

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791531

研究課題名(和文) 肝硬変モデルにおける切除後肝再生機序の解明

研究課題名(英文) Models of liver regeneration using the fibrotic mice.

研究代表者

葺満 薫 (Kuramitsu, Kaori)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：80596784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本実験では、四塩化炭素の投与時間を調整することにより、F1-F4までの肝硬変マウスを作成する事に成功した。

基礎分野では、肝硬変モデルを作成する事は可能であったが、いままでの検討項目は硬変肝の繊維化を抑制する事を目標とし、肝再生に関する検討は全く行われていなかった。しかし肝細胞癌に対し手術を行う場合は、背景肝が通常ウイルス性肝炎であることから繊維化に応じた切除式の選択が必須である。本研究では、臨床分野で出来なかった硬変度合い別の肝再生を体系的に解析する事が可能となり、この結果を踏まえ、今後は臨床面で術前肝硬変の程度に応じた肝切除術式の決定を行う事が可能となった。

研究成果の概要(英文)：In our experiment, we could establish the experimental model of fibrosis mouse by introducing CCl4 orally to mice. By changing the introduction time, we could make F1 to F4 mice.

In basic science, the experimental model was utilized to suppress the fibrosis stage, and there was no experiments focused on liver regeneration. However, in clinical situations, we need to focus on the fibrosis stage to perform hepatectomy, as background liver status is usually injured for virus infection. In our experiments, we could analyze liver regeneration based on the different fibrosis stage. Our experiment achieved the novel strategy for hepatectomy based on the background fibrosis stage.

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：肝再生

1. 研究開始当初の背景

現在基礎分野で行われている肝硬変の実験の目的は、肝臓の線維化を抑制する事を目的として行われている。しかしながら長年にわたり世界各国で行われているこのテーマの研究成果は未だ見出されていないのが現状である。一方臨床分野では、肝細胞癌に対し肝切除術は広く行われているが、術後肝再生を評価した術式決定は全く行われておらず、しばしば術後肝不全を合併する症例を経験する。術後肝不全を合併すると、根本的な治療はない。そこで肝臓外科の分野からは術後肝不全を合併しない肝再生に注目した術式選択基準の整備が急務である。このような背景から今回我々は背景肝の線維化に応じた術式決定基準を立案すべく、実験を行った。

2. 研究の目的

臨床分野では、肝臓の線維化に応じた肝切除を行う事は不可能である。そこでマウス肝線維化モデルを作成し、線維化の程度に応じて肝切除後の肝再生の程度について検討を行う事を目的とし実験を行った。本研究の最終目的は、線維化に応じた肝再生を客観的に評価することである。

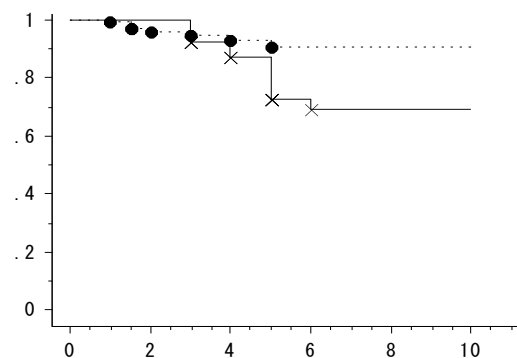
3. 研究の方法

まずは四塩化炭素を投与し F1~F3 の線維化を来したマウスを作成した。次に各々のマウスに対し 70%肝切除を実施し、術後の間再生の程度について検討を行った。肝切除はマウスをイソフルレンで麻酔をかけ開腹し左と中部の肝葉を 4-0 絹糸で結紮し切除を行った。術後脱水と栄養補給のためブドウ糖を皮下に注射し、ヒートパッドの上で十分に覚醒させた後ケージに戻した。マウスは術後 1 日、2 日、3 日、5 日、10 日、14 日で殺傷し、肝臓及び血液サンプルを回収した。体重及び肝重量を測定し、肝組織はホルマリン固定された。肝再生の指標として、残肝の再生率が計算された。肝細胞の増殖の指標として、顕微鏡下で Ki67 染色陽性の肝細胞が全体の何%を占めるかが算出された。

