

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591601

研究課題名（和文） 肝移植後・大量肝切除後の肝再生促進と感染制御の研究
特に好中球機能からみた解析研究課題名（英文） Promotion of Liver Regeneration and Control of Infectious
Complications after Liver Transplantation and Major Hepatectomy.

研究代表者

竹内 男 (TAKEUCHI DAN)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20400822

研究成果の概要（和文）：

ラットの実験において、90%肝切除時には好中球集積を伴う肝実質障害が惹起され、肝再生が抑制され生存率の低下を来していると考えられた。この際、HSCはTGF- β を産生していた。また、肝細胞においてはMRP-2の発現が抑制されていた。70%肝切除時の肝障害は90%肝切除時と比較して軽減されており、Kupffer細胞においてHGFやFGFが産生されていた。肝再生時においては、類洞構成細胞や炎症浸潤細胞が産生する液性因子が重要と考えられた。

肝切除患者において、感染性合併症発症例では、術後3日目における好中球によるIL-1 β 、TNF α 、CCL2産生量が高値であり、CD14⁺ monocyteはM2 macrophageの特性を示した。重篤SIRS発症例では、術前から好中球によるIL-1 β 、TNF α 産生量が高値であった。

マウスの実験において、Steroid投与により肝切除後のウイルス感染時の炎症細胞浸潤は抑制され、また好中球による α -defensinの産生は抑制され、結果としてウイルス感染は持続した。

研究成果の概要（英文）：

In rat model, 90% hepatectomy caused neutrophil dependent liver tissue injury, impaired liver regeneration, resulting in poor survival. This was accompanied by TGF- β production by HSC and suppressed expression of MRP-2 by hepatocytes. Liver tissue injury was attenuated after 70% hepatectomy. Kupffer cells from remnant liver produced HGF and EGF. Humoral agents produced by cells in sinusoidal space were supposed to be important for liver regeneration.

In patients developing infectious complications after hepatectomy, neutrophils produced IL-1 β , TNF α , and CCL2 3 days after surgery, and CD14⁺ monocytes showed properties of M2 macrophages. In patients developing severe SIRS, preoperative neutrophils produced IL-1 β and TNF α .

In murine model, administration of steroids caused impaired recruitment of inflammatory cells to the site of viral infection after hepatectomy. This also caused impaired production of α -defensin by neutrophils resulting in prolonged viral infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝臓外科学

1. 研究開始当初の背景

肝胆道外科学、血管外科学の進歩により、肝疾患末期患者に対する生体肝移植や進行肝胆道癌に対する拡大肝葉切除が広く行われている。临床上において、Small-for-size graft 移植時や大量肝切除後にみられる肝障害、臓器不全への対応や、術後感染症のコントロールは治療成績向上のために重要な点である。

2. 研究の目的

本研究では Small-for-size graft 移植時や大量肝切除後の肝障害発症・肝再生抑制のメカニズムを肝への集積細胞の機能より解明し、また術後の感染性合併症発症の機序について好中球を中心とした自然免疫の面から検討を加え、新たな治療法開発の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肝障害発症・肝再生抑制のメカニズムの解明

臨床的に Small-for-size graft 移植時や大量肝切除後に問題となるのは胆汁鬱滞とそれに続く肝再生抑制である。外科切除や移植時には肝への流入血行遮断により阻血再灌流障害が惹起され、好中球が肝局所に集積活性化して活性酸素や protease を放出する。この好中球は、類洞並びに Disse 腔の構成細胞と直接的または間接的に interaction をすることにより肝再生抑制に寄与している可能性が考えられ、集積好中球と類洞構成細胞並びに肝細胞の相互作用について検討する。

マウスモデルにおいて、肝再生に対する G-CSF の効果は促進的に働く報告と抑制的に働く報告がなされており Controversial である。臨床的には、外科切除や移植時に肝阻血再灌流障害が加わるため、実際の肝再生のメカニズムはさらに複雑になるものと考えられるので、本研究では動物モデルを用いて阻血再灌流後の肝切除時の G-CSF, IL-6 の発現と共に STAT3 の活性を検討する。また、これらの検討後に exogenous に G-CSF を投与することが肝再生にどのように影響を及ぼすかについても検討を加える。

(2) 感染性合併症発症の機序の解明

外科侵襲後の易感染性には Th1/Th2 imbalance が関与しており、宿主が Th2 優位に傾くと感染性合併症を惹起する。また、肝移植後は免疫抑制剤投与による抗原特異的な免疫抑制が必要であり、感染防御の点からは不利となる。したがって術後の感染性合併

