

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月16日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591755

研究課題名（和文）肝硬変症における肝内微小循環障害の分子機序の解明と肝機能改善のための治療法の開発

研究課題名（英文）The development of new treatment for improvement of microcirculation in cirrhotic liver

研究代表者

赤星 朋比古（AKAHOSHI TOMOHIKO）

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：20336019

研究成果の概要（和文）：

研究1においては、肝硬変症における肝内微小循環障害の分子機序を解明するために、我々は、血管拡張因子である NO とその活性酵素 eNOS, その調節因子である Rho kinase について、ラット肝硬変モデルで検討したところ、肝硬変においては、肝臓での Rho kinase の活性が上昇しており、そのことが肝臓内での eNOS の活性を低下させ、肝微小循環障害を引き起こしていることを証明した。また脾臓由来の ET-1 が、Rho kinase 活性を促進していることを初めて明らかにした。

研究2においては、血小板中に含まれるセロトニンが肝微小循環に及ぼす影響について検討した。肝臓内にはセロトニンの受容体が正常ラット、肝硬変ラットで同程度に認められた。肝線維化の過程において、血小板中セロトニンは肝再生を促進した。肝再生能が亢進することから、肝線維化が抑制され、結果として肝機能の改善、肝微小循環の改善が得られていた。脾臓摘出術による肝機能改善の機序として、脾臓後の血小板が肝再生、肝微小循環に影響していることを明らかにした。

研究3では、肝臓指向性のナノカプセルを作成し、これに NO 除放剤を搭載することに成功した。肝硬変ラットに投与したところ、肝臓での NO の発現増強を確認することができ、臨床における肝硬変微小循環障害の改善治療としての可能性があることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Study 1. RhoA and Rho kinase expressions were significantly over expressed in cirrhotic liver accompanied with decrease in eNOS activity. Splenectomy significantly reduce portal vein pressure and improved disturbance of microcirculation in the cirrhotic liver. In the liver of cirrhotic rat, Splenectomy also decreased serum ET-1 levels. The ET-1 level was strongly related RhoA activation, and decrease of eNOS phosphorylation. ET-1 derived from the spleen increase intrahepatic resistance by down-regulating Rho signaling in liver cirrhosis.

Study 2. Splenectomy induced thrombocytosis, and increased serotonin content in cirrhotic liver.

Stimulation of liver regeneration was indicated by the following parameters: hepatocyte ratio to the entire liver area, Ki67-positive hepatocyte count, and expression of phosphorylated extracellular signal-regulated kinases. This enhancement of liver regeneration was negated by ketanserin. Our results showed that splenectomy promoted liver regeneration by increasing serotonin content in liver even under cirrhotic conditions.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：肝硬変、肝微小循環

Rho kinase, eNOS

### 1. 研究開始当初の背景

本研究における肝硬変患者は約 30 万人、その予備軍であるウイルス肝炎患者は 200-300 万人と推定され、薬害 C 型肝炎問題とあいまって、厚生労働省により平成 14 年度から「肝炎等克服緊急対策研究事業」による予防・治療方法の研究開発と診療体制の整備、予防や感染経路の遮断などを柱とする総合的な対策が実施されている。慢性肝炎・肝硬変患者の診療において消化管出血・腹水貯留・肝性脳症・脾機能亢進症などの門脈圧亢進症はその予後に影響を与える重要な合併症である。しかしながら門脈圧亢進症に対する治療は食道静脈瘤に対する内視鏡的治療やシャント手術などの対症療法があるのみで、現在のところ肝移植以外に根本的な治療法は存在しない。しかしながら世界的にもドナー不足の問題もあり、さらに生体肝移植が中心の本邦においては、ドナーのリスクの問題や倫理的問題もあり、肝移植は誰もが享受できる一般的な肝硬変症の治療とは言い難い。また、欧米で唯一有効と認められている薬剤であるプロプラノール（ベータブロッカー）は門脈血流を低下させ門脈圧を低下させる薬剤であり、本邦でも我々の努力により保険適応と認められるようになったが、副作用として血圧低下を認め、全例に使用できる薬剤ではない。従って、本邦だけでなく欧米においても肝硬変症に伴う門脈圧亢進症の新しい治療法の開発が必要とされている。

### 2. 研究の目的

本研究においては硬変肝の微小循環障害の分子機序の解明と新しい治療法開発への展開を行うことで、門脈圧を低下させるだけでなく、肝内の微小循環状態と肝線維化の改善により、極的には肝硬変自体を改善する可能性を秘めた新しい治療戦略の開発を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

