

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10507

研究課題名(和文) 脾腫に伴う脾臓機能異常と肝線維化・肝発癌における肝脾臓器相関の解明

研究課題名(英文) Role of splenomegaly in liver fibrosis and hepatocarcinogenesis

研究代表者

飯室 勇二 (IIMURO, Yuji)

山梨大学・大学院総合研究部・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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)： 肝炎治療により進行した肝硬変も可逆性であることが示されているが、肝硬変に伴う門脈圧亢進症は遷延することが多く、その合併症や発癌のリスクから大きな問題である。代表者らは、門脈圧亢進状態の遷延に、器質変化して機能不全に陥った腫大脾臓が関与しているという仮説のもとに研究を行った。今回の検討では、ヒトにおいて、肝硬変の進行とともに脾臓の線維化が進行することが確認され、その線維化には脾臓赤脾髄の脾索内に存在するCytoglobin陽性細胞(細網細胞)が関与していることが示された。また、線維化脾臓の摘出後、肝線維化の改善が確認された。

以上より、肝硬変における肝臓・脾臓の臓器相関の一部が解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝炎治療の進歩により肝硬変の改善などの恩恵を受けることができるが、進行した肝硬変に合併する門脈圧亢進症は遷延することが多い。今回の研究では、進行した肝硬変においては脾臓においても高度の線維化を伴うこと、またこれを摘出することにより肝線維化が改善することを見出した。

つまり、線維化に伴い機能不全に陥った脾臓が肝硬変の病態に悪影響を与えていることが示され、今後、脾摘術以外に脾臓の線維化を改善する治療法を開発することにより、肝硬変に伴う合併症の抑制、肝発癌リスクの軽減を図ることができる可能性が示されたとも考える。

研究成果の概要(英文)： Effective antiviral treatment has shown that even advanced hepatic fibrosis can be ameliorated by relieving causative stress. However, whether advanced portal hypertension and its complications could be reversible is still controversial. We speculated advanced functional change in the spleen possibly contribute to this phenomenon.

In the current study, we found that splenic fibrosis appears within the splenic cords in patients with advanced splenomegaly and thrombocytopenia in conjunction with congestion of the splenic sinus and that cytoglobin-expressing cells, which have been reported to affect fibrogenesis in several organs, are possibly responsible for the fibrosis in the splenic cord.

In addition, we also found that splenectomy of the fibrotic spleen often led to amelioration of liver fibrosis in these patients, indicating significant roles of splenomegaly with fibrosis in the irreversibility of advanced portal hypertension.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：門脈圧亢進症 脾腫 脾線維化 肝線維化 サイトグロビン 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

C 型肝炎撲滅時代の到来に伴い、高度肝線維化の修復、線維化に起因する肝発癌抑制が、重要な課題として浮上している。これまでに、肝硬変における腫大脾臓の摘出が、肝線維化・肝予備能を改善することが報告され、脾臓腫大が門脈圧亢進に伴う単なるうっ血にとどまらず、脾機能不全の状態である可能性が推測される。そこで、肝硬変における脾臓の役割(肝臓・脾臓の臓器相関)の解明が不可欠であるが、その詳細は未解決のままである。

2. 研究の目的

本研究では、肝硬変患者における脾臓に伴う脾臓線維化のメカニズムや脾臓の機能変化および脾摘に伴う肝病態変化などを解明し、肝線維化および肝発癌における脾臓の関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

門脈圧亢進症に伴う脾臓の組織学的検討の歴史は古いですが、意外にも近年目立った進歩がなく、またヒトにおける系統的な検討が行われていないため、再評価が必要である。そこで、肝硬変患者から得られた腫大脾臓組織を用いて、免疫組織染色、蛍光免疫、などの詳細な組織学的検討および Western Blot による定量的タンパク発現検討を行い、脾臓に伴う組織変化を評価した。また、赤脾髄・脾索における線維化の進行のメカニズムを検討した。

一方、肝硬変患者において、脾摘後に肝予備能が改善することが報告されているが、実際に脾摘により肝線維化が改善するのかの長期的検討がなされていないため、経過観察が可能な肝硬変患者において、肝線維化の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) 肝硬変における脾臓組織変化

