

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461016

研究課題名(和文)慢性肝疾患における肝細胞障害と肝内凝固亢進状態の関連性に関する検討

研究課題名(英文)The role of impaired micro circulation or coagulopathy in chronic liver disease

研究代表者

西口 修平(NISHIGUCHI, SHUHEI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10192246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性の肝細胞障害に、微小循環障害がどのように関与するのかを検討した。フォン・ウィルブラント因子(vWF)、トロンビン・アンチトロンビン複合体、プロテインC、プロテインS抗原を測定したが、多くの凝固因子が連動して動いている症例は稀であり、生体内で凝固因子系の暴走に対する多重の制御機構の存在が示唆された。肝生検検体を用いたvWFの免疫染色は、肝組織中の類洞に特異的で、肝組織全体に観察された。肝疾患で高値を示すPAI-1は、同様に類洞が染色された。肝障害時には凝固亢進状態に陥っており、微小血栓が形成されやすい状況が存在し、一部の症例においてトロンビンが過剰産生されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We examined the role of coagulopathy in chronic liver disease (CLD). Blood samples and liver tissues were taken from 15 chronic hepatitis (CH)-B, 27 CHC, 10 autoimmune hepatitis (AIH), and 8 non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Von Willebrand factor (vWF) was high 8/15 in CHB, 14/27 in CHC, 6/8 in AIH, was low 4/8 in NASH. Thrombin and Antithrombin 3 complex (TAT) was high 3/15 in CHB, 4/27 in CHC, 3/11 in AIH, 2/8 in NASH. Protein C (PC) and S (PS) were low in 6/15 and 3/15 in CHB, 10/27 and 9/27 in CHC, 2/10 and 1/10 in AIH, 0/8 and 0/8 in NASH respectively. But these clotting factors rarely working simultaneously. Liver samples were analyzed by immunohistochemical staining. Both vWF-Ag and PAI-1 were stained uniformly in the liver tissue, especially around sinusoids. Hypercoagulopathy (high vWF and low PC and PS) was found in CLD, lead to thrombin overproduction in some cases.

研究分野：肝疾患

キーワード：凝固亢進 肝障害 肝線維化

1. 研究開始当初の背景

劇症肝炎にみられる広範肝壊死は、基礎研究において我々が示した凝固亢進から生じる微小循環障害が有力な機序の一つである。しかし、このような微小循環障害が臨床的にも慢性肝炎や肝硬変に見られる巣状壊死やピースミール壊死の発生に關与するのか、あるいは慢性肝不全と關連性などについては未だに検討されていない。一方、最近 Toripodi らが The coagulopathy of chronic hepatitis (New Engl.J.Med.2011;365:147-56)の総説を発表したように、肝硬変における凝固亢進状態の存在は臨床的にも明らかとなっており、その臨床的な意義に注目が集まっている。しかし、凝固異常と肝障害の關係や凝固異常の制御に關する臨床的取り組みは国内外ともに皆無であり、今回研究テーマとして取り上げた。

2. 研究の目的

劇症肝炎において、病的凝固亢進・播種性血管内凝固症候群とそれに引き続く微小循環障害が広範囲の肝壊死の原因と考えられている。慢性肝炎においても一過性に急激な肝機能障害が加重することがあり、一般的に考えられている免疫学的な肝細胞障害に、このような微小循環障害がどの程度關与しているのかは不明である。また肝硬変では、凝固亢進状態が血小板低値により代償されている。慢性肝炎の安定期と急性増悪期、肝硬変における血栓症の有無別にそれぞれ微小循環障害の關与を新しい手法を用いて比較検討し、肝疾患の病態、微小循環障害の關係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 慢性肝炎急性増悪期、肝硬變の非代償期への移行時期の血液サンプルの保存を行い、血漿中の凝固因子を測定した。

【測定項目】

フォン・ウィルブランド因子抗原定量(vWF)、トロンビン・アンチトロンビン 複合体 (TAT)、プロトロンビンフラグメント F1+2、プロテイン C (PC)、プロテイン S 抗原(PS)

(2) 可能な症例においては肝生検組織の採取を行い、ホルマリン固定後にパラフィン切片を作成し、免疫組織化学的解析を行った。

【免疫染色に用いた一次抗体】

vWF、PAI-1、フィブリノーゲン

(3) 造影超音波による門脈血流量および流速の測定法の確立

4. 研究成果

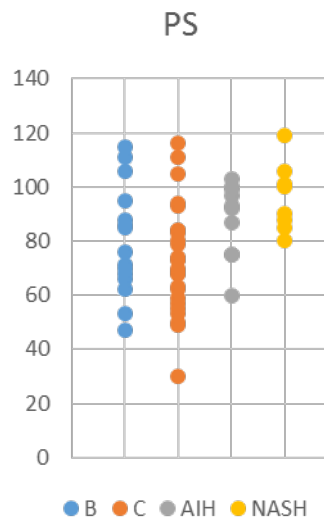
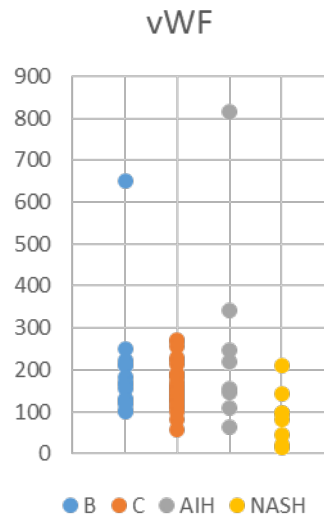
(1) 慢性肝炎急性増悪期、肝硬變の非代償期

