

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 21 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390250

研究課題名（和文） 外科手術による癒着・線維形成過程の分子機構解析と制御法開発と探索医療への展望

研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanism and the regulation of adhesion formation and fibrin formation after abdominal surgery and its medical application

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

研究成果の概要（和文）：

マウス及びヒトでの肝切除後の癒着形成について解明した。肝切除後には肝内の NKT 細胞が肝切除部位近傍に集簇し、これらが肝内での IFN- γ を産生した。IFN- γ 依存性に、肝細胞から線溶系因子である PAI-1 が産生された。これらが癒着形成に重要な因子であることが判明した。マウスに HGF を投与することにより、IFN- γ 及び PAI-1 の産生を抑制し癒着を軽減でき、今後ヒトにおける癒着予防法の応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the adhesion formation after hepatectomy in mice and humans. After hepatectomy, NKT cells in the liver accumulated nearby cut end and produced IFN- γ . Hepatocyte produced PAI-1, fibrinolysis factor, dependent on IFN- γ production. These molecules are crucial role for adhesion formation after hepatectomy. Mice treated with recombinant HGF was decreased adhesion formation after hepatectomy though inhibition both IFN- γ and PAI-1 production. This treatment may apply for the adhesions in human cases in near future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2011 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：外科総論

1. 研究開始当初の背景

外科術後の腹腔内癒着形成は、腸閉塞・腹痛・不妊など慢性的な様々な合併症を起し患者に不利益を被る。現在まで癒着形成のメ

カニズムや治療法について様々な報告がなされてきているが、いずれも決定的な因子ではない。研究代表者たちは、手術マウス腸管癒着モデルの確立・癒着形成のメカニズムの

解析と、HGF（肝細胞増殖因子）による癒着制御に関する論文を *Nature Medicine* 誌に発表した。

2. 研究の目的

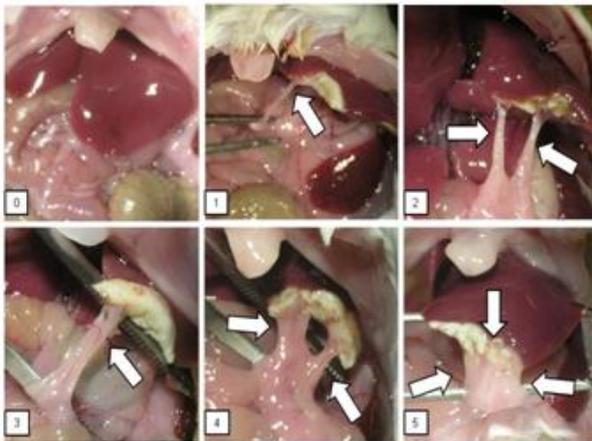
今回の研究では、この成果をさらに発展させることとした。肝切除における癒着は、前述の合併症以外に問題が存在する。近年肝切除は肝癌などにおける第一選択の治療となっているが、初回治癒切除後に肝内再発した時にも再肝切除が最適な治療とされる。しかし前回手術による癒着により手術が難渋することがある。また生体肝移植ドナーは、生来健康でなければいけないが、術後癒着は重大な合併症のひとつとされ、ドナーを悩ませているのが現実である。

(1) 腹部外科手術全般に対応するため、以前のモデルである腸管に加え肝臓手術における癒着モデルの開発、及び免疫・血液凝固系も含む線維・癒着形成の分子機構の詳細な解明を行う。また、同モデルにおける HGF による制御方法の開発を行う。

(2) ヒト手術中組織を用いた癒着メカニズムの検証を目的とする。

3. 研究の方法

(1) Balb/c マウス（野生型；以下 WT）のほか、NKT ノックアウト (KO)、IFN- γ KO、PAI-1KO マウスを今回の実験に用いた。マウス麻酔後に肝左葉部分切除術(約 200mg) (以下 PH) を実施し 1 週間後に癒着をスコア化し評価した (0-5) (図 1)。



