

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461966

研究課題名(和文) 肝組織修復における類洞内皮細胞、星細胞の役割解明と骨髄、脾臓との臓器関連の解析

研究課題名(英文) The role of non-parenchymal cells in the liver tissue remodeling.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝硬変症例において、脾臓後に肝予備能が改善することが報告されているため、同肝組織修復機構における肝非実質細胞の役割に注目して検討を行った。ヒト肝硬変をよく反映するチオアセトアミド長期投与マウス肝硬変モデルを作製すると、肝線維化に血小板減少を伴い、肝組織傷害部位に一致して肝幹細胞マーカーを有する細胞集団が多数出現した。これに脾摘術を行うと、肝線維化の改善に加え、肝幹細胞様細胞に隣接して多数の単球系細胞の集積がみられ、これらがWntシグナルを介して幹細胞様細胞に働きかけ、肝細胞への分化を誘導する可能性が示された。ヒト肝硬変症例における脾摘後の肝臓の組織学的検討でも類似の現象が確認された。

研究成果の概要(英文)：Splenectomy (SP) improves liver function in cirrhotic patients. We investigated the mechanism. C57BL/6 male mice were treated with thioacetamide (TAA) for 32 weeks. After SP at 32 weeks, mice were sacrificed on days 1, 7, and 28, respectively. After SP, thrombocytopenia and leukocytopenia were improved, and liver fibrosis was attenuated. Meanwhile, progenitor-like cells expressing CK-19, EpCAM, or CD-133 appeared along the fibrous scar after TAA treatment, and gradually disappeared after SP. Wnt2 protein expression in liver monocytes and accumulation of β -catenin in the progenitor-like cells were confirmed. In cirrhotic patients with HCC, thrombocytopenia and leukocytopenia were quickly attenuated after SP. In the liver, accumulation of round- or oval-shaped macrophages/monocytes positive for CD163 was detected after SP, and they existed closely to the CK19-positive cells, which spread out from the ductular reactions, suggesting interaction between these cells.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝線維化 脾摘 肝幹細胞 単球 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

肝組織傷害時には迅速にその修復機構が誘導される。肝小葉には、知覚神経の発達は乏しく、代表者のこれまでの研究から、肝マクロファージ以外に、肝類洞内皮細胞および肝星細胞がこの修復過程において重要な直接的役割を果たす可能性が示唆されてきた。

2. 研究の目的

切除後肝再生を含めた、障害後の肝組織修復メカニズムの背後には、肝非実質細胞の存在が推測され、肝マクロファージの関与はもちろん重要であるが、これまでの研究成果を踏まえて、肝類洞内皮細胞および肝星細胞の組織修復機構における役割をさらに解明し、これら肝非実質細胞と骨髄および脾臓との臓器相関を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

障害肝修復時の肝非実質細胞の働きを脾臓・骨髄との関連で検討するため、(1)脾臓摘出に伴う硬変肝マウスモデルの肝線維化改善現象のメカニズム解明、および(2)ヒト脾機能亢進合併肝硬変症例における脾摘後の肝組織の検討を行った。

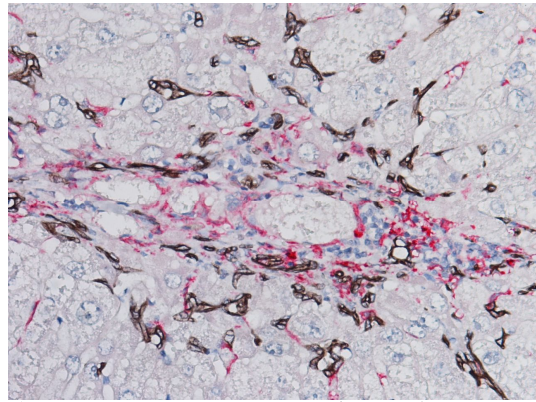
一方、肝切除後および巨大肝嚢胞開窓後の肝組織修復(肝再生)における門脈血流および肝非実質細胞の関与を検討するため、(3)ヒト肝切除後肝組織修復(肝再生)と術後門脈血流分布変化との関連に関する検討、および(4)ヒト非感染性肝嚢胞開窓後の肝再生に関する検討を行った。

