

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790704

研究課題名(和文) 部分的脾動脈塞栓術と自己骨髄細胞投与療法を組み合わせた新規肝線維化改善療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy for hepatic fibrosis using combination of partial splenic embolization and autologous bone marrow infusion

研究代表者

石川 剛 (ISHIKAWA, Tsuyoshi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20569305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：マウス「部分的脾動脈結紮術(PSL)」モデルを確立し、平均67%の脾梗塞が得られた。四塩化炭素の腹腔内反復投与により作成された肝硬変マウスに対してsplenectomy(SP)、PSLを施行したところ両群で術後経過に有意差はなく、またSP群でPSL群より有意に血小板が増加したものの他の所見に有意差は認められなかった。肝硬変患者に対する部分的脾動脈塞栓術(PSE)後に、HGFなどの増殖因子やMMPなどのコラゲナーゼが劇的に増加した。肝硬変マウスに対するPSLモデルでもほぼ同様の結果が得られた。今後、PSLと骨髄細胞投与が「肝線維化改善」にもたらす相乗効果を証明する予定である。

研究成果の概要(英文)：A new mouse model of partial splenic artery ligation (PSL) was originally developed and the procedure induced 67% of splenic infarction. Splenectomy (SP) or PSL was performed for cirrhotic mice induced by continuous intraperitoneal injection of carbon tetrachloride. Platelet counts were significantly increased by SP as compared to by PSL, but there were no statistical differences in other results between two procedures. Partial splenic embolization for cirrhotic human patients dramatically increased various growth factors such hepatocyte growth factor and some collagenases including matrix metalloproteinase, and similar results were shown in cirrhotic mice that underwent PSL. Near the future, we will clarify the synergistic effects on an improvement in hepatic fibrosis by combination of PSL and bone marrow cell infusion.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝線維化 門脈圧亢進症 自己骨髄細胞投与療法 部分的脾動脈塞栓術

1. 研究開始当初の背景

我々は2003年11月より世界に先駆けて臨床研究『非代償性肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法 (ABMi療法)』を推進しているが、現状での効果は「肝機能の改善・維持」が主たるものであり「肝線維化改善」という観点での検討は未だ十分とはいえない。我々はマウス「骨髄細胞から肝細胞への分化・増殖評価モデル(GFP/CCI₄モデル)」において脾臓摘出術(脾摘;SP)が肝線維化改善を促進することを報告し(Iwamoto T, et al. J Gastroenterol. 2012)、さらに臨床研究において部分的脾動脈塞栓術(partial splenic embolization; PSE)が単球/マクロファージ分画の有意な増加を伴って抗肝線維化作用を導き出すことを証明した。脾摘とPSEは理論的には類似した効果をもたらすと考えられるが、非代償性肝硬変患者にとってはPSEの方が明らかに低侵襲であり、PSEとABMi療法を組み合わせることで「線維化改善」の相乗効果が期待できる。

2. 研究の目的

非代償性肝硬変症の様々な病態の中心は高度の肝線維化に起因する門脈圧亢進症(脾機能亢進に伴う汎血球減少、食道胃静脈瘤、肝性脳症など)であり、「線維化改善」がそのQOLおよびADLの改善に直結すると言える。本疾患において肝臓と脾臓は極めて密接に関連しており、今回の研究ではABMi療法の効果をより高めるために「肝脾相関」に着目した新規肝線維化改善療法「PSE先行ABMi療法」の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) マウス部分的脾動脈結紮術(PSL)モデル

「部分的脾動脈塞栓術(PSE)」のマウスモデルは過去に報告されておらず、肝硬変に伴う脾機能亢進症患者に我々が施行しているPSEを小動物で再現することは解剖学的および技術的に不可能である。先にも述べたようにマウス脾摘モデルはすでに確立しているが、臨床における「脾摘」と「PSE」の間には多くの相違点が認められるため、PSEに準じた「部分的脾動脈結紮術(PSL)マウスモデル」を新たに開発する。

【方法】過去に報告されたマウス脾摘モデルを参照し、吸入麻酔下に小開腹したのち3本の脾動脈のうち2本を糸で結紮して閉腹する。PSL1週後に犠死させ、摘出した脾臓を組織学的に検討する(HE染色・Azan染色・梗塞率測定<目標梗塞率; 60-70%>)。

(2) 肝硬変マウスに対するPSLモデル(LC/PSL model)

