

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791296

研究課題名 (和文) 門脈圧亢進症における脾腫の分子メカニズムおよび肝脾関連の解明とその臨床応用

研究課題名 (英文) Endothelin-1 derived from spleen might modulate hepatic stellate cell and increase intrahepatic resistance in liver cirrhosis.

研究代表者

金城 直 (KINJO NAO)

九州大学・大学病院・特任助教

研究者番号：00507791

研究成果の概要 (和文)：

肝硬変症における門亢症の一因の肝内抵抗に関して、脾臓との関係に注目し、その分子的メカニズムの解明を目的とした。①ヒト肝硬変症例における脾臓での preproendothelin-1(ppET-1)、Endothelin converting enzyme(ECE)、Transforming growth factor β 1(TGF β 1)、Tumor necrosis factor α (TNF α)の mRNA の発現に関して realtime PCR 法を用いて検討を行ったところ、肝硬変の脾臓においては、非門亢症症例の脾臓に比べ、ppET1 の発現が有意に高値であった。胆汁性肝硬変モデルを用いて行った検討においては、開腹群 1.81 ± 0.15 pg/ml であるのに対して、BDL 群 4.17 ± 0.62 pg/ml と有意に高値を示し ($p < 0.05$)、BDL に脾摘を行った群では、有意差はないものの低下傾向を認めた (3.38 ± 0.53 pg/ml, $p = 0.056$)。脾臓の免疫染色を行ったところ、BDL 群では開腹群に比べ有意に ET-1 の高発現を認めた。BDL 群では、開腹群に比べ、肝組織中の RhoA、RockII の発現が有意に高値で、脾摘を行うことで、その発現が有意に低下することが分かった ($p < 0.05$)。Rho kinase 活性においても同様に BDL 群では、開腹群に比べ、肝組織中の RhoA の活性が有意に高値で ($p < 0.01$)、脾摘を行うことで、その活性が有意に低下することが分かった ($p < 0.05$)。脾臓由来の ET-1 が肝星細胞を収縮させ、肝内抵抗を増加させ、肝内の微小循環に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

The aim of study is to elucidate that endothelin-1 derived from spleen might modulate hepatic stellate cell and increase intrahepatic resistance in liver cirrhosis. mRNA of Endothelin-1 (ET-1) was significantly more synthesized in the spleen of cirrhotic patients than that of nonportal hypertensive patients. The study using bile duct ligated rats showed that ET-1 in the portal vein was higher in bile-duct ligated (BDL) rats than in sham operated rats (4.17 ± 0.62 pg/ml vs 1.81 ± 0.15 pg/ml, $p < 0.05$). Rho A and Rock II expression in the liver of BDL rats was significantly higher than that of sham operated rats ($p < 0.05$) and splenectomy decreased Rho A and Rock II expression in the liver of BDL rats ($p < 0.05$). Phosphorylation of moesin, which is substrate of Rho kinase, was significantly increased in the BDL rats than sham operated rats ($p < 0.001$), and splenectomy decreased phosphorylation of moesin in the liver of BDL rats ($p < 0.05$). In conclusion, ET-1 derived from spleen might modulate hepatic stellate cell, leading to increase intrahepatic resistance in cirrhotic patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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、脾門脈外科

キーワード：門脈圧亢進症、肝内微小循環、肝硬変症、エンドセリン-1、脾臓

1. 研究開始当初の背景

日本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、慢性肝炎・肝硬変症患者の診療において消化管出血・腹水貯留・脾機能亢進症などの門脈圧亢進に伴う症状は、その予後に影響を及ぼす重要な合併症である。しかし、これらの治療の多くは局所的な治療法で、現時点では、根本的に門脈圧亢進症(門亢症)を治療する方法としては、肝移植以外に方法が無く、生体肝移植が中心の本邦においては、ドナーのリスクや倫理的問題もあり、誰でもが享受できる治療とは言い難い。

門亢症の成因として、(1)肝内抵抗の増大、(2)循環亢進状態による門脈流入血流の増大が関与している。門脈圧亢進症における肝内抵抗は、fixed element (肝内の線維化、門脈域・中心静脈域の閉塞など)と modulable element (肝星細胞の弛緩・収縮)から構成されている。modulable element に関しては、類洞において、収縮因子(angiotensin II, Endothelin 1 など)や弛緩因子(NO, CO など)が肝星細胞に作用し、類洞の収縮・血流は調節し、肝硬変における門亢症において、modulable element は3割程度、関与していると考えられている。線維化の抑制と共に、この modulable element をコントロールすることが、門脈圧亢進症の治療の一助になると考えられるが、未だその詳細なメカニズムに関してはわかっていない。

