様式Ｆ－１９

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：１１３０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23659633

研究課題名（和文）　肝硬変治療のための新規低出力体外衝撃波を用いた肝細胞及び肝組織再生療法の開発
研究課題名（英文）　Development of liver tissue regeneration therapy using a novel low-power extracorporeal shock wave for treatment of liver cirrhosis

研究代表者
宮田　剛（MIYATA　GO）
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：60282076

研究成果の概要（和文）：

肝硬変に対する従来の治療法は残された肝臓の機能を助け、合併症をコントロールすることが主である。本質的に有効な治療法は今のところないため、低侵襲かつ有効性の高い新しい治療法の開発が強く望まれている。低出力衝撃波を体外から虚血組織に照射することによる血管新生作用や心筋リモデリング抑制作用がすでに報告されている。本研究では、肝臓に対する低出力衝撃波の及ぼす作用を明らかにすることと、肝硬変に対する治療応用を動物モデルにより検討を行った。

研究成果の概要（英文）：

There is no silver bullet of the treatment for liver cirrhosis currently and essentially. It is important to prevent the complications and help the function of the cirrhotic liver. Development of new treatments highly effective and minimally invasive is strongly desired. Angiogenic activity and inhibition of myocardial remodeling have been reported by irradiation of the low power extracorporeal shock wave to the ischemic tissue. We elucidate the effect of the low power extracorporeal shock wave for the liver cirrhosis. In this study, we evaluate the liver function, cell regeneration, degree of fibrosis, angiogenic activity and adverse events in the animal model using rat. Although the irradiation of the low power extracorporeal shock wave were performed safely, it is necessary to consider the optimum condition and the biological mechanism further more.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：外科学
科研費の分科・細目：消化器外科
キーワード：肝、衝撃波、肝硬変

１．研究開始当初の背景

肝硬変の原因はウイルス性、アルコール性、非アルコール性、自己免疫性など様々であるが慢性炎症を背景にして組織の破壊、再生を繰り返すうちに肝の繊維化が進む疾患である。従来の治療法は薬物療法や生活習慣改善などが主であるが、いずれも肝硬変の進行を緩めようとするものや合併症をコントロールする治療が主であった。原因が除去されても硬変肝の線維化を改善させるような、あるいは肝細胞再生を優位にさせるような本質

的な治療法はいまだ登場していない。そのため低侵襲で、かつ有効性の高い新しい治療法の開発が大いに期待されている。

体外衝撃波治療は、尿路結石破砕治療として、20年以上前から保険適応となっている安全で副作用のない確立した治療法である。東北大学循環器内科の下川らは、低出力（尿路結石破砕治療に用いる出力の10%）の衝撃波を用いた非侵襲性血管新生療法を開発し、虚血性心疾患において、その有効性と安全性を基礎的・臨床的研究により確認し論文発表している（Keiji Oi, Yoshihiro Fukumoto, Kenta Ito,Tohoku J Exp Med. 2008）。また、東北大学先進外科の佐藤らは下肢虚血を対象に研究論文(Vascular Med vol.4 no2,2008)を発表し、現在、臨床試験を行っている。そのメカニズムとして低出力体外衝撃波により種々の増殖因子やサイトカインが動員されることが報告されている（Ito K, et al. Tohoku J Exp Med. 2009）。一方で肝再生においてVEGFなどの血管新生因子やHGFなどの増殖因子が協調して作用することが知られている。肝疾患に対する低出力体外衝撃波治療の試みは今のところ皆無であり、慢性炎症性疾患に対しても再生を促すことによりその効果を検証する必要がある。

本研究では、肝臓に対する低出力衝撃波の及ぼす作用を明らかにすることと、肝硬変に対して、肝細胞再生を促し、繊維化を改善することができないかを動物モデルを用いて検討することを目的とする。

２．研究の目的

現在有効な治療法が確立されていない肝硬変に対して、有効かつ低侵襲な治療法を確立することが最終目標である。本研究では動物実験をおこない、低出力体外衝撃波の肝臓に及ぼす影響と安全性の評価を行う。

肝硬変の治療モデル作成のため、ラット肝硬変モデルの確立が必要である。種々の方法で肝硬変モデルを作成しその特徴を解明し、衝撃波を用いた肝硬変治療モデルとして確立する。ラット肝硬変モデルを用い体外衝撃波を照射し、その有効性と安全性を明らかにする。このモデルを用いて線維性隔壁の改善、肝細胞再生、末梢門脈枝の血管新生を伴った肝小葉構造の再構築を形態学的かつ分子生物学的に検討することによって、衝撃波の新たな細胞及び組織再生と線維化改善の機序を明らかにするとともに臨床応用するための知見を収集する。