への移行時期の血漿中の凝固因子の測定

B 型慢性ウイルス性肝疾患 (CHB) 15 症例、C 型慢性ウイルス性肝疾患 (CHC) 27 症例、自己免疫性肝炎 (AIH) 10 症例、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 8 例の凝固因子を測定した。その結果、vWF は CHB, CHC, AIH において 8/15、14/27、6/10 で高値を示したのに対し、NASH では 4/8 で低値であった。低値は NASH のみに認められた。TAT は、それぞれ 3/15、4/27、3/11、2/8 に高値で、PC は、6/15、10/27、2/10、0/8、PS は、3/15、9/27、1/10、0/8 で低値であった。(図 1)

vWF は NASH では他の 3 群に比べ、有意に低値であり、AIH が最も高値であり、CHB と CHC においては ALT の急性増悪時や慢性肝不全の症例で高値となった。(図 2)

それぞれの凝固因子が連動して動いている症例は稀であり、生体内で凝固因子系の暴走に対する多重の制御機構が働いていることが考えられた。



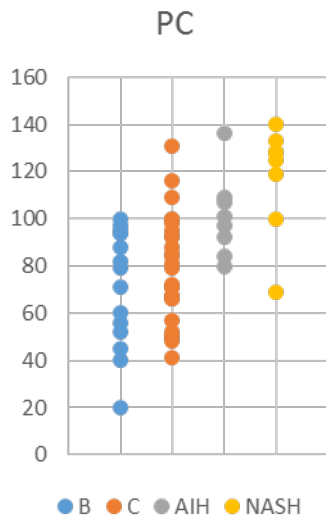


図 1：血漿中の各疾患別の vWF, PC, PS の量

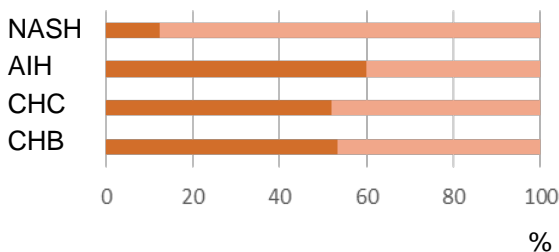


図 2：各疾患別の vWF 高値の割合

(2)免疫組織化学的解析

肝生検サンプルを用いて線維化の進行とともに有意に増加するフォン・ウィルブラント因子 (vWF-Ag) の免疫染色を行った。vWF-Ag は肝組織中の類洞が特異的に染色されており、肝組織全体に均一に観察された。(図 3)

肝疾患で高値を示す線溶系を抑制するポリペプチドである PAI-1 は、vWF-Ag と同じように類洞が染色されたが、それは不規則的に観察された。(図 4)

この 2 種の凝固因子の血漿中の動態と肝組織の免疫染色は必ずしも一致しないことが明らかとなった。

肝臓で産生される糖タンパクのフィブリノーゲンは、血小板凝集による止血に重要な因子である。これは肝細胞がすりガラス状に染色された。

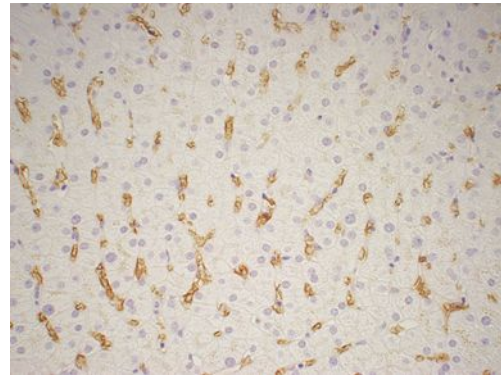


図 3：肝組織中の vWF の局在



図 4：肝組織中の PAI-1 の局在

(3) 造影超音波による門脈血流量および流速の測定法の確立

今回検討した症例の一部で Fibroscan や APRI などの他の線維化マーカーを用いて肝硬度を測定した。vWF は、APRI などの各種線維化診断マーカーと弱い正の相関性を示した。また、造影超音波による門脈血流量および流速の測定法を行った。肝組織内の微小血栓の存在は、門脈血流量や流速を低下させることが予測されたいが、造影超音波・ドップラー法を用いての計測は困難であった。測定は、Phillips iU22 の専用解析ソフト QLAB を用いて TIC を解析し、肝内の関心領域の血流量を解析し、最高輝度に達するまでの時間を Time to Peak を指標として表した。合わせて脈管計における血栓の有無を検索したが、今回測定した症例には大血管内の血栓は存在しなかった。

(4) 結果の総括

血漿中の凝固因子、肝組織中の局在より、肝障害時には凝固亢進状態に陥っており、vWF 高値、PC、PS 低値から微小血栓が形成されやすい状況が存在し、TAT、F1+2 の結果から一部の症例においてトロンピンが過剰産生されていることが明らかとなった。

造影超音波による門脈血流量および流速の測定法を確立できたことは、大きな成果で

ある。しかし、大きな血栓は検出できるが今回問題にするような肝小葉内血栓は、当初の予測通り、用いた機器では測定できなかった。

当初予測していたよりも凝固因子に異常をきたす症例はかなり限定され、ALT300IU以上の高度の異常例でないと凝固亢進状態に至らない。よって、このような臨床検体を確保することが困難であり、研究成果をあげる上での大きな障害となった。

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 1 件)

Tsusui H, Nishiguchi S. Importance of kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice. 2014;15:7711-30.doi:10.3390/ijms15057711.

6. 研究組織

(1)研究代表者

西口 修平 (NISHIGUCHI, SHUHEI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：10192246

(2)研究分担者

筒井 ひろ子 (TSUTSUI, HIROKO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：40236914

榎本 平之 (ENOMOTO, HIRAYUKI)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40449880