

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591994

研究課題名(和文) 硬変肝切除後の類洞再生遅延の分子機構と血管内皮前駆細胞導入による肝再生促進の研究

研究課題名(英文) Evaluation of the inhibited hepatic sinusoidal regeneration after hepatectomy in cirrhotic liver and attempt for promoting liver regeneration using endothelial progenitor cells

研究代表者

清水 宏明 (SHIMIZU, Hiroaki)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80272318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：黄疸肝、硬変肝の肝切除後肝再生：閉塞性黄疸、肝硬変時には、星細胞(HSCs)の数の増加と活性化に伴い、繊維化/増殖抑制因子としてのTGF- β 1が強発現し、また肝組織中のHGFもすでに誘導されていた。肝切除後には活性化HSCsからのHGFの産生低下に起因してHGF発現は低下し、TGF- β 1の発現の亢進と相まって肝再生は抑制・遅延される状態にあった。さらにVEGF、HGFのピークが消失し、肝類洞内皮細胞の再生も抑制・遅延される状態にあった。血管内皮前駆細胞(EPC)の分離では末梢血より単核球分画に存在するCD34の発現細胞をFACSにより解析・分離するも回収率が悪く、骨髓細胞を用いることにした。

研究成果の概要(英文)：Hepatic TGF- β 1 mRNA levels increased in both cholestatic and cirrhotic rats. HGF and VEGF also tended to increase. In cell isolates, TGF- β 1 mRNA was found mainly in hepatic stellate cell (HSC) fraction. Immunohistochemical study revealed increased number of HSCs (desmin-positive cells) and activated HSCs (α -SMA-positive cells) in portal areas with length of cholestasis. In 70% hepatectomy model, liver regeneration was delayed. TGF- β 1 mRNA was significantly upregulated and earlier peak of HGF mRNA was lost. Cholestatic or cirrhotic liver induces HSC proliferation and activation, leading to upregulation of TGF- β 1 mRNA expression and suppression of HGF and VEGF mRNA expression. These altered expression pattern may be strongly involved in delayed hepatic sinusoidal regeneration. Next, we have tried to isolate endothelial progenitor cells using FACS, but failed to obtain the expected amount of the CD34 cells. Thus, we planed to use bone marrow cell in portal administration

研究分野：医歯薬学

キーワード：肝再生 黄疸 肝硬変 肝類洞 血管内皮前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝臓という臓器の再生現象を解き明かすうえで、肝実質細胞のみならず肝再生時に起こる類洞壁細胞の増殖・再生機序を解き明かすこと、とくに分裂、増殖した肝実質細胞への血液供給のための類洞の再構築、つまり類洞内皮細胞の増殖過程の究明は必要不可欠と考える。悪性腫瘍の進展・増大に血管新生は、不可欠とされ、現在まで、さまざまな悪性腫瘍において血管新生の機序が解明されつつある。肝切除後の肝再生においても、類洞の増殖・再生状態は、残肝組織の再生状態、とくに volume を規定している可能性も考えられる。

(2) 最近の再生医学の研究から、新生血管には、造血幹細胞、血液内皮前駆細胞の関与が示されている。血管内皮前駆細胞 (EPC) は骨髄由来で内皮細胞に分化する細胞であるが、この細胞は、骨髄から動員されて末梢血液中に存在し、新しく血管が形成されつつある局所に特異的に取り込まれ、分化・増殖し、新規血管の形成に関与することが証明されている。すなわち、既存隣接血管の血管内皮細胞の増殖、遊走により成立する血管新生とは異なる概念であり、最近では、血液内皮前駆細胞を虚血性疾患に応用しようという臨床における試みがなされている。

2. 研究の目的

(1) 大量肝切除、あるいは、硬変肝、黄疸肝などの障害肝において、肝切除後の類洞の再生を正常肝と比較し、その再生プロセスを促進させることにより、残肝自体の再生に変化があるのかをラット肝切除モデルにて評価する。(2) 肝切除後に血管内皮前駆細胞を門脈内に投与することにより、類洞新生の促進のみならず、血管内皮前駆細胞の有するさまざまな増殖因子の発現が、肝細胞の増殖を促進させ、肝構成細胞にバランスのとれた再生が得られるかどうかを解明する。

3. 研究の方法

(1) 肝切除後、黄疸肝、硬変肝の肝切除後肝再生: Wistar 系ラット (200-250 g) を用い、90%肝切除、総胆管結紮による黄疸肝モデル、さらに四塩化炭素を投与した肝硬変モデルを作成し、それぞれに70%肝切除を行い、まず、その再生過程を類洞内皮細胞、肝細胞の PCNA labeling index、さらには、残肝重量から評価し、正常肝群の肝再生と比較・検討する。さらに、分離された血管内皮前駆細胞 (EPC) を門脈内に注入し、それぞれの残肝組織の再生、ラットの生存を検討する。血管内皮前駆細胞 (EPC) 投与群の肝切除後の再生肝組織より凍結切片を作製し、抗 VEGF 抗体、抗 Ang1 抗体、Ang2 抗体、さらには、抗 HGF 抗体を用い、それぞれの蛋白の発現を経時的に評価、また同時に再生肝組織より mRNA を分離し、RT-PCR 法を用いて、VEGF、Ang1、Ang2、及び HGF の mRNA の発現の推移を検討し、コントロール群の推移と比較検討する。この実験結果の data を解析し、黄疸肝、硬変肝の肝切除後の血管内皮前駆細胞 (EPC) を門脈内に注入の効果とその作用機序を検討する。

(2) 血管内皮前駆細胞の分離: ラット末梢血を尾静脈より採取し、その中の単核球を比重遠沈法で分離する。この単核球分画に存在する EPC は Thy-1 (CD90)、CD31 (PECAM-1)、Flt-1 (VEGF-2) を発現するとされるが、まず、CD34 の発現した細胞を FACSscan により解析し、EPC と推測される細胞集団を分離する。分離された血管内皮前駆細胞 (EPC) を蛍光標識し、ラット肝70%切除後に門脈内に投与し、経時的に肝組織を蛍光顕微鏡にて観察し、EPC の肝内への着床の有無、つまり、類洞にとりこまれるのか、否かを評価し、さらには、残肝組織の免疫染色も行い、その分化についての一定の評価を行う。

4. 研究成果

(1) 90%肝切除後、黄疸肝、硬変肝の肝切除後肝再生促進の試み：

Wistar 系ラットを用い、90%肝切除、総胆管結紮による黄疸肝(BDL)モデル、肝硬変モデルを作成し、70%肝切除を行い、まず、その再生過程を類洞内皮細胞、肝細胞の PCNA labeling index、さらには、残肝重量から評価し、正常肝群の肝再生と比較・検討したところ、BDL 2 週群にて肝組織中の HGF, VEGF mRNA の発現は増加していた。さらに TGF- β 1 mRNA の発現は sham 群に比し有意に亢進しており、肝星細胞(HSCs)にて強発現していた。また desmin 陽性である HSCs の数およびその活性化を認めた。OJ 群では肝切除前より PCNA L.I. が sham 群に比して高く、肝再生は遅延していた。さらに、TGF- β 1 mRNA の発現は sham 群に比し、肝切除前から 48 時間まで有意に高値であった。また、sham 群では肝切除後に HGF mRNA 発現の急激な上昇を認め、12-24 時間にピークとなったのに対し、OJ 群ではその発現のピークは消失していた。したがって、閉塞性黄疸時には、HSCs の数の増加と活性化に伴い、繊維化/増殖抑制因子としての TGF- β 1 が強発現しており、また肝組織中の HGF もすでに誘導されていた。肝切除後には活性化 HSCs からの HGF の産生低下に起因して HGF 発現は低下し、TGF- β 1 の発現の亢進と相まって肝再生は抑制・遅延される状態にあることが示唆された。さらに黄疸肝では、類洞内皮細胞障害がすでに起こっており、VEGF, HGF のピークが消失し、肝類洞の再生も抑制・遅延される状態にあることが強く示唆された。

(2)血管内皮前駆細胞の分離 ラット末梢血を尾静脈より採取し、その中の単核球を比重遠沈法で分離する。この単核球分画に存在する CD34 の発現した細胞を FACSscan により解析してみるものの、EPC と推測される細胞集団の分離収量が

少なく、骨髄細胞を用いて実験を計画し、現在進行している。

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 3 件)

Fukada T, Shimizu H, Kuboki S, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Miyazaki M. Significance of serum TGF- β 1 levels for estimating bilirubin decrease following biliary drainage in jaundiced patients caused by biliary tract carcinoma. Hepato-Gastroenterol, 査読あり, 2015 (in press)

DOI: NA.

Shimizu H, Hosokawa I, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Miyazaki M.

Clinical significance of anatomical variant of the left hepatic artery for perihilar cholangiocarcinoma applied to right-sided hepatectomy. World J Surg, 査読あり, Vol. 38, 2014, pp. 3210-3214.

DOI: 10.1007/s00268-014-2715-8

Miura S, Mitsuhashi N, Shimizu H, Kimura F, Yoshidome H, Otsuka M, Kato A, Shida T, Okamura D, Miyazaki M. Fibroblast growth factor 19 correlates with tumor progression and poorer prognosis of hepatocellular carcinoma. BMC cancer, 査読あり, Vol.12, 2012, pp.56-71,

DOI: 10.1186/1471-2407-12-56.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 宏明 (SHIMIZU, Hiroaki)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：80272318

(2) 研究分担者

宮崎 勝 (MIYAZAKI, Masaru)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：70166156

大塚 将之 (OHTSUKA, Masayuki)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：90334185

久保木 知 (KUBOKI, Satoshi)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50571410

木村 文夫 (KIMURA, Fumio)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：70334208

(3) 連絡研究者

なし

(4) 研究協力者

なし