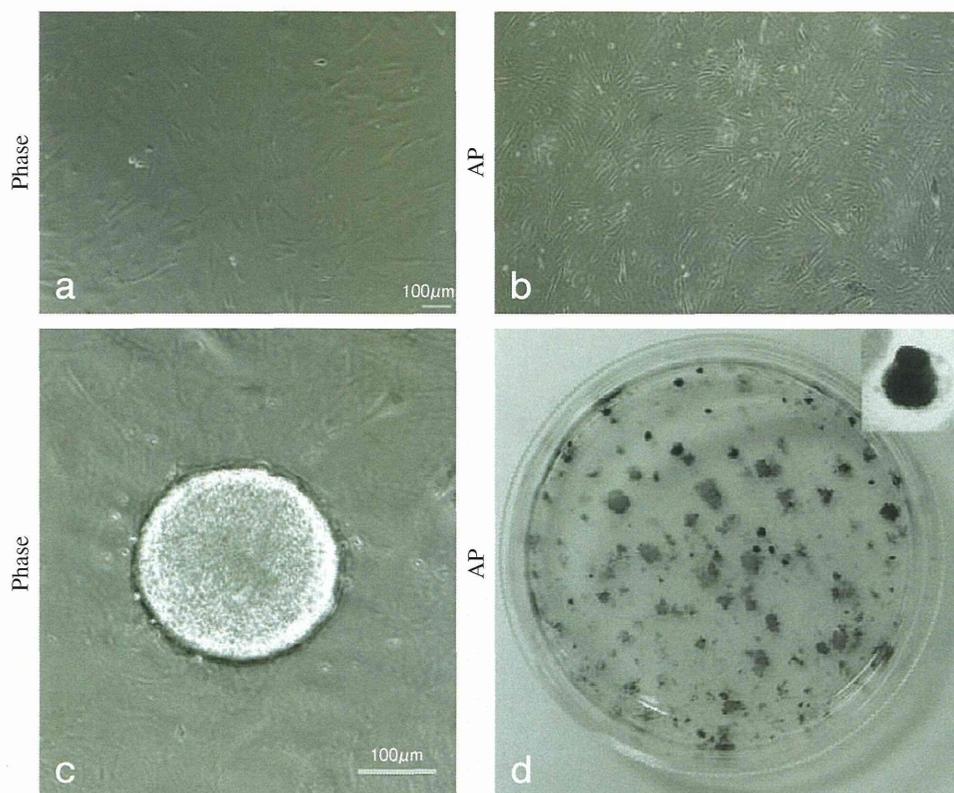


図2 マウス ADSC のリプログラミング前 (a, b), リプログラミング後 (c, d)
(Kawamoto K et al. Disease Markers 35 : 573-579, 2013⁶⁾より)

を導入することで、iPS コロニーを誘導することができた(図 2)。このことはマウス ADSC でもレンチウイルスベクターを用いたリプログラミングが可能であることを示している。また、FACS アリアを用いて doublet を除去、7-アミノアクチノマイシン D (7-AAD) 染色にて死細胞を除去、CD31-CD45-CD34-分画のうち、CD90^{high} 分画と CD90^{low} 分画にソートし、プレートに播種した(図 3a)。翌日に観察したところ、いずれも形態学的には同様の細胞であった(図 3b)。ソート後であっても、1 週間培養すると、特に、CD90^{low} 分画から、また CD90^{high} 細胞が誘導されていた(図 4)。したがって、ウイルスベクターを導入するのは、なるべくソート後早期がよいことが示唆される。また、このコロニーは、免疫細胞染色にて OCT3/4 および SSEA1 陽性であった(図 5)。CD90^{high} 分画および、CD90^{low} 分画でソートした ADSC のリプログラミング効率率は、それぞれ 1.48 ± 0.24 , 1.0 ± 0.15 と有意差を認めた ($p = 0.01$)(図 6, 7)。

細胞治療の今後

細胞療法は、ドナーのリンパ球輸注 (donor lymphocyte or leukocyte infusion, DLI) を皮切りに、最近では、樹状細胞、制御性 T 細胞、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, mSC) の効果が報告されている。なかでも mSC は、ある特定の細胞に分化誘導させることで、再生医療の細胞ソースとなる可能性に加えて、分化誘導していない mSC 自身にも、免疫修飾作用が知られている⁸⁾。このことは、分化誘導させた幹細胞の効果がいまだ確立していない現況を鑑みると、分化誘導させずとも、幹細胞自身を移植時に投与することで、成績改善が得られる可能性を示唆している。さらに最近、mSC が免疫抑制作用の可能性に基づき、免疫抑制剤の代替療法としての mSC を用いた臨床試験が、海外を中心に進行中である⁹⁻¹¹⁾。また、このメカニズムに関しては、さまざまなサイトカインのオートクラインおよびパラクライン効果などが推察されている。本研究では、この mSC の一種で

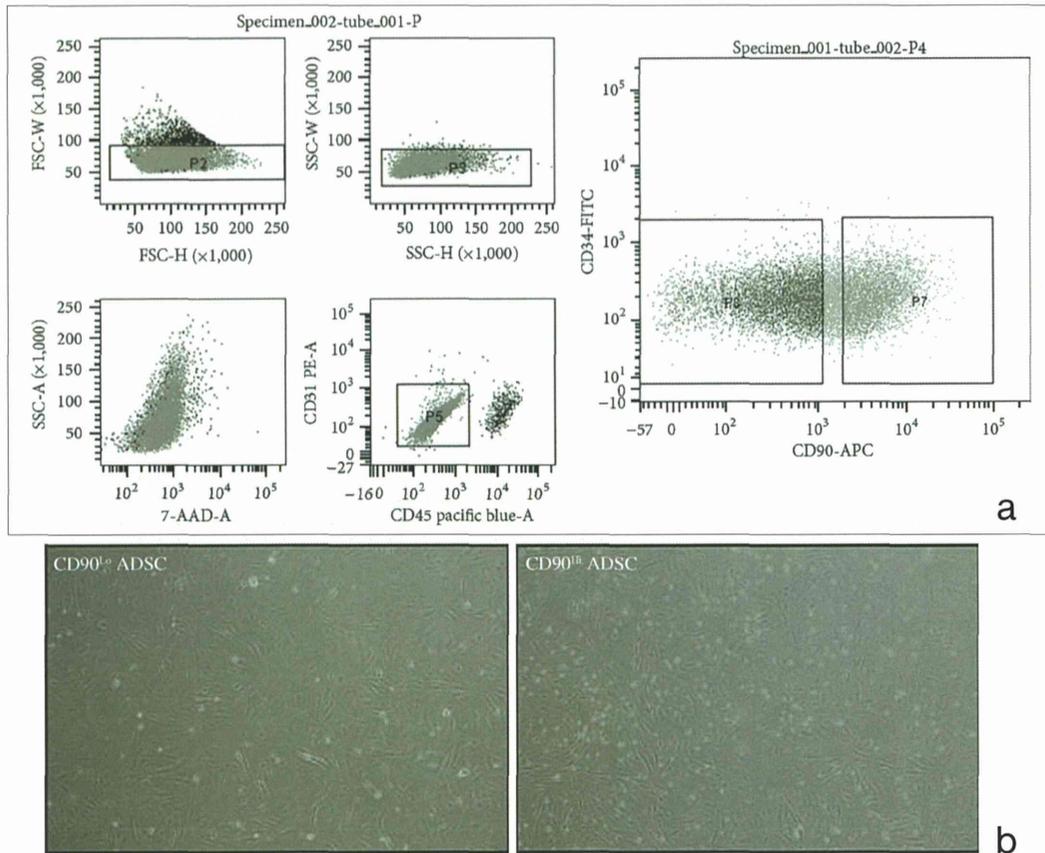


図3 ゲーティングによる分析
(Kawamoto K et al. Disease Markers 35 : 573-579, 2013⁶⁾より)

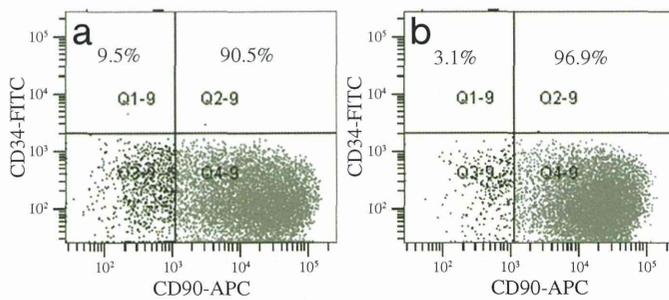


図4
長期培養の影響
a : CD90Lo ADSC
b : CD90Hi ADSC
(Kawamoto K et al. Disease Markers 35 : 573-579, 2013⁶⁾より)

ある ADSC を細胞ソースとして用いることで、1 型糖尿病に対する治療の可能性を検討した。

今回の研究で、レンチウイルスベクターを用いて山中 4 因子を導入することでマウス ADSC から iPS 細胞を誘導可能であることを、AP 染色および免疫細胞染色により証明した。細胞の初期化およびダイレクトリプログラミング(細胞の初期化を経ずに他の分化細胞に転換する現象)が、さまざまな転写因子により調節されていることは想

像にがたくないが、いまだにどのように細胞の初期化を制御しているかの詳細は明らかになっておらず、今後の研究の進捗が期待される。

幹細胞との共移植は、臨床臓器移植を含む移植医療の成績を改善しうるテクノロジーとして期待されている。通常 ADSC そのものを使用するが、将来、移植療法により適した ADSC を峻別可能であれば、さらなる成績向上が期待できる。細胞療法施行時には、どのタイミングで、どれくらいの

