

機関番号：24601

研究種目：基盤研究 C

研究期間：平成 20 年度～平成 22 年度

課題番号：20590793

研究課題名（和文） 肝硬変腹水病態への腹腔マクロファージと反応性中皮細胞の関与

研究課題名（英文） Involvement of peritoneal macrophages and reactive mesothelial cells in pathological status of cirrhotic ascites

研究代表者

山崎 正晴 (YAMAZAKI MASAHARU)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60360054

研究成果の概要（和文）：

肝硬変腹水中における主要な細胞成分である腹腔マクロファージと反応性中皮細胞の共培養上清において、強力な血管透過性因子であり腹水の難治化への関与が報告されている VEGF-A の産生が腹腔マクロファージ単独培養の上清に比して著明に亢進すること、また、腹腔マクロファージと反応性中皮細胞の混在する比率によって、腹腔内の環境に大きな影響を与える炎症性サイトカインのプロファイルが変化することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we found that high VEGF-A concentration was observed in the medium in a co-culture of peritoneal macrophages and reactive mesothelial cells, which are major cellular components in ascites of cirrhotic patients. Moreover it was revealed that the ratio of peritoneal macrophages and reactive mesothelial cells could influence inflammatory cytokines profile in the culture medium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	500,000	150,000	650,000
平成 21 年度	500,000	150,000	650,000
平成 22 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・肝臓学

キーワード：肝硬変, 腹水

1. 研究の背景

門脈圧亢進症のうち肝類洞内圧の上昇を来す病態で腹水の出現が認められ、その成立過程には門脈圧亢進と腎での Na・水貯留が重要であるが、神経および体液性因子が複雑に関与しており、その正確な機序は現在でも十

分には解明されていない。また、肝硬変腹水の約 10% に塩分摂取制限と利尿剤投与に反応しない、いわゆる難治性腹水が存在する。この治療抵抗性の腹水に対して腹水濃縮再静注法、経皮的肝内門脈静脈短絡術(TIPS)、腹腔頸静脈シャント術などが試みられるが、その効果が不十分であったり、重篤な副作用

を生じる可能性から未だ標準的治療とは言い難い。難治性腹水は末期肝硬変患者の QOL を著しく損なうだけでなく、続発する特発性細菌性腹膜炎を含む SIRS や腎機能障害にも密接に関連し患者の予後に重大な影響を及ぼすが、その発症の機序も明らかにされていない。我々は腹水が難治化する過程について腹腔内環境の変化が関与すると仮説を立て、その要因として腹膜の血管透過性と腹膜リンパ系の腹水吸収機構に着目して研究を重ねてきた。これまでの研究成果としてヒスタミンの 5 万倍の血管透過性を示す VEGF-A が難治性腹水において非難治例に比し有意に高値を示すこと、腹膜リンパ組織の構築に影響を与えると考えられるリンパ管増殖因子の VEGF-C の腹水中濃度が腹水貯留の長期化に伴い漸減傾向を示し、また、腹水難治化の指標と考えられる尿中ナトリウム濃度と腹水 VEGF-C の間に有意な順相関を認めたことを報告してきた。これらの腹水中における VEGF ファミリーの由来細胞は腹腔マクロファージと考えられている。腹腔マクロファージは肝硬変腹水の沈渣における主要な細胞成分のひとつで、腹水中の様々な異物の貪食だけでなく bacterial translocation によって滲出した細菌もしくは細菌成分を取り込むことによって他の免疫担当細胞と共同して腹腔内や全身の免疫反応に影響を及ぼすことが報告されている。腹水沈渣に含まれるもうひとつの細胞成分として反応性中皮細胞が挙げられる。反応性中皮細胞は肝硬変腹水に比較的特徴的に出現することが知られており、その形態的特徴から悪性細胞との鑑別についての研究は詳細になされているが、肝硬変や腹水そのものの病態との関連についての報告は少ない。一方で腹膜透析患者における腹膜機能と腹膜透析液中の中皮細胞との関連が近年報告されており、腹腔壁を構成するだけに止まらない中皮細胞の腹腔内環境への関与が注目されている。そこで今回我々は、肝硬変腹水に浮遊する主要な細胞成分である腹腔マクロファージと反応性中皮細胞との相互関係に焦点をあて、それらがサイトカイン・ケモカインを介して腹腔内環境の恒常性にどのように影響するかについて検討を行うことを計画した。