脾機能亢進および脾臓を伴う肝硬変患者の摘出脾臓を用いた組織学的検討では、従来の報告通り、脾臓においてうっ血に伴う脾洞の拡張および脾索の狭小化が認められた。さらに、脾臓の線維化を検討すると、非肝硬変の脾臓では線維性コラーゲンおよび α -SMA の発現は、赤脾髄においては主に筆毛動脈周囲のみに認められる一方、肝硬変では、脾索に沿って明らかな線維性コラーゲンの増生が認められ、また同部位に α -SMA 発現細胞の著明な増加が観察された(図1)。

また、画像解析による脾臓における線維化の程度は、肝硬変の重症度と良く相関する抹消血中の血小板数と良く相関していた(図2 逆相関： $P=0.0011$)。さらに脾臓の線維化は、腫大した脾臓体積とも良く相関していた(正相関)。

これらの結果から、肝硬変の進行とともに、脾臓のみならず、脾臓の線維化が進行することが示され、線維化に伴う脾臓の臓器機能障害が容易に推測された。

(2) 肝硬変の脾臓(脾索)における α -SMA 発現細胞の同定

次に、脾臓赤脾髄の脾索における線維性コラーゲン産生細胞についての検討を行った。

肝臓では、その線維化に肝星細胞および門脈域線維芽細胞が関与しており、類洞内の線維化には前者の関与が大きい。そこで、肝星細胞や他臓器の線維化に関与する細胞が発現している Cytoglobin の発現を脾臓組織を用いて検討した。

蛍光2重免疫組織染色を行うと、非肝硬変では星形の Cytoglobin 発現細胞が脾索内に散在するものの、前述のように α -SMA 発現細胞はほとんど認められなかった。

一方、肝硬変では Cytoglobin 発現細胞の形状変化(細胞質の拡大及び伸張)及び細胞数の増加が確認された。また、これらの細胞の多く

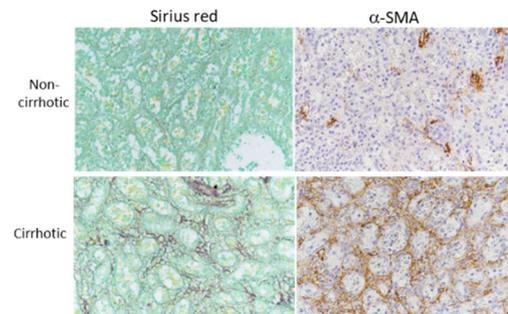


図1 肝硬変における脾臓(脾索)の線維化と α -SMAの発現

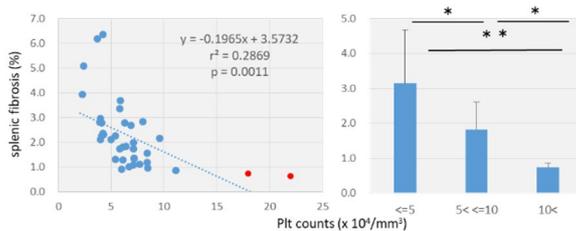


図2. 脾臓の線維化と血小板数の相関

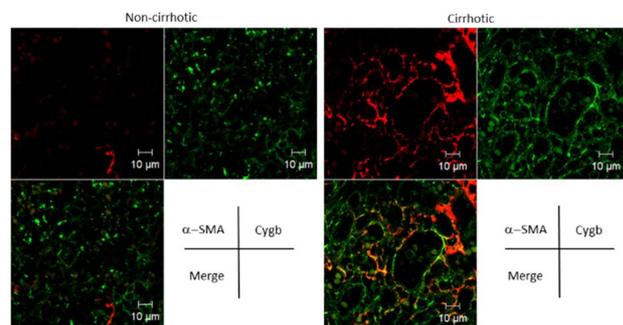


図3 脾臓(脾索)における α -SMAとCytoglobinの発現

が α -SMA を発現しており、他の臓器と同様に Cytoglobin 産生細胞が脾臓赤脾髄における線維化の責任細胞であることが明らかとなった(図3)。これまでの動物モデルを用いた検討で、脾臓における Cytoglobin 陽性細胞は、細網細胞であることが報告されており、以上の結果から、慢性の脾臓うっ血により脾索内の Cytoglobin 陽性細網細胞が形質転換し、線維性コラーゲン産生細胞へと変化したことが強く示唆された。

肝硬変の脾臓における Cytoglobin のタンパク発現は、Western Blot においても確認された。また、これらの現象に脾臓における酸化ストレスの増強が確認され、酸化ストレスを介した線維化のメカニズムが示唆された。

(3) 脾摘後の肝硬変肝臓における組織変化

これまでに代表者らは動物モデルにおいて、肝硬変マウスの脾摘後に肝臓内に Ly6C-low マクロファージの集積がみられ、肝線維化の改善に関与していることを報告した。今回、ヒトにおいても同様な現象がみられるかを検討した。

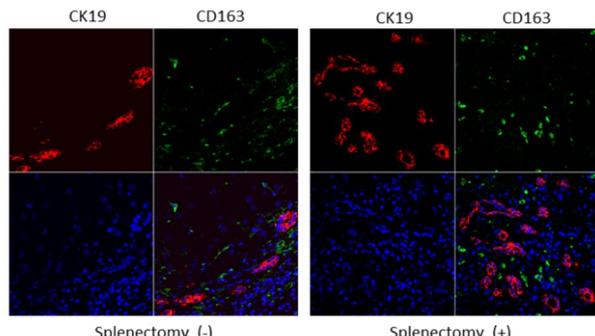


図4 脾摘後の肝臓におけるM2マクロファージの集積とCK19陽性細胞の分布

脾摘後4週目の肝組織では、マウス Ly6C-low マクロファージに相当する CD163 陽性マクロファージ (M2 マクロファージ) の肝臓内への集積を認め、肝臓の線維性隔壁から肝小葉内に進展するように存在する CK19 陽性細胞と隣接していた。一方、脾摘を行っていない肝臓では、CD163 陽性細胞の集積は少なく、CK19 陽性細胞も線維性隔壁周囲に限局していた。以上の結果から、ヒトにおいてもマウスモデルと同様に脾摘後の肝組織変化が生じていることが示唆された。

肝癌併存肝硬変症例において、脾摘を先行させ肝切除を行った症例と脾摘せずに肝切除を行った症例において、悲癌部の肝組織変化を比較検討した。

脾摘後4週目の肝組織では、マウス Ly6C-low マクロファージに相当する CD163 陽性マクロファージ (M2 マクロファージ) の肝

(4) 脾摘後長期経過後の肝線維化の改善

肝硬変症例において、脾摘後に肝予備能が改善することが報告されているが、実際に線維化が改善しているかの検討はほとんどない。今回、肝硬変症例において脾摘を行った後、長期的観察中に肝細胞癌を発症し、肝切除が施行された症例において、脾摘時の肝組織(生検)と肝切除時の肝組織を用いて、線維化の程度を比較した。

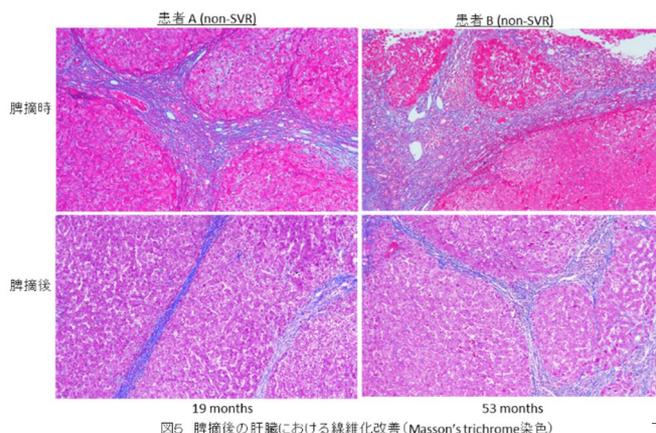


図5 脾摘後の肝臓における線維化改善 (Masson's trichrome染色)

C型肝硬変患者において、いずれも HCV 消失が得られていない状態 (Non-SVR) での症例 9 例中 7 例で、脾摘のみの効果によると考えられる肝線維化の改善が確認された。

これらの結果から、線維化の進行に伴い機能不全に陥った腫大脾臓を摘出することにより、肝臓への集積細胞の変化に関連して、肝線維化が長期的に改善された可能性が強く示唆された。

この結果は、高度の線維化自体がリスクとなる肝発癌において、不可逆的な門

亢症の原因となっている可能性のある脾臓を摘出することで、肝発癌を抑制できる可能性を示唆するものとも考えられる。

以上、ヒトにおいて、肝硬変の進行に伴い脾臓の線維化が進行し、門脈圧亢進状態の遷延に関与していることが推測され、また機能不全に陥っている脾臓を摘出することで、肝線維化が改善することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mochizuki Y, Iimuro Y, Suzuki O, Nagashima Y.	4. 巻 103
2. 論文標題 A case of cholangiocellular carcinoma preoperatively diagnosed with typical imaging findings	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int Surg	6. 最初と最後の頁 72-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.9738/INTSURG-D-18-00002.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Iimuro Yuji	4. 巻 33
2. 論文標題 ICG Clearance Test and 99mTc-GSA SPECT/CT Fusion Images	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Visceral Medicine	6. 最初と最後の頁 449 ~ 454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000479046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura Ikuo, Iimuro Yuji, Hai Seikan, Kondo Yuichi?, Hatano Etsuro, Fujimoto Jiro	4. 巻 59
2. 論文標題 Impaired Value of 99m Tc-GSA Scintigraphy as an Independent Risk Factor for Posthepatectomy Liver Failure in Patients with Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Surgical Research	6. 最初と最後の頁 12 ~ 22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000484044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iimuro Y, Yada A, Okada T, Nakamura I, Suzumura K, Xu J, Sudo M, Nishiguchi S, Kawada N, Hatano E, Fujimoto J	4. 巻 -
2. 論文標題 Cytoglobin-expressing cells in the splenic cords contribute to splenic fibrosis in cirrhotic patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histology and Histopathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 飯室勇二、岡田敏弘、藤元治朗
2. 発表標題 門脈圧亢進症患者における脾臓線維化機構の検討
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯室勇二、岡田敏弘、藤元治朗
2. 発表標題 門亢症に伴う脾腫の組織学的検討と脾線維化メカニズムの考察
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Iimuro, Toshihiro Okada, Jiro Fujimoto
2. 発表標題 Splenic fibrosis in porta hypertension and the effect of laparoscopic splenectomy on liver fibrosis
3. 学会等名 26th International Congress of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯室勇二、岡田敏弘、藤元治朗
2. 発表標題 門亢症における脾臓線維化と脾摘に伴う肝線維化改善
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯室勇二、岡田敏弘、藤元治朗
2. 発表標題 門亢症における脾線維化機構と脾摘に伴う肝組織変化
3. 学会等名 第7回脾臓研究会（第25回門脈圧亢進症学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯室勇二、岡田敏弘、藤元治朗
2. 発表標題 門脈圧亢進症に伴う脾臓線維化の解析 - 脾原性悪循環の可能性 -
3. 学会等名 JDDW2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Iimuro, Akito Yada, Toshihiro Okada, Jiro Fujimoto
2. 発表標題 Progression in splenic fibrosis in patients with portal hypertension
3. 学会等名 The 52nd Congress of the European Society for Surgical Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯室勇二、矢田章人、望月理玄、鈴木修、岡田敏弘、藤元治朗
2. 発表標題 門脈圧亢進症における脾臓の線維化と脾摘の意義
3. 学会等名 第72回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuji Iimuro, Akito Yada, Toshihiro Okada, Jiro Fujimoto
2. 発表標題 Splenic fibrosis in patients with portal hypertension and splenectomy as a modality of therapy
3. 学会等名 6th A-PHPBA and 29th JSHBPS (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯室勇二、岡田敏弘、藤元治朗
2. 発表標題 門亢症患者の脾臓組織変化からみた脾摘の意義
3. 学会等名 第24回日本門脈圧亢進症学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯室勇二、岡田敏弘、藤元治朗
2. 発表標題 脾臓の線維化からみた門脈圧亢進症における脾摘術の再考察
3. 学会等名 JDDW 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯室勇二、岡田敏弘、藤元治朗
2. 発表標題 門亢症の脾機能異常における脾臓線維化の関与と脾摘よる肝組織改善効果
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯室勇二、岡田敏弘、鷹野敦史
2. 発表標題 肝組織変化からみた高度門脈圧亢進症における脾摘術（腹腔鏡下）の意義
3. 学会等名 第32回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯室勇二
2. 発表標題 血小板減少を伴う門脈圧亢進症に対する脾摘の意義
3. 学会等名 第26回日本門脈圧亢進症学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Iimuro, Toshihiro Okada, Jiro Fujimoto
2. 発表標題 Laparoscopic splenectomy in cirrhotic patients ameliorates liver fibrosis and stimulate proliferation of progenitor-like cells
3. 学会等名 27th International Congress of the European Association for Endoscopic Surgery (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	河野 寛 (KONO Hiroshi) (40322127)	山梨大学・大学院総合研究部・准教授 (13501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴村 和大 (SUZUMURA Kazuhiro) (50434949)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究分担者	藤元 治朗 (FUJIMOTO Jiro) (90199373)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究分担者	川井田 博充 (KAWAIDA Hiromitsu) (00345711)	山梨大学・大学院総合研究部・助教 (13501)	