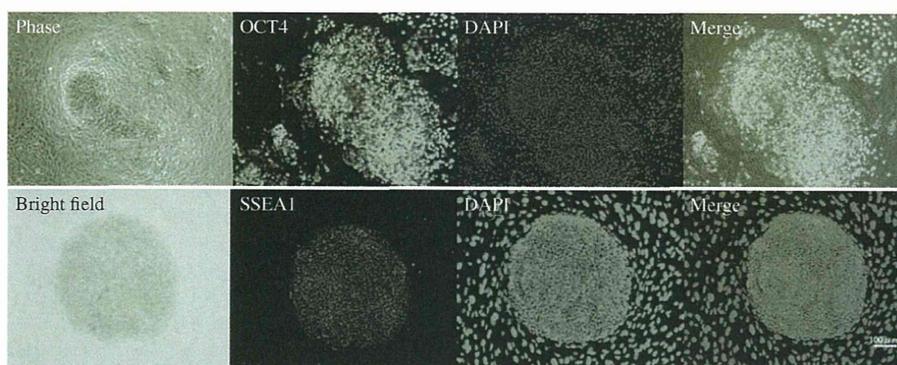


図5 細胞免疫染色

(Kawamoto K et al. Disease Markers 35 : 573-579, 2013⁶⁾より)

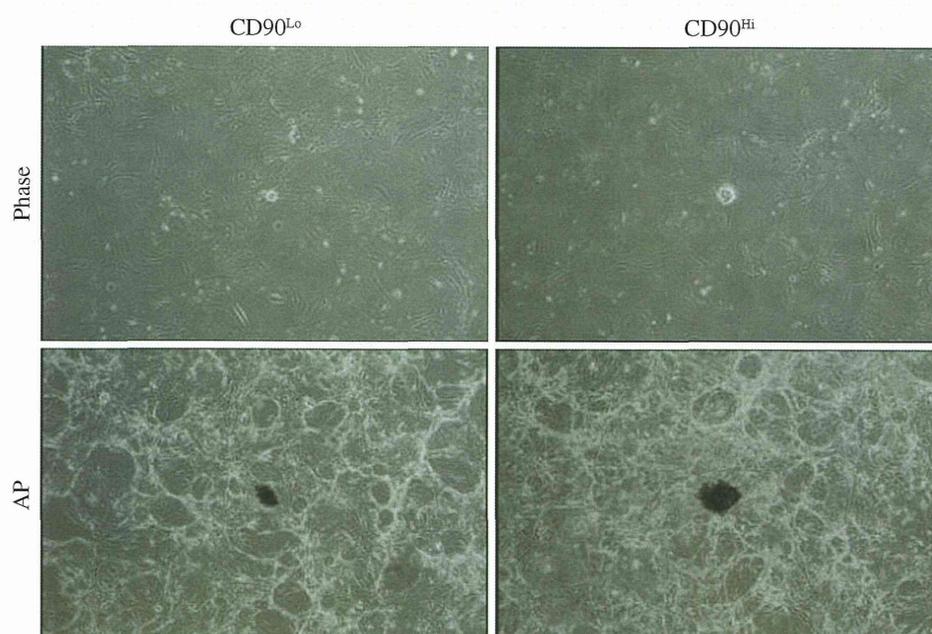


図6 ソート後のリプログラミング

(Kawamoto K et al. Disease Markers 35 : 573-579, 2013⁶⁾より)

質および量の細胞が必要とされるかは、マウスモデルでは同定不能であり、最終的にヒトでの臨床試験が必要となるが、コスト面から最適の条件を絞り切れていない点もハードルとなる。すなわち、ある細胞に移植成績を改善する効果があっても、使用方法が不適切であれば、ネガティブな結果しか得られない。筆者らの仮説どおりであれば、リプログラミング効率を、幹細胞を選択するときのマーカーとして利用することも可能である。今後は、マウス移植実験にて、実際の有効性を確認し、将来的には臨床検体を用いて同様の実験を計画している。また、臨床応用を考慮し、筆者らのグルー

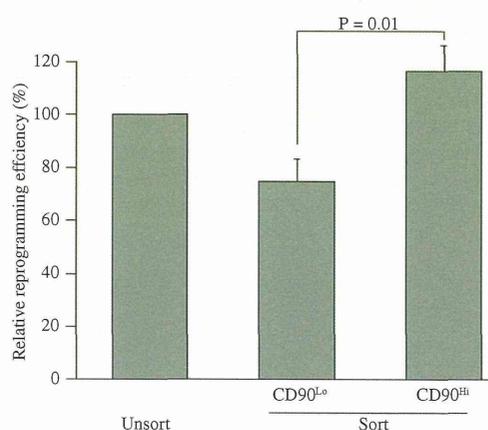


図7 リプログラミング効率

プを含めて、ウイルスベクターを用いない方法も報告されており、今後、ADSC から全能性を持つ細胞を誘導することで、難治性疾患に苦しむ患者への新規治療の可能性がみえてくる^{12,13)}。

文 献

- 1) Ohmura Y, Tanemura M, Kawaguchi N, Machida T, Tanida T, Deguchi T, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Takeda Y, Matsuura N, Ito T, Nagano H, Doki Y, Mori M. Combined transplantation of pancreatic islets and adipose tissue-derived stem cells enhances the survival and insulin function of islet grafts in diabetic mice. *Transplantation* 90 (12): 1366-1373, 2010. doi: 10.1097/TP.0b013e3181ffba31
- 2) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4): 663-676, 2006. Epub 2006 Aug 10
- 3) Eminli S, Foudi A, Stadtfeld M, Maherali N, Ahfeldt T, Mostoslavsky G, Hock H, Hochedlinger K. Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 41 (9): 968-976, 2009. doi: 10.1038/ng.428 Epub 2009 Aug 9
- 4) Chung MT1, Liu C, Hyun JS, Lo DD, Montoro DT, Hasegawa M, Li S, Sorkin M, Rennert R, Keeney M, Yang F, Quarto N, Longaker MT, Wan DC. CD90 (Thy-1)-positive selection enhances osteogenic capacity of human adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng Part A* 19(7-8): 989-997, 2013. doi: 10.1089/ten. TEA. 2012.0370 Epub 2013 Jan 28
- 5) Konno M, Hamabe A, Hasegawa S, Ogawa H, Fukusumi T, Nishikawa S, Ohta K, Kano Y, Ozaki M, Noguchi Y, Sakai D, Kudoh T, Kawamoto K, Eguchi H, Satoh T, Tanemura M, Nagano H, Doki Y, Mori M, Ishii H. Adipose-derived mesenchymal stem cells and regenerative medicine. *Dev Growth Differ* 55(3): 309-318, 2013. doi: 10.1111/dgd.12049 Epub 2013 Mar 3
- 6) Kawamoto K, Konno M, Nagao H, Nishikawa S, Tomimaru Y, Akita H, Hama N, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Tanemura M, Ito T, Doki Y, Mori M, Ishii H. CD90-(Thy-1)-high selection enhances reprogramming capacity of murine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Disease Markers* 35 (5): 573-579, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/392578>
- 7) Nishikawa S, Konno M, Hamabe A, Hasegawa S, Kano Y, Ohta K, Fukusumi T, Sakai D, Kudo T, Haraguchi N, Satoh T, Takiguchi S, Mori M, Doki Y, Ishii H. Aldehyde dehydrogenase high gastric cancer stem cells are resistant to chemotherapy. *Int J Oncol* 42(4): 1437-1442, 2013. doi: 10.3892/ijo.2013.1837 Epub 2013 Feb 22
- 8) Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 12(5): 383-396, 2012. doi: 10.1038/nri3209
- 9) Peng Y, Ke M, Xu L, Liu L, Chen X, Xia W, Li X, Chen Z, Ma J, Liao D, Li G, Fang J, Pan G, Xiang AP. Donor-derived mesenchymal stem cells combined with low-dose tacrolimus prevent acute rejection after renal transplantation: a clinical pilot study. *Transplantation* 95(1): 161-168, 2013. doi: 10.1097/TP.0b013e3182754c53
- 10) Reinders ME, de Fijter JW, Roelofs H, Bajema IM, de Vries DK, Schaapherder AF, Claas FH, van Miert PP, Roelen DL, van Kooten C, Fibbe WE, Rabelink TJ. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study. *Stem Cells Transl Med* 2(2): 107-111, 2013. doi: 10.5966/sctm.2012-0114 Epub 2013 Jan 24
- 11) Tan J1, Wu W, Xu X, Liao L, Zheng F, Messinger S, Sun X, Chen J, Yang S, Cai J, Gao X, Pileggi A, Ricordi C. Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial. *JAMA* 307(11): 1169-1177, 2012. doi: 10.1001/jama.2012.316
- 12) Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322(5903): 949-953, 2008. doi: 10.1126/science.1164270 Epub 2008 Oct 9
- 13) Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, Nishikawa S, Tanemura M, Mimori K, Tanaka F, Saito T, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yamamoto H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 8(6): 633-638, 2011. doi: 10.1016/j.stem.2011.05.001

本論文では、文献 6: Kawamoto et al. *Disease Markers*, 2013⁹⁾ の図を使用していますが、同誌の著作権ポリシー (<http://www.hindawi.com/journals/dm/guidelines/>) によれば適切な引用がなされていれば構わないとされております (Organ Biology 編集委員会)。

本稿は、2013年11月9、10日に東京医科大学病院臨床講堂(東京・新宿)で行われた、第40回日本臓器保存生物医学学会学術集会におけるシンポジウム2“再生医療”での発表をもとに書き下ろしたものである。

別冊請求先: 永野浩昭
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2
大阪大学大学院医学系研究科外科学講座消化器外科学
E-mail: hnagano@gesurg.med.osaka-u.ac.jp

特集「小児の移植」

小児移植医療—小腸移植

工藤博典, 和田 基, 仁尾正記

東北大学病院小児外科学分野

Intestinal transplantation for children

Department of Pediatric Surgery, Tohoku University School of Medicine

Hironori Kudo, Motoshi Wada, Masaki Nio

【Summary】

Although the development of parenteral nutrition has improved outcomes of intestinal failure, parenteral nutrition still often leads to numerous life-threatening complications. Intestinal failure-associated liver disease (IFALD), which can be progressive and fatal in children, is one of the most serious complications. Intestinal transplantation (Itx) represents a definitive treatment for patients with irreversible intestinal failure. By 2013, a total of 2887 intestinal transplants had been performed worldwide, 55% of which were in patients under 18 years old. In Japan, 60% of all recipients were under 18 years old. Because of recent advances in the management of Itx, short-term outcomes following transplantation have improved; however, the long-term outcomes remain insufficient. Furthermore, some patients with severe IFALD require liver-intestinal transplantation, a procedure that remains practically unavailable in Japan. In this article, we provide an overview of the process and the problems of pediatric Itx, with special focus on the situation in Japan.