4. 研究成果

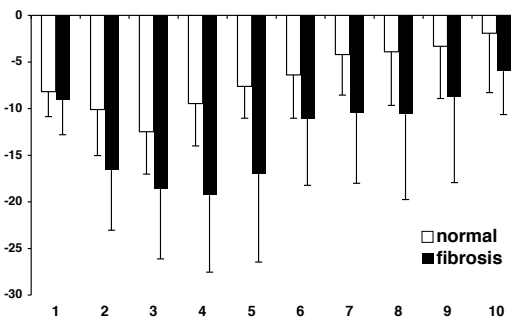
6 週間四塩化炭素を投与することで、肝臓のコラーゲン含有率はコントロールの正常肝と比較して 4 倍増加した。四塩化炭素の最終投与後 70%肝切除が実施された。肝切除後正常肝のマウスは 90.8%が生存したのに対し硬変肝のマウスは 68.9%と低下した生存率を示した。この結果から硬変肝のマウスの生存率は肝硬変により肝再生が障害される事によって低下するのではないかと予想された。

図 1



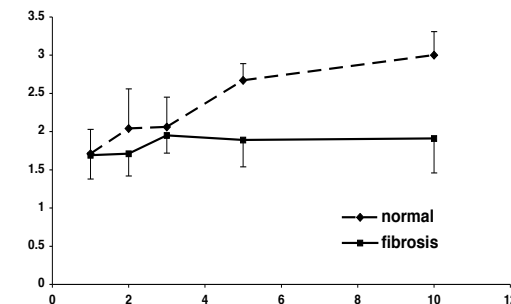
次に術後の体重変化に注目すると、正常肝のマウスは術後 1 日目から 3 日目まで体重が減少を示したのに対し硬変肝のマウスは術後 4 日目まで一定に体重減少を示した。

図 2



肝再生について評価を行うために、術後残肝の再生率を評価した。正常肝は 1 週間以内に術前の肝重量まで再生したのに対し、硬変肝では術後 10 日目でも 38%の再生しか示さなかった。

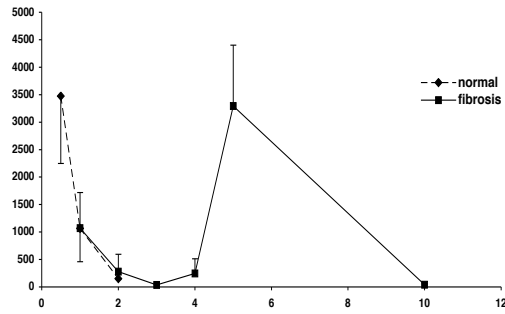
図 3



この結果から硬変肝の再生は完全な肝硬変まで至っていない状態でも非常に障害されている事がわかった。

次に術後の生化学的変化について検討を行った。正常肝では血清 ALT の値は術後 1 日目にピークを迎える。これは硬変肝でも同じ現象が認められたが、硬変肝での上昇の方が著しく、またさらに術後 5 日目にも再上昇を示した。

