

厚生労働省特定疾患

門脈血行異常症調査研究班
平成十四年度研究報告書

平成 15 年 3 月

班 長 橋 爪 誠

序 文

昭和50年、厚生省特定疾患「特発性門脈圧亢進症」調査研究班が発足した（班長：杉浦光雄）。その後、肝外門脈閉塞症（EHO）、バッドキアリ症候群（BCS）が加わって、「門脈血行異常症」調査研究班として再編成され、奥田、亀田、小幡、二川、杉町各班長に引き継がれ、今日に至っている。この間、多くの班員、研究者の努力により、これら疾患の病因、病態、病理、疫学、診断、治療、予後などについて精力的に研究が推進された。昭和62年（1987年）には特発性門脈圧亢進症（IPH）、EHO、平成2年（1990年）にはBCSの診断の手引きが作成され、平成2年（1990年）には治療指針も作成された。そしてその後、3疾患の原因解明は、分子生物学的解析や遺伝子解析を新たに行うことで、新たな展開を迎えた。最先端の分子生物学的手法を使い、IPHにはCTGFが過剰発現していること、そしてHO-1の発現が低下していることを発見した。また、BCSの国際間比較もなされた。一方、社会的には、平成10年度に、BCSが治療研究対象疾患に採択され、患者にとって大きな福音となり、平成12年12月には「門脈血行異常症の診断と治療（2001年）」を新基準として設定することができた。

その流れを受け継いで、平成15年度より新たに橋爪班が立ち上がった。未だこれら疾患の原因は不明であるが、IPHにおける免疫異常や血管増殖因子の関与、BCS、EHOにおける凝固線溶系の異常と遺伝子異常が次第に明らかと成りつつある。さらに分子生物学的、遺伝子学的アプローチを続けることでさらなる原因解明ができるものと期待される。そして、これらの原因解明を、臨床の場で診断・治療に応用することが次の課題である。

本年度は橋爪班初年度となるが、初年度にふさわしく、各班員とも分子生物学的手法をさらに発展させた研究内容を発表して頂いた。IPHでは、前回までのDNAマイクロアレイ解析よりさらに進み、プロテインチップによる解析がなされた。また、IPHにて発現が低下しているHO-1の病理生理学的意義がtransfectionによる遺伝子発現変化から解析された。また、EHO・BCSではFactor VR2のメカニズムが分子生物学的に解析され、Factor VのSNP解析も行われた。また、ネパールのBCSが病理組織学的に検討され、国際間比較がなされた。

全国患者登録及び検体保存センターは今年6年目を迎えるが、IPH 98例、EHO 49例、BCS 38例の計185例の登録と検体の保存を完了し、さらに登録症例を増やしつつある。これにより、さらなる研究の進展と治療への貢献が期待される。

今年度も、ここに研究成果をとりまとめることができ、わずかでも各疾患の病因、病態の解明に貢献することができたと確信している。最後に、厚生労働省保健医療局疾病対策課のご指導、ご支援に厚く御礼申し上げるとともに本研究班の班員、研究協力者の先生方、ならびに関係諸氏に深く感謝する。

平成15年3月

厚生労働省特定疾患
「門脈血行異常症」調査研究班

班 長 橋 爪 誠

厚生労働省 特定疾患
門脈血行異常症 平成14年度研究報告書

目 次

序 文

I 総括研究報告 班長 橋 爪 誠 …… 1

II 分担研究報告

A. 病 因

プロテインチップによる IPH 特異的タンパクの解析

大阪市立大学大学院核医学 塩 見 進 …… 5

血液凝固第V因子の新しい遺伝子多型 FV R2について

国立名古屋病院 齋 藤 英 彦 …… 8

肝臓・門脈循環機能の heme oxygenase-CO 系による調節機構

慶應義塾大学医化学教室 末 松 誠 …… 11

生体肝移植前後の病態からみた門脈血行異常

長崎大学大学院移植・消化器外科 兼 松 隆 之 …… 13

Budd-Chiari 症候群の病因に関する検討

九州大学大学院災害・救急医学 橋 爪 誠 …… 16

B. 病 理

ネパールの Budd-Chiari 症候群 — 第2報 —

久留米大学病理学教室 鹿 毛 政 義 …… 19

Incomplete septal cirrhosis の病理

金沢大学大学院形態機能病理学 中 沼 安 二 …… 22

C. 病 態

肝門部と肝末梢域での血行動態の差異：門脈血行異常症での検討

金沢大学大学院形態機能病理学 中 沼 安 二 …… 25

Endothelin antagonist による門亢症胃粘膜下微小循環の変化

— In Vivo Microscopy による解析 —

大分医科大学第一外科 北 野 正 剛 …… 27

門脈大循環短絡路の血行動態

— グルカゴン負荷時の変化について —

千葉大学大学院腫瘍内科学 松 谷 正 一 …… 31

I 総括研究報告

総括研究報告

班長 橋爪 誠 (九州大学大学院災害・救急医学)

