

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：87502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10169

研究課題名(和文) 肝内微小循環改善と脾機能制御による肝硬変症に対する革新的集学的治療法の確立

研究課題名(英文) Multidisciplinary treatment focusing on impaired intrahepatic microcirculation and splenic dysfunction in liver cirrhosis and portal hypertension

研究代表者

川中 博文 (Kawanaka, Hirofumi)

独立行政法人国立病院機構別府医療センター(臨床研究部)・臨床研究部・臨床研究部長

研究者番号：10363334

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)：肝内微小循環障害の改善と脾機能制御による肝硬変に対する治療法の開発を目的とした。(1)類洞内皮細胞機能障害におけるEndothelial-mesenchymal transition (EndMT)の関与：Tie-2 GFP、Tie-2 LacZマウスを用いた肝硬変モデルにて、EndMTの関与の可能性は少ないと考えられた。(2)類洞内皮細胞へのshear stress増加によるNO分泌の改善：シャント閉鎖による門脈血流増加により肝静脈NO濃度が増加した。(3)血管新生からみた脾機能制御：VEGF受容体阻害剤により肝硬変において脾サイズは縮小し、血管新生制御による脾腫改善の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Portal hypertension with liver cirrhosis is characterized by impaired intrahepatic microcirculation with sinusoidal endothelial cell (SEC) dysfunction and portal hypertensive splenopathy. We herein aimed to investigate whether endothelial-mesenchymal transition (EndMT) is associated with SEC dysfunction; whether increased shear stress in portal circulation by B-RTO affects NO concentration in hepatic vein blood; and whether splenomegaly is related to splenic neovascularization. In cirrhotic models with Tie-2 GFP and Tie-2 LacZ mouse, EndMT was not likely to be associated with SEC dysfunction. Augmented portal shear stress by B-RTO increased NO concentration in hepatic vein blood. Decreased neovascularization by Sorafenib (anti-VEGFR agent) shrank splenic volume and vein. In conclusion, therapeutic strategy focusing on impaired intrahepatic microcirculation and controlling splenic function may provide a feasible multidisciplinary treatment of liver cirrhosis and portal hypertension.

研究分野：消化器外科学

キーワード：脾門脈外科 門脈圧亢進症 脾機能亢進症 類洞内皮細胞 EndMT 肝内微小循環障害 脾腫

## 1. 研究開始当初の背景

非代償性肝硬変の生命予後の改善のためには、食道胃静脈瘤出血・門脈血栓・腹水貯留・肝性脳症・脾機能亢進症などの門脈圧亢進症の制御が重要である。本邦における食道胃静脈瘤に対する内視鏡治療や血管塞栓術(B-RTO)は世界に誇れる治療法であるが、あくまでも局所的治療法である。門脈圧亢進症の成因として、(1)肝内微小循環障害による肝内血管抵抗増大、(2)門脈流入血流増大、(3)肝脾相関が考えられおり、非代償性肝硬変の生命予後の改善のためには、門脈圧亢進症の成因を考慮した集学的治療法の開発が必要である。

## 2. 研究の目的

肝硬変における微小循環障害ならびに肝脾相関の分子機序を解明し、肝内微小循環障害の改善のための脾機能制御を含めた革新的集学的治療法の開発を行うことを目的とした。

### 【1. 肝内微小循環障害の分子機序解明と治療への展開】

(1-1: 類洞内皮細胞機能障害における Endothelial-mesenchymal transition (EnMT)の関与についての研究)

炎症, mechanical stress, hypoxia などの血管への injury や TGF- $\beta$ , FGF, EGF, Notch/delta, WNT などが, EndMT の引き金と考えられており、肝硬変における類洞内皮細胞においては、low shear stress, hypoxia, 高 TGF- $\beta$  状態にさらされていることが知られており、EnMT を引き起こしている可能性が考えられた。そこで、肝硬変症における類洞内皮細胞機能障害の原因として、EndMT の影響について検討した。

(1-2: 類洞内皮細胞への shear stress 増加による NO 分泌シグナルの改善についての研究)

肝硬変症の類洞血流は低下しており、類洞内皮細胞にかかる shear stress の低下は、更なる eNOS シグナルの低下による NO 分泌障害につながると考えられるため、強制的に門脈血流を増加させることで eNOS-NO 分泌シグナルの改善による肝内微小循環障害改善の可能性について検討した。

