

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19350

研究課題名(和文) 門脈圧亢進症に伴う膵うっ血評価の有用性の検討と肝硬変モデルラットを用いた病態解明

研究課題名(英文) Pancreatic congestion in liver cirrhosis correlates with impaired insulin secretion

研究代表者

黒田 太良 (Kuroda, Taira)

愛媛大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10771876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は肝硬変ラットを用いた肝性糖尿病の病態解明，肝硬変患者を対象としたShear wave elastography・造影エコーを用いた膵うっ血評価および内分泌機能評価を行った．肝硬変ラットでは門脈圧亢進がみられ膵うっ血の状態となっていた．HIF-1 の膵ラ氏島における発現は，肝硬変ラットでコントロールに比して高発現しておりインスリン発現は低下していた．膵うっ血に伴う膵の低酸素状態がインスリン分泌低下の原因となっていることが示唆された．さらに，肝硬変患者を対象とした膵うっ血評価を行った．肝硬変患者では膵うっ血がみられ，膵硬度はコントロールに比して高値となっておりインスリン分泌能も低下していた．

研究成果の概要(英文)：The aim of our study was to clarify pathogenesis of hepatogenous diabetes. Using rat model with liver cirrhosis, we showed portal hypertension caused congestion in the pancreas. Expression of HIF-1 in the pancreatic islet cell was significantly more in liver cirrhosis group than that of control group, whereas insulin expression was less. Furthermore, using shear wave elastography and contrast-enhanced ultrasound, we demonstrated degree of the pancreatic congestion and stiffness was significant and insulin secretion was diminished in patients with liver cirrhosis compared to control group. These results suggest hypoxia due to pancreatic congestion contributes to insufficiency of insulin secretion in liver cirrhosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肝性糖尿病 膵うっ血 内分泌機能低下

1. 研究開始当初の背景

肝硬変患者の 10~15%が糖尿病を発症し、肝性糖尿病として知られているが、その発症機序については不明な点が多い。これまでに、肝代謝能低下や門脈大循環シャントに起因した高インスリン血症およびインスリン抵抗性や(参考文献 1)、膵β細胞の過形成およびインスリン分泌低下、膵β細胞の分化・機能維持に寄与する転写因子 pancreatic duodenal hemeobox-1 (PDX-1)の増加が肝性糖尿病の病態として報告されている(参考文献 2)。しかし、いずれも肝硬変患者の膵β細胞におけるインスリン分泌低下のメカニズムについては十分な検討がされていない。

肝硬変では類洞に存在する星細胞の活性化により、類洞の毛細血管化現象が起こる。これにより類洞内圧が上昇し、門脈-脾静脈系の圧の上昇をきたす。脾臓は、門脈-脾静脈系に排水する臓器であり、肝硬変では門脈-脾静脈系がうっ血状態となるため、著明な脾臓腫大を引き起こし、汎血球減少の原因となる。脾臓は脾臓と同様、門脈-脾静脈系に排水する臓器であり、門脈圧亢進状態にある肝硬変患者では膵うっ血となることが推測される。実際我々は、過去に造影超音波による検討で門脈圧亢進を有する肝硬変患者の膵がうっ血状態となっていることを報告した。また、その検討において膵うっ血の程度とインスリン分泌能低下との間には強い相関関係がみられることを証明した(参考文献 3)。これらの結果は、膵うっ血が肝性糖尿病の一因となることを示している。

2. 研究の目的

本研究は、膵うっ血による膵β細胞からのインスリン分泌低下を引き起こす詳細なメカニズムの解明を行い、肝性糖尿病発症の予測因子や治療効果判定マーカーになり得る因子を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は肝硬変モデルラットを用いて膵うっ血による膵β細胞からのインスリン分泌低下を引き起こすメカニズムの解明を行う。さらに臨床的な評価として、組織のうっ血状態をより鋭敏に反映することが報告されている Shear wave elastography (以下 SWE) および造影エコーを用いて、門脈圧亢進を有する肝硬変患者を対象とした膵硬度および血流動態の評価を行い、膵内分泌機能との関連性について解析する。

(1) 肝硬変モデルラットの作製と門脈圧の評価

週令ラットに CC14 (2mg/kg) を週 2 回、皮下投与し肝硬変モデルラットを作製する。8~10 週を目安に肉眼的な肝形態を確認する。さらに門脈へのカテーテル挿入による圧測定を行い、肝硬変モデルラットにおいて門脈圧が亢進していることを確認する。また、HE 染色、