Keywords: intestinal transplantation, intestinal failure, IFALD, liver-intestinal transplantation

■ ■ はじめに

小腸移植は、重症腸管不全に対する究極的治療法として確立されつつあり、世界でこれまでに2,800回以上施行され、そのうち約55%が小児症例である。

本稿では、小児腸管不全治療における小腸移植の役割と現状について概説する。

■ ■ 腸管不全の定義と重症度

腸管不全は、腸管の主な役割である消化吸収機能が著しく損なわれ、恒常性を維持できなくなった状態である。腸管不全例の多くは静脈栄養（parenteral nutrition: PN）を必要とするが、成人では生体維持のみの栄養量をサポートすればよいのに対し、小児では生命

維持に加え発育・発達の上乗せが必要で、その分、PNへの依存度は高くなるため、これに伴う合併症のリスクも高まると考えられる。

腸管不全は、疾病や外傷などのため手術的に大量の腸管が切除され、結果的に腸が極端に短くなった場合（短腸症候群）と、長さは保たれているが腸管自体の疾患によりその機能を果たせない場合（腸管機能障害）の2つに大別される。

腸管不全の中でも、特に比較的残存小腸が長い、あるいは回盲弁の残存する特に小児の短腸症候群では、数カ月から数年の経過を経て、順応（adaptation）により残存する腸管機能が回復し、さらに失われた腸管機能を代償することにより、PNからの離脱可能な症例も存在するが、残存する腸管のきわめて短い短腸症候群や重症または進行性の腸管機能障害の場合、PN

からの離脱はきわめて困難で、長期あるいは恒久的なPN管理を要する。

腸管不全の重症度は、通常、PNへの依存度に従属する。PNへの依存度は個々の症例に必要な静脈栄養量を必要な総栄養量で除したもので表す。PNへの依存の高い症例、特に依存度が70-80%以上の症例では、PNや原疾患そのものに起因する合併症を来す危険性が高くなる。PNへの依存度の他、腸管機能障害の症例では、一般的に短腸症候群と比べ、腹痛、経口摂取の困難あるいは不能、腸管内容のうっ滞に伴う感染、炎症などの要因によりQOLが阻害され合併症を来す危険性が高く、重症度は高いと考えられる。

腸管不全関連肝障害

腸管不全症例の肝障害は、予後に大きく影響する合併症の一つである。以前は静脈栄養関連肝障害 (PN associated liver disease : PNALD) や静脈栄養関連胆汁うっ滞 (PN associated cholestasis : PNAC) といった用語が使用されていたが、肝障害の要因が静脈栄養のみによらないことや、胆汁うっ滞以外の病態も取りうるため、現在では腸管不全合併肝障害 (intestinal failure-associated liver disease : IFALD) が主に用いられている。IFALDの一般的な定義は、正常値の1.5倍以上の肝機能異常 (トランスアミナーゼ、ALP、 γ -GTP) が2週間以上続く状態とされている。小児では胆汁うっ滞例も多く、PNACでは直接ビリルビンが2.0 mg/dlが2週間以上継続したものと定義されている。しかし、高度な線維化・肝細胞変性・胆汁うっ滞に至るまで、組織像、血液検査と臨床の重症度に相関がみられない例も経験しており、潜在的に肝病態が進行する可能性にも留意すべきと考えている¹⁾。また、潜在的に進行していたIFALDの病態が、感染などを契機に短期間に肝不全に進行することが時に、特に小児例で経験され、細心の注意が必要である。

Kellyは、小児では長期PN症例の40-60%に発症し、在宅PN成人例では15-40%に発症し、線維化・門脈圧亢進症・肝不全への進行は全体として多くはないが、成人よりも新生児・乳児例でその頻度が高い傾向にあると述べた²⁾。またWalesらは、新生児短腸症候群の死亡誘因のうち60%が肝不全であったと述べており³⁾、IFALDが致死合併症であることについては論を待たない。

IFALDの発症には多くの病因が報告されている

が、単独より複数の因子の相互作用によって発症するケースが多いと考えられている^{2,4)}。細胆管での胆汁輸送機構の未熟性や bowel rest、敗血症などの宿主要素に加えて、栄養欠乏 (タンパク質、必須脂肪酸、カルニチン、コリン、ビタミンE、セレン、グルタミン、タウリンなど)、栄養過剰 (ブドウ糖、脂質、アミノ酸、特に methionine)、またはさまざまな毒性 (phytosterol、マンガン) が考えられている^{5,6)}。とくに近年、 ω 6 脂肪酸製剤の経静脈的投与の毒性に注目が集まり、魚油由来の ω 3 製剤 (オメガベン[®]) による治療への期待が高まりつつある。

小児のIFALDの多くは胆汁うっ滞が主体で、組織所見では胆汁うっ滞、細胆管の増生を主体とし、門脈域の線維化を伴い進行することが知られている⁴⁾。一方、成人では脂肪化が主で、長期化に伴い胆汁うっ滞、胆石症を併発するケースが多いとされていたが、最近では長期PN症例での非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis : NASH) の発症が明らかになった^{4,6,7)}。しかしNASHは必ずしも成人に特異的ではなく、ときに小児でも経験されることが分かっている^{1,8)}。IFALDが重症化する前に単独小腸移植を行った場合、移植後にIFALDが軽快したとの報告もあり⁹⁾、IFALDの進行前に単独小腸移植の適応を考えることも重要である。

腸管不全に対する包括的治療

～腸管リハビリテーションプログラム～

腸管不全治療の基本は、可能なかぎり残存腸管の機能を有効に活用しPNへの依存度を軽減し、IFALD、カテーテル関連血流感染症 (catheter related blood stream infection : CRBSI) などの合併症を予防、軽減することである¹⁰⁾。種々の外科的・内科的治療と、さらに多方面からのアプローチを組み合わせる包括的治療戦略を腸管リハビリテーションプログラム (intestinal rehabilitation program : IRP) と呼び、世界で積極的に取り入れられつつある。

具体的には、閉鎖可能な人工肛門および腸瘻の閉鎖、腸管延長手術¹¹⁾、小腸移植などの外科的治療、栄養管理、腸内細菌叢の制御、IFALDに対するオメガベン[®]の使用¹²⁾ (前述)、CRBSIに対するエタノールロック療法¹³⁾、短腸症候群に対するグルカゴン様ペプチド-2 (glucagon-like peptide-2 : GLP-2) アナログ製剤¹⁴⁾などの内科的治療に加え、精神的支援、疼痛管理、在宅移行などの社会的支援をも包括する。そのためス

スタッフも医師(小児科, 消化器内科・外科, 移植外科, 小児外科, 精神科, 麻酔科, 放射線科, リハビリテーション科など)だけでなく, 看護師, 栄養士, コーディネーター, ソーシャルワーカー, 理学療法士などの多職種連携が重要とされている¹⁰⁾。日本国内においても, 小児に対する nutritional support team (NST) による重症腸管不全治療の多職種連携による取り組みが広まりつつあるが, 小腸移植を加えた包括的な IRP を持つ施設はごく限られているのが現状である。

■ 小腸移植の適応

小腸移植は, 不可逆的腸管不全において IFALD, CRBSI など致命的な合併症により生命の維持が脅かされている場合, 中心静脈アクセスルートの確保困難など PN そのものの継続が困難になりつつある場合, 著しい QOL 障害を来している場合などに適応とされる。IFALD の重症度や CRBSI の頻度, 重症度, 残存する中心静脈アクセスルートの本数などにより, 具体的な小腸移植の適応基準が提唱されている^{15,16)}が, 適応基準のみでは, 実際にその適応と時期を判断するのは困難なことが多く, QOL を含めた総合的な判断が必要である。後述のごとく小腸移植の長期的予後は良好とはいえないため, 現時点では PN からの離脱の可能性のある症例や離脱の可能性が低い場合でも, PN 管理で良好な QOL を保っている症例に対しては小腸移植の適応とはならない。一方, PN 合併症を繰り返すうちに敗血症で死亡する症例や, 中心静脈へのアクセスルートの枯渇, 重篤な肝障害や腎障害の合併などにより移植のリスクが高まり, そのチャンスを失う例も少なくない。すなわち, 本邦の小腸移植適応患者が少なく見える背景には, 患者に小腸移植の選択肢が与えられる前に病態が進行し移植の適応から除外される, あるいは死亡する症例の存在がデータとして現れていないことが考えられる。よって不可逆的腸管不全で, かつ PN への依存度が高く, 合併症により生命の維持が困難となる可能性があり, また経口摂取が制限されるなど QOL が障害されている症例においては, 常に小腸移植の適応を考慮し, 移植施設と連携して管理することが望ましい。