四塩化炭素(CCl₄)の腹腔内反復投与により作成された肝硬変マウスにPSLを施行し(LC/PSL model)、過去に我々が報告した「肝

硬変マウスに対する脾摘モデル(LC/SP model) (Iwamoto T, et al. J Gastroenterol. 2012)」と比較・検討する。

【方法】CCI₄の腹腔内反復投与(週2回4週間<計8回>)後、sham operation(control)、PSLあるいはSPを施行し、術2週後よりさらに2週間CCI₄を投与した上で犠死させる(control vs LC/PSL vs LC/SP)。血液生化学検査、組織学的検査(肝臓・脾臓)により3群間の比較・検討を行う。

<血液生化学検査> 血算(血小板数、ヘモグロビン値、白血球数)、生化学(総ビリルビン値、血清アルブミン値、AST値、ALT値、LDH値)

<組織学的検査> 肝組織のHE染色、Azan染色、Sirius-red染色、F4/80免疫染色

(3) 肝硬変マウスに対するPSL(基礎研究)と肝硬変患者に対するPSE(臨床研究)

肝硬変症(HBV, HCV, アルコール)に対するPSE症例を対象として、「肝線維化」に関連する各種サイトカイン・増殖因子の術前後の変化を血清学的・組織学的に解析する(臨床研究)。「肝硬変マウスに対するPSL(基礎研究)」の検討結果と比較することで、PSLやPSEの肝線維化に及ぼす影響およびそのメカニズムについて証明する。

【方法】「肝硬変患者に対するPSE症例(臨床研究)」においてはPSE施行前・1ヶ月後に、「肝硬変マウスに対するPSLモデル(基礎研究)」においてはPSL施行前・2週後に血液および肝組織を採取する。Sirius-red染色・αSMA免疫染色・F4/80免疫染色などで組織学的に肝線維化を評価した上で、各種サイトカイン・増殖因子の変化を免疫染色・ELISA・ウェスタンブロットなどの手法を用いて解析する。

* 肝線維化への関与が報告されているサイトカインおよび増殖因子*

Tumor necrosis factor (TNF) α, Matrix metalloproteinase (MMP) 2, MMP9, Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 1, Hepatocyte growth factor (HGF), Epidermal growth factor (EGF), Platelet derived growth factor (PDGF) -AA, PDGF-AB, PDGF-BB, Vascular endothelial growth factor (VEGF), Insulin-like growth factor (IGF) 1, Transforming growth factor (TGF) α, TGFβ1, Fibroblast growth factor (FGF) 2

4. 研究成果

(1) マウスPSLモデルの作成

小動物であるマウスに対するPSLは技術的に非常に難易度が高く当初手技が安定しなかったが、予定された以上の時間を費やしたものの、試行錯誤のうえ最終的には平均67%の脾梗塞が得られることが確認された。

(2) 肝硬変マウスに対する PSL モデル (LC/PSL model)における血球数および肝機能の変化

control (sham operation) 群, LC/PSL 群, LC/SP 群の 3 群間において、処置後の経過 (体重・毛並みなどの変化) や生存率に有意な差は生じなかった。control 群, LC/PSL 群, LC/SP 群における処置 1 カ月後の血小板数 ($\times 10^{10}/L$) はそれぞれ 101.4, 115.2, 129.4 であり、血小板増加数には各群間で有意差が認められた。一方、総ビリルビン値、血清アルブミン値、AST 値、ALT 値、LDH 値など肝機能を反映する各パラメーターに SP 群と PSL 群で有意差は認められなかった。また肝組織の HE 染色、Azan 染色、Sirius-red 染色、F4/80 免疫染色においても統計学的には有意差は認められなかった。

(3) 肝硬変患者に対する PSE (臨床研究) と肝硬変マウスに対する PSL (基礎研究) の比較

本研究期間内に計 32 例の肝硬変患者に対して PSE を施行したが、いずれも重篤な偶発症を発生させることなく、全症例で一定の効果が得られた。術前、術後の血球数および血液生化学検査の結果は表 1 のごとくであった。また各種増殖因子およびサイトカインの relative ratio (術 1 ヶ月後/術前) は表 2 のとおりで HGF などの増殖因子および MMP などのコラゲナーゼが PSE によって劇的に増加することが確認された。一方基礎実験においても、その比率に若干の相違はあるものの、概ね同様の結果が得られた。

(表 1) PSE 前後の血球数・肝機能の変化

	前	1 カ月後	p 値
Plt	6.6	14.0	<0.01
WBC	3063.4	4651.7	<0.01
(Granulo)	55.7	54.1	0.44
(Lympho)	36.7	36.6	0.98
(Mono)	7.6	9.2	<0.01
Hb	12.8	12.6	0.25
C-P	6.4	6.3	0.32
TB	1.3	1.1	<0.01
Alb	3.5	3.3	<0.01
ALT	58.4	47.7	<0.05
ChE	159.9	141.6	<0.05
PT	73.1	75.5	0.08