鍍銀染色、アザン染色を用いて肝の線維化を確認する。

(2) 肝硬変モデルラットにおけるインスリン分泌能評価

肝硬変モデルラットに経静脈内ブドウ糖負荷試験を行い、門脈血中の血糖上昇およびインスリン分泌の状態を評価する。また膵ラ氏島におけるインスリン分泌を PCR 法において定量的に評価し、コントロールラットと比較検討する。

(3) 肝硬変モデルラットにおける膵低酸素状態の証明

細胞の低酸素環境下に応答して活性化される転写因子である低酸素誘導性因子 (hypoxia-inducible factor: HIF) が知られている(参考文献 4)。肝硬変ラット膵組織における HIF-1 α の発現を RT-PCR にて確認し、膵組織内の HIF-1 α の分布を免疫染色で確認する。

(4) 低酸素条件下での膵ラ氏島のインスリン分泌低下の証明

低酸素チャンバー内(酸素濃度 5%, 10%, 20%)で膵β細胞株 (ins-1)、ラット初代膵島を培養し、インスリン分泌能を検討する。培養上清中のインスリン濃度は ELISA 法で測定する。また、細胞株、膵島におけるインスリン発現を RT-PCR、Western blot 法を用いて定量し、免疫染色で発現を評価する。さらに、細胞株、膵島における HIF-1 α の発現を RT-PCR、Western blot で確認することで、低酸素条件のレベルに応じたインスリン分泌を経時的かつ定量的に評価し、その相関関係を確認する。

(5) 臨床的評価、対象患者の選定(選択基準、除外基準)

本研究は愛媛大学医学部附属病院臨床倫理委員会の承認を得て行う(承認番号:1509014)。倫理委員会で承認の得られた患者説明書、同意書を用いて慎重に同意を取得し、患者に関する個人情報の守秘義務、患者の権利保護等については十分に配慮し遂行する。肝硬変症例とコントロール症例を対象とし、膵硬度、膵血流動態、インスリン分泌機能に関する観察研究を行う。組み入れ基準は肝生検にて組織学的に診断された肝硬変患者 50 例、比較対象(コントロール)は肝および膵に器質的異常を有さず、門脈圧に影響をおよぼすような基礎疾患をもたない患者 50 例とする。除外基準は、①膵に何らかの疾患を有する者(膵癌、膵嚢胞性病変、慢性膵炎など)、②過去に門脈圧に影響をおよぼすような治療歴のあるもの(脾摘、部分的脾動脈塞栓術など)、③常習飲酒家または大酒家、④肝疾患の診断より前に糖尿病と診断されている者、⑤β遮断薬を投与されている者、⑥門脈圧に影響をおよぼすような基礎疾患を有する者(慢性心不全、門脈腫瘍塞栓など)とする。また、研究手法の

特性上、⑦超音波検査（Bモード）で脾臓または膵臓が描出困難な者、⑧検査・処置の同意が得られない者も除外対象とする。

(6) 肝硬変患者における膵硬度・膵血流動態・インスリン分泌能の評価

近年、組織硬度測定技術としてSWEが注目されている。これは超音波照射により発生する剪断波を計測することにより、定量性に優れた組織の硬度を測定する方法である。肝疾患においてSWEによる硬度値は組織のうっ血状態により上昇することが報告されている（参考文献5）。本研究では膵硬度評価として両群にSWEによる膵硬度測定を行う。さらに、膵血流動態として両群に膵造影エコー検査（Contrast-enhanced ultrasound: CE-US）を行い膵血流を評価する。膵実質組織の輝度と時間の関係を時間輝度曲線に変換し、膵への血液流入時間、排血時間を評価する。またインスリン分泌能評価として両群に75g経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）およびグルカゴン負荷試験を行う。それぞれで得られた膵硬度、膵血流動態、インスリン分泌能を比較検討し、相関関係についても評価する。

4. 研究成果

(1) 肝硬変モデルラットの作製と門脈圧の評価

週令ラットにCC14（2mg/kg）を週2回、8～10週、皮下投与したところ、肉眼的にも病理組織学的にも肝硬変になっていることが確認された（図1）。また、肝硬変ラットはコントロールラットに比して肝胆道系酵素が高値となっており、予備能低下も疑われた（表1）。門脈へのカテーテル挿入による圧測定では、肝硬変モデルラットにおいて門脈圧が亢進していることが確認された（図2）。

図1 四塩化炭素皮下投与による肝硬変モデルラットの作製

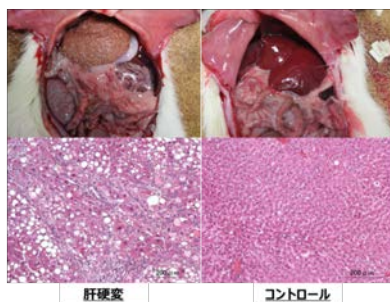


表1 肝硬変ラットとコントロールラット血液生化学検査データ比較

サンプルNo.	ALB (g/dl)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	LDH (IU/L)	AMY (IU/L)	r-GT (IU/L)	Lip (mg/dl)	T-CHO (mg/dl)	T-BIL (mg/dl)	
1	LC	2.7	475	166	1850	230	1118	11	6	43	0.47
2	LC	2.8	506	176	2000	380	1164	10	8	46	0.54
3	LC	2.6	474	163	1840	234	1095	10	7	42	0.48
4	cont	3.8	149	43	526	1260	1551	3>	10	51	0.07
5	Cont	3.4	158	46	476	1310	1350	3>	9	44	0.05
7	Cont	3.9	94	21	313	706	1440	3>	7	95	0.06
8	cont	4.0	96	22	322	828	1471	3>	9	98	0.05

図2 肝硬変モデルラットにおける門脈圧亢進

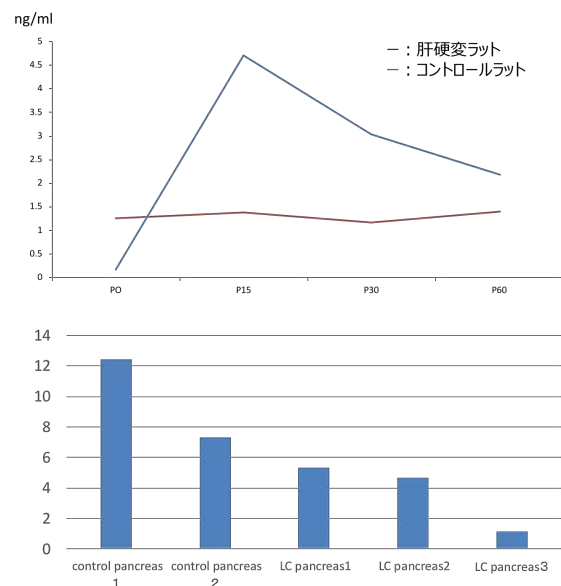


門脈圧	肝硬変ラット	コントロールラット
	18	8
	16	6

(2) 肝硬変モデルラットにおけるインスリン分泌能評価

経静脈内ブドウ糖負荷試験時の門脈血中のインスリン分泌は肝硬変ラットにおいて明らかに低下していた。さらに、膵ラ氏島におけるインスリン分泌をPCR法において定量的に評価したところ、こちらも肝硬変ラットにおいて低下していることが確認された（図3）。

図3 IVGTT 門脈内インスリン分泌と膵ラ氏島におけるインスリン（PCR）



(3) 肝硬変モデルラットにおける膵低酸素状態の証明

肝硬変ラットおよびコントロールラットの膵組織内のHIF-1 α の免疫染色による分布では、明らかな形態上の差異は認められなかった（図4）。しかし、HIF-1 α 発現をRT-PCR法にて定量的に評価したところ、肝硬変ラットの膵組織ではコントロールラットに比して高発現していることが確認された（図5）。以上のことより、膵うっ血に伴う膵の低酸素状態が、インスリン分泌低下の原因となっていることが示唆された。

図4 HIF-1α抗体 免疫染色(膵)

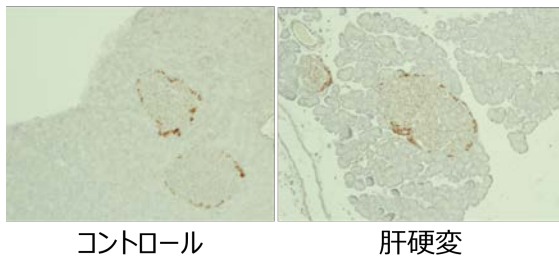
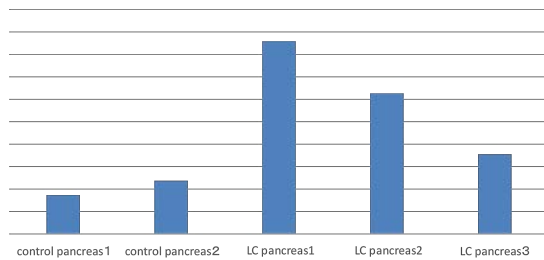