I. 研究目的

本研究班の研究目的は、原因不明で門脈血行動態の異常を来す特発性門脈圧亢進症 (IPH)、肝外門脈閉塞症 (EHO)、バッドキアリ症候群 (BCS)、などを対象疾患として、これらの疾患の病因および病態の追求とともに、患者発生状況、その予後などが国における実態を正確に把握し、予後の向上のために治療上の問題点を明らかにするところにある。

本研究班は、昭和50年以降厚生省特定疾患として検討されてきたIPH以外に、EHO、BCSなどを含み、昭和59年に発足した。しかし、長年の班員の努力にもかかわらず、未だその病因は不明である。そこで、近年の分子生物学的アプローチと遺伝子学的アプローチに重点を置き、これらの疾患の解明を行うこととした。

II. 研究成果

【病 因】

塩見らはプロテインチップを用いてIPHに特異的に発現するタンパク質の解析を行った。解析の結果、IPHに特異的に発現していたのは7770Daのタンパク質であり、発現量はIPH5例中、4例で上昇していた。今回の検討ではIPH全例で一致したパターンを示したタンパク質はなく、本疾患が単一の病態を示すものではない可能性が考えられた。

齋藤らは、Factor V R2 haplotypeのメカニズムを分子生物学的に解析した。Factor V R2 haplotypeに含まれる変異のうち、機能的に重要であると考えられる4つの変異を導入したリコンビントFactor V R2 haplotypeをin vitroの発現系で発現させ、個々の変異が異常蛋白質の発現に及ぼす

影響を解析した。また、pulse-chaseを用いて、リコンビナントFV R2の細胞内輸送、細胞内修飾について詳細に解析した。Asp2194 to Gly変異の存在がリコンビナントFV R2分子の粗面小胞体からGolgi体への細胞内輸送を障害し、細胞培養上清中への最終的な発現量を低下させることが判明した。

末松らはHO-1の病態生理学的意義を明らかにする目的で、ヒトマクロファージ細胞株U937を用いてHO-1cDNAをtransfectionしてどのような遺伝子に発現変化が起こるかを網羅的解析法(transcriptome analysis)により解析した。HO-1の発現に伴いマクロファージではMCP-1の低下など炎症反応の低下に関与するものばかりでなく、PAI-1の低下やCTGFの低下など組織の再生や線維化抑制に関与する可能性を示唆する反応が認められた。

兼松らは門脈血行異常の解析を、肝移植周術期の画像、血流の見地から検討した。生体肝移植前の門脈血行異常は24例中4例に認めた。右葉グラフト移植後の門脈流速、流量は、肝硬変群で2週目まで徐々に上昇し、劇症肝炎群、対照群に比し約2倍と高値であった。また、右葉グラフト肝の標準肝容積比は肝硬変群が劇症肝炎群より迅速高値で、1ヶ月後に両群間に有意差があった。

橋爪らは、Budd-Chiari症候群(BCS)の病因に関して、本邦及びネパールのBCSのFactor V codon 830, 897の遺伝子多型性、Leiden mutation、Prothrombin gene mutationを検討した。本邦及びネパールのBCSの遺伝子多型性は類似性があったが、Controlとは有意差がなかった。また、Leiden mutation及びProthrombin gene mutationは認められなかった。

【病 理】

鹿毛らはカトマンズの Budd-Chiari 症候群 (BCS) 症例に対して施行された肝生検症例81例を対象にし、臨床経過から3型、すなわち急性例、亜急性例、慢性例に分類し、臨床病理学的検討を行った。急性型ではアルコール性肝障害像を呈する症例が主体をなした。亜急性型では、病変は多様であり、急性のうっ血肝からうっ血性肝硬変に至るうっ血性肝病変のスペクトラムの広がりが見られた。慢性型では、うっ血性肝線維症とうっ血性肝硬変を呈する症例が主体をなし、アルコール性肝障害像を呈する症例は認められなかった。

中沼らは、IPH とともに、原因不明の非硬変性門脈圧亢進症に含まれる代表的肝病変の一つである Imcomplete septal cirrhosis (ISC) 剖検例2例を報告した。

【病 態】

中沼らは、IPH 肝中枢部 (perihilar region) での変化を検討するため、まず典型的な正常肝と、IPH 肝の perihilar region に関して、剖検例を用いて検討した。正常肝では肝門部付近の肝実質には、肝門部の胆管、動脈からの分枝が直接門脈域を構成して肝実質内に侵入し、支配していることが分かった。また、IPH の病期の進行していない症例では、perihilar region の門脈枝に変化は乏しいが、進行した症例では肝末梢域の門脈枝と同様の変化を認めた。

北野らは門脈亢進症性胃症 (Portal Hypertensive Gastropathy) の ET receptor antagonist による微小循環の変化を in vivo microscopy にて観察し、ET と PHG の関係について in vivo microscopy を用いて検討した。胃粘膜血管径は動脈径、静脈径とも門脈圧亢進症 (PVL) 群の方が sham operation (SO) 群より有意に拡張していた。また、ET-A antagonist 投与により、PVL 群にて動脈径・静脈径ともに更に拡張した。門亢症ラット胃粘膜下において ET-1 は ET-A receptor を介して微小循環の regulation を行っていると考えられた。

松谷らは、門脈血流増加作用が知られているグル

カゴンを負荷した際の、食道静脈瘤血行路血流の反応性を検討した。負荷前後の血流速度の変化率は門脈本幹より左胃静脈で有意に高値であった。肝内の門脈血管抵抗と門脈大循環短絡路の血管抵抗の差がこのような反応性の背景にあるものと考えられた。また、静脈瘤が高度になるほど、また、左胃静脈径が大きいほど、血流速度の変化率は低値であった。門脈圧亢進症が高度になるほど、持続的な高グルカゴン血症の状態にあることから、グルカゴンに対する反応性が低下すること、また、静脈瘤血行路が発達するほど、高度な血流のために高度な血流のために血管の伸展性が限界に達し、新たな血流を受け入れられなくなることなどが、このような現象の背景として考えられた。

【全国調査・疫学】

廣田らは、検体登録症例に係る疫学・臨床情報を郵送により収集し、生体試料からの情報との関連を検討した。2002年8月現在、全国検体保存センターに登録されている IPH 症例の中から疫学・臨床情報の収集ができた40例を集計対象として、1998年全国疫学調査の集計結果と比較検討した。

【全国患者登録および検体保存センターの現況】

厚生労働省特定疾患門脈血行異常症調査研究班の調査研究対象となる特発性門脈圧亢進症 (IPH)、肝外門脈閉塞症 (EHO)、バッドキアリ症候群の病因は未だに不明である。これら3疾患は全国的に症例数が限られているため、病因や病態の解明を行うには、調査研究対象となる症例の確保が必要である。

当研究班では、全国症例登録および検体保存センターを設立・運営をおこなってきた。稀な疾患である門脈血行異常症の病因や病態を解明するためには全国から広く症例を集め一人ひとりの遺伝情報の違いと疾病との関連を研究し (遺伝子解析)、それを疾病の予防、早期発見、早期治療に結びつけることが必要である。

しかし、遺伝子解析を行うにあたり、その研究の結果が様々な倫理的・法的・社会的問題を招く可能性を十分考慮しなければならず、研究に当たっては、

試料等提供者、その家族や血縁者さらには同じような病気にかかっている他の患者の尊厳を尊重し、人権を守り、利益を保護することが重要である。平成13年3月29日付けで、文部科学省・厚生労働省・経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」が告示され、この指針に定められた手続きを遵守することが求められている。

以上のことを考慮し、倫理面の整備と全国検体保存システムの再編を行った。

まず、九州大学大学院医学系研究院の遺伝子解析倫理審査委員会に「門脈血行異常症の遺伝子異常に関する調査研究」の審査を申請し、九州大学医学部において遺伝子解析における倫理委員会に当研究班の遺伝子解析の研究の内容と方法を審議して頂き、平成14年3月に承認を得た。また承認を受けた遺伝子解析研究のガイドラインに沿って研究班の目的や検体保存センターの趣旨に賛同し、協力していただけの協力施設にたいして配付する患者説明同意書の作成を行った。

現在までに研究協力を依頼した施設は666施設、研究協力に同意した施設は258施設（内訳：174大学、病院84施設）であり。実際に登録症例のあった施設は167施設、さらに検体提供のあった施設は59施設であった。平成14年3月31日現在、IPH 98例、

EHO 49例、バッドキアリ症候群 38例の計185例の検体の登録を完了した。全血検体よりDNAを抽出し、血漿および血清は凍結保存した。

【臨床】

川崎らは門脈血行異常症を含めた食道静脈瘤症例（肝硬変、IPH、EHO）を左胃動脈造影、腹腔動脈造影、上腸間膜動脈造影によって、左胃静脈の血流方向を遠肝性、求肝性、両方向、非造影の4群に分類し、発生頻度、静脈瘤の形態、直達手術の頻度などについて検討した。

松谷らは、門脈血栓の急な形成に伴って肝不全、門脈圧亢進症の増悪をきたした症例に対し、抗凝固療法が効果のあった2症例を報告した。

橋爪らは、脾臓摘出術により術後肝機能が改善したIPHの一例を報告した。

加藤らは、IPH症例に対するシャント手術の成績を肝硬変例と比較し、IPHに対する本術式の有用性の再評価を行った。

川崎らは、経内視鏡的マイクロバスキュラー・ドップラー血流計（EMDS）を用いて直達手術の術前、術後に静脈瘤血流速度を測定し、静脈瘤の形態や直達手術の治療効果について検討した。

II 分担研究報告

プロテインチップによる IPH 特異的タンパクの解析

大阪市立大学大学院医学研究科核医学

塩見 進

共同研究者

大阪市立大学大学院医学研究科肝胆臓病態内科学

西口 修平、羽生 大記、田守 昭博、巽 信之

はじめに

特発性門脈圧亢進症 (IPH) の原因を探るために、本班会議において検体保存センター構想がスタートし、¹⁾ IPH 症例については現在までに肝臓31例、脾臓30例、血清133例の検体が集積されている。我々はその検体を用いて、Atlas cDNA micro array 法により数種類の IPH 肝に特異的に発現する遺伝子群をピックアップし、その中で特に connective tissue growth factor (CTGF) に注目し検討を行ってきた。²⁾ その結果、IPH 症例では ELISA 法にて測定した CTGF 値は健常コントロールや C 型慢性肝疾患患者に比べ異常高値を示す症例が存在し、それら症例では CTGF が病態と関連している可能性がある。近年、プロテインチップを用いた方法により検体中のタンパク質を直接検出できるようになってきた。³⁾ 今回、我々はプロテインチップを用い、IPH に特異的に発現するタンパク質の解析を行った。

対象と方法

検体として IPH 患者 5 例、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 患者 3 例の血清を使用した。タンパク質の解析はサイファージェン・バイオシステムズ社製のプロテインチップシステムを用い行った。プロテインチップとして陽イオン交換、陰イオン交換、金属イオンの 3 種類のケミカルチップを用い、金属イオンとして Cu を使用した。患者血清を直径 2 mm の

スポットに添加、インキュベート後 buffer で洗浄しチップ表面に affinity のない物質を除去した。洗浄液として陽イオン交換は pH4.5 と pH6.0 の条件で行い、陰イオン交換は pH8.0 と pH4.5 の条件で行った。さらに、陽イオン交換と陰イオン交換に関して通常の非変性条件以外に urea buffer で希釈し、変性条件でも行った。その後、目的のタンパク質の測定に必要なエネルギー吸収分子 (EAM) を加え乾燥させた。タンパク重量の解析には surface-enhanced laser desorption ionization (SELDI)-time of flying (TOF) 型のチップリーダーを使用した。すなわち、プロテインチップに UV パルスレーザーを照射することにより、エネルギーを受けてイオン化したタンパク質は一定の電圧で加速され、真空管の対局にあるイオン検知器に向かって飛行するが、この飛行時間を測定することにより目的物質の重量数を測定した。全ての測定は再現性をみるため duplicate で実験を行った。

結 果

タンパク質の発現解析を行ったものの内 IPH に特異的に発現していたのは陽イオン交換、pH6.0、変性条件での 7770Da のタンパク質であった (図1A)。その量は図1B に示す通りで、IPH 5 例中 4 例で上昇していた。また、PBC に特異的に発現していたのは陽イオン交換、pH6.0、非変性条件で 8935Da のタンパク質であった (図2A)。その発現量は図2B に示すように PBC 3 例全例で上昇していた。

プロテインチップを用いた解析は近年卵巣癌、⁴⁾膀胱癌⁵⁾ など各種悪性腫瘍の解析を中心に行われつつある。プロテインチップを用いた測定には25KDa以下のペプチドタンパク質の検知感度が高い、ダイナミックレンジが広い、測定が等電点の影響を受けない、他の方法に比べスループットが高い、少ないサンプル量でも測定可能、チップ上での発現解析および同定が可能などの利点がある。しかし、欠点として40KDa以上のタンパク質の検知感度が低い、発現解析のためのデータの蓄積が少ない、目的タンパク質の同定を行うには精製のステップが