症対策には抗原非特異的な自然免疫の賦活が極めて重要であると考えられる。

自然免疫を担う細胞の代表は好中球であり、炎症の場において最も早く出現し異物の食食や破壊を行う一方で次なる高次機能を有するマクロファージ、樹状細胞やリンパ球の集積を誘導する機能をもつ。担癌状態、閉塞性黄疸患者の術前術後の好中球の status を検討し、これを modulation することが出来れば術後感染症合併を軽減することができると予想され、結果として手術成績の向上につながると考えられる。

自然免疫の effector molecule として defensin や cathelicidin などの antimicrobial peptide が好中球の分泌顆粒内に貯蔵されている他、皮膚・気道粘膜・腸管粘膜・口腔粘膜などの上皮細胞で内因性に発現して病原微生物を殺滅することにより生体内に侵入するのを阻止している。一方 defensin や cathelicidin にはマクロファージや DC, T-cell を遊走させる働きもある。本研究では動物実験モデルを用いて移植後ウイルス感染時の defensin 発現と細胞内シグナル伝達について検討する。

4. 研究成果

ラットを用いて脾を腹腔外に皮下に転置して側副血行路を発達させて門脈鬱血を回避するモデルを作成した。このラットに30分間の全肝阻血後、70%もしくは90%肝切除を行った。Transaminaseの値でみた術後肝障害は90%肝切除群で高度であった。肝切除後の生存率は90%肝切除群で低値であった。肝への好中球集積は90%肝切除群で高度であった。肝再生に関与する転写因子の活性は70%肝切除群で有意に増強していた。肝切除後24時間、48時間にBrdUの取り込みとPCNAの免疫染色を行い肝再生について検討したところ、70%肝切除群で有意に肝再生が亢進していた。

同様のモデルで、切除後の残肝より好中球、SEC、Kupffer細胞、HSCを分離し、それぞれ無刺激で24時間培養し、上清中の各種サイトカイン濃度をELISAで測定した。90%肝切除群に於いてHSC培養上清中のTGF-β濃度が高値であった。HGFやFGFは70%肝切除群のKupffer細胞の培養上清中で高値であった。定量PCRによるmessage levelの検討でもELISAと同様の結果が得られた。

normal liver から SEC、Kupffer 細胞、HSC、肝細胞を分離し、これらを切除後の残肝より分離した好中球と共培養して肝細胞の増殖を評価した。70%肝切除群から分離した好中球と共培養した系で肝細胞増殖が良好であ

った。この結果は全ての細胞を同一の Well に加えて細胞同士の接着を可能にさせた群においても、Dual Chamber Transwell System を用いた系でもほぼ同様に認められ、肝細胞増殖には類洞構成細胞との細胞間接着は必須ではなく、液性因子が重要であると推察された。同様のシステムを用いて、好中球と共培養した肝細胞の MRP-2, 3 の発現を免疫組織染色で検討し、胆汁鬱滞との関係性を評価した。90%肝切除後の残肝から分離した肝細胞では 70%肝切除群と比較して MRP-2 の発現が低レベルであり、90%肝切除群に於いてみられる胆汁鬱滞の原因の1つとして考えられた。

肝切除を受ける患者より術前と術後経時的に末梢血採血を行い、CD14⁺ monocyte、CD4⁺ T 細胞と好中球を分離した。好中球を LPS 刺激下に培養し、サイトカイン産生能について BioPlex Suspension Array System を用いて検討した。術後に重篤な SIRS を発症した症例では術前に分離培養した好中球の培養上清中の TNF α や IL-6 などの炎症性サイトカインが有意に高値を示した。また感染性合併症を起こした症例では術後 3 日目の TNF α 、IL-1 β などの炎症性サイトカイン並びに CCL2 などの Th2 誘導性のケモカインが有意に高値を示した。分離した CD14⁺ monocyte より Total RNA を抽出して cDNA を合成し定量 PCR を施行したところ、感染性合併症を発症した症例では mannose receptor mRNA を強く発現していた。サイトカイン産生能については IL-10、CCL17 等を産生し M2 macrophage の特性を示していた。

C57BL/6 マウスに 70%肝切除を施し、その直後より dexamethason を腹腔内へ投与するモデルを作製した。肝切除後 1 日目に herpes simplex virus (HSV) を静注投与により感染させた。感染後 5 日目に測定した血清 α -defensin の濃度は dexamethasone 非投与軍と比較して有意に低値であり、肝・脾・肺組織中の HSV の力価は dexamethasone 投与群において有意に高値であった。