図5 HIF-1α抗体 免疫染色(膵)



(4) 低酸素条件下での膵ラ氏島のインスリン分泌低下の証明

低酸素条件下での培養実験を実施するため、酸素濃度を調整できる培養インキュベーターを導入した。また、膵β細胞株である ins-1 を用いて、培養条件の設定を行っている。ラット膵島細胞の分離は手技の確立を試みている。培養条件、手技が確立した後に低酸素条件下での膵β細胞のインスリン分泌能の評価を行う予定である。

(5) 肝硬変患者における膵硬度・膵血流動態・インスリン分泌能の評価

現時点でコントロール患者 10 例、肝硬変患者 9 例まで症例集積がすすんでおり、現在症例エントリーを継続し解析を待っている状態である。現時点での中間解析では膵硬度は肝硬変群で有意に高値 (1.29 ± 0.11 vs. 2.26 ± 0.11 , $P < 0.0001$)、門脈本幹径も有意に高値であり (10.5 ± 0.77 vs. 13.3 ± 0.73 , $P = 0.016$)、肝硬変群で門脈圧亢進があることが示唆された。

インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR は肝硬変群でコントロール群に比して有意に高値であった (0.90 ± 0.33 vs. 2.96 ± 0.31 , $P = 0.0003$)。また、有意差はみられないものの、膵硬度は肝硬変群で高くなっており (1.23 ± 0.06 vs. 1.37 ± 0.05 , $P = 0.11$)、 Δ CPR 値 (グルカゴン負荷試験による) についても肝硬変群で低くなっている (2.49 ± 0.46 vs. 1.66 ± 0.43 , $P = 0.21$)。引き続き症例を集積し、解析に目標症例数まで達成した時点で最終解析を行い評価する予定である。

参考文献

1. Petrides AS, et al. Hepatology. 18(2):284-91, 1993

2. Sakata M, et al. J Gastroenterol. 48(2):277-85, 2013
 3. Kuroda T, et al. J Gastroenterol. 50(6):683-93, 2015
 4. John B West, et al. NEJM. 376:1965-71, 2017
 5. Suh CH, et al. Radiology. 271(3):895-900, 2014

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 6 件)

1. Ogura T, Kitano M, Chiba Y, et al. (16 人中 11 番目) A multicenter prospective evaluation study of endoscopic ultrasound-guided hepaticogastrostomy combined with antegrade stenting (with video). Dig Endosc. 2018;30(2):252-259. 査読有
 2. Ohno Y, Kumagi T, Hiasa Y, et al. (12 人中 4 番目) Usefulness of laparoscopy and intraductal ultrasonography in a patient with isolated immunoglobulin G4-related sclerosing cholangitis. Clin J Gastroenterol. 2018;11(1):62-68. 査読有
 3. Azemoto N, Kumagi T, Hiasa Y, et al. (12 人中 4 番目) Diagnostic Challenge in Pancreatic Sarcoidosis using Endoscopic Ultrasonography. Intern Med. 2018;57(2):231-235. 査読有
 4. Kuroda T, Kumagi T, Hiasa Y, et al.; Ehime Pancreato-Cholangiology (EPOCH) Study Group. (20 人中 1 番目) Efficacy of chemotherapy in elderly patients with unresectable pancreatic cancer: a multicenter review of 895 patients. BMC Gastroenterol. 2017;17(1):66. 査読有
 5. Ohno Y, Koizumi M, Nakayama H, Watanabe T, Hirooka M, Tokumoto Y, Hiasa Y, et al. (12 人中 7 番目) Downregulation of ANP32B exerts anti-apoptotic effects in hepatocellular carcinoma. PLoS One. 2017;12(5):e0177343. 査読有
 6. Miyake T, Hirooka M, Hiasa Y, et al. (14 人中 8 番目) Differences in the risk of fatty liver for onset of impaired fasting glucose according to baseline plasma glucose levels. J Gastroenterol. 2017;52(2):237-244.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 黒田太良, 熊木天児, 小泉光仁, 大野芳敬, 日浅陽一. 当院における胃再建術後症例に対する ERCP の実態と問題点. 第 118 回日本消化器内視鏡学会四国支部例会 2017 年 6 月 17 日, 高知

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 太良 (Kuroda, Taira)
愛媛大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：10771876

- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし
- (4) 研究協力者
なし