３．研究の方法

全身麻酔下にWisterラット（8～9週）健康肝に、季肋部より体外衝撃波（0.55ｍｊ/ｍｍ2,3Hz、1000shocks）を照射し、7病日に犠牲死させ組織学的検討および血液生化学的検討をおこなう。Wisterラット（8-9周）に対し70%肝部分切除を施行する。施行後、残肝に衝撃派を直接照射し、72時間後に犠牲死させる。摘出した肝を用いて免疫組織学的に検討をするとともに血管新生因子について分子生物学的に検討する。摘出肝重量/予想残肝重量比を求め衝撃波を照射していない対象群と比較検討する。

低出力体外衝撃波の効果を評価するためWisterラットを用いて肝硬変モデルを作製する。四塩化炭素、ニトロソジメチルアミン、胆管結紮法などを行い、犠牲死させ肝硬変の程度を肉眼的かつ組織学的に評価する。

評価可能な実験系を確立したのち作成した肝硬変ラットに対して体外衝撃波を照射する。剣状突起から肋骨弓下縁までを等分した5点に対して肋弓下から0.25mJ/mm3, 4Hz、200発×5箇所に照射を行う。4日後に体重測定、血液生化学検査用の採血を行ったのちに犠牲死させる。線維化の程度を組織学的に比較検討する。具体的には繊維化面積の全体に占める割合を測定する。procollagen、TGF-β、MMPの定量PCRを行い抗線維化作用を解析する。門脈周囲の小葉構造と新生血管を免疫組織学的に解析する。摘出肝の一部を凍結保存したのちきっとを用いてRNAを抽出する。VEGF、HGFをといった血管新生因子、増殖因子の発現について免疫組織学的、分子生物学的に検討を行う。

４．研究成果

正常肝に低出力衝撃波を体外照射したラットにおいて門脈周囲に組織学的に微小出血が見られたが、肝細胞及び小葉構造に著明な変化を認めなかった（図 1)。ラット 70%肝切除モデルの残肝への照射実験において摘出肝重量/予想残肝重量比を測定した。治療群が 6.75±1.90、control 群 6.52±1.89（p＝0.38）と有意差は得られなかった。健康肝を用いた実験において、正常な肝細胞、および小葉構造に変化を認めず、低出力体外衝撃波は安全に行うことができると考えられた。また切除後肝への照射実験では肝再生に有意な差を認めなかったが、安全に行うことが可能であった。正常肝では正常な再生が生じるため、さらに疾患モデルでの検討が必要であると考えられた。

ニトロソジメチルアミンを4週間投与した群ではほとんどのラットで部分的に肝壊死が生じていることと致死率が高いことにより。瀰漫性に肝硬変を作成することは難しかった。細い塩化ビニルチューブを用いてラット総胆管を結紮（狭窄）し、4 週間後に犠牲死させた。胆汁鬱滞がすべての肝葉に生じる

わけでなく、びまん性肝硬変にいたらず、さらにその程度の個体差は大きかった。そのため照射実験には適さないと考えられた。Wister ラット、オス第７週令に四塩化炭素を 2.0 ml/kgを週に２回３か月間、腹腔内投与した。肝硬変の程度にはばらつきがあるが全体の 70%に新犬山分類で F3、F4 が同程度であり本研究における肝硬変モデルとして適当と思われた（図 2）。ただし肝硬変モデルの作成に３か月と長期を要することが難点であった。

四塩化炭素を用いて作成した肝硬変モデルに対して低出力体外衝撃波を照射し、4 日後に犠牲死させ、各項目について評価を行った。血液生化学検査において直接ビリルビンが照射群は 3.07±0.18 mg/dl、対照群は 6.47±0.87 mg/dl と有意に低下しており、トランスアミナーゼについては AST と ALT は照射群で 94.5±19 U/L、52.1±4.0 IU/L、対照群で 152.9±45 IU/L、63.2±4.16IU/L と照射群で低下の傾向があり、AST については有意差を認めた(図 4, 5)。衝撃波照射群と対照群では体重はそれぞれ 408±110g、435±51g と有意な差を認めず、ほかに有害事象を認めなった。現在、肝での血管新生、組織増殖因子である VEGF、HGF の発現について免疫組織学的検討と肝の線維化の程度を NIHimage を用いて定量化を行っている。照射群と対照群の摘出肝より RNA を抽出し RNA レベルでの VEGF,HGF の発現の比較検討を行っておりその効果とメカニズムについての研究を進める必要がある。本研究の成果により肝硬変モデルに対して低出力対外衝撃波を照射した際に特に有害事象を認めることはなく安全に試行することができた。総ビリルビンや AST については有意な改善を認めたため、肝機能改善につながる可能性がある。肝再生や線維化に改善についてさらに検討の必要がある。肝再生と線維化の改善、肝機能の改善のための最適な出力と回数についてはさらに条件の検討が必要であり今後の課題である。