同じモデルで肝・脾・肺組織のパラフィン包埋切片を作製して炎症細胞浸潤を検討した。dexamethasone 投与群においてリンパ球の浸潤が軽微であった。免疫組織化学的に肺での α -defensin の局在を検討したところ、dexamethasone 投与群では肺胞内好中球の特異顆粒内に内包されていた。一方で非投与群においては肺胞内や肺実質内でも確認された。

C57BL/6 マウスの脾よりマクロファージと CD4⁺ T 細胞を、末梢血より好中球を分離した。好中球との共培養下に C57BL/6 マウス由来 II 型肺胞上皮 cell line である T7 に HSV を感

染させ、1 時間後にマクロファージと CD4⁺ T 細胞を添加した。感染 1 日後に測定した培養上清中の α -defensin の濃度は、マクロファージと CD4⁺ T 細胞を添加しない群と比較して有意に高値であった。

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 5 件)

- ① Takeuchi D, Yoshidome H, Kurosawa H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Miyazaki M. Interleukin-18 exacerbates pulmonary injury after hepatic ischemia/reperfusion in mice. J Surg res 2010; 158: 87-93.
- ② Takeuchi D, Jones VC, Kobayashi M, Suzuki F. Cooperative role of macrophages and neutrophils in host antiprotozoan resistance in mice acutely infected with *Cryptosporidium parvum*. Infect Immun 2008; 76: 3657-3663.
- ③ Morita Y, Yoshidome H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Takeuchi D, Mitsuhashi N, Iida A, Miyazaki M. Excessive inflammation but decreased immunological response renders liver susceptible to infection in bile duct ligated mice. J Surg Res 2008; 146: 262-270.
- ④ Kobayashi M, Yoshida T, Takeuchi D, Jones VC, Shigematsu K, Herndon DN, Suzuki F. Gr-1⁺CD11b⁺ cells as an accelerator of sepsis stemming from Pseudomonas aeruginosa wound infection in thermally injured mice. J Leukoc Biol. 2008; 83: 1354-1362.
- ⑤ Takeuchi D, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Nozawa S, Suda K, Nagai M, Hanawa T, Miyazaki M. Successful treatment for pancreatic injury presented with pancreatic ascites 2 months after a blunt abdominal trauma. Hepatogastroenterology 2008; 55: 1834-1837.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 竹内男、吉留博之、高野重紹、木村文夫、清水宏明、大塚将之、加藤厚、吉富秀幸、古川勝規、高屋敷吏、須田浩介、宮崎勝。脂肪肝切除後の肝再生におけるリン酸化シグナルの検討 第 110 回日本外科学会定期学術集会 2010 年 4 月 10 日 名古屋
- ② 竹内男、吉留博之、木村文夫、清水宏明、大塚将之、加藤厚、吉富秀幸、古川勝規、高屋敷吏、須田浩介、高野重紹、横山元昭、宮崎勝。肝胆膵領域の好中球機能と合併症 第 110 回日本外科学会定期学術集会

2010年4月10日 名古屋

- ③ 竹内男、吉留博之、木村文夫、清水宏明、大塚将之、加藤厚、吉富秀幸、古川勝規、三橋登、宮崎勝. 高度脈管侵襲 (Vp3/4・Vv3) を伴う進行肝細胞癌に対する外科治療の意義 第64回日本消化器外科学会総会 2009年7月17日 大阪
- ④ 竹内男、吉留博之、木村文夫、清水宏明、大塚将之、加藤厚、吉富秀幸、古川勝規、三橋登、高屋敷吏、須田浩介、高野重紹、横山元昭、宮崎勝. 肝胆膵領域の好中球機能と合併症 第109回日本外科学会定期学術集会 2009年4月2日 福岡
- ⑤ 竹内男、吉留博之、木村文夫、清水宏明、大塚将之、加藤厚、吉富秀幸、古川勝規、野沢聡志、三橋登、高屋敷吏、須田浩介、高野重紹、宮崎勝. 軽症熱傷により誘導される感染抵抗性についての検討 第108回日本外科学会定期学術集会 2008年5月15日 長崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 男 (TAKEUCHI DAN)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20400822

(2) 研究分担者

宮崎 勝 (MIYAZAKI MASARU)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：70166156
吉留 博之 (YOSHIDOME HIROYUKI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：10312935
大塚 将之 (OHTSUKA MASAYUKI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：90334185
吉富 秀幸 (YOSHITOMI HIDEYUKI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60375631
古川 勝規 (FURUKAWA KATSUNORI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00400987

(3) 連携研究者

なし