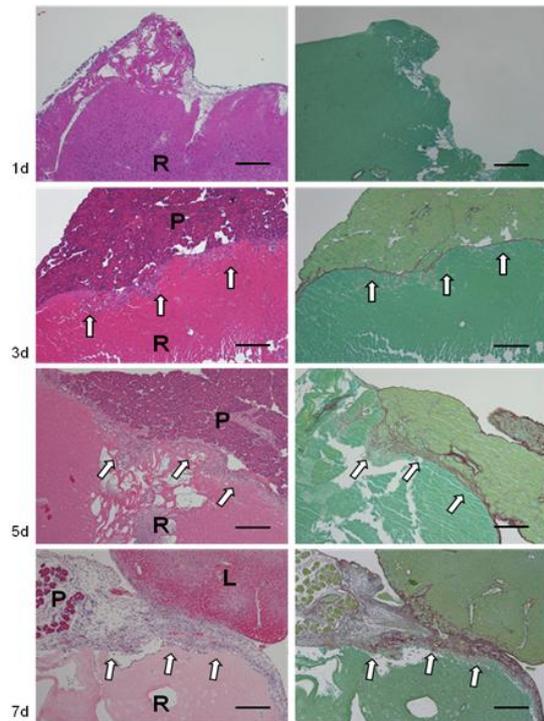
(図 1 : 肝部分切除後の癒着スコア (7 日後))

PH 後、3~24 時間後の残肝における IFN- γ /tPA/PAI-1 の RNA 発現を RT-PCR で検証した。WT マウスにおけるリコンビナント HGF 投与の癒着軽減効果の検討。この動物実験は同大学内における承認を得た。

(2) ヒト肝切除症例において、肝切除前のサンプルをコントロールとして採取し、肝切除開始後に経時的な肝臓切離面組織をサンプリングした。このサンプルにおける IFN- γ 及び PAI-1 の RNA 発現を検討した。また同サンプルを用いて NKT 及び PAI-1 の免疫染色を行った。このヒト臨床研究は同大学内倫理委員会での承認を得た。

4. 研究成果

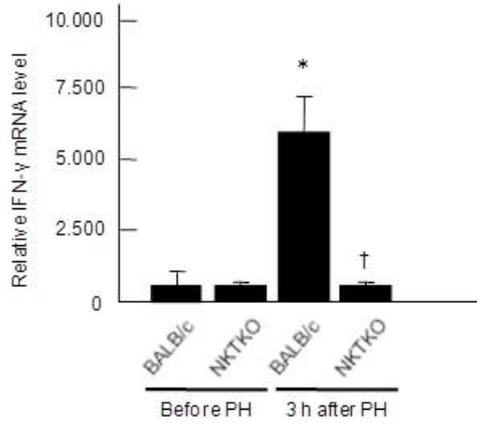
(1) PH を行うと 7 日目には周囲の大網・脾臓・肝臓などが肝切離面に癒着していた。PH 後の癒着が形成される経時的 (1-7 日) な変化を、HE 及びシリウスレッド染色を用いて組織学的に検討した (図 2)。癒着部において、炎症細胞及び線維化が徐々に形成されていた。



(図 2 : PH における経時的な組織学的検討。左 ; HE 染色、右 ; シリウスレッド染色)

CD4 陽性 T 細胞が癒着に関連があると報告されており (*J Exp Med* 2002; **195**: 1471-1478)、これを確認すべく WT マウスに CD4 抗体処置を行ったところ、癒着が減弱された。CD4 陽性には conventional な T 細胞と NKT が含まれる。肝には NKT 細胞が豊富に存在しており、NKT 細胞が関与しているかを確認した。NKTKO マウスでは癒着が減弱しており、当モデルにおいては NKT 細胞の関与が疑われた。NKT 細胞は活性化すれば IFN- γ を産生するため、IFN- γ について検討した。PH 後、経時的に残肝の RT-PCR 解析を行ったところ、3 時間

後に IFN- γ の上昇を認め以後漸減した。IFN- γ が NKT 細胞から産生されているかどうかを検討するため、WT 及び NKTKO マウスを用いた実験を行った。両マウスに PH を行い、3 h 後の残肝の IFN- γ の発現を検討したところ、NKTKO マウスでは有意差を持って IFN- γ の産生が抑制されていた (図 3)。

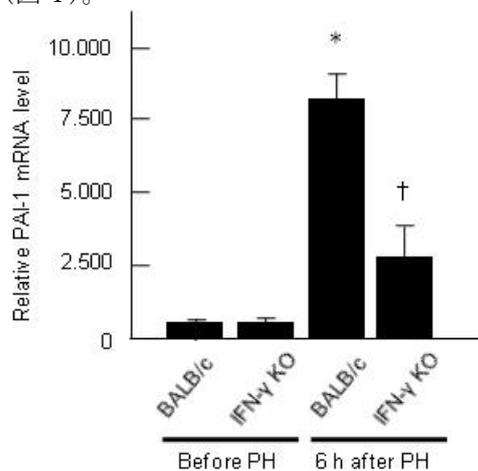


(図 3 ; PH により NKT 細胞から IFN- γ が産生)