2. 研究の目的

腹腔マクロファージおよび反応性中皮細胞を培養系に移行し、マクロファージ活性化因子 (LPS [Lipopolysaccharide], IFN- γ) の存在下もしくは非存在下における VEGF 産生能, NO (Nitric oxide) 産生能および炎症性サイトカイン産生能について観察し、腹水病態に関連したこれらの因子の動態についての今までの知見との関連について検討する。

3. 研究の方法

(1) 研究対象と材料

当施設における医の倫理委員会の承認を得た実施計画に基づいて、慢性に大量腹水を有する肝硬変患者からインフォームドコンセントを文書で取得し、症状緩和目的の腹腔穿刺排液時にその腹水の一部 (1000~1500ml) を無菌的に採取し、遠心後その沈渣を回収した。

(2) 細胞培養

腹水沈渣を単核球・リンパ球分離用試薬を用いて分離された細胞成分と沈渣そのものを直接培養系に移行した場合に得られた細胞成分を比較検討した。また、①10%FBS 添加 M199 培地および、②マクロファージ・単球用無血清培地で培養し付着細胞のみを継代して得られる細胞成分についても検討を行った。

(3) 細胞培養上清の分析

細胞培養上清の VEGF-A、総窒素酸化物濃度は ELISA によって測定した。また、上清中の炎症性サイトカインのプロファイルとその定量はマルチプルプロテインアレイを用いて測定した。

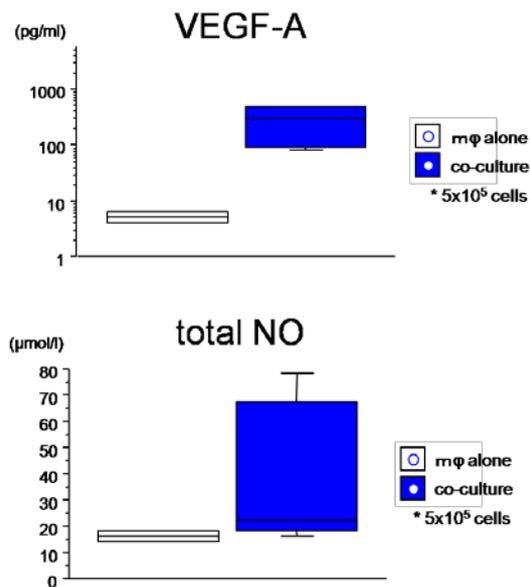
4. 研究成果

(1) 回収した腹水沈渣中の有核細胞成分の 90% 以上が生細胞であることをトリパンブルー染色により確認し、①単核球・リンパ球分離用試薬を用いて分取した単核球成分からなる細胞群と、②赤血球成分のみ取り除いた細胞群に分け、コートされていないプラスチックディッシュ上で培養し、付着細胞のみを回収した。単核球成分からの付着細胞群は免疫染色で CD14 陽性・サイトケラチン陰性を示すマクロファージであることが示され、単核球分離を経ずに得られた付着細胞群はマクロファージのみならず CD14 陰性・サイトケラチン陽性の中皮細胞も混じていることが示された。このマクロファージ単独群およびマクロファージ・中皮細胞混在群を①無添加、②LPS 添加、③IFN- γ 添加後 24 時間培養し、その上清中の総窒素酸化物および VEGF-A を ELISA にて定量した。

その結果、①マクロファージ単独群に比してマクロファージ・中皮細胞混在群で VEGF-A が著明に高値を示した。総窒素酸化物もマクロファージ単独群に比してマクロファージ・中皮細胞混在群で高い傾向を示したが両群に有意差を認めなかった。(図 1)