そういった状況下で, 腸管不全症例の全体像を把握し潜在的に小腸移植を必要とする症例がどの程度存在しているかを検討するため, 平成 23 年度より厚生労働科学研究費として, 腸管不全の全国調査(福澤正洋

研究班)が行われた¹⁷⁾。対象となった 15 歳以下の腸管不全例は 264 例で, うち生存が 230 例, 死亡例が 34 例であった。生存例 230 例中, 非可逆的腸管不全例(6 カ月以上静脈栄養から離脱不可)は 127 例で, うち黄疸を伴う肝障害ないしは 2 本以上静脈栄養血管が閉塞した症例は 29 例あり, 小腸移植の適応を考慮すべき症例は決して少なくないものと考えられた。

■ 移植術式

1. 単独小腸移植

軽度肝障害の腸管不全症例が対象である。

1) 生体移植

生体ドナーでは, 回盲部は温存し, 全小腸の 40% 以下, 1-2 m (通常成人の全小腸長は約 5 m) の回腸を摘出し, レシピエントに移植する。これはグラフト摘出後にドナーが短腸症候群に陥る危険性に対する安全域を重視した基準である。レシピエント側からみたグラフトの必要量と必ずしも一致しないため, 特に成人レシピエントの場合には, PN からは離脱することができても脱水などの補正が必要となる場合もある。血縁間, 例えば両親から子どもへの移植の場合, 主要組織適合抗原 (human leukocyte antigen : HLA) の少なくともハロタイプが一致するため, 免疫学的に有利である可能性があるが, これまでの国内外のデータをみる限り, 生体ドナーからの移植が脳死ドナーからの移植よりも成績がよいことを示す根拠はない。

2) 脳死移植

脳死小腸移植では, 腹腔内容積が許容されれば移植腸管の長さ生体移植のような制限はないが, 脾臓移植との関係でグラフト血管の右結腸動静脈の分岐部で上腸間膜動静脈を切離するため空腸側の約 100 cm は犠牲となり, 多くの場合 250-350 cm の小腸が移植される。自己結腸がない, あるいはきわめて短い症例に対しては, 結腸の一部(回盲部~上行結腸)を移植することも可能である。結腸を含めた移植は小腸移植全体の 25-30% に行われており, PN, 補液からの離脱率は向上すると報告されているが¹⁸⁾, グラフト回盲部の免疫学的異常には注意が必要である。臓器搬送などに伴う阻血時間は 12 時間以内とするのが原則で, 冷虚血時間は 6~8 時間以内におさめることが望ましい。

2. 肝臓-小腸移植・多臓器移植

多臓器移植は、国際小腸移植登録では移植グラフトに胃を含む移植と定義されている。IFALDが進行し、不可逆的肝不全に陥った症例に対しては、肝臓-小腸移植が必要である。また、とくに高度の腸管機能障害例では肝臓、胃十二指腸を含む多臓器移植が望ましく、欧米ではよく行われているが、脳死ドナーからの臓器提供数の少ない日本国内において、これまでに脳死ドナーからの肝臓および胃十二指腸を含む多臓器移植は実施されておらず、実際に同一ドナーでこれらを行うための法整備もなされていない。肝臓を含む小腸移植は含まない移植と比べ、拒絶反応の頻度が少なく、長期予後は良好であるが、その免疫学的機序は不明である¹⁹⁾。不可逆的肝不全を来していない腸管機能障害症例に対して、欧米では肝臓を含まない多臓器移植も行われている²⁰⁾。

免疫抑制療法

小腸移植が、他の臓器移植に比べて治療成績が伸び悩んでいるのは、小腸が拒絶反応の起こりやすい臓器であり、そのために免疫抑制療法を強化しなければならず、易感染状態となるためである。小腸移植の免疫抑制療法は、導入療法と維持療法に大別される。

導入療法：移植直前から移植後早期にかけて、宿主の細胞性免疫あるいは液性免疫をも消去・無機能化させる薬剤を投与する同療法は、小腸移植では特に有用で、同療法が行われるようになった1990年代後半から短期成績は著しく向上した。使用される薬剤としては、抗IL-2レセプター抗体、抗胸腺ポリクローナル抗体製剤、抗CD52抗体などが挙げられる。本邦では、basiliximab（シムレクト[®]）の使用頻度が高いが、海外では、抗胸腺抗体製剤（サイモグロブリン[®]）、抗CD52抗体の使用頻度が増えている。

維持免疫抑制：使用薬剤としては、tacrolimus（プログラフ[®]）、ステロイドが最も多い。タクロリムスの血中濃度は導入療法の施行により、以前より低くなっている。ピッツバーグ大学では、抗胸腺ポリクローナル抗体製剤を用い、ステロイドを投与しないプロトコルも行われている。mTOR阻害剤であるsirolimus（ラパマイシン[®]）も、tacrolimusによる腎障害例や慢性拒絶反応症例で使用される。他の臓器移植で使用される代謝拮抗剤は、現在ではほとんど使用されていない。特にmycophenolate mofetil（MMF）は、副作用で

ある腸管上皮障害がグラフト腸管でも起こり、下痢などを生じる。

合併症

1. 拒絶反応

急性拒絶反応は小腸移植後90日以内に46-70%の頻度で発症する²¹⁾。小腸移植の急性拒絶反応は進行が早く、腸管（グラフト）内容からのトランスロケーションにより感染症（敗血症）を来す。移植後の直接死因の多くは感染症（敗血症）であるが、グラフト喪失、死亡には拒絶反応が直接あるいは間接的に関与していると思われる。他の臓器の移植では、急性拒絶反応は移植後6カ月以内に発症するが、小腸移植後においては移植後数年以上経過しても起こりうる。急性拒絶反応はステロイドパルスや抗胸腺抗体製剤などにより治療される。小腸グラフト内視鏡、生検病理組織診断などにより早期に診断し、迅速かつ適切に治療することが必要である。抗HLA抗体などに関連した抗体関連拒絶反応や非特異的な拒絶反応なども注目されており、プロテアソーム阻害剤や抗TNF- α 抗体製剤による治療の効果も報告されている^{22,23)}。慢性拒絶反応も小腸移植後中長期のグラフト喪失、死亡の主要な原因とされている²⁴⁾が、その発症機序は不明で、有効な治療法は見つかっていない。

2. 感染症と移植後リンパ増殖症（PTLD）

小腸移植後には免疫抑制や拒絶反応に伴い、さまざまな感染症を来しうる²⁵⁾。サイトメガロウイルス、EBウイルス、カリニ肺炎などの他の臓器移植後にもみられる日和見感染などの他、小腸移植後に特異的な腸炎などの腸管感染症や、静脈栄養、補液から離脱していない症例では、CRBSIが問題となる。小腸移植後のCRBSIは重症化し致死的な経過をとることもあるため、早期に適切に治療する必要がある。

移植後リンパ増殖症（post transplant lymphoproliferative disorders：PTLD）は、移植後の免疫抑制状態下において発症するリンパ球増殖症で、主にはEBウイルス感染B細胞の増殖に起因する。発症のリスクは、腎・心・肝移植では低いが、肺・小腸・多臓器移植症例では高い²⁶⁾。本邦の小腸移植例でのPTLD発症は1例のみであるが²⁷⁾、国際的な発症率は10%前後といわれており、特に小児は高リスクである²⁸⁾。改正臓器移植法の施行に伴い、今後小児移植例が増加する可能

性があり、より注意すべき感染症の一つである。

3. 腎機能障害

小腸移植後は他の臓器移植後とくらべ、移植前からの脱水や腎結石、膀胱機能障害（腸管運動機能障害の中には膀胱機能障害を合併するものもある）に加え、カルシニューリン阻害剤などの免疫抑制剤や抗真菌剤、抗ウイルス剤などの腎毒性により、腎機能障害を来す危険性が高い。透析や腎移植が必要な末期腎不全を来す危険性は小腸移植と肺移植で特に高いとされている²⁸⁾。小腸移植の腎機能障害は予後に有意差をもって悪影響を与えることが知られている²⁹⁾。小腸移植後は、必要以上に免疫抑制剤の血中濃度を高く維持せず、十分な補液により脱水を起こさないよう管理するとともに、定期的に腎機能を評価し、拒絶反応、感染症の治療の際にも腎機能障害を最小限とするよう配慮すべきである。

■ 国際小腸移植登録における移植実施状況と成績

小腸移植後の短期成績は近年向上し、他の臓器移植の成績と遜色ないものとなっているが、長期成績にはいまだ課題を残している。最新の2013年の国際小腸

移植登録によると、2013年2月までに2,887回（18歳未満の小児はこのうち1,611回）の小腸移植が行われ、1,416例（小児822例）が生存している。小腸移植の年次別実施数をみると、2009年頃の年間250件をピークにそれ以降は減少している（図1）。減少は主に小児例で、肝臓-小腸移植/肝臓を含む多臓器移植が減少している（図1, 2）。これはIFALDに対する前述の魚油由来静注用脂肪製剤による治療が広く実施されるようになったため（この薬剤のIFALDに対する適応、薬事は米国でも未承認）、小児の不可逆的IFALD症例が減少したことが原因と考えられる。小児期（乳幼児期）に不可逆的肝不全を来していた症例の多くは重症の不可逆的腸管不全症例と考えられるため、魚油由来静注用脂肪製剤により乳幼児期の移植を免れた症例が、その後小腸移植の適応となり、今後、小腸移植の実施数が再び増加に転じるのか否かは注意深く見守る必要がある。移植適応疾患は、小児では短腸症候群63%（腹壁破裂22%、壊死性腸炎14%、腸捻転16%、他）、運動機能障害18%、吸収障害8%であった（図3）。一方、成人例では短腸症候群64%（虚血24%、クローン病11%、腸捻転8%、外傷7%、他）、運動機能障害11%、腫瘍13%であった（図3）。小腸移植のグラフト生着率は、特に小児では年代ごと