研究 1：胆管結紮により肝硬変ラットを作成し、脾臓摘出を施行群と非脾摘群において間微小循環の評価および組織学的変化について検討した。また脾摘による血小板の増加がセロトニンを介するかどうかについて 5-HT 阻害剤である ketanserin の投与を行い検討した。

研究 2：胆管結紮により肝硬変ラットを作成し、脾臓摘出術が肝臓微小循環と肝線維化に及ぼす影響について検討した。これまで肝臓の微小循環において重要とされる Rho-kinase の活性化と eNOS の発現について検討した。また、脾臓由来サイトカインとしての微小循環への影響をエンドセリン(ET-1)についての脾臓での発現とともに検討した。

### 4. 研究成果

本研究においては、(1)肝変肝臓における肝微小循環における Rho-kinase の役割 (2)肝微小循環における NO と VEGF の役割 (3) 血小板由来セロト

ニンの肝微小循環への影響 (4)肝星細胞特異的ナノカプセルの作成とこれによる肝微小循環障害改善治療の可能性、について研究を行い以下の成果を得た。

(1) 肝硬変における肝臓微小循環の特殊性の分子機序の解明として Rho-kinase、endothelin-1 の役割について研究を行った。肝硬変モデルラットを作成したところ、硬変肝では Rho-kinase の活性が上昇しており、腫大した脾臓におけるエンドセリンの発現を脾臓 B cell に確認した。脾摘したラットにおいては、Rho-kinase 活性が低下しており、レーザドップラーにおいて肝微小循環の改善を認めた。ヒト臨床における脾摘による肝機能改善の機序として、脾摘による ET-1 の産生の低下が肝臓における肝臓微小循環の改善に寄与していることを初めて見いだした。(2) ラット肝再生モデルにおいて、肝微小循環において重要な肝類洞内皮の検討したところ、類洞内皮の再生が NO 阻害剤である L-NAME により VEGF の発現低下を伴い生じていることが明らかとなった。肝類洞内皮の循環不全、NO と VEGF のクロストークの破綻によりもたらされ、このことが肝再生不全の原因となっていることを初めて報告した。(3) 胆管結紮による肝硬変モデルラットにおいて、脾臓摘出群は非脾臓摘出群にくらべ有意に肝臓中のセロトニン濃度が増加し、肝再生が促進されていた。この効果はセロトニン阻害剤により抑制されていた。血小板数の脾摘後の増加はセロトニンの小腸から肝臓への運搬を促し、ひいては肝再生を促進していることが明らかとなった。

(4) NOC18-maleimide (NO 放出剤) を hsp16.5 ナノカプセルに内包することに成功し、硬変肝の類洞内皮および星細胞に貪食させることに成功し、これにより肝微小循環の改善をレーザドップラーにて確認することができた。

## 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. Uehara H, Kawanaka H, Akahoshi T, Tomikawa M, Kinjo N, Hashimoto N, Ikegami T, Soejima Y, Taketomi A, Maehara Y. The feasibility and effectiveness of a hand-assisted laparoscopic splenectomy for hypersplenism in patients after living-donor liver transplantation. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech. 2009 Dec;19(6):484-7.
2. Hashimoto N, Akahoshi T, Yoshida D, Kinjo N, Konishi K, Uehara H, Nagao Y, Kawanaka H, Tomikawa M, Maehara Y. The efficacy of balloon-occluded retrograde transvenous obliteration on small intestinal variceal bleeding. Surgery. 2010 Jul;148(1):145-50.
3. Shimabukuro R, Kawanaka H, Tomikawa M, Akahoshi T, Konishi K, Yoshida D, Anegawa G, Uehara H, Hashimoto N, Hashizume M, Maehara Y. Effect of thrombopoietin on platelet counts and liver regeneration after partial hepatectomy in a rat model. Surg Today. 2009;39(12):1054-9.
4. Kinjo N, Kawanaka H, Akahoshi T, Tomikawa M, Yamashita N, Konishi K, Tanoue K, Shirabe K, Hashizume M, Maehara Y. Risk factors for portal venous thrombosis after splenectomy in patients with cirrhosis and portal hypertension. Br J Surg. 2010 Jun;97(6):910-6.
5. Tomikawa M, Akahoshi T, Sugimachi K, Ikeda Y, Yoshida K, Tanabe Y, Kawanaka H, Takenaka K, Hashizume M, Maehara Y. J

Gastroenterol Hepatol. 2010 Feb;25(2):397-402.  
Laparoscopic splenectomy may be a superior supportive intervention for cirrhotic patients with hypersplenism.