### 【2. 肝脾相関のメカニズムの解明と脾機能制御による肝機能の改善】

肝硬変症においては、脾全体として脾静脈血流が増大し、門脈流入血流増大に関与していることは知られているが、脾が何故腫大するかは不明である。側副血行路の発達には VEGF と関連することが知られており、本研究では脾の腫大を血管新生と捉え、脾腫大における VEGF などの血管新生因子の関与と同時に、そ

の制御法について検討した。

## 3. 研究の方法

(1-1)内皮細胞由来の細胞が GFP を発現する Tie-2 GFP マウスおよび内皮細胞由来の細胞が生涯にわたり LacZ を発現する Tie-2 LacZ マウスを用いて肝硬変モデルを CCl<sub>4</sub> にて肝硬変モデルを作成し、肝類洞内皮細胞において EndMT を認めるか否かを検討した。

(1-2)胃静脈瘤あるいは肝性脳症に対して B-RTO によるシャント塞栓術を施行した肝硬変症 25 例において、肝静脈圧 (HVPR, Hepatic vein pressure gradient) (cmH<sub>2</sub>O)、門脈血流速度 (portal flow velocity) (cm/sec)、肝静脈血中 NO<sub>x</sub>(NO 代謝産物)濃度および Endothelin-1 濃度の変化について検討した。

(2) VEGF 受容体や PDGF 受容体のチロシンキナーゼ活性を阻害することが知られているソラフェニブを投与した切除不能肝癌を有する肝硬変症 14 例において、血球数・肝機能の変化、CT による脾サイズおよび脾静脈系の変化について検討した。

## 4. 研究成果

(1-1) Tie-2 GFP マウスを用いて、初代培養した類洞内皮細胞に TGF- $\beta$  を負荷したところ、CD31 発現は低下し、 $\alpha$ -SMA 発現は増加したことより、類洞内皮細胞は TGF- $\beta$  刺激により EndMT を起こしうることが分かった。Tie-2 LacZ マウスを用いた肝硬変モデルにて、初代培養された線維芽細胞の多くが LacZ を発現しており、肝硬変由来の線維芽細胞には内皮細胞由来の細胞が含まれていることが確認できた。Tie-2 GFP マウスおよび Tie-2 LacZ マウスを用いた肝硬変モデルを免疫組織染色したところ、Xgal 染色と  $\alpha$ -SMA との二重染色および、GFP と  $\alpha$ -SMA との二重染色で Merge する細胞を認めた。

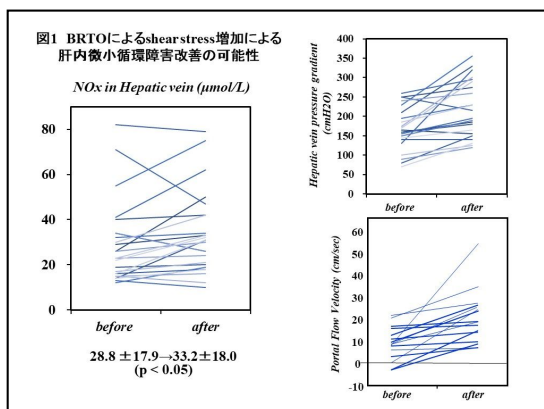
しかし、Tie-2 GFP マウスおよび Tie-2 LacZ マウスを用いた肝硬変モデルからの類洞内皮細胞の FACS 解析では、EndMT を来したと考えられる細胞が Tie-2 LacZ マウスでは認められず、Tie-2 GFP マウスでは微量だが確認できたことより、EndMT は起こっていても少数であると考えられた。

そこで、骨髄細胞由来の Tie-2 発現 (GFP 陽性) 細胞を除去するために、ワイルドタイプの骨髄細胞を移植し、血管内皮細胞のみに Tie-2 発現 (GFP 陽性) するモデルを作成し、肝硬変モデルを免疫組織染色したところ、Tie-2 発現 (GFP 陽性) 細胞は類洞周囲には存在しなかった。

