

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：12501
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2022
課題番号：20K17639
研究課題名（和文）障害肝における肝障害後肝再生機構の解明と再生促進治療開発：肝切除術の適応拡大へ

研究課題名（英文）Liver repair and regeneration after acute liver injury in chronic hepatitis

研究代表者
小西 孝宜（Konishi, Takanori）

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80865882
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：線維化を伴う障害肝においては、元来M2 macrophageが肝内に多く存在し更なる肝障害時に特異的な反応を呈した。具体的には肝阻血再灌流障害48時間後の肝再生開始時に炎症性サイトカイン発現が低く急性炎症の遷延が軽減されるとともに、96時間後のmacrophageとhepatic stellate cellの集積が亢進し壊死領域の貪食が進み、さらに血管新生とductular reactionの亢進も加わり肝障害後の肝修復が促進されたことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

障害肝における急性肝障害に対する肝再生・肝修復機構は未だ明らかとされていなかったが、本研究ではその肝修復の概要とメカニズムを炎症細胞浸潤やcytokine/chemokine発現などの観点からin vivoで解明したことに学術的意義がある。社会的意義として、これらの成果は臨床的に慢性肝炎・肝硬変例における手術や外傷に伴う肝障害後の肝再生機構に応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：There are originally remarkable accumulation of M2 macrophage observed in the fibrotic liver caused by chronic liver injury, suggesting that fibrotic liver may show specific immunological response after further insults. Indeed, the inflammatory cytokines level in the liver at the onset of liver regeneration decreased in the fibrotic liver. During liver repair and regeneration, there were more macrophage accumulation which phagocyte necrotic tissue in the fibrotic liver than in the normal liver. Furthermore, increase in hepatic stellate cell accumulation, micro vessel density, and liver regeneration caused by ductular reaction were observed in the fibrotic liver. As a result, fibrotic liver showed prompt liver recovery after acute liver injury.

研究分野：肝再生

キーワード：肝再生 肝修復 マクロファージ 肝阻血再灌流障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝切除術において、術後肝不全は致命的となりうる重大な合併症であり、残肝の肝障害と肝再生低下が原因となる。脂肪肝・脂肪肝炎や肝線維化を伴う肝臓においては、肝阻血再灌流障害などの手術に伴う急性肝障害が強く惹起され術後肝不全の頻度が高いことが報告されており、手術適応が限定されている()。肝移植においても同様に、脂肪肝グラフトは移植後肝不全のリスクファクターである()。近年、生活習慣病の増加ならびに術前化学療法の普及などにより脂肪肝や脂肪肝炎を伴う肝悪性腫瘍症例が増加している。また、肝細胞癌は慢性肝炎・肝硬変を背景として発癌する。今後の肝悪性腫瘍疾患の予後向上のためには、これら障害肝症例に対して術後肝不全を回避する肝臓手術の安全な施行と手術適応の拡大が急務である。炎症を伴わない肝切除後の生理的な肝再生機序は広く研究されてきたが、障害肝における急性肝障害後の肝再生メカニズムは明らかでなく、また肝再生を促進させる画期的な治療法は確立されていない。

2. 研究の目的

本研究では、障害肝における肝再生促進療法の開発を念頭に、障害肝における急性肝障害後の肝再生機構が正常肝とどのように異なるかを研究課題の核心をなす学術的「問い」とした。よって、障害肝の中でも特に肝線維化を伴う肝臓の急性肝障害後の肝再生メカニズムの解明とその治療介入の可能性の追及を研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス肝線維化モデルの解析

マウスに対して carbon tetrachloride(CCl₄)を2回/週の頻度での腹腔内投与を6週間継続することにより構築される肝線維化モデルを使用する。Control 群には vehicle を同様の頻度と量で投与している。線維化肝における炎症細胞など非肝実質細胞の浸潤様式や肝内の炎症性サイトカインレベルを解析する。

(2) 肝線維化モデルにおける急性肝障害後肝再生メカニズムの解析

肝線維化群と control 群に対して、急性肝障害の一つである肝阻血再灌流障害(I/R)を惹起させたマウスモデルを解析する。具体的には片葉のグリソンの90分間阻血による部分肝阻血再灌流障害モデル()を作成して、それぞれの肝再生・肝修復メカニズムを特に肝内炎症性サイトカインレベルやマクロファージを代表とした炎症細胞など非肝実質細胞浸潤や肝再生形式に着目して検討する。

(3) 肝線維化マウスモデルにおける macrophage の役割

肝線維化マウスモデルに I/R を惹起した後に chondronate liposome を I/R 24 時間後と 72 時間後に投与する macrophage 欠損モデルを作成し、線維化を伴う肝臓における macrophage の機能解析を肝再生・肝修復に関わるサイトカインレベルの評価を中心として施行する。