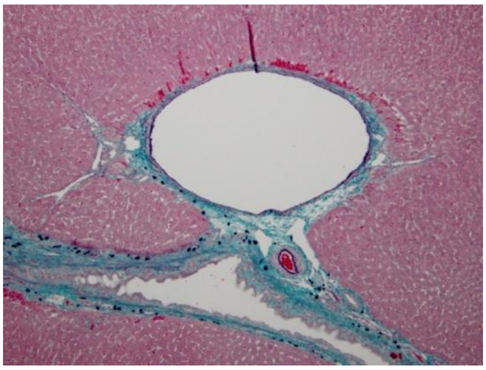

図１健康肝衝撃波照射後

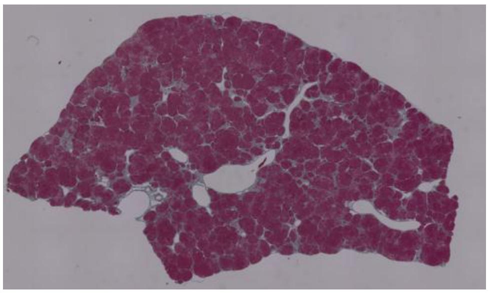

図２　四塩化炭素による肝硬変モデル

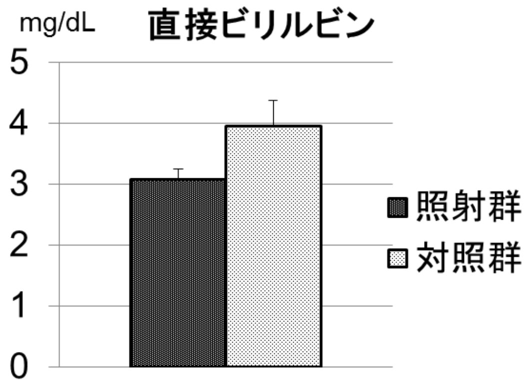

図３、直接ビリルビン値

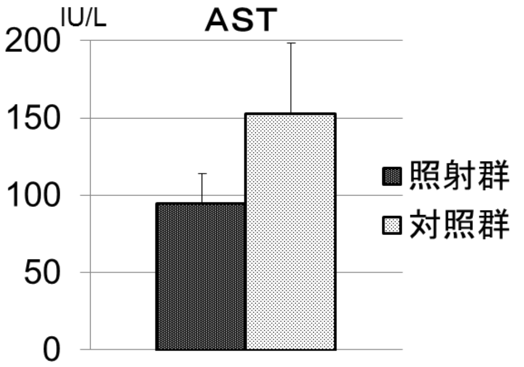

図４、AST 値

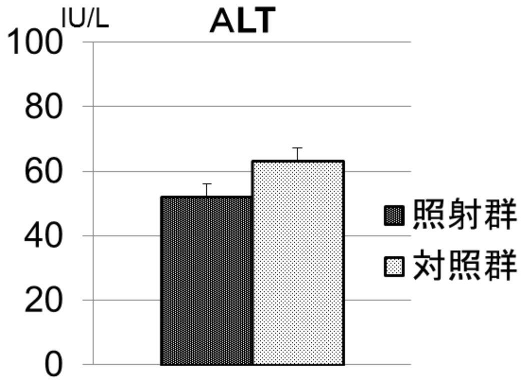

図５、ALT 値

５．主な発表論文等

〔学会発表〕（計２件）
1.山田誠人、中野徹、宮田剛
低出力衝撃波の肝に及ぼす影響についての研究。 第３回衝撃波ミーティング（2012 年 12 月 3 日仙台）

2.Nakano T, Yamada S. Miyata, G
Experimental application of low power shock wave for the treatment of liver cirrhosis. 第二回低出力衝撃派治療勉強会(2011 年 3 月 10 日仙台)

６．研究組織

(1)研究代表者
宮田 剛 (MIYATA GO)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：60282076

(2)研究分担者
里見 進 (SATOMI SUSUMU)
東北大学・その他部局等・総長

研究者番号：00154120

佐藤 成 (SATO AKIRA)
東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20250764

伊藤 健太 (ITO KENTA)
東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50375086

川岸 直樹 (KAWAGISHI NAOKI)
東北大学・病院・准教授

研究者番号：00333807

関口 悟 (SEKIGUCHI SATOSHI)
東北大学・病院・講師

研究者番号：20312580

赤松 順寛 (AKAMATSU YORIHIRO)
東北大学・病院・助教

研究者番号：50302112

藤島 史喜 (FUJISIMA FUMIYOSI)
東北大学・病院・助教

研究者番号：40451596

中野 徹 (NAKANO TORU)
東北大学・病院・助教

研究者番号：50451571

(3)連携研究者

佐藤 靖史 (SATO YASUFUMI)
東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：50178779