脾臓は肝臓と門脈系を介して連結しており、肝疾患の進展に伴い、脾臓は増大、脾腫を呈することが知られている。慢性肝疾患において古くから脾性中毒説の存在が考えられてきたが、その存在や詳細に関しては依然不明のままで、未だ十分に解明されていないのが現状である。日常臨床では硬変肝では脾臓を摘出すると肝機能が改善することや脾腫症例で脾動脈血流量は増加していることなど、脾臓(脾腫)が門亢症や肝臓に対して何らかの影響を及ぼしていることが示唆されているが詳細は不明である。最近では肝硬変動物モデルやヒト肝硬変患者における検討で、transforming growth factor- β (TGF β)や Endothelin -1 といったサイトカインが脾臓で多く産生され、肝再生や肝内微小循環に影響を及ぼしているとの報告がある。これまでに我々は、著明な脾腫を伴い、原因不明の門脈圧亢進を示す、特発性門脈圧亢進症症例において、脾内の

preproEndothelin-1 (ppET-1;強力な血管収縮因子である Endothelin-1 の前駆体)、Endothelin converting enzyme(ECE; endothelin-1 前駆体から endothelin-1 への変換酵素)、Transforming growth factor β (TGF β ;線維化の主役となるサイトカイン)、Tumor necrosis factor α (TNF α)の mRNA が非門亢症症例と比較して増加していることを報告してきた。

Rho シグナルは、肝硬変モデルにおいて肝星細胞に高発現し、Rho シグナル異常が肝内血管抵抗の原因の一つであることが報告されている。Endothelin -1 は Rho シグナルの上流に位置し、Rho シグナルを亢進させることが知られている。

2. 研究の目的

以上のこれまでの研究結果から、脾臓における何らかの分子が門脈を介して、肝星細胞に働き、収縮・弛緩のバランスが崩れ、収縮に強く働くことで、肝内抵抗が増大し、門亢症の一因、肝内微小循環障害の原因となっている可能性がある。肝脾相関の一つである可能性がある。本研究は、肝硬変症における門亢症の成因に関して、脾臓と肝内抵抗の関係に注目して、その分子的メカニズムの解明とその臨床応用を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肝硬変患者の摘出脾での m-RNA の発現

九州大学病院において、手術にて採取し凍結保存を行った脾臓 59 例を今回の検討に用いた。肝硬変症例は 47 例で、門脈圧亢進症を呈さない疾患での脾摘症例(非門亢症症例)12 例を対照とした(特発性血小板減少性紫斑病 n=3, 脾嚢胞 n=3, AIHA n=1, 脾外傷 n=2, 悪性リンパ腫 n=1, 食道癌 n=1, サラセミア n=1)。凍結保存を行った脾臓の一部を採取し、mRNA を抽出し、cDNA を作成して

preproendothelin-1(ppET-1)、Endothelin converting enzyme(ECE)、Transforming growth factor β 1(TGF β 1)、Tumor necrosis factor α (TNF α) の mRNA の発現を realtime PCR 法(SYBR Premix Ex Taq)にて検討を行った。使用したプライマーは下記の通りで、GAPDH を標準マーカーに用いた。(F:forward, R:reverse)

ppET-1;

(F) 5'-CAGCGCGGTGGGTGAGAACG-3',

(R)5'-CAAATGATGTCCAGGTGGCAGAAGT AG-3'

ECE;

(F) 5'-TGAAAACGAGAAGGTGCTGAC-3',
(R) 5'-CGGTGGTGTGATGAGAGTGG-3',
TGFβ1;

(F) 5'-CGAGCCTGAGGCCGACTAC-3',
(R) 5'-AGATTTCGTTGTGGGTTCCA-3',
TNFα;

(F) 5'-TTCCTCAGCCTCTTCTCCTT-3',
(R) 5'-GGCTTGTCACTCGGGGTTTCG-3'
GAPDH;

(F) 5'-TTGGTATCGTGAAGGACTCA-3',
(R) 5'-TGTCATCATATTTGGCAGGTT-3'

(2)胆汁性肝硬変モデルを用いた肝硬変と肝微小循環の検討

モデル；週齢6週の雄性SDラット(200～250g)に胆管結紮を行い、胆汁性肝硬変モデル(BDL)を作成(n=12)、うち6例は脾摘を行った(n=6)。対照群は、開腹のみを行ったもの(開腹群、n=12)とし、うち6例は脾摘を行った。手術2週間後に犠牲死を行い、下記実験に使用した。