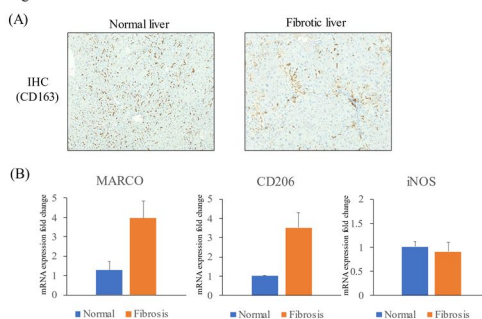
4. 研究成果

(1) マウス肝線維化モデルの解析

CCl₄ を6週間投与したマウスにおいて Sirius Red 染色を施行するとグリソンを架橋する bridging fibrosis の所見を認め、肝線維化マウスモデルとして適切と判断した。rPCR では Fibrosis model は control 群と比較して肝内の TNF- α , IL-1 β , IL-10 と炎症性サイトカインならびに抗炎症性サイトカインが高く発現していた。

また Fibrosis model の F4/80 免疫染色で bridging fibrosis に沿った CD163 陽性 macrophage の集積を認める(Figure 1A)とともに、rPCR では Fibrosis model の肝内で Ccl2 が高発現し、MARCO・CD206 の発現上昇を認める一方で iNOS の発現上昇は認めなかった(Figure 1B)。これらの結果から、肝線維化を伴う障害肝(臨床的には慢性肝炎・肝硬変に該当)においては繰り返す慢性炎症により M2 macrophage が集積しており、急性肝障害に対してならびにその後の肝再生や肝修復に対して特異的な反応を示す可能性

Figure 1



が示唆された。

(2) 肝線維化モデルにおける急性肝障害後肝再生メカニズムの解析

肝線維化マウスモデルと control 群に I/R を惹起させ、その後の肝修復・肝再生機構を比較検討した。肝線維化マウスモデルにおいて、necrotic area が正常肝に比して早く減少し肝修復がより促されており、そのメカニズムを解析した。

まず肝再生時のサイトカインレベルを rPCR にて解析した。肝再生が開始される I/R 後 48 時間の肝内 TNF α ・IL-1 β ・IL-6 発現は肝線維化マウスモデルにおいて control 群より有意に低かった一方で、IL-4・IL-10 発現には有意差を認めなかった (Figure 2)。次に免疫染色で非肝実質細胞に着目すると、F4/80 陽性の macrophage 集積と desmin 陽性の hepatic stellate cell 集積が肝線維化マウスにおいて肝再生時 (I/R 後 96 時間) に顕著に認められた (Figure 3)。また、CD31 の免疫染色では肝線維化マウスで肝再生時の障害部における microvessel density が有意に高かった (Figure 4)。これらの結果から、線維化を伴う障害肝においては肝再生開始時に炎症性サイトカイン発現が低く急性炎症の遷延が軽減されるとともに、肝再生時に創傷治癒に関わる細胞浸潤が顕著となり壊死組織の貪食や血管新生が亢進し肝修復が促進されたと考えられた。肝再生に関しては、肝線維化マウスモデルにおいては免疫染色で PCNA 陽性肝細胞数に増加は認められなかった一方で、CK7 陽性の reactive ductules と CK8/18 染色によるその周囲の肝細胞の増加を認めていた (Figure 5, serial section による免疫染色像)。これらの結果から、線維化を伴う障害肝の肝再生に ductular reaction に伴う肝細胞増殖が関わっている可能性が示唆された。

(3) 肝線維化マウスモデルにおける macrophage の役割

Chrodronate liposome による macrophage depletion モデルを用いて、肝線維化マウスモデルの肝再生における macrophage の機能を解析した。chrodronate liposome 群において F4/80 染色で肝再生時の macrophage 集積の低下を認めるとともに、肝組織の再生低下と障害組織の修復の遅延を認めた。Macrophage は cytokine や chemokine を分泌することで血管新生や ductular reaction に影響を及ぼす可能性があり、肝内の HGF・EGF・TWEAK・VEGF 発現を rtPCR で解析したが、chrodronate liposome 群において control 群と比較してそれら cytokine の発現に有意差は認めなかった。これらの結果より、肝線維化マウスモデルにおいて macrophage が壊死組織の貪食をすることで肝修復を促す可能性が示唆されたが、その他の現象への影響を解明することはできなかった。

< 引用文献 >

- Hong F et al. Hepatology 2004;40:933-41.
- Zhao J et al. Br J Surg 2017;104:990-1002
- McCormack L et al. J Hepatol 2011;54:1055-62
- Konishi T et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2018;314:G471-82

Figure 2

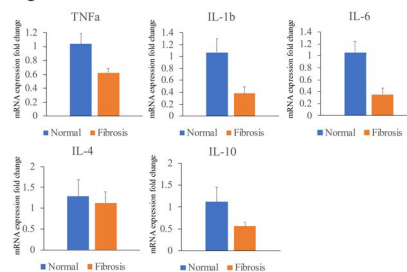


Figure 3. IHC (F4/80)

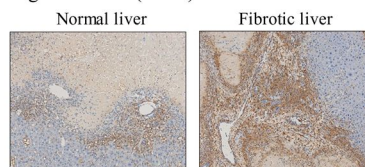


Figure 4. IHC (CD31)

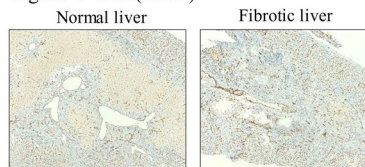
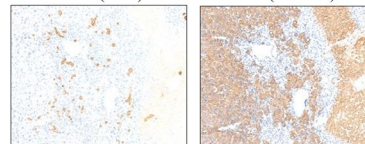


Figure 5. Fibrotic liver (96 hours after I/R)
IHC (CK7) IHC (CK8/18)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Konishi Takanori, Yoshidome Hiroyuki, Shida Takashi, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Takano Shigetsugu, Miyazaki Masaru, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 124
2. 論文標題 Phosphorylated mTOR expression as a predictor of survival after liver resection for colorectal liver metastases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 598 ~ 606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jso.26551	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 Konishi Takanori, Yoshidome Hiroyuki, Shimizu Hiroaki, Yoshitomi Hideyuki, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Takano Shigetsugu, Miyazaki Masaru, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 18
2. 論文標題 Splenic enlargement induced by preoperative chemotherapy is a useful indicator for predicting liver regeneration after resection for colorectal liver metastases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12957-020-01918-4	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小西孝宜、吉留博之、古川勝規、高屋敷 吏、久保木 知、高野重紹、鈴木大亮、酒井 望、細川 勇、三島 敬、西野仁恵、大塚将之
2. 発表標題 大腸癌肝転移におけるphosphorylated mTOR発現の予後予測因子としての意義
3. 学会等名 第19回日本消化器外科学会大会 JDDW2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小西孝宜、吉留博之、古川勝規、高屋敷 吏、久保木 知、高野重紹、鈴木大亮、酒井 望、賀川真吾、細川勇、三島敬、大塚将之
2. 発表標題 肝阻血再灌流障害の低温阻血による肝保護作用とHMGB1動態
3. 学会等名 第27回外科侵襲とサイトカイン研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小西孝宜, 吉留博之, 古川勝規, 高屋敷 史, 久保木 知, 高野重紹, 鈴木大亮, 酒井 望, 賀川真吾, 細川勇, 三島敬, 大塚将之
2. 発表標題 Histopathological growth patterns of colorectal liver metastases
3. 学会等名 第30回 日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小西孝宜、吉富秀幸、古川勝規、高屋敷史、久保木知、高野重紹、鈴木大亮、酒井望、賀川真吾、三島敬、中台英里、Alex B. Lentsch、大塚将之
2. 発表標題 線維化を伴う肝臓の肝阻血再灌流障害後の肝再生修復機構
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小西孝宜、吉富秀幸、古川勝規、高屋敷史、久保木知、高野重紹、鈴木大亮、酒井望、賀川真吾、三島敬、中台英里、Alex B. Lentsch、大塚将之
2. 発表標題 線維化を伴う肝臓は急性肝障害後に肝再生・修復が促進される
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Konishi Takanori, Yoshidome Hiroyuki, Shimizu Hiroaki, Yoshitomi Hideyuki, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Takano Shigetsugu, Miyazaki Masaru, Ohtsuka Masayuki.
2. 発表標題 Splenic enlargement induced by preoperative chemotherapy is a useful indicator for predicting liver regeneration after resection for colorectal liver metastases.
3. 学会等名 14th World Congress of the International Hepato-Pancreato- Biliary Association (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小西孝宜、吉富秀幸、古川勝規、高屋敷吏、久保木知、高野重紹、鈴木大亮、酒井望、賀川真吾、三島敬、中台英里、Alex B. Lentsch、大塚将之
2. 発表標題 How does liver recover and regenerate after hepatic ischemia reperfusion injury? ~Contribution of YAP and TAZ to liver repair~
3. 学会等名 第32回日本肝胆膵外科学会・学術集会
4. 発表年 2021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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of Cincinnati		