4. 研究成果

(1)脾臓摘出に伴う硬変肝マウスモデルの肝線維化改善現象のメカニズム解明

C57BL/6 マウスにチオアセトアミド(TAA)を32週連続投与し、代償性肝線維化モデルを作製した。全身麻酔下に脾臓摘後、1, 7, 28日の血液および肝組織の変化を観察した(脾臓摘後TAAは継続投与)。

TAA32週投与マウスにおいて、高度の肝線維化と脾腫(代償性肝硬変)血小板・白血球数の減少が再現可能であった。脾臓摘後、28日までに肝線維化は著明に改善(Sirius red染色、HP量測定)し、血中血小板数増加に加え、白血球数(単球分画)の著増がみられた。肝組織の検討では、既報同様、血小板が肝臓に集積したが、より顕著な単球・マクロファージの集積がみられた。これら単球・マクロファージは、特に線維性傷害領域に集積していた。一方、TAA32週投与後、CK19-, EpCAM-, CD133-陽性の肝前駆細胞が線維性癒痕領域に多数出現したが、脾臓摘によりこれらの細胞は漸減し、28日後にはほぼ消失した。脾臓摘7日後の2重免疫染色では、肝臓内に集積した単球・マクロファージ(桃色)と肝前駆細胞(茶色)は隣接して存在し、単球・マクロファ-



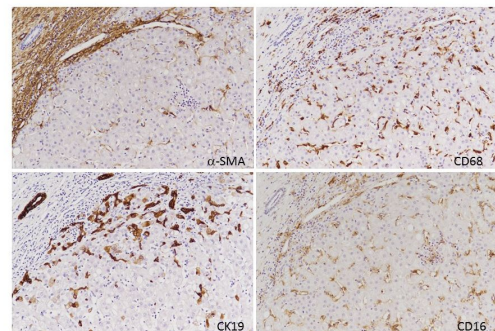
ジ由来の canonical Wnt シグナルが増強していた(PCR、免疫染色)。その結果として、肝前駆細胞内でのβ-cateninの蓄積が見られ、また肝細胞増殖(Ki-67)が誘導された。さらに肝内のMMP-9の発現が14日をピークに増強した(28日まで持続)。

門亢症合併硬変肝における脾臓の肝予備能改善メカニズムに、脾臓摘後肝臓に集積する単球・マクロファージを介した肝前駆細胞の分化誘導機構が関与する可能性が示された。

(2)ヒト脾機能亢進合併肝硬変症例における脾臓摘後の肝組織の検討

脾臓摘術を先行した脾機能亢進症合併肝癌症例の術後肝予備能と肝切除時に得られる非癌部肝組織を、脾臓摘なしで肝切除を行った症例との比較で検討した。

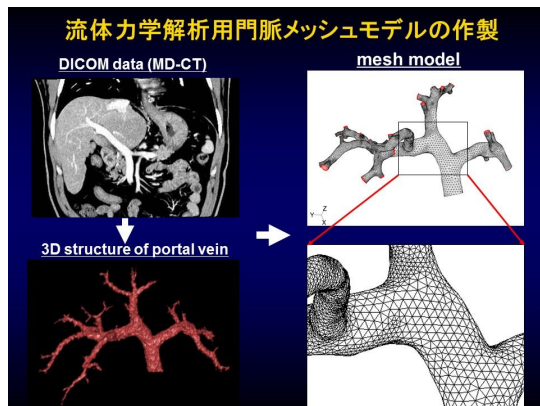
動物モデルと同様に、脾臓摘後肝予備能の有意な改善が見られ、末梢血中の血小板増加に加え、単球分画が著増し、非癌部肝組織中への単球・マクロファージ(CD68+)の有意な集積とCK-19陽性ductular reaction構成細胞の分化誘導を示唆する現象が観察された。また、CD68陽性細胞は、そのほとんどがCD16+CD14-であり、通常の炎症性マクロファージとは異なる炎症および線維化の抑制に働く特殊な細胞集団である可能性が示唆された。