① 門脈圧、肝組織血流量の測定

犠牲死直前に門脈圧、肝組織血流量を測定した。門脈圧は腸間膜静脈末梢枝に26Gを挿入し、生食で満たしたアトム管を用いて測定した。肝組織血流量はレーザードップラー血流計を用いて測定した。

② 門脈血および肝組織の採取

犠牲死直前に、門脈血と下大静脈血を直接穿刺し採取した。脾および肝組織は重量測定したのち、一部を採取し凍結保存を行った。

③ ET-1 血中濃度の測定

ET-1 血中濃度に関しては、Endothelin-1 ELISA kit; Assay Design, Michigan, USA を用いて測定を行った。

④ 免疫組織染色

肝および脾臓組織を一部採取し、10%ホルマリンで固定した後、それぞれの切片を脱パラフィンを行った薄切片を用いて行った。一次抗体にはET-1 antibody (ALEXIS, 803-001-R100, Clone TR.ET.48.5; Alexis, Lausen, Switzerland)を用いた。

⑤ 蛋白定量(ウエスタンブロット法)

凍結保存した組織を、蛋白分解酵素阻害剤を含む溶解液に溶かし、蛋白を抽出した。同等量の蛋白をSDS-PAGEにて分離し、nitrocellulose膜に転写した。一次抗体は、RhoA(BD Biosciences, San Jose, CA), ROCKII (BD Biosciences, San Jose, CA)を用い、定量はLAS3000を用いて行った。

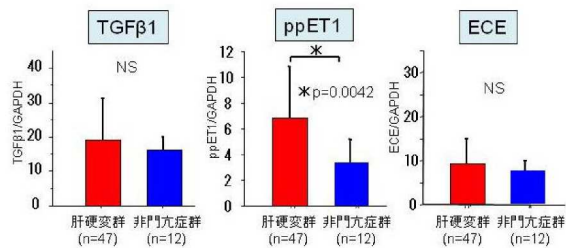
⑥ Rho kinase 活性

Rho kinaseの基質であるmoesinのリン酸化によって測定した。一次抗体は、p-moesin(Cell Signaling Technology, Boston, MA), t-moesin(Cell Signaling Technology, Boston, MA)を用いた。

4. 研究成果

① ヒト脾臓におけるppET-1、ECE、TGFβ1、の mRNA の発現

肝硬変の脾臓においては、非門亢症症例の脾臓に比べ、ppET1の発現が有意に高値であった。TGFβ1やECEでは有意差を認めなかった。



(図1 ヒト脾臓におけるppET-1、ECE、TGFβ1のmRNAの発現(realtime PCR法))

(2) 胆汁性肝硬変モデルを用いた肝硬変と肝微小循環の検討

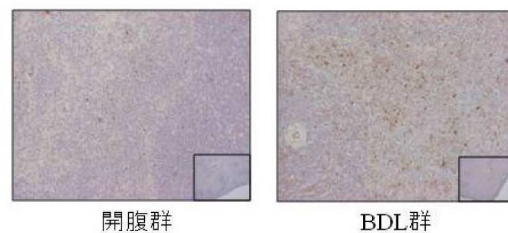
①門脈圧はBDL群 23.3±3.91cmH2Oで、開腹群 11.1±0.82cmH2Oに比べ、有意に高値であった(p<0.01)。肝組織血流量は開腹群 18.6±1.91ml/minであるのに対して、BDL群 13.3±1.82 ml/minで有意に低下していた(p<0.01)。

② 門脈血中 ET-1 濃度

開腹群 1.81±0.15 pg/mlであるのに対して、BDL群 4.17±0.62 pg/mlと有意に高値を示し(p<0.05)、BDLに脾摘を行った群では、有意差はないものの低下傾向を認めた(3.38±0.53 pg/ml, p=0.056)。

③ 脾内の ET-1 の発現(免疫組織染色)

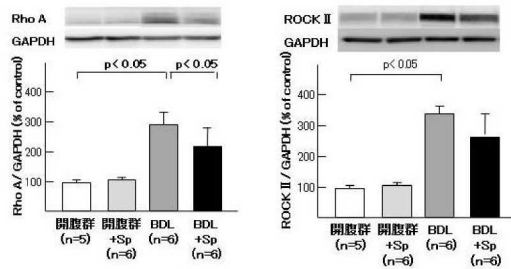
脾臓の免疫染色を行ったところ、BDL群では開腹群に比べ有意にET-1の高発現を認めた。



(図2 脾内の ET-1 の発現(免疫組織染色))

④ 肝臓における RhoA、ROCKII の蛋白発現

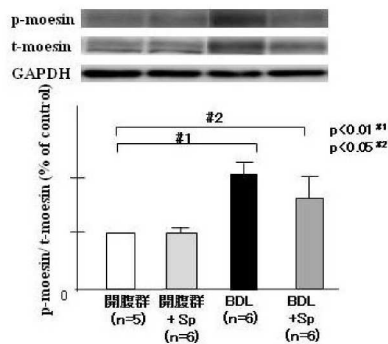
ウエスタンブロット法による検討では、BDL群では、開腹群に比べ、肝組織中の RhoA、RockII の発現が有意に高値で、脾摘を行うことで、その発現が有意に低下することが分かった(p<0.05)。



(図3 肝臓における RhoA、ROCKII の発現 (ウエスタンブロット法))

⑤ 肝組織における Rho A 活性の検討

Rho A の基質である moesin を用いた活性測定においても同様に BDL 群では、開腹群に比べ、肝組織中の RhoA の活性が有意に高値で (p<0.01)、脾摘を行うことで、その活性が有意に低下することが分かった(p<0.05)。



(図4; 肝組織における RhoA 活性の検討)

以上より、脾臓由来の ET-1 が肝星細胞を収縮させ、肝内抵抗を増加させ、肝内の微小循環に影響を及ぼしている可能性が示唆された。脾臓からの ET-1 が肝内微小循環障害を引き起こすことが、肝硬変症における肝脾相関の一つであることが示唆されたが、引き続き検討を要する。

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 8 件)

・ 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.

・ 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;97(9):1452 author reply

・ Hashimoto N, Akahoshi T, Tomikawa M, Kawanaka H, Konishi K, Uehara H, Kinjo N, Korenaga D, Takenaka K, Maehara Y. Value of Laparoscopic Splenectomy as Salvage Treatment for Relapsed Thrombocytopenia after Partial Splenic Arterial Embolization. *Dig Surg*. 2010 Dec 23;27(6):515-520.

・ 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.

・ 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.

・ 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.

・ Anegawa G, Kawanaka H, Uehara H, Akahoshi T, Konishi K, Yoshida D, Kinjo N, Hashimoto N, Tomikawa M, Hashizume M, Maehara Y. Effect of laparoscopic splenectomy on portal hypertensive gastropathy in cirrhotic patients with portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009 Sep;24(9):1554-8.

・ Kawanaka H, Akahoshi T, Kinjo N, Konishi K, Yoshida D, Anegawa G, Yamaguchi S, Uehara H, Hashimoto N, Tsutsumi N, Tomikawa M, Koushi K, Harada N, Ikeda Y, Korenaga D, Takenaka K, Maehara Y. Technical standardization of laparoscopic splenectomy harmonized with

hand-assisted laparoscopic surgery for patients with liver cirrhosis and hypersplenism. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2009;16(6):749-57.

〔学会発表〕（計4件）

- ・金城 直、赤星朋比古、家守雅大、長尾吉泰、橋本直隆、上原英雄、小西晃造、富川盛雅、調 憲、田上和夫、橋爪 誠、前原喜彦、一般口演；肝硬変/門脈圧亢進症に対する腹腔鏡下脾摘術の術中出血量に関する臨床因子の検討（第110回日本外科学会定期学術集会、平成22年4月8-10日、名古屋）
- ・金城 直、赤星朋比古、吉武宣明、家守雅大、長尾吉泰、橋本直隆、上原英雄、富川盛雅、橋爪 誠、前原喜彦、慢性C型肝炎/肝硬変患者に対する脾摘後肝機能改善効果に関する検討（第22回日本肝胆膵外科学会総会、平成22年5月26-28日、仙台）
- ・金城 直、赤星朋比古、吉武宣明、家守雅大、長尾吉泰、橋本直隆、上原英雄、富川盛雅、橋爪 誠、前原喜彦、要望演題「障害肝合併における脾臓摘出術の功罪」、慢性C型肝炎/肝硬変患者に対する脾摘後肝機能改善効果に関する検討（第65回日本消化器外科学会定期学術集会、平成22年7月14-16日、下関）
- ・上原英雄、赤星朋比古、金城 直、橋本直隆、長尾吉泰、家守雅大、富川盛雅、武富紹信、調 憲、前原喜彦、硬変肝において脾臓摘出術が肝微小循環に及ぼす影響についての検討（第65回日本消化器外科学会、2010年7月15日）

6. 研究組織

(1)研究代表者

金城 直 (KINJO NAO)

九州大学・大学病院・特任助教

研究者番号：00507791

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：