Plt, platelet ($10^{10}/L$); WBC, white blood cell ($10^6/L$); Granulo, granulocyte (%); Lympho, lymphocyte (%); Mono, monocyte (%); Hb, hemoglobin (g/dl); C-P, Child-Pugh score (points); TB, total bilirubin (mg/dl); Alb, albumin (g/dl); ALT, alanine transaminase (IU/L); ChE, cholinesterase (IU/L); PT, prothrombin activity (%)

(表 2) PSE 後の増殖因子/サイトカインの変化

	術前後比 (後/前)	p 値
PDGF-AA	2.17	<0.01
PDGF-BB	2.44	<0.01
PDGF-AB	5.30	0.196
EGF	6.44	<0.05
HGF	1.28	<0.01
IGF1	0.97	0.34
TGF α	1.22	<0.05
TGF β 1	1.62	<0.01
VEGF	4.50	<0.01
MMP2	1.24	0.11
MMP9	5.89	0.17
TIMP1	1.20	<0.01

PDGF, platelet derived growth factor; EGF, epidermal growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; IGF, insulin-like growth factor; TGF, transforming growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; MMP, matrix metalloproteinase; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase

マウスにおける脾摘モデルはすでに確立されているが、PSE に匹敵する動物実験モデルは過去に報告されていない。脾機能が全て失われる「脾摘」と脾機能の一部が温存される「PSE」は理論的には似て非なる治療であるため、今回の研究ではまず PSE に準じた「PSL マウスモデル」を開発・確立することを目的とし、予定より時間を費やしたもののそれに成功した。CCI $_4$ による慢性肝障害マウスに対して PSL を施行すると、実臨床における PSE 同様に血小板をはじめとする血球増加効果が得られ、一方 control 群や脾摘群と比較しても重篤な偶発症を引き起こすことはなかった。

続いて、「肝硬変マウスに対する PSL (基礎研究)」と「肝硬変患者に対する PSE (臨床研究)」の比較では双方ほぼ同様・同等の結果が認められ、注目すべきは脾梗塞後の血小板増加に伴って各種増殖因子やサイトカインが劇的に増加することが示された。血清学的には線維化マーカーの変化にばらつきがあるものの、今後基礎・臨床両面での組織学的な検討を蓄積していく必要がある。さらに我々が独自に確立した GFP/CCI $_4$ モデルを用いて PSL と骨髄細胞投与が「肝線維化改善」にもたらす相乗効果について検討する計画であったが、PSL モデルの確立に時間を要したため最終実験が期間内に十分に行えず、その証明には至らなかった。今後さらに研究を継続し、論文化につなげていく予定である。

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 1 件)

Ishikawa T, Shiratsuki S, Matsuda T,

Iwamoto T, Takami T, Uchida K, Terai S, Yamasaki T, Sakaida I. Occlusion of portosystemic shunts improves hyperinsulinemia due to insulin resistance in cirrhotic patients with portal hypertension. J Gastroenterol. 査読有, 2014, DOI なし 掲載確定

〔学会発表〕(計 7 件)

Tsuyoshi Ishikawa, Takashi Matsuda, Takuya Iwamoto, Shuji Terai, Isao Sakaida. Occlusion of portosystemic shunts improves hyperinsulinemia due to insulin resistance in cirrhotic patients with portal hypertension. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2013/11/4, The Walter E. Washington Convention Center (Washington, DC. USA)

石川 剛、白築 祥吾、松永 一仁、松田 崇史、岩本 拓也、坂井田 功、PSE が門脈圧亢進症を伴う肝硬変患者の血行動態に及ぼす影響、第 20 回日本門脈圧亢進症学会総会、2013 年 9 月 20 日、名古屋国際会議場(名古屋市)

石川 剛、白築 祥吾、松永 一仁、松田 崇史、岩本 拓也、坂井田 功、PSE は門脈圧亢進症を伴う肝硬変患者に種々の有効性をもたらす。第 20 回日本門脈圧亢進症学会総会、2013 年 9 月 20 日、名古屋国際会議場(名古屋市)

石川 剛、松田 崇史、岩本 拓也、坂井田 功、B-RT0 は肝硬変患者の高インスリン血症・インスリン抵抗性を改善する。第 49 回日本肝臓学会総会、2013 年 6 月 7 日、京王プラザホテル(東京)

石川 剛、岩本拓也、坂井田 功、PSE による血小板増加が肝再生・肝発癌・肝線維化に及ぼす影響、JDDW2012、2012 年 10 月 10 日、神戸国際会議場(神戸市)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 剛 (ISHIKAWA, Tsuyoshi)
山口大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：20569305

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：