IFNKO マウス及び IFN- γ 抗体処置したマウスでも癒着スコアの減弱が確認された。

以上より PH を行えば早期に肝内に存在する NKT 細胞が活性化され IFN- γ が産生され、これらが癒着形成に関与している可能性が示唆された。

癒着形成には以前より線溶系因子である PAI-1 の関与が指摘されている。当モデルにおいて PAI-1 に関して検討した。PH 後肝内の PAI-1 を測定したところ、術後 3-12h 後に上昇を認めた。また PAI-1 とは相反関係にある tPA に関して検討した。tPA は PH 後 18 h 後に減少していることが確認された。続いて、IFN- γ と PAI-1 の関連性について検討した (図 4)。

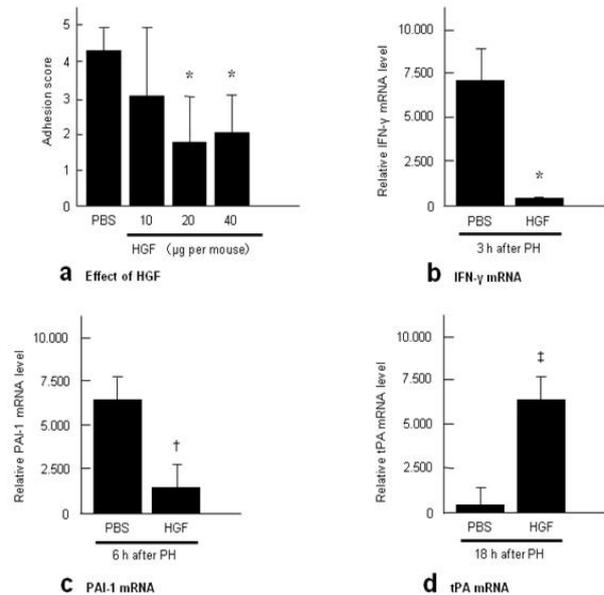


(図 4 ; PH により IFN- γ 依存性に PAI-1 が産生)

WT マウス及び IFNKO マウスを用い、PH を行い 6 h 後の残肝 PAI-1 の発現を検討した。IFNKO マウスでは PAI-1 の発現が有意に少なく、IFN- γ 依存性に PAI-1 の産生がされることが示唆された。また PAI-1KO マウスは WT と比べ癒着スコアが有意に少なく、PAI-1 は PH 後の癒着形成に重要であることが示された。

以上のマウス実験より、肝切除を行うと① NKT 細胞が活性化され IFN- γ が産生される、② IFN- γ 依存性に PAI-1 が産生される (tPA は減少する)、ことにより癒着が形成されている可能性が示唆された。

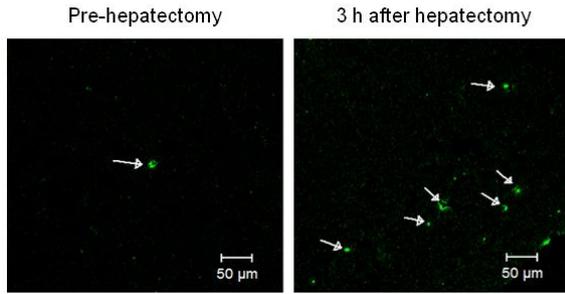
続いて癒着予防法につき検討を行った。HGF は抗炎症・線維化が報告されているが、当モデルにおける HGF の癒着予防効果を検討した。WT マウスを用い PH 直後にリコンビナント HGF を皮下に投与したところ (20 μ g/マウス)、7 日目の癒着スコアが軽減された (図 5 a)。



(図 5 ; WT マウスに HGF 投与して PH 後の癒着を検討)

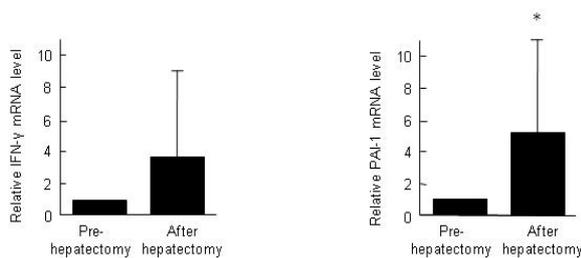
続いて、HGF 癒着軽減のメカニズムを検討した (図 5 b, c, d)。PH 後 HGF 投与により、残肝の IFN- γ 及び PAI-1 の産生が抑制され、また逆に tPA の産生が増強した。

