

令和元年6月17日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10158

研究課題名(和文) 肝の難病“類洞閉塞症候群”の病態解明と新規予防法・治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of pathophysiology of Sinusoidal Obstruction Syndrome and development of new prevention and treatment methods

研究代表者

田島 秀浩 (Tajima, Hidehiro)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：00436825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝移植後に生じる慢性拒絶やオキサリプラチンなどの抗癌剤による肝障害、造血幹細胞移植後の重篤な肝障害は類洞閉塞症候群(SOS)と呼ばれる原因不明の病態であるが、これらは脾腫などの門脈圧亢進症状を呈しながら中心静脈域(zone 3)を中心として慢性に進行するという共通の特徴を有している。今回の研究ではSOSの原因としてzone 3を中心としたDisse腔内での血管外血小板凝集が大きな役割を担うと仮説を立て、ラットSOSモデルを用いて肝の免疫組織学的検討および電子顕微鏡によりzone 3における血小板のDisse腔内での凝集を確認し、抗血小板薬によりSOS発症が抑制できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血小板は核を持たないため、通常のHE染色では組織内での存在を確認することができず、その重要性は認識されながらもこれまで研究が進展してこなかった。血小板からは様々な成長因子が分泌されることが知られており、血小板が原因であると仮定するとSOS以外にも敗血症時の肝障害や癌の転移など様々な病態を説明することができることから、今後の研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Chronic rejection after liver transplantation, anticancer agents such as oxaliplatin, and hematopoietic stem cell transplantation are cause sinusoid obstruction syndrome (SOS) characterized by splenomegaly and thrombocytopenia, resulting in liver dysfunction. SOS have the common feature of progressing chronically around the central vein (zone 3). If it is hypothesized that extravascular platelet aggregation in the Disse's space cause of SOS, it will be possible to unify the series of pathogenesis that accompanies SOS. In this study, we aimed to confirm the state of platelet aggregation with rat SOS model and to examine the preventive effect of antiplatelet drug on SOS. We made rat SOS model with monocrotaline and discovered the presence of platelet aggregation in the Disse's space around central vein (zone 3) with immunohistological examination and electron microscopy, and also certified that antiplatelet drug (cilostazol) has preventive effect for SOS.

研究分野：肝胆膵・移植外科学

キーワード：肝類洞閉塞症候群 血小板 veno-occlusive disease シロスタゾール

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝移植後に生じるいわゆる慢性拒絶反応や一部の抗癌剤による肝障害、造血幹細胞移植後の重篤な肝障害は肝類洞閉塞症候群 (SOS: sinusoidal obstruction syndrome) と呼ばれる原因不明の病態であるが、これらは脾腫や血小板低下などの門脈圧亢進症状を呈しながら中心静脈域 (zone 3) を中心として慢性に進行するという共通の特徴を有している。SOS における血小板の減少は門脈圧亢進症による脾機能亢進症の結果と考えられてきたが、オキサリプラチンによる化学療法を行った大腸癌症例の検討では比較的早期から血小板の低下が認められている。SOS の原因として肝組織内での血小板凝集が関与していると仮説を立てると SOS に伴って生じる一連の病態を一元的に説明することが可能となる。我々は予備実験として肝移植後慢性拒絶症例、オキサリプラチンによる化学療法後肝切除症例において血小板の局在を免疫組織学的に検索し、肝の類洞外 (Disse 腔) への血小板凝集が zone 3 を中心に認める傾向を見出し、この血管外血小板凝集を EPA (extravasated platelet aggregation) と名付けた。

2. 研究の目的

血小板から分泌される様々な成長因子 (thromboxane-A₂、TGF- β 、VEGF-A、PAI-1 など) の作用により中心静脈は収縮を生じて類洞内圧および門脈圧の上昇を生じるとともに、zone 3 を中心とした線維化が促進されて Disse 腔における物質交換も障害を受け、肝再生も障害を受ける。これが SOS の病態であり、血清ビリルビン値の上昇、門脈圧亢進症状や ICG 排泄遅延を生じて重症例では肝不全に至る病態を一元的に説明することが可能である。今回の研究ではラット SOS モデルを用いて血小板の関与を検討することを目的とし、さらに抗血小板薬による SOS 抑制あるいは予防効果についても検討した。