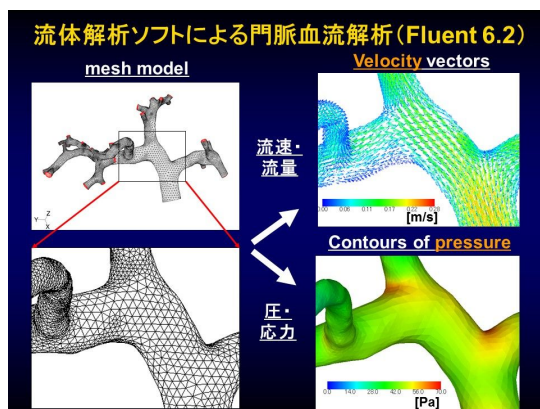
ヒトにおいても、マウスモデルと類似の現象が観察され、脾臓摘後の肝組織修復機構に骨髄および末梢血由来の単球・マクロファージが大きく関与していることが示唆された。

(3)ヒト肝切除後肝組織修復(肝再生)と術後門脈血流分布変化との関連に関する検討

系統的肝切除を行い術前後の流体解析用 3D 門脈構造が入手可能であった 18 例を対象とした。術前・術後 2 週の造影 CT から 3D 門脈像を抽出し、流体解析用 3D 門脈メッシュモデルを作製した。流体解析ソフト (Fluent

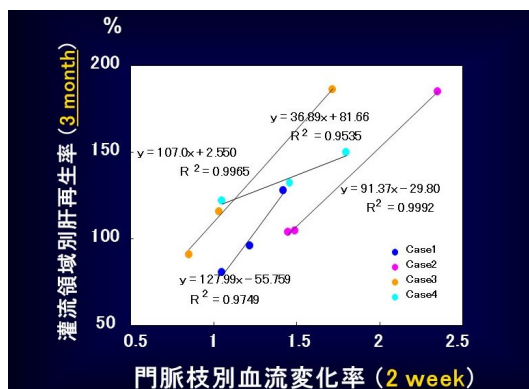


v.13; ANSYS Inc.) を用いて、各門脈枝における血流分布変化を算出し、流体解析の妥当



性は Doppler US との比較で行った。術前・術後 3 月の造影 CT から、region growing software を用いて肝亜区域体積を算出し、3 カ月間の領域別肝再生率を算出した。門脈血流分布変化率(2W)と領域別肝再生率(3M)の相関を各症例において検討した。

術前門脈 1 次分枝における血流分布は、流体解析と US 計測でよく相関し ($r=0.94$, $p<0.01$)、流体解析の妥当性が示された。術後 2 週の各門脈枝血流分布は大きく変化し (71-270%)、その変化は同一切除術式後でも様々であった。術後 3 カ月の領域別肝再生率は全症例において不均一で、切除術式には影響されなかった。一方、各領域別再生率



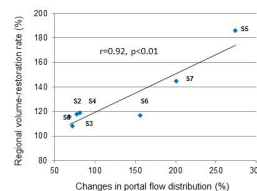
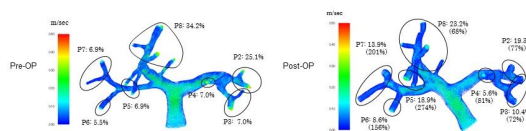
(3M)と灌流門脈枝血流分布変化率(2W)との間には、各症例において強い相関がみられた ($r=0.98-0.74$)。

ヒト肝切除症例において先行する門脈血流動態変化とその後の領域別肝再生との間に強い相関がみられ、術後の不均一肝再生が門脈血流動態により制御されている可能性が示された。

(4)ヒト非感染性肝嚢胞開窓後の肝再生に関する検討

症状を有する非感染性巨大肝嚢胞に対しては、腹腔鏡下嚢胞開窓術が選択されるが、開窓術後に明らかな肝再生が誘導される症例を経験する。しかし、これまでに系統的な解析は報告されていない。当科で腹腔鏡下開窓術を行った単発巨大肝嚢胞症例 7 例および多発性肝嚢胞症例 7 例を対象とした。開窓術は、単発症例では可能な限り嚢胞壁を切除し、多発性肝嚢胞では自覚症状の責任嚢胞を含め可能な限り開窓を行った。単発症例では区域別の術前後体積変化と各門脈径の変化を CT/MRI で測定した。多発症例では全肝実質体積変化を測定した。単発症例のうち 2 例について、コンピュータ流体解析 (CFD) で、各門脈枝における術前後の血流分布変化と灌流領域の体積変化を検討した。