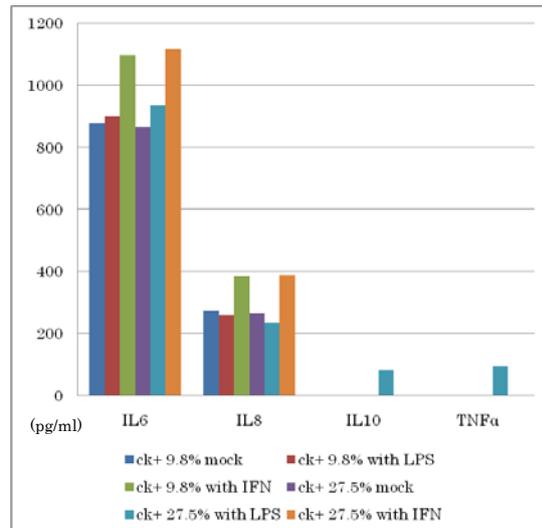
②両群とも総窒素酸化物は LPS 刺激および IFN- γ 刺激により上昇を認めたが、VEGF-A はこれらの刺激による変化は認められなかった。以上の結果から、VEGF-A はマクロファージと中皮細胞が相互作用してその産生が亢進し、それが NO に関与しない機序で起こる可能性が示唆された。

[図 1]



(2)回収した沈渣中の有核細胞成分の 90%以上が生細胞であることをトリパンブルー染色により確認し、コートされていないプラスチックディッシュ上で①10%FBS 添加 M199 培地および、②マクロファージ・単球用無血清培地で培養し付着細胞のみを継代した。両群の培養細胞を回収し、フローサイトメトリーで解析したところ、腹膜中皮細胞と考えられるサイトケラチン陽性細胞の割合は①で 9.8%，②で 27.5%であった。また、上記①②の培養系に LPS もしくは IFN- γ 添加し 20 時間後の培養上清中の炎症性および抗炎症サイトカインをマルチプルプロテインアレイで定量した。その結果、LPS および IFN- γ 添加による培養上清中の IL-6 および IL-8 の上昇には①②の培養系に間に差異を認めなかったが、LPS 刺激下において①では検出されなかった TNF- α と IL-10 の上昇が②で認められた (図 2)。以上より、肝硬変腹水から分離された付着性細胞群における腹膜中皮細胞 (サイトケラチン陽性細胞) の占有率の増加と炎症性サイトカインである TNF- α とそのカウンターバランスを担うとされる抗炎症性サイトカイン IL-10 の上昇との関連が示唆され、腹膜中皮細胞と腹腔マクロファージが相互作用して炎症性・抗炎症性サイトカイン産生のプロファイルに影響する可能性が示された。

[図 2]



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 3 件)

①Tanaka S, Yamazaki M, Okamoto Y. Determination of advanced glycation end-products on IgG in liver cirrhosis. Hepatogastroenterology. 56:1735-1737, 2009. 査読有

②植村正人, 山崎正晴, 福井博. 劇症肝炎, 亜急性肝炎, 肝不全, 肝性昏睡, 肝不全【肝・胆道系症候群(第 2 版)その他の肝・胆道系疾患を含めて 肝臓編(上)】日本臨床 別冊肝・胆道系症候群 I, 2010, 302-311. 査読無

③Yamazaki M, Okamoto Y, et al (他 6 名) Rapid Detection of Spontaneous Bacterial Peritonitis by Granulocyte Elastase Latex Immunoassay and Reagent Strip. 臨床病理 2011, in press. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

①山崎正晴. 肝硬変腹水におけるアディポネクチンの検討. 第 56 回日本臨床検査医学会学術集会. 2009 年 8 月 28 日. 札幌コンベンションセンター

②山崎正晴. 腹水顆粒球エラストラーゼと肝硬変腹水病態. 第 13 回日本肝臓学会大会 (JDDW 2009). 2009 年 10 月 15 日. 国立京都国際会館

③山崎正晴. 進行した門脈腫瘍塞栓合併肝細胞癌症例における腹水の病態と治療. 第 38 回日本肝臓学会西部会. 2009 年 12 月 4 日. 米子コンベンションセンター

④山崎正晴. 消化器がん骨転移症例の臨床. 第52回日本消化器病学会大会 (JDDW 2010). 2010年10月14日. パシフィコ横浜

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 正晴 (YAMAZAKI MASA HARU)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 60360054

(2) 研究分担者

岡本 康幸 (OKAMOTO YASUYUKI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70145879