6. Kawanaka H, Akahoshi T, Kinjo N, Konishi K, Yoshida D, Anegawa G, Yamaguchi S, Uehara H, Hashimoto N, Tsutsumi N, Tomikawa M, Maehara Y.

Impact of antithrombin III concentrates on portal vein thrombosis after splenectomy in patients with liver cirrhosis and hypersplenism. Ann Surg. 2010 Jan;251(1):76-83.

7. Akahoshi T, Tomikawa M, Kamori M, Tsutsumi N, Nagao Y, Hashizume M, Maehara Y.

Impact of balloon-occluded retrograde transvenous obliteration on management of isolated fundal gastric variceal bleeding.

Hepatol Res. 2011 Dec 19.

8. Yoshida D, Akahoshi T, Kawanaka H, Yamaguchi S, Kinjo N, Taketomi A, Tomikawa M, Shirabe K, Maehara Y, Hashizume M.

Roles of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase during revascularization and regeneration after partial hepatectomy in a rat model.

Surg Today. 2011 Dec;41(12):1622-9.

9. Yoshida D, Nagao Y, Tomikawa M, Kawanaka H, Akahoshi T, Kinjo N, Uehara H, Hashimoto N, Hashizume M, Maehara Y.

Predictive factors for platelet count after laparoscopic splenectomy in cirrhotic patients. Hepatol Int. 2011 Sep 30. [Epub ahead of print]

10. Akahoshi T, Tomikawa M, Kawanaka H,

Furusyo N, Kinjo N, Tsutsumi N, Nagao Y, Hayashi J, Hashizume M, Maehara Y.

Laparoscopic splenectomy with IFN therapy in one hundred HCV-cirrhotic patients with hypersplenism and thrombocytopenia.

J Gastroenterol Hepatol. 2011 Jul 28.

11. Nagao Y, Akahoshi T, Kamori M, Uehara H, Hashimoto N, Kinjo N, Shirabe K, Taketomi A, Tomikawa M, Hashizume M, Maehara Y.

Liver regeneration is promoted by increasing serotonin content in rat liver with secondary biliary cirrhosis.

Hepatol Res. 2011 Aug;41(8):784-94.

12. Hashimoto N, Shimoda S, Kawanaka H, Tsuneyama K, Uehara H, Akahoshi T, Kinjo N, Taketomi A, Shirabe K, Akashi K, Lleo A, Ansari AA, Gershwin ME, Maehara Y.

Modulation of CD4<sup>+</sup> T cell responses following splenectomy in hepatitis C virus-related liver cirrhosis. ClinExpImmunol. 2011 Aug;165(2):243-50.

[学会発表] (計4件)

1. 赤星朋比古、富川盛雅、金城 直、上原英雄、橋本直隆、長尾吉泰、前原喜彦

ワークショップ「肝硬変症における腹腔鏡下脾摘術の臨床的意義についての検討」

第64回日本消化器外科学会(2009年7月18日)

2. 赤星朋比古、富川盛雅、家守雅大、長尾吉泰、前原喜彦

パネルディスカッション「肝硬変合併脾機能亢進症に対する腹腔鏡下脾臓摘出術と合併症についての検討」

第65回日本消化器外科学会(2010年7月16日)

3. 赤星朋比古、前原喜彦

門脈圧亢進症胃粘膜における門脈血行異常症の分子生物学的検討

厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成20年度研究報告書 32-36, 2008.

#### 4. 赤星朋比古、橋爪 誠

検体保存センターの登録と解析について

厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成23年度研究報告書 48-50, 2012.

〔図書〕 (計 1 件)

1. 赤星朋比古、川中博文、金城 直、小西晃造、富川盛雅、前原喜彦

(腹腔鏡下)脾臓摘出術:安全確実な手術を行うための工夫 手術 第63巻8号 2009 (H21) 7月 p1153-1160

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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

富川 盛雅 (TOMIKAWA MORIMASA)  
九州大学・大学病院・准教授  
研究者番号：60325454

村田 正治 (MURATA MASA HARU)  
九州大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：30304744

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：