単発症例の嚢胞体積は 1158 ± 93 ml で、術後全肝再生率との相関は見られなかった。区域別再生率の検討では、嚢胞により圧排を受けていた領域の再生率が、圧迫を受けていない領域に対して有意に大きく (126% vs 111% ; $P<0.01$)、門脈枝径も嚢胞の圧排が解除された部位で有意に増大した (176% vs 116% ; $P<0.05$)。多発症例による検討でも、術後全肝実質体積の増加を認めた。CFD を用いた、門脈血流分布の変化では、開窓術後に嚢胞による圧排が解除された門脈枝で流量が増加し ($\sim 274\%$)、同灌流域の再生率が大きかった ($\sim 186\%$)。さらに、各門脈枝血流量変化率と領域別肝再生率との間に強い相関 ($r = 0.92$, $P < 0.01$) を認め、門脈血流分布変化が特殊な肝再生を制御している可能性が示唆された。



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 4 件)

Yada A, Limuro Y, Uyama N, Uda Y, Okada T, Fujimoto J. Splenectomy attenuates murine liver fibrosis with hypersplenism stimulating hepatic accumulation of Ly-6C(10) macrophages. J Hepatol. 査読有、2015、63、905-16. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.05.010.

Limuro Y, Suzumura K, Ohashi K, Tanaka H, Iijima H, Nishiguchi S, Hao H, Fujimoto J. Hemodynamic analysis and treatment of an enlarging extrahepatic portal aneurysm: report of a case. Surg Today. 査読有、2015、45、383-9. DOI: 10.1007/s00595-014-0882-8.

Limuro Y, Kondo Y, Suzumura K, Uyama N, Asano Y, Hirano T, Yamanaka J, Iijima H, Nishiguchi S, Fujimoto J. Regional hepatic regeneration after liver resection correlates well with preceding changes in the regional portal circulation in humans. Dig Dis Sci. 査読有、2013、58、3001-9. DOI: 10.1007/s10620-013-2756-0.

Limuro Y, Okada T, Kondo Y, Suzumura K, Uyama N, Uda Y, Yamanaka J, Fujimoto J. Analysis of unique liver volume restoration after laparoscopic fenestration of liver cysts. Asian J Endosc Surg. 査読有、2014、7、124-32. DOI: 10.1111/ases.12092.

〔学会発表〕(計 5 件)

飯室勇二、近藤祐一、裴正寛、田中省吾、中村育夫、鈴木和太、麻野泰包、平野公通、藤元治朗 肝切術後の門脈血流動態変化と不均一な領域別肝再生、第113回日本外科学会定期学術集会、2013、4、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

飯室勇二、鈴木和太、大橋浩一郎、田中弘教、飯島尋子、西口修平、藤元治朗 肝外門脈瘤治療における門脈血流動態シミュレーション解析の応用、JDDW2013(第17回日本肝臓学会大会)、2013、10、グランドプリンスホテル新高輪(東京都)

飯室勇二、矢田章人、藤元治朗 脾摘による硬変肝での肝前駆細胞の分化誘導メカニズム、第51回日本肝臓学会総会、2015、5、ホテル日航熊本(熊本県・熊本市)

飯室勇二、矢田章人、藤元治朗 脾臓と肝臓の臓器相関：脾摘による硬変肝再生促進機構の検討、JDDW2015、2015、10、

グランドプリンスホテル新高輪(東京都)

Yuji Limuro, Akito Yada, Toshihiro Okada, Naoki Uyama, Jiro Fujimoto Splenectomy attenuates advanced liver fibrosis stimulating hepatic accumulation of anti-fibrogenic monocytes/macrophages. AASLD The liver meeting, 2015、11、サンフランシスコ(米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

鈴木 和太 (SUZUMURA, Kazuhiro)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：50434949

藤元 治朗 (FUJIMOTO, Jiro)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：90199373

平野 公通 (HIRANO, Tadamichi)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90340968

(3) 連携研究者

池田 一雄 (IKEDA, Kazuo)
大阪市立大学・医学部・教授
研究者番号：80275247