図1 国際小腸移植登録 2013：年次別移植数推移

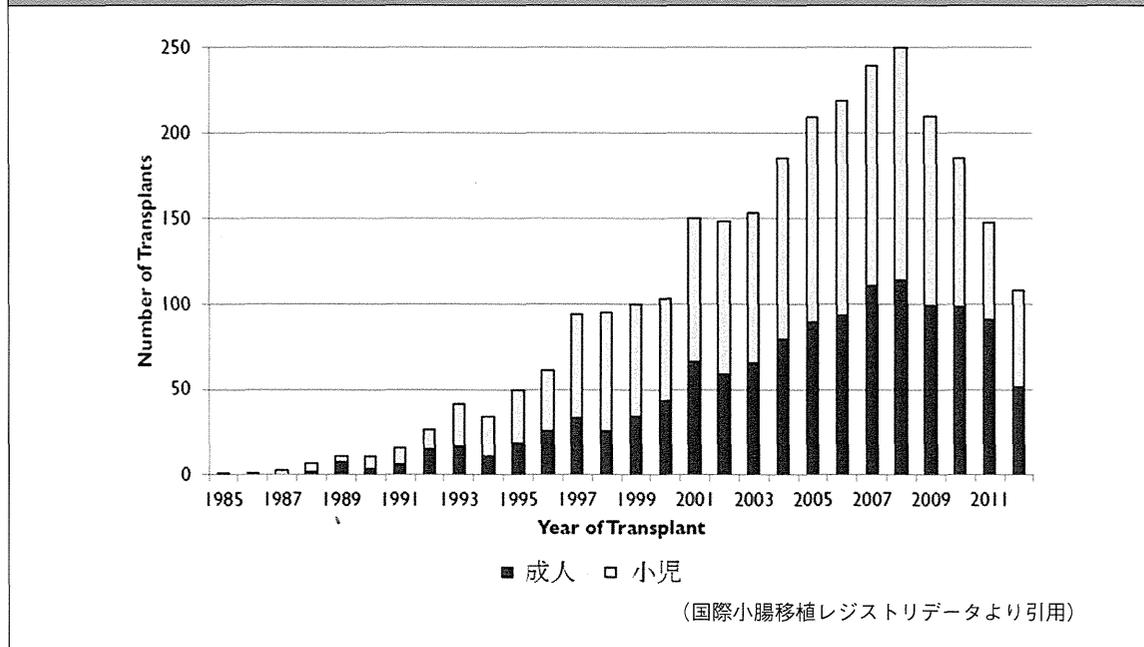


図2 国際小腸移植登録 2013：グラフト別移植数推移

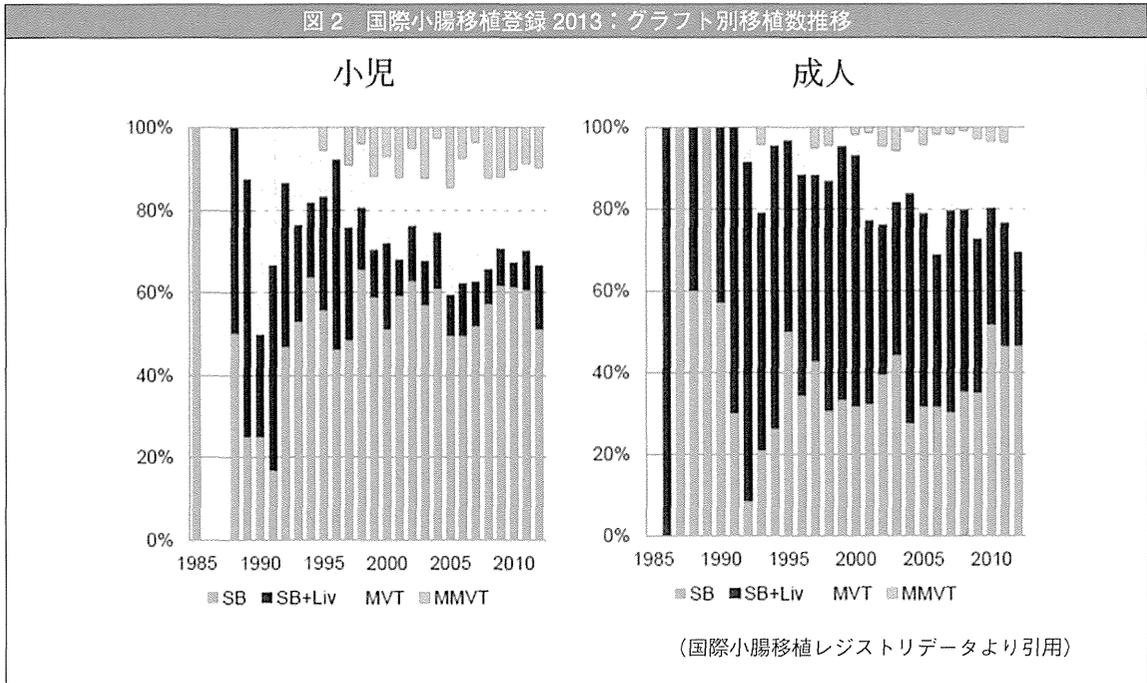
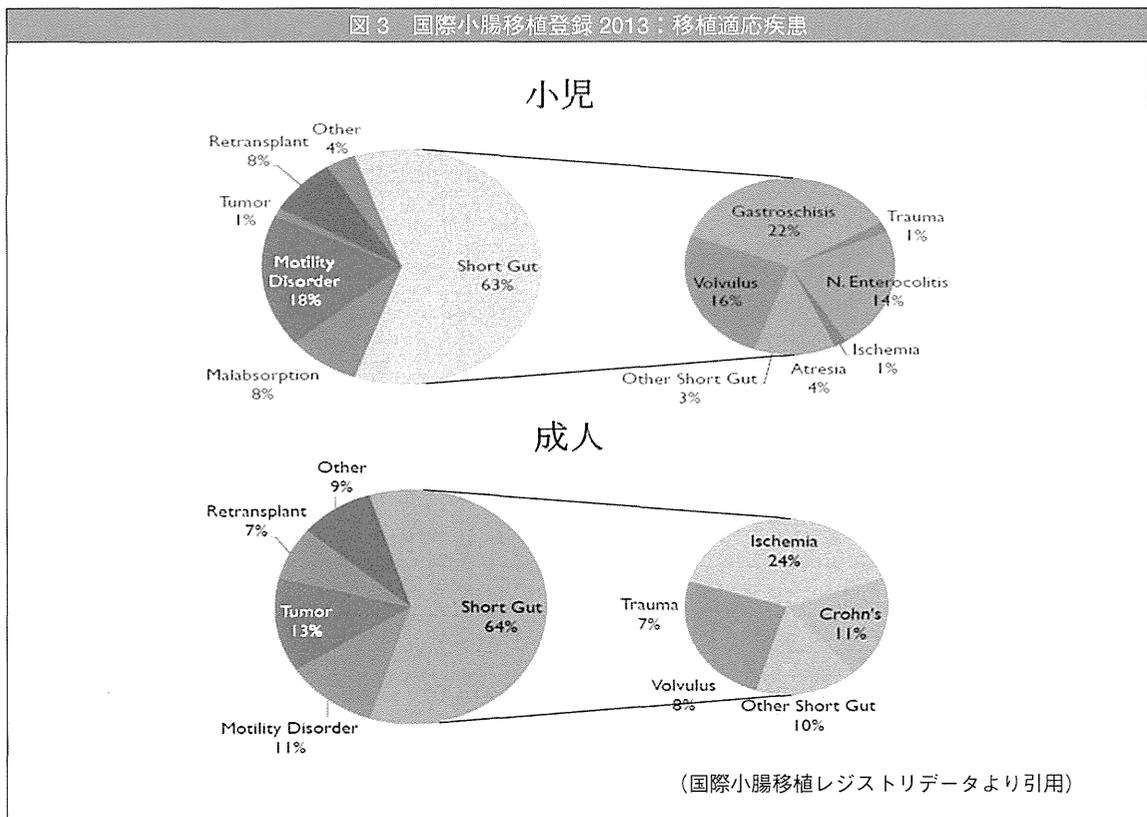
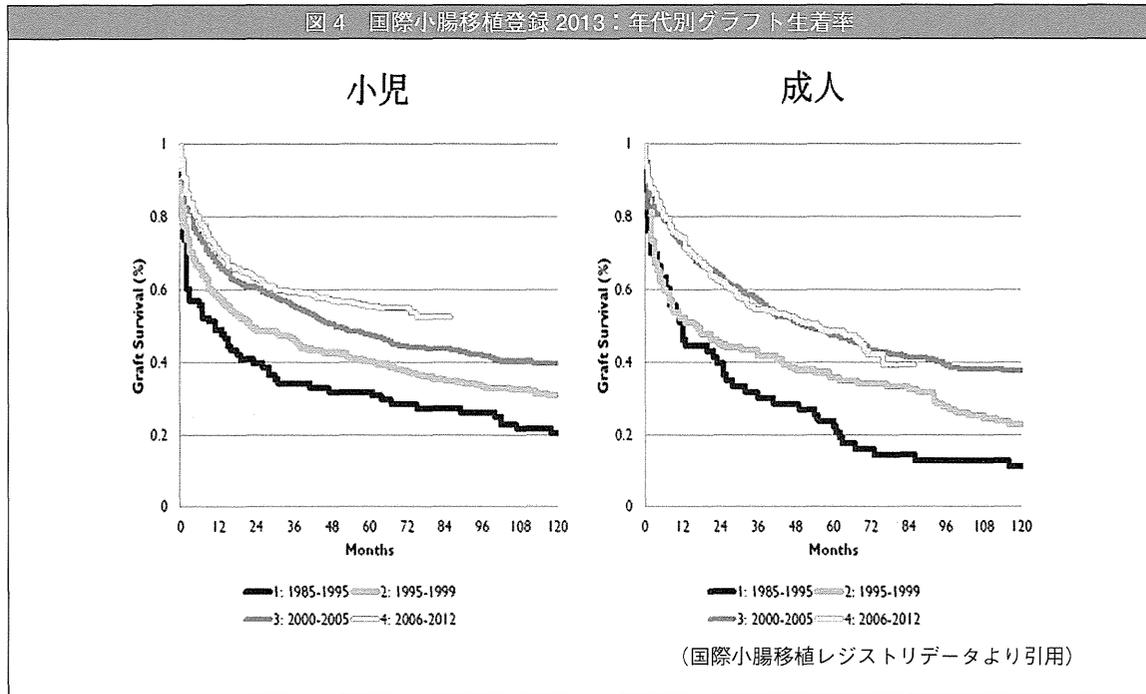


図3 国際小腸移植登録 2013：移植適応疾患





に向上しており、2006年以降の症例では、移植後1年の生着率は約75%、5年生着率は約55%まで改善している(図4)。

■ 本邦での実施状況と課題

日本小腸移植研究会では、国内での小腸移植実施状況を把握し、今後の発展へ寄与することを目的とし、2007年より登録事業を開始した。同研究会からの1996年の本邦第1例目から2013年6月末までの集計では、22名に対して25回の移植が実施された³⁰⁾。ドナーは、脳死が13回、生体が12回であった。年齢分布は、0~2歳が12%、3~6歳が12%、7~18歳が36%、19歳以上が40%であった。本邦での小腸移植例の原疾患が小児期に発症するものが多いにもかかわらず、成人例の割合が多いのは、小児移植へのドナーが少ないため、成人期まで待機した症例のみが移植を受けられていることが原因と考えられている。術式は、2人の生体ドナーからの肝小腸同時移植が1例、他は単独小腸移植であるが、うち2例は小腸移植の前に生体ドナーからの肝移植が行われた異時性肝小腸移植症例であった。成績は、患者1年/5年/10年生着率では86%/65%/65%、グラフト1年/5年/10年生着率は80%/62%/

51%であった。これを2006年前後で分けて検討すると、有意差は得られなかったが、2006年以降の患者1年/5年/生存率は93%/76%、グラフト1年/5年年生着率は87%/71%と成績の向上を認めた。また、小児・成人例(18歳を境界とする)で成績をみると、成人例は患者1年/5年/生存率は100%/73%、グラフト1年/5年年生着率は90%/67%と良好であった。小児の成績は、統計学的評価は不明だが、これにやや劣る傾向にあった。

2010年の改正臓器移植法施行以降、本邦でも脳死ドナーからの臓器提供は増加し、年間40~50例の臓器提供が行われている。小児の脳死ドナーからの臓器提供も法的には家族の同意により実施可能となったが、現在のところ少数例しか実施されていない。小児に対する脳死下小腸移植を検討した場合、成人ドナーからの提供であっても移植腸管長を調整することで、体重比で300~500%程度(体重50kgの成人から体重10~15kgの小児への移植)までは対応可能である。しかし、10kg以下の症例には小児ドナーからの臓器提供が必要である。

肝小腸移植では、ドナーの確保はさらに大きな問題である。欧米では脳死ドナーから肝・小腸移植(または多臓器移植)が行われるが、わが国の現行のシステ

ムではほぼ不可能である。すなわち、肝と腸管の両方が必要な患者に対して脳死ドナーから臓器の提供を受けようとするとき肝・小腸の2つの待機リストの両方で第1位にリストアップされなければならなかった。2011年からは肝臓と小腸を同時に登録し肝臓の提供を受けられれば優先的に小腸が提供されることとなったが、いまだハードルは高いといえる。さらに、通常肝・小腸移植が行われる場合、両方の臓器がひとつながりの状態、いわゆる composite graft の状態で移植されるのが一般的であるが、この間には膵臓が存在し、わが国の現行のルールでは、膵臓はこれを必要とする別のレシピエントに提供されなければならない。

2008年にイスタンブール宣言が出され、その翌年WHO理事会で渡航移植の原則禁止が採択されたため、わが国の現行のシステムに則って、肝・小腸移植を行おうとすると、生体と生体、または生体と脳死を組み合わせた移植を行わざるを得ない。藤本らは2名の生体ドナーの³¹⁾、Testaらは同一生体ドナーの症例³²⁾をそれぞれ報告しているが、免疫学的影響、ドナーの安全性、倫理面を考慮すると、クリアすべき問題は少なくない。

もうひとつのオプションが、肝を生体ドナーから、小腸を脳死ドナーから、それぞれ提供される場合である。これは、小腸移植の脳死待機者がきわめて少ないという現在のわが国の特殊事情によって成り立つ戦略である。われわれが小児 IFALD 例に対して計画した方法は、脳死小腸移植を登録した後に生体肝移植を行い、その後一定期間脳死ドナーを待ちつつ、これが現れない場合には生体小腸移植を行うというものであった。実際には生体肝移植を行った2カ月後に、生体小腸移植を行う直前のタイミングで脳死ドナーが出現し、脳死小腸移植が行われた。同様に IFALD に対し生体肝移植後に異時性に脳死小腸移植を施行した症例が本邦でもう1例報告されているが³⁰⁾、このような生体肝移植と脳死（または生体）小腸移植を組み合わせた治療戦略は、わが国では有力な方法であるが、いわば苦肉の策であり、欧米で一般的な同一脳死ドナーからの肝小腸（または多臓器）移植がレシピエントにとってはより望ましい。わが国においても、肝・小腸のグラフトが同時に1人の患者へ配分されるようなルール改定や、行政レベルの議論や関連臓器移植医との協調などのシステム整備が急がれる。

また現在、小腸移植は保険適応となっておらず、先進医療の承認には脳死および生体小腸移植、それぞれ

2例以上の施設としての経験が要求され、2013年末現在、承認されているのは2施設のみである。このような経済的障壁も小腸移植の実施を妨げる因子となっている。

■ ■ おわりに

小児小腸移植について概説した。移植成績は国内外ともに向上してはいるものの、他の臓器移植と比較するといまだ十分とはいえない。液性免疫なども含めた免疫制御や免疫寛容の誘導など新たな拒絶反応ターゲットの開発や感染症制御などにより、小腸移植のさらなる成績向上が期待される。また、脳死移植症例の増加や肝小腸・多臓器移植実施へ向けた多方面にわたる取り組みも急務である。

文 献

- 1) 工藤博典, 石田和之, 和田 基, 他. 小腸不全, 小腸移植症例の肝組織病理所見. 小児外科 2010; 42: 912-917.
- 2) Kelly DA. Intestinal failure-associated liver disease: what do we know today? Gastroenterology 2006; 130: S70-S77.
- 3) Wales PW, Silva N, Kim J, et al. Neonatal short bowel syndrome: Population-based estimates of incidence and mortality rates. J Pediatr Surg, 39: 690-695, 2004.
- 4) 田中芳明, 朝川貴博. TPNに伴う肝障害の病因・病態. 日本医事新報 2009; 4442: 80-83.
- 5) 和田 基, 工藤博典, 天江新太郎, 他. IFALD (腸管不全合併肝障害) の病因と治療. 静脈経腸栄養 2012; 27: 63-68.
- 6) 吉田英生, 黒田浩明, 松永正訓, 他. 短腸症候群患者に対する高カロリー輸液時の敗血症, 肝障害の予防. 小児外科 2000; 32: 198-203.
- 7) 加藤純子, 橋本悦子, 高崎 健. 中心静脈栄養による NASH. 肝胆膵 2002; 44: 477-484.
- 8) 工藤博典, 和田 基, 佐々木英之, 他. 腸管不全合併肝障害 (intestinal failure-associated liver disease; IFALD) に対する包括的治療戦略. 日本小児外科学会雑誌 2010; 46: 1108-1114.
- 9) Fiel MI, Wu HS, Iyer K, et al. Rapid reversal of parenteral-nutrition-associated cirrhosis following iso-