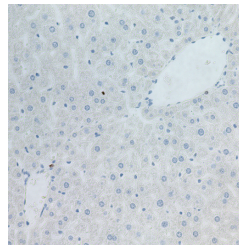
図 4



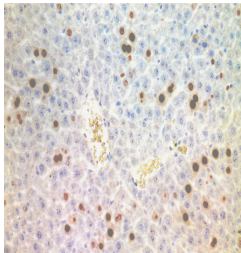
70%肝切除を行った後、肝細胞は速やかに細胞分裂を始める。

図 5

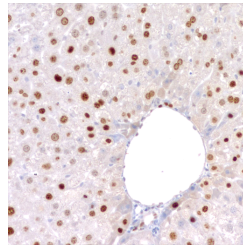
術前（正常群）



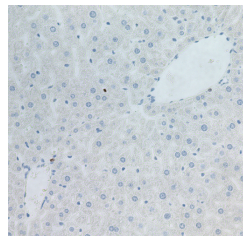
術後 1 日目



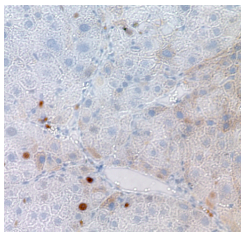
術後 2 日目



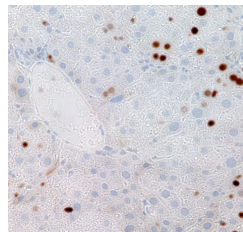
術前（線維化群）



術後 1 日目



術後 2 日目



正常群では術後 1～2 日目をピークに肝細胞の分裂がみられるのに対し、線維化群では殆ど肝細胞の分裂が認められなかった。図 3 の染色結果を術後日数毎に定量化すると、正常群では術後 2 日目に肝細胞の分裂がピークを迎えたのに対し、線維化群では殆ど肝細胞の増殖を認めなかった。

図 6

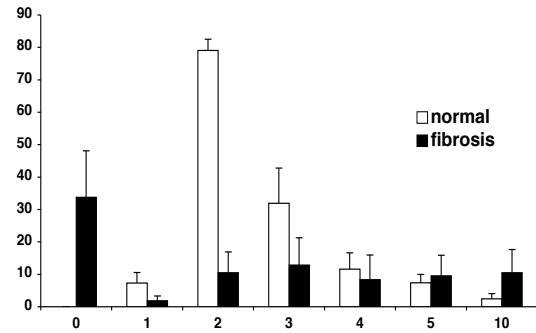
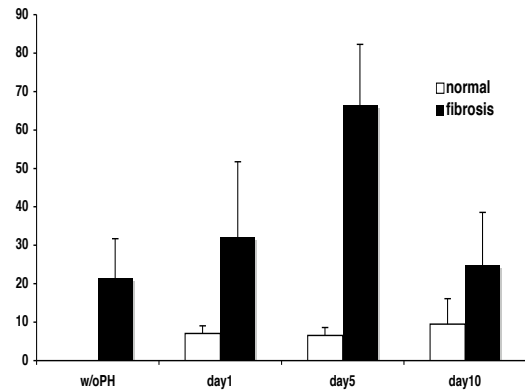


図 3 の染色結果を術後日数毎に定量化すると、正常群では術後 2 日目に肝細胞の分裂がピークを迎えたのに対し、線維化群では殆ど肝細胞の増殖を認めなかった。

最後に線維化のマーカであるコラーゲン量は、線維化群で術後 5 日目にピークを迎えた。

図 7



以上の結果をまとめると、マウス肝硬変モデルを作成し肝切除を実施した結果、

- 1) 硬変肝マウスでは肝切除術後の生存率が正常肝マウスと比較して有意に低い
- 2) 硬変肝マウスでは術後の体重減少が正常肝マウスと比較して有意に多い
- 3) 硬変肝では正常肝と比較して術後ほとんど再生しない
- 4) 硬変肝マウスでは術後 ALT の上昇を 1 日目と 5 日目の 2 峰性に認める
- 5) 組織学上も硬変肝では肝細胞の増殖を肝切除後殆ど認めない
- 6) 術後線維化のマーカであるコラーゲンは 5 日目をピークに増加する。

以上の結果が本研究で明らかとなった。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

本研究結果は、現在論文執筆中であり、結果を知らせないためにいずれの学会でも報告は行っていない。

〔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

蔵満 薫 (Kaori Kuramitsu)

肝胆膵外科 特定助教

研究者番号: 80596784

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: