

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293280

研究課題名(和文) 外科手術後癒着形成分子機構に基づく新規包括的癒着制御法の開発と探索医療の模索

研究課題名(英文) molecular mechanisms under adhesional formation after abdominal surgery

研究代表者

藤元 治朗 (Jiro, Fujimoto)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：90199373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究概要は、(1)マウス肝切除術後癒着モデル確立、その分子機構は肝組織断端にNKT細胞が集積、IFN-g, PAI-1の上昇・t-PAの減少が認められた。また、ヒト肝切除でも同様の分子機構が証明された。(2)腹膜を構成する中皮細胞に着目、ヒト培養細胞(Met-5A・MES-F)を用いて遺伝子発現を検索、 $\alpha$ -SMA, PDGF-R, TGF- $\beta$ -Rの強発現を認め、中皮細胞自身がコラーゲン産生細胞に分化誘導された。(3)上記マウスモデル免疫染色結果よりマクロファージ・T細胞・好中球の集積を強く認め、また中皮細胞・繊維芽細胞増殖をみいだした。これらより中皮細胞が癒着線維形成の中心であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated and obtained results of post-operative adhesion formation as follows. (1)We established a mouse model of adhesion formation after hepatectomy and found overexpression of IFN-g and PAI-1, downregulation of t-PA. Moreover the same mechanisms were noted in human hepatectomy. (2)We investigated fibrogenesis relating gene expression using cultured human mesothelial cells (Met-5A and MES-F). Overexpression of  $\alpha$ -SMA, PDGF-R, and TGF- $\beta$ -R were found and the mesothelial cells itself transformed into collagen producing cells. (3)We investigated which cells accumulated into the adhesion area after mouse hepatectomy. By immunohistochemistry revealed that macrophage, T-cells, and neutrophils were identified in the tissue. Thus, mesothelial cells seems to play a pivotal role in fibrogenesis in adhesion formation after surgery.

研究分野：外科学

キーワード：手術後癒着 PAI-1 IFN-g t-PA NKT cell HGF mesothelial cell macrophage

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外科手術による癒着形成は腹部手術において67-93%の割合で認められ、癒着による腹痛、腸閉塞など生活レベルの低下は今後解決すべき問題のひとつである。我々はこれまでにマウス腸管焼灼による癒着モデルを用いて癒着形成のメカニズムを調べてきた。腸管焼灼モデルでは焼灼によって活性化されNK (Natural Killer) T細胞が産生するINF- (Interferon gamma) が組織におけるPAI-1(plasminogen activator inhibitor-1), tPA (tissue plasminogen activator) の発現を制御することによって癒着形成の制御を行っていることを示した。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は

- A) マウス肝切除モデルにおけるT細胞を介する癒着形成メカニズムの解明
- B) 薬剤投与 (FK506 Dexamethasone 大建中湯) における癒着抑制判定
- C) 局所における癒着形成のメカニズム

を明らかにすることである。

3. 研究の方法

A)(1) マウス肝切除モデルを作成し、7日目に開腹し癒着の評価を行った。癒着の程度は下記の6段階にて評価した。また、肝切除24時間以内の肝臓でのINF-、PAI-1、tPAの発現の変化をRT-PCRにて調べた。

Table.1

<b>Score 0</b> , no adhesions (before PH)
<b>Score 1</b> , a single thin filmy adhesion
<b>Score 2</b> , more than one thin adhesion
<b>Score 3</b> , thick adhesion with focal point
<b>Score 4</b> thick adhesion with plantar attachment or more than one thick adhesion with focal point
<b>Score 5</b> very thick vascularized adhesion or more than one plantar adhesion

(2)CD4 抗体、NKT KO mice での癒着抑制効果を判定し、肝臓での INF- の発現をコントロール群と比較した。

(3)INF- 中和抗体および INF- KO マウスでの癒着抑制効果を判定し、PAI-1 及び tPA の発現をコントロール群と比較検討した。また、PAI-1 KO マウスでの癒着抑制効果を判定した。

B) 腸管焼灼モデル、肝切除モデルにおけ免疫抑制剤、大建中湯、ステロイド投与による癒着抑制の評価を行った。両モデルにおいて

- (1)Fk506 ( 1-8mg/Kg ) 7 日間投与群
- (2)Dexamethasone (1-4mg) 7日間投与群
- (3) 大建中湯 ( 1800mg-2700mg/Kg/day ) 7 日間投与群

を作成し、各群のコントロール群と比較検討した。大建中湯投与群においては、焼灼後3時間後の INF-、PAI-1 及び tPA の発現をコントロール群と比較検討した。

C)(1)肝切除モデルの癒着形成にかかわる線維芽細胞、免疫細胞の免疫染色学的検討。Sirius red 染色のほか Collagen type I、-SMA(smooth muscle actin-alpha: 筋線維芽細胞マーカー)、Mesothelin (中皮細胞マーカー)、PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) receptor (線維芽細胞マーカー) CD45 (白血球マーカー)、F4/80 (M マーカー)、CD3 (T細胞マーカー)の抗体を用いた免疫染色を行った。

(2) ヒト腹膜中皮細胞(MES-F細胞)、中皮細胞株 (Met 5A) の Characterization : MES-F細胞及び Met-5A細胞と肝線維芽細胞株 (LX-2)における -SMA、Mesothelin、PDGF receptors、TGF- receptor、Collagen type I の発現を RTqPCR を用いて調べ、類似性を調べた。

(3) Profibrogenic Factor である PDGFs(PDGF A-C), CTGF(Connective Tissue Growth Factor), TGF(Transforming growth factor)- の中皮細胞株(Met-5-A)の増殖能(Alamar Blue Assay)および Collagen type I 産性能へ(RTqPCR)の関与を調べた。

#### 4. 研究成果

A) (1) 肝切除 7 日目の癒着形成は、ほぼ score 5 であった。INF-、PAI-1、tPA の発現形式に関しては、肝切除 3 時間後に INF- の発現が、6 時間後に PAI-1 の発現が上昇しピークとなる。その後、両物質とも時間とともに発現が低下し、24 時間後には切除前のレベルにまで戻る。一方、tPA は 12 時間の時点から有意に発現が低下し、18 時間でボトムになる。24 時間後にはその発現は回復してきていることがわかった。以上から、肝切除によって INF- の発現が上昇し、その影響によって PAI-1 と tPA が制御されている可能性が考えられた。

(2) CD4 抗体投与群、NKT KO mice での癒着形成を見てみると Score 1.0( Control: 4.9)、Score 1.7(control 4.6)と有意に癒着形成が抑制されていた。また、肝切後 3 時間での NKT KO mice の INF- の発現は有意に抑制され、肝切離前と同等であった。

(3) 次に INF- 中和抗体投与群および INF- KO マウスでの癒着 score を測定したところ、2.0(control : 4.4) 1.7 (control : 4.4) と有意に抑制されていた。また、コントロール群に比べ INF- KO マウスでの肝切 6 時間後の PAI-1 は有意に抑制され、18 時間後の tPA は有意に増加していた。また、PAI-1KO マウスでの癒着 Score は 0(control : 4.1)と有意に抑制されていた。以上より INF- を介した PAI-1 /tPA の発現制御が癒着にかかわっている可能性が考えられた。

B) 腸管焼灼モデルにおいて Fk506 投与群、Dexamethasone 投与群(3) 大建中湯投与群において明らか癒着抑制効果は認めなかった。肝切除による癒着形成モデルにおいては Dexamethasone 投与群においてコントロール群に比べ有意な癒着形成の抑制を認めたが、(1)群および(3)群に有意な癒着抑制は認めなかった。

大建中湯投与群における腸焼灼 3 時間後の INF-、PAI-1、tPA の発現に関してはコントロール群と有意な差は認めなかった。

C) (1) 癒着形成後(肝切離後 7 日目)癒着部組織の Sirius 染色及び Collagen type I 免疫染色にて癒着部形成部にて fibril collagen の蓄積が認められた(図 1)。

また、癒着形成部には、 $\alpha$ -SMA 陽性細胞 Mesothelin 陽性細胞 PDGF receptor 陽性細胞の集積を認めた(図 2)。

共焦点顕微鏡による蛍光二重免疫染色では、Mesothelin 陽性細胞の多くは  $\alpha$ -SMA(図 3)、PDGF receptor (図 4)ともに陽性、であった。また、癒着部表層は非切除部の肝被膜中皮と連続していることから肝被膜を構成する中皮細胞が肝切離後の癒着形成に関与していることが考えられた。

また、免疫細胞の染色では多くの CD45 陽性細胞、F4/80 陽性細胞および少数の CD3 陽性細胞の集積を認めた(図 5)。これらのことから M が主に肝切除モデルの癒着形成にかかわっていることがわかった。

(2) Met-5A 細胞、MES-F 細胞及び LX-2 細胞株における  $\alpha$ -SMA、Mesothelin、PDGF receptor- $\alpha$ 、 $\beta$ 、TGF- $\beta$  receptor Collagen type I の発現を RT-QPR で比べたところ Met-5A および MES-F 細胞ともに Mesothelin および  $\alpha$ -SMA を強く発現していた。一方、線維芽細胞である LX-2 細胞は  $\alpha$ -SMA を強く発現していたが、Mesothelin の発現は低かつ

た。これは免疫染色で認めた  $\alpha$ -SMA 陽性 Mesothelin 陽性細胞が中皮由来であることを support するデータであった。また、PDGF receptor- $\beta$ 、TGF- $\beta$  receptor Collagen type I の発現に関しては Met-5A 細胞 MES-F 細胞ともに LX-2 細胞同様強く発現しており、コラーゲン産生細胞である可能性が示唆された。

(3) PDGFs(PDGF A-C), CTGF, TGF- $\beta$  の Met-5A に対する増殖能及びコラーゲン産性能を調べたところ、PDGF-C の増殖能亢進作用 (図 6) および TGF- $\beta$  のコラーゲン産性能の亢進作用 (図 7) を認めた。