- lated intestinal transplantation. *J Gastrointest Surg* 2009; 13: 1717-1723.
- 10) Sudan D, DiBaise J, Torres C, *et al.* A multidisciplinary approach to the treatment of intestinal failure. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 165-176.
 - 11) Almond SL, Haveliwala Z, Khalil B, *et al.* Autologous intestinal reconstructive surgery to reduce bowel dilatation improves intestinal adaptation in children with short bowel syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; 56: 631-634.
 - 12) Gura KM, Lee S, Valim C, *et al.* Safety and efficacy of a fish-oil-based fat emulsion in the treatment of parenteral nutrition-associated liver disease. *Pediatrics* 2008; 121: e678-e686.
 - 13) Corrigan ML, Pogatschnik C, Konrad D, *et al.* Hospital readmissions for catheter-related bloodstream infection and use of ethanol lock therapy: comparison of patients receiving parenteral nutrition or intravenous fluids in the home vs a skilled nursing facility. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2013; 37: 81-84.
 - 14) Jeppesen PB, Pertkiewicz M, Forbes A, *et al.* Quality of life in patients with short bowel syndrome treated with the new glucagon-like peptide-2 analogue teduglutide--analyses from a randomised, placebo-controlled study. *Clin Nutr* 2013; 32: 713-721.
 - 15) Selvaggi G, Gyamfi A, Kato T, *et al.* Analysis of vascular access in intestinal transplant recipients using the Miami classification from the VIIIth International Small Bowel Transplant Symposium. *Transplantation* 2005; 79: 1639-1643.
 - 16) O'Keefe SJ. Candidacy for intestinal transplantation. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1644-1646.
 - 17) 上野豪久, 福澤正洋. 腸管不全患者における小腸移植の適応. *小児外科* 2013; 45: 703-706.
 - 18) Matsumoto CS, Kaufman SS, Fishbein TM. Inclusion of the colon in intestinal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16: 312-315.
 - 19) Abu-Elmagd KM, Wu G, Costa G, *et al.* Prefomed and de novo donor specific antibodies in visceral transplantation: long-term outcome with special reference to the liver. *Am J Transplant* 2012; 12: 3047-3060.
 - 20) Matsumoto CS, Fishbein TM. Modified multivisceral transplantation with splenopancreatic preservation. *Transplantation* 2007; 83: 234-236.
 - 21) Desai CS, Khan KM, Gruessner AC, *et al.* Intestinal retransplantation: analysis of Organ Procurement and Transplantation Network database. *Transplantation* 2012; 93: 120-125.
 - 22) Island ER, Gonzalez-Pinto IM, Tsai HL, *et al.* Successful treatment with bortezomib of a refractory humoral rejection of the intestine after multivisceral transplantation. *Clin Transpl* 2009; 465-469.
 - 23) Gerlach UA, Koch M, Müller HP, *et al.* Tumor necrosis factor alpha inhibitors as immunomodulatory antirejection agents after intestinal transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11: 1041-1050.
 - 24) Takahashi H, Kato T, Delacruz V, *et al.* Analysis of acute and chronic rejection in multiple organ allografts from retransplantation and autopsy cases of multivisceral transplantation. *Transplantation* 2008; 85: 1610-1616.
 - 25) Timpone JG Jr, Girlanda R, Rudolph L, *et al.* Infections in intestinal and multivisceral transplant recipients. *Infect Dis Clin North Am* 2013; 27: 359-377.
 - 26) Gross TG. Management of posttransplant lymphoproliferative disease. In: Langnas AN, Goulet O, Quigley EMM, *et al.* editors. *Intestinal failure: diagnosis, management and transplantation.* Massachusetts: Wiley Blackwell, 2008: 342-348.
 - 27) 上野豪久, 福澤正洋. 小腸移植の術後管理. *小児外科* 2011; 43: 45-49.
 - 28) Ruebner RL, Reese PP, Denburg MR, *et al.* End-stage kidney disease after pediatric nonrenal solid organ transplantation. *Pediatrics* 2013; 132: e1319-e1326.
 - 29) Suzuki M, Mujtaba MA, Sharfuddin AA, *et al.* Risk factors for native kidney dysfunction in patients with abdominal multivisceral/small bowel transplantation. *Clin Transplant* 2012; 26: E351-E358.
 - 30) 日本小腸移植研究会. 本邦小腸移植症例登録報告. *移植* 2013; 48: 390-394.
 - 31) 藤本康弘, 岡本晋弥, 阪本靖介, 他. 生体ドナーによる肝小腸同時移植の1例. *移植* 2008; 43: 162-163.
 - 32) Testa G, Holterman M, Abcarian H, *et al.* Simultaneous or sequential combined living donor-intestine transplantation in children. *Transplantation* 2008; 85: 713-717.

Impact of Donor and Recipient Single Nucleotide Polymorphisms of IL28B rs8099917 in Living Donor Liver Transplantation for Hepatitis C

Nobuhiro Harada¹, Sumihito Tamura¹, Yasuhiko Sugawara^{1,3*}, Junichi Togashi¹, Takeaki Ishizawa², Junichi Kaneko¹, Taku Aoki², Yoshihiro Sakamoto², Kiyoshi Hasegawa², Tomohiro Tanaka³, Noriyo Yamashiki³, Norihiro Kokudo^{2,3}

1 Division of Artificial Organ and Transplantation, The University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan, **2** Division of Hepato-Biliary and Pancreatic Surgery, Department of Surgery, The University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan, **3** Organ Transplantation Service, The University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan

Abstract

Single nucleotide polymorphisms of interleukin-28B (IL28B) rs8099917 are reported to be associated with virologic clearance in interferon-and ribavirin -based treatment for hepatitis C virus (HCV)-infected patients. We examined virologic response in accordance with IL28B polymorphisms in our living donor liver transplantation series under a preemptive interferon and RBV treatment approach. Adequate DNA samples from both the recipient and donor for the study of single nucleotide polymorphisms of IL28B were available from 96 cases and were the subjects of the present study. Various clinical factors related with virologic response including early virologic response (EVR) and sustained virologic response (SVR) were examined. Totally 51% presented with EVR and 44% achieved SVR. Presence of the major allele (TT) in either the recipient or the donor corresponded to SVR of 53% and 48%. Presence of the minor allele (TG or GG) corresponded to SVR of 26% and 32%. Multivariate analysis revealed that genotype of HCV or EVR, but not IL28B polymorphisms in either the recipient or donor, was an independent factor for achieving SVR. When virologic response to treatment was incorporated into analysis, the impact of IL28B polymorphism on virological clearance remained relative to other factors and was not significantly independent.

Citation: Harada N, Tamura S, Sugawara Y, Togashi J, Ishizawa T, et al. (2014) Impact of Donor and Recipient Single Nucleotide Polymorphisms of IL28B rs8099917 in Living Donor Liver Transplantation for Hepatitis C. PLoS ONE 9(3): e90462. doi:10.1371/journal.pone.0090462

Editor: John E. Tavis, Saint Louis University, United States of America

Received: November 26, 2013; **Accepted:** January 31, 2014; **Published:** March 5, 2014

Copyright: © 2014 Harada et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The study has been supported by a Grant-in-aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and Grants-in-aid for evolutionary treatment strategies for recurrent hepatitis after liver transplantation using genome-wide analysis and Research on HIV/AIDS and Research on Measures for Intractable Diseases from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: yasusuga-ky@umin.ac.jp

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is the leading cause of end-stage liver disease necessitating liver transplantation in developed countries [1–3]. HCV reinfection following liver transplantation is universal, however, and the histologic progression of HCV-related liver cirrhosis is accelerated in comparison with the non-transplant population [4–8]. Long-term outcomes are reported to be poorer in liver transplant recipients with HCV recurrence [9–10]. Although its efficacy remains unsatisfactory, the standard treatment for HCV relapse following liver transplantation is the combined application of pegylated interferon and ribavirin (RBV) [11–16]. To improve the overall outcomes of patients undergoing living donor liver transplantation (LDLT) for HCV-related liver disease, we routinely administered interferon based treatment preemptively in our series [17] with recent results indicating a sustained viral response (SVR) rate of 43% [18].

In a recent genome-wide association study, three independent institutions identified single nucleotide polymorphisms in the interleukin (IL)-28B gene on chromosome 19q13; rs12980275 or rs8099917 as being strongly associated with the virologic response

to interferon and RBV-based treatment in HCV-infected patients [19–21]. In Japanese patients, the G nucleotide of rs8099917 (minor allele) is associated with a poor response to treatment, whereas a T nucleotide (major allele) is associated with a fair response [20].

The impact of the IL28B polymorphism was recently studied in the liver transplant setting. A small series reported that combined analysis of IL28B polymorphisms in both donors and recipients may predict the possibility of achieving SVR under current standard pegylated interferon-and RBV-based therapy [22–23]. The evidence, however, remains limited. In the present study, we examined the virologic response to a preemptive treatment approach in accordance with IL28B polymorphism.

Patients and Methods

Patients

From June 1996 to December 2012, 499 LDLT surgeries were performed at the University of Tokyo Hospital among which 134 cases were for HCV-related liver disease. Among them, three recipients remained negative for HCV RNA after transplantation

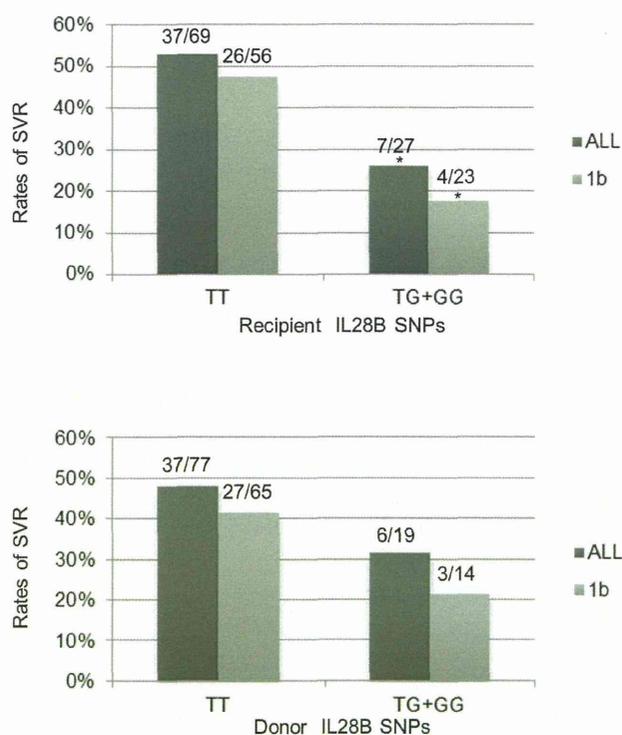


Figure 1. IL28B rs8099917 SNPs in the recipient and donor and corresponding rates of SVR. * indicates $p < 0.05$ v.s. major allele (TT) with corresponding background.
doi:10.1371/journal.pone.0090462.g001

alone, not requiring interferon treatment, and were excluded from the study. In the remaining 131, either appropriate informed consent or adequate samples for genetic analysis was not available in 25 cases for the following reasons and therefore excluded; death during the earlier period in 18, lost to follow-up in 3, and decline of study consent in 14 cases. The remaining 96 cases were the subjects of the present analysis. The earliest case of this population underwent LDLT in June 1998, and the latest case underwent LDLT in February 2011. Follow up was done until the end of 2012, or death.

Antiviral therapy for HCV

Treatment was initiated with low-dose interferon alpha-2b and RBV 400 mg/day promptly after improvement of the general condition following liver transplantation. Recovery of hematologic and renal function was considered crucial. Specifically, initiation was considered when the leukocyte number $\geq 4000/\text{ml}$, platelet count $\geq 50\,000/\text{ml}$, hemoglobin $\geq 8\text{ g/l}$, and serum creatinine $< 2\text{ mg/dl}$. Thereafter, the dosage was gradually increased as tolerated. Finally, pegylated-interferon alpha-2b 1.5 $\mu\text{g/kg/week}$ and RBV 800 mg/day were administered, depending on patient compliance [17,18].

HCV RNA was measured quantitatively by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (Amplicor HCV; Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA). The response was considered to be an EVR at 12 week with an at least 2 log₁₀ drop in serum HCV-RNA. The treatment was continued for 12 months after serum HCV-RNA turned negative, defined as ETR. The response was considered to be a SVR after another 6 months of negative serologic results without anti-viral treatment. Flexible dose adjustments were made as necessary to avoid serious adverse

events and to prevent a lapse in treatment. A fixed overall treatment period length was not defined [17,18].

Analysis of the genotype of IL28B

Genomic DNA from recipients and donors was extracted either from peripheral blood mononuclear cells or from formalin-fixed paraffin-embedded liver biopsy samples depending on availability. Genotyping of single nucleotide polymorphisms IL28B rs8099917 was performed as previously described [20,22].

Ethics Statement

All LDLTs were performed after individually obtaining informed consent from recipients and donors. LDLT program at the University Of Tokyo Hospital has been approved by its Institutional Review Board, and all aspects of the procedures have been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. The current human subject research was approved as project number G3514 by Graduate School of Medicine and Faculty of Medicine, the University of Tokyo Research Ethics Committee and Human Genome, Gene Analysis Research Ethics Committee. All subjects have been properly instructed and participated by signing the appropriate informed consent paperwork. In the preparation of this manuscript, all efforts have been made to protect patient privacy and anonymity.

Statistical analysis

The cumulative rate of viral responses was studied using the Kaplan-Meier method. Comparison was made using the log-rank test. A multivariate analysis was performed using the Cox proportional-hazards model and a forward stepwise procedure. Categorical various clinical factors were compared between groups using the Fisher's exact test. JMP 9 software (SAS Institute Japan, Tokyo, Japan) was used for all analyses. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Patient demographics and virologic response

All recipients and donors of the 96 cases were of Japanese origin. Median age of the recipients and donors was 56 (range 23–66) and 34 (range 17–66), respectively. In 60 cases, the donor was a relative within a first degree of consanguinity. Among the recipients, 60 cases presented with hepatocellular carcinoma, 3 with HIV co-infection, and 2 with hepatitis B virus co-infection. The HCV RNA genotype was confirmed to be 1b in 79 (81%). Median calculated model for end-stage liver disease score at the time of transplant was 14.

All 96 recipients received interferon treatment according to our pre-emptive regimen described above. None presented with fibrosing cholestatic hepatitis at the time of treatment initiation. Overall, at the time of follow-up, 49 (51%) presented with early virologic response (EVR). Sixty-five (67%) patients had negative serum HCV RNA results at least once, among which 52 (54%) patients experienced a non-detectable level of serum HCV RNA for 12 months on treatment (end of treatment response, ETR). Forty-three (44%) patients remained negative for serum HCV RNA for 6 months or longer after cessation of interferon treatment following ETR, and these recipients were considered to have achieved SVR. Consistent with the nature of a treatment protocol without a defined time endpoint, the response rate increased over time. The cumulative rates of SVR and ETR based on the Kaplan-Meier method are 41% and 54%, respectively, 5 years after transplantation.

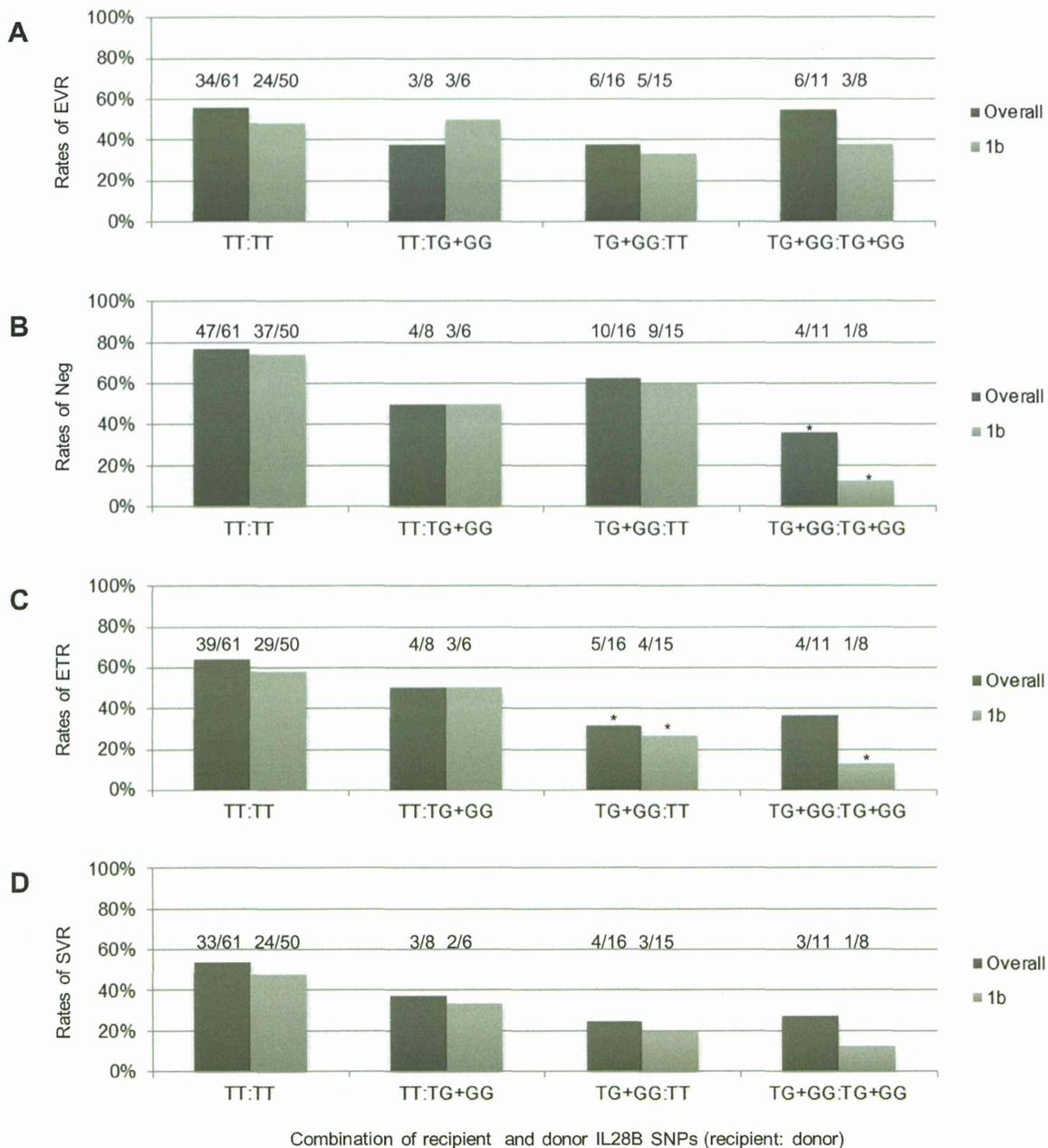


Figure 2. Combination of recipient and donor IL28B rs809917 SNPs and corresponding rates of viral responses (A–D). A. Rates of EVR, B. Rates of recipients that presented with temporal non-detectable level of serum HCV RNA at least once during the course of INF treatment, C. rates of ETR, D. rates of SVR. Abbreviation: SNPs, single nucleotide polymorphism; SVR, sustained viral response; EVR, early virologic response; Neg, temporal non-detectable level of serum HCV RNA; ETR, end of treatment response. * indicates $p < 0.05$ v.s. combination of major allele both in the recipient and donor (TT:TT) with corresponding background. doi:10.1371/journal.pone.0090462.g002

Frequency of IL28B rs809917 single nucleotide polymorphisms in recipients and donors

The proportion of TT, TG and GG genotypes in recipients was 72%, 28%, and 0%, respectively, whereas TT was the most frequent genotype in donors (80%), followed by genotypes TG (19%) and GG (1%). This distribution did not differ significantly between genotype 1b and the others.

IL28B polymorphism and interferon sensitivity after LDLT

As previously reported, IL28B polymorphisms in both the recipient and donor seemed to be strongly correlated with the sensitivity to interferon treatment. The major allele (TT) in the recipient and donor corresponded to SVR rates of 54% (37 of 69) and 48% (37 of 77), respectively, whereas the presence of the minor allele (TG or GG) corresponded to SVR rates of 26% (7 of 27) and 32% (6 of 19), respectively (Figure 1). Difference of SVR between TT and TG/GG in recipient was statistically significant