(2) ヒト肝切除サンプルを用いた研究を行った。上記でマウスでの癒着メカニズムの解明を行ったが、ヒトでも同様のメカニズムが機能しているかを確認した。まず肝切除後の NKT 細胞の存在を確認することとした。NKT 細胞の表面抗体 (iNKT) を用いて免疫染色を行った。肝切除後 3 h 後には肝切離面近傍に NKT の集簇が認められた (図 6)。



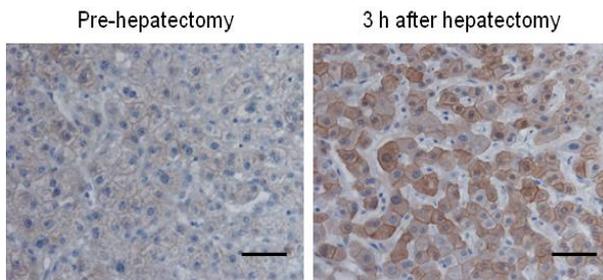
(図6 ; 肝切除時のNKT細胞)

肝切除を行い、IFN- γ 及び PAI-1 の発現について解析した (図7)。IFN- γ は有意差はないが上昇傾向にあった (3.3 倍の上昇)。PAI-1 は有意差をもって上昇していた。



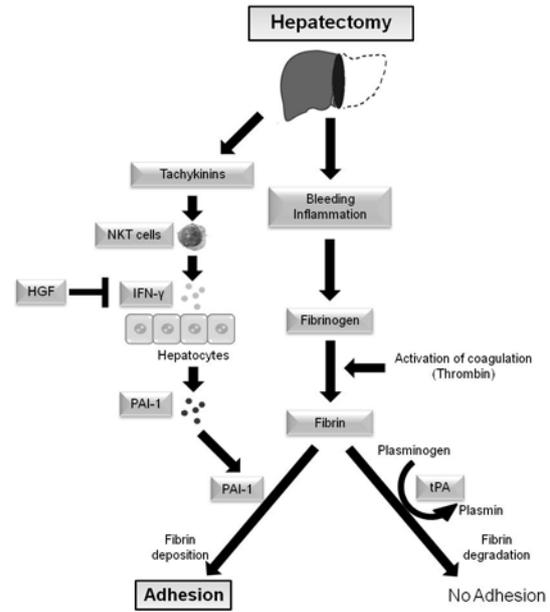
(図7 ; 肝切除による肝内の発現)

最後に、PAI-1 の発現を免疫染色で確認することとした (図8)。3 時間後には PAI-1 の発現がみられ、強拡大では肝細胞に発現が認められた。



(図8 ; 肝切除時の PAI-1 発現)

(1) (2) の結果をもとに、今回の研究における概念を図9に示した。



(図9 ; 肝切除後の癒着形成のメカニズム)

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)

[学会発表] (計3件)

① The Liver Meeting
IFN- γ derived from NKT cells and plasminogen activator inhibitor-1 regulate adhesion formation after hepatectomy
 (Boston, USA, 2012/11/12)

発表代表者：大橋浩一郎

② 第46回欧州外科研究会 (ESSR)
Hepatocyte growth factor inhibited adhesion formation after hepatectomy by regulating interferon-gamma and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in mice

(Aachen, Germany, 2011/5/27)

発表代表者：大橋浩一郎

③ 米国消化器病週間 2011(DDW)
Hepatocyte growth factor inhibited adhesion formation after hepatectomy by regulating interferon-gamma and plasminogen activator inhibitor-1 in mice
 (Chicago, USA, 2011/5/8)

発表代表者：大橋浩一郎

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

中西 憲司 (NAKANISHI KENJI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：60172350

飯室 勇二 (IIMURO YUJI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：30252018

平野 公通 (HIRANO TADAMICHI)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：90340968

宇山 直樹 (UYAMA NAOKI)
兵庫医科大学・医学部・研究生 (研究員)
研究者番号：70402873

善本 知宏 (YOSHIMOTO TOMOHIRO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：60241171

廣田 誠一 (HIROTA SEIICHI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：50218856