3. 研究の方法

1) ラット SOS モデル

Wistar 系、雄性ラット (230-300g) を対象として SOS モデルとして確立している monocrotaline (MCT) 経口投与方法によりモデルを作成した (3)。抗血小板薬としては phosphodiesterase (PDE)-III 阻害剤である cylostazol (CZ) を用いた。具体的にはラットを 10 匹ずつ 3 群に分け、MCT 投与群には 12 時間の絶食後に MCT (和光薬品) を 90mg/kg 経口投与し、何も投与しない Control 群には溶媒のみを投与した。MCT+CZ 投与群においては MCT 投与の 48 時間前、24 時間前、30 分前、8 時間後、24 時間後に CZ (大塚製薬) 30mg/kg を経口投与し、Control 群および MCT 投与群には溶媒のみを投与した。

すべてのラットは MCT 投与後 48 時間で犠牲死させ、血液及び組織の採取を行った。

2) 血液生化学的検査

ラットから採取した血液を用いて白血球数 (WBC)、ヘモグロビン値 (Hb)、血小板数 (PLT) を自動血球測定器 (Celltac MEK-6458; 日本光電) を用いて測定した。生化学的検索は SRL 社にて aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), 総ビリルビン値 (T-Bil), 直接ビリルビン値 (D-Bil), lactate dehydrogenase (LDH) およびヒアルロン酸 (HA) を測定した。

3) 組織学的検索

肝組織は 10% 中性ホルマリンを用いて固定し、パラフィン包埋から HE 染色を行って評価した。

4) 免疫組織学的検討

包埋した肝組織は抗 rat endothelial cell antigen 1 (RECA-1) 抗体 (Serotec, Oxford, UK)、抗 CD41 抗体 (Biorbyt, Cambridge, UK) に対して Dako Envision system (Dako, Carpinteria, USA) を用いた免疫組織学的検索を行った。

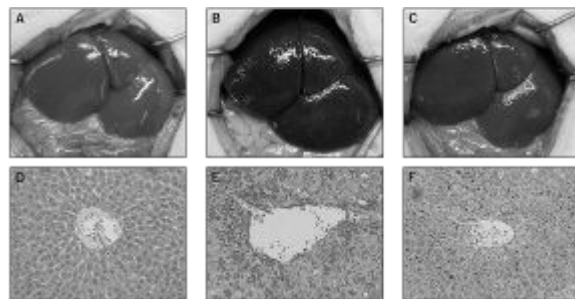
5) 電子顕微鏡検査

ラットの肝臓を 1mm 程度に細切り、2% パラホルムアルデヒドと 2.5% グルタルアルデヒドを混合した固定液で固定し、1% オスミウムで後固定を行い、1% 酢酸ウラニルで電子染色したのち、脱水してエポン樹脂に包埋した。銅製グリッド上の超薄切片を、酢酸ウラニルと鉛塩で二重染色し、透過電子顕微鏡 (H7650; 日立) を用いて観察した。

4. 研究成果

1) 肝の肉眼所見と HE 染色組織像

MCT 投与群の肝は Control 群に比して肉眼的に暗褐色に変化し、腹水も多量に認められた。これは臨床的にオキサリプラチン投与症例に見られる blue liver に類似した変化であると考えられた。これに対して MCT+CZ 投与群においては肝の色調変化が抑制され、腹水も減少を認めた (図中 A-C)。組織学的に MCT 投与群では中心静脈周囲を中心として広範囲の鬱血、間質に浮腫などを認め、SOS 所見と考えられた。これに比して MCT+CZ 投与群においては内皮障害や鬱血の程度が軽度であった (図中 D-F)。



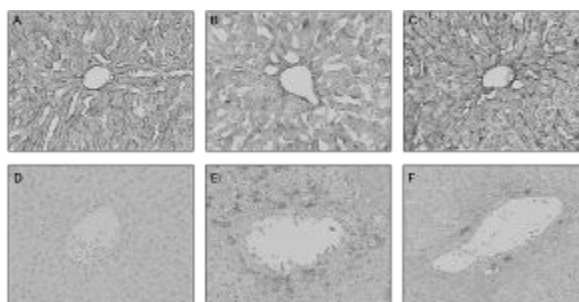
2) 血液生化学的所見

血液検査所見上、MCT 投与群においては Control 群に比して末梢血中の白血球および血小板の低下を認めたが、MCT+CZ 投与群においては白血球および血小板の低下を有意に抑制した。ヘモ