以上より、肝硬変症における類洞内皮細胞機能障害においては EndMT の関与の可能性

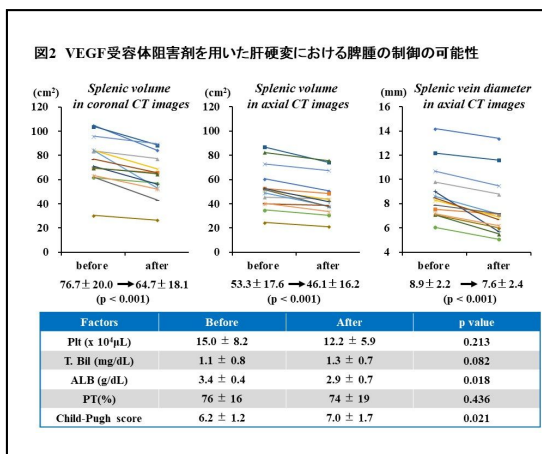
は少ないと考えられた。

(1-2) シャントの塞栓により門脈圧の指標である HVPG は、170cmH2O から 220cmH2O と平均 35%増加したが、超音波ドプラによる門脈血流速度 (portal flow velocity) は、9.1 cm/sec から 20.5cm/sec と有意に増加しており、門脈うっ血だけではなく、門脈の shear stress も増加したと考えられた。さらに、肝静脈血中 Endothelin-1 濃度に大きな変化は認めなかったが、NOx 濃度は、29  $\mu\text{mol/L}$  から 33  $\mu\text{mol/L}$  へと有意に増加していた。シャントを閉鎖することで、胃静脈瘤や肝性脳症の治療となるだけでなく、強制的に門脈における shear stress を増やすことで、肝内微小循環におかえる NO 分泌が改善し、肝硬変症における微小循環障害の改善の可能性が示唆された (図 1)。



(2) ソラフェニブ 800mg/日、2~24 ヶ月 (平均 5.4 ヶ月) の投与期間で、病状の悪化により肝機能は悪化したにもかかわらず、coronal CT による脾面積は 77cm<sup>2</sup> から 65cm<sup>2</sup> と平均 16%減少 (p < 0.001)、axial CT による脾面積は 53cm<sup>2</sup> から 46cm<sup>2</sup> と平均 14%減少 (p < 0.001)、脾静脈径も 8.9mm から 7.6mm と平均 15%減少した (p < 0.001) (図 2)。

VEGF などの血管新生シグナルが肝硬変症における脾腫の原因の一つであり、血管新生制御により脾腫は改善する可能性があることが示唆された。



## 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 12 件)

1. Takeishi K, Kawanaka H, Itoh S, Harimoto N, Ikegami T, Yoshizumi T, Shirabe K, Maehara Y. Impact of Splenic Volume and Splenectomy on Prognosis of Hepatocellular Carcinoma Within Milan Criteria After Curative Hepatectomy. World J Surg (査読有) 42(4):1120-1128, 2018.

2. Hidaka H, Kokubu S, Sato T, Katsushima S, Izumi N, Igura T, Asahara S, Notsumata K, Osaki Y, Tsuji K, Kawanaka H, Akahoshi T, Hirota S, Matsutani S. NPB-06 study group. Antithrombin III for portal vein thrombosis in patients with liver disease: A randomized, double-blind, controlled trial. Hepatol Res (査読有) 48(3):E107-E116, 2018.

3. Kawanaka H, Akahoshi T, Nagao Y, Kinjo N, Yoshida D, Matsumoto Y, Harimoto N, Itoh S, Yoshizumi T, Maehara Y. Customization of laparoscopic gastric devascularization and splenectomy for gastric varices based on CT vascular anatomy. Surg Endosc (査読有) 32(1):114-126, 2018.

4. 長尾吉泰、赤星朋比古、川中 博文、吉住朋晴、橋爪 誠、前原喜彦。腹腔鏡下脾臓摘出術。手術 (査読無) 72(4):561-567, 2018.

5. Itoh S, Uchiyama H, Ikeda Y, Morita K, Harada N, Sugimachi K, Kawanaka H, Korenaga D, Yoshizumi T, Takenaka K, Maehara Y. Post-hepatectomy Refractory Ascites in Cirrhotic Patients with Hepatocellular Carcinoma: Risk Factor Analysis to Overcome this Problematic Complication. Anticancer Res (査読有) 37(3):1381-1385, 2017.

6. Tsutsumi N, Tomikawa M, Akahoshi T, Kawanaka H, Ota M, Sakaguchi Y, Kusumoto T, Ikejiri K, Hashizume M, Maehara Y. Pancreatic fistula after laparoscopic splenectomy in patients with hypersplenism due to liver cirrhosis: effect of fibrin glue and polyglycolic acid felt on prophylaxis of postoperative complications. Am J Surg (査読有) 212(5):882-888, 2016.

7. 川中博文、赤星朋比古、金城直、吉田大輔、松本佳大、吉田佳弘、伊藤心二、播本憲史、山下洋市、池上徹、吉住朋晴、前原喜彦。外科的アプローチによる門脈圧亢進症治療 - 脾機能制御の意義について - 肝胆膵 (査読無) 72(2):337-344, 2016 .

8. 川中博文、赤星朋比古、松本佳大、吉田佳

弘、長尾吉泰、橋本直隆、吉田大輔、金城直、山口将平、富川盛雅、前原喜彦。胃静脈瘤に対する腹腔鏡下 Hassab 術の手技の工夫 日本門脈圧亢進症学会雑誌(査読有)22:251-258, 2016.

9. 赤星朋比古、川中博文、橋爪誠、前原喜彦。門脈圧亢進症患者における脾臓摘出術が免疫に及ぼす影響について 肝胆膵(査読無)72(2):331-336, 2016 .

10. Kawanaka H, Akahoshi T, Kinjo N, Harimoto N, Itoh S, Tsutsumi N, Matsumoto Y, Yoshizumi T, Shirabe K, Maehara Y. Laparoscopic Splenectomy with Technical Standardization and Selection Criteria for Standard or Hand-Assisted Approach in 390 Patients with Liver Cirrhosis and Portal Hypertension. J Am Coll Surg (査読有) 221(2):354-366, 2015.

11. Wang H, Ikegami T, Harada N, Yoshizumi T, Soejima Y, Uchiyama H, Yamashita Y, Itoh S, Harimoto N, Kawanaka H, Shirabe K, Maehara Y. Optimal changes in portal hemodynamics induced by splenectomy during living donor liver transplantation. Surg Today (査読有) 45(8):979-985, 2015.

12. Hu Q, Takeishi K, Yamashita Y, Ikeda T, Wang H, Itoh S, Harimoto N, Ikegami T, Yoshizumi T, Kawanaka H, Shirabe K, Maehara Y. Splenectomy Followed by Hepatectomy for Hepatocellular Carcinoma with Hypersplenism and Portal Hypertension Caused by Macroglobulinemia. Anticancer Res (査読有) 35(7):4077-4081, 2015.

〔学会発表〕(計4件)

1. 川中博文、赤星朋比古、長尾吉泰、伊藤心二、播本憲史、池上徹、吉住朋晴、前原喜彦. Child-Pugh B、C 肝硬変に対する脾摘の効果について 第 24 回日本門脈圧亢進症学会総会 2017 年 9 月 15 日

2. 川中博文、赤星朋比古、天野翔太、久保信英、増田崇、廣重彰二、松本敏文、鶴田悟、酒井浩徳. ソラフェニブの脾腫に及ぼす影響について～脾腫のメカニズムの考察～ 第 23 回日本門脈圧亢進症学会総会 2016 年 9 月 9 日～10 日

3. 川中博文、赤星朋比古、長尾吉泰、吉田佳弘、吉田大輔、橋本直隆、上原英雄、伊藤心二、播本憲史、池上徹、吉住朋晴、前原喜彦. 肝硬変症に対する脾摘の長期成績について 第 23 回日本門脈圧亢進症学会総会 2016 年 9 月 9 日～10 日

4. 川中博文、赤星朋比古、松本佳大、吉田佳弘、伊藤心二、播本憲史、池上徹、吉住

朋晴、前原喜彦. 脾摘による C 型肝硬変における肝発癌および予後への影響についての検討 第 27 回日本消化器癌発生学会総会 2016 年 9 月 16 日

〔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  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川中 博文 (KAWANAKA HIROFUMI)  
独立行政法人国立病院機構  
別府医療センター 臨床研究部 部長  
研究者番号：10363334

### (2) 研究分担者

赤星 朋比古 (AKAHOSHI TOMOHIKO)  
九州大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：20336019

下田 慎二 (SHIMODA SHINJI)  
九州大学・大学病院・准教授  
研究者番号：30279319

前原 喜彦 (MAEHARA YOSHIHIKO)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号：80165662

### (3) 研究協力者

なし