図 1

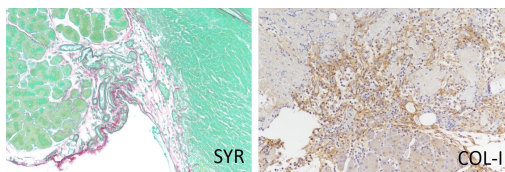


図 2

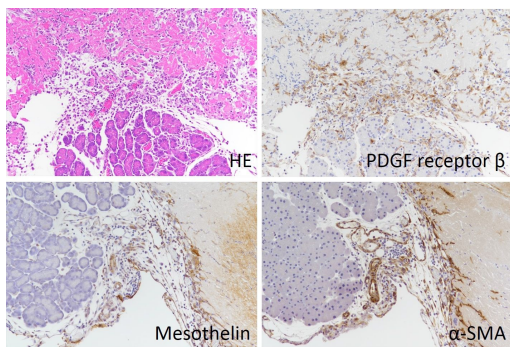


図 3

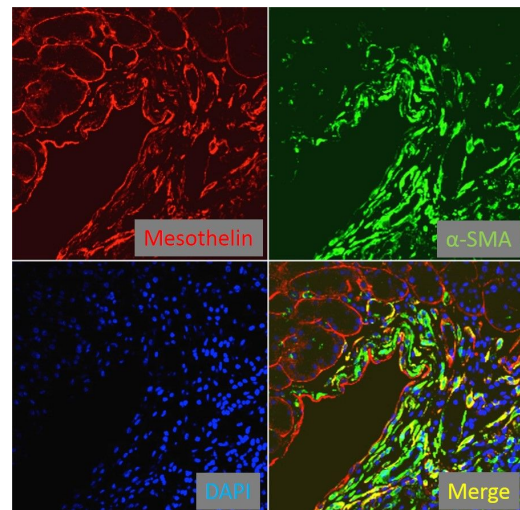


図 4

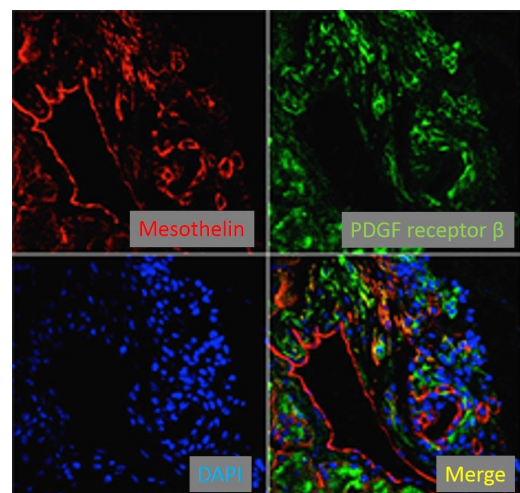


圖 5

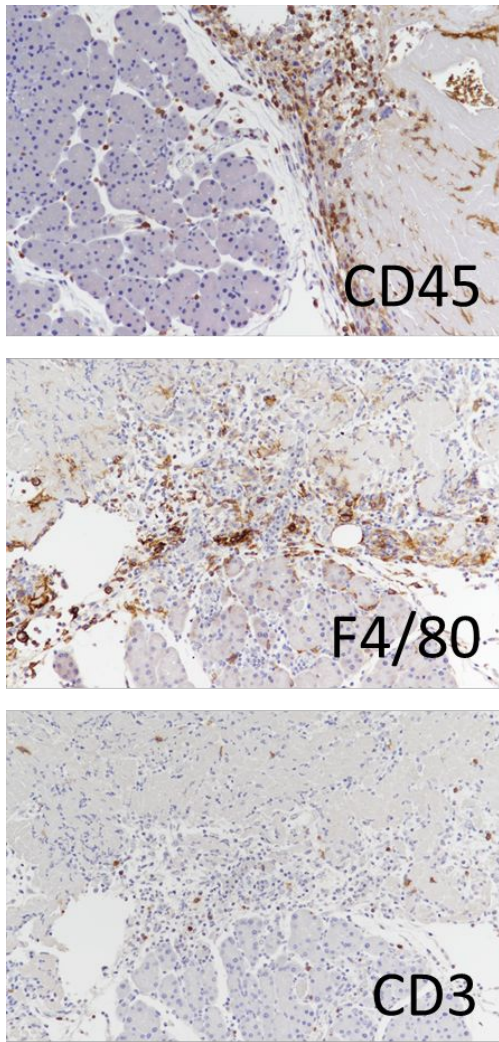


圖 6

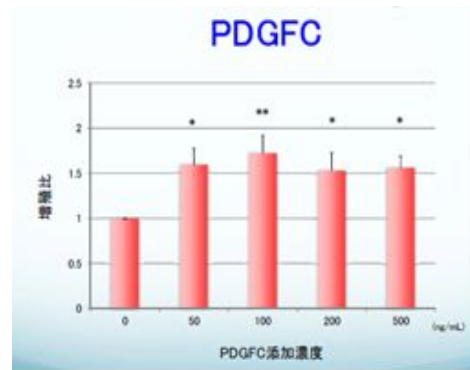
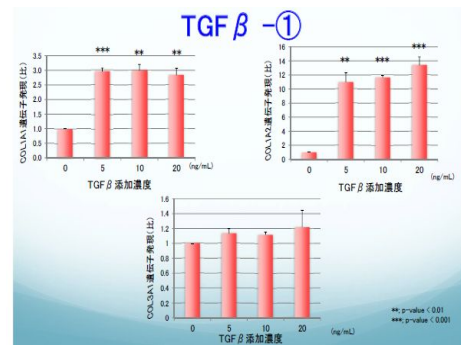


圖 7



## 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 1件)

Ohashi K, Yoshimoto T, Kosaka H, Hirano T, Imuro Y, Nakanishi K, Fujimoto J. Interferon and plasminogen activator inhibitor 1 regulate adhesion formation after partial hepatectomy. 査読有 British Journal of Surgery. 2014 Mar;101(4):398-407.

doi: 10.1002/bjs.9405.

〔学会発表〕(計 1件)

“Liver producing plasminogen activator-1 regulates adhesion formation after hepatectomy in patients underwent hepatectomy.” J. Fujimoto. The 24th World Congress of the international association of surgeons, gastroenterologists and oncologists (IASGO). December 5-7 2014 Medical university of Viena, Austria.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

藤元 治朗 (FUJIMOTO, Jiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：90199373

### (2)研究分担者

小坂 久 (KOSAKA, Hisashi)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00532251

飯室 勇二 (IIMURO, Yuji)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号：30252018

大橋 浩一郎 (OHASHI, Koichiro)

兵庫医科大学・医学部・病院助手

研究者番号：50573987

中西 憲司 (NAKANISHI, Kenji)

兵庫医科大学・医学部・学長

研究者番号：60172350

善本 知広 (YOSHIMOTO, Tomohiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：60241171