グロビン値に有意な変化は認めなかった。
生化学的所見において MCT 投与群では AST、ALT、T-Bil、D-Bil、LDH、HA すべてにおいて正常値からの上昇を認めたが、MCT+CZ 投与群においてはすべての上昇が有意に抑制された。

3)免疫組織学的所見

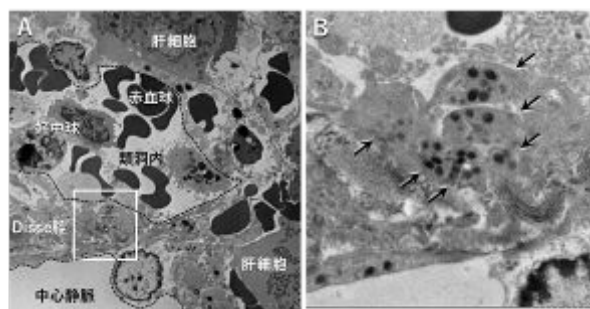
ラット正常血管内皮細胞が特異的に染色される RECA-1 は Control 群では類洞内皮と中心静脈が均一に染色されたが、MCT 投与群においては血管内皮障害を反映して全体的に染色性が低下していた。MCT+CZ 投与群においては染色性が保たれており、血管内皮障害が軽減されていることが示唆された(図中 A-C)。



ラットの血小板表面抗原である CD41 の発現は Control 群においてはほとんど認められないが、MCT 投与群の中心静脈周囲に染色され、血小板凝集の可能性が示唆された。MCT+CZ 投与群においては CD41 抗原の染色性が MCT 投与群に比して低下しており、血小板凝集が抑制されていた可能性が示唆された(図中 D-F)。

4)電子顕微鏡所見

MCT 投与群の肝を電子顕微鏡で観察すると、複数の顆粒を含む血小板が肝細胞や中心静脈壁に接して存在していることが確認された。赤血球、好中球などが存在する類洞と肝細胞とは Disse 腔によって通常は隔てられており、血小板が肝細胞と接触して存在している事実から血小板は Disse 腔に存在していると推察された(図中 B は A の白四角部の拡大)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Miyata T, Tajima H, Hirata M, et al: Phosphodiesterase III inhibitor attenuates rat sinusoidal obstruction syndrome through inhibition of platelet aggregation in Disse's space. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 査読あり 33 巻、2018、950-957 DOI:10.1111/jgh.14004

Hirata M, Tajima H, Miyashita T, et al: Extravasated platelet aggregation in the livers of rats with drug-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome. *MOLECULAR MEDICINE REPORTS*, 査読あり 15 巻、2017、3147-3152 DOI: 10.3892/mmr.2017.6407

田島秀浩、太田哲生、平田美紀ほか: 肝類洞閉塞症候群の発生における血管外血小板凝集の関与. *BIO Clinica*, 査読あり 32 巻、2017、74-79

〔学会発表〕(計 3 件)

田島秀浩ほか: 肝類洞閉塞症候群の発生における血管外血小板凝集の関与. 日本消化器病学会総会 2018 年

田島秀浩ほか: 肝類洞閉塞症候群の発生における血管外血小板凝集の関与に関する実験的研究. 日本消化器外科学会総会 2018 年

〔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:
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織：金沢大学 消化器・腫瘍・再生外科学 (surg2.w3.kanazawa-u.ac.jp/)

(1)研究分担者

研究分担者氏名：太田哲生
ローマ字氏名：Tetsuo Ohta
所属研究機関名：金沢大学
部局名：医学系
職名：教授
研究者番号(8桁)：40194170

(2)研究分担者

研究協力者氏名：宮下知治
ローマ字氏名：Tomoharu Miyashita
所属研究機関名：金沢大学
部局名：附属病院
職名：講師
研究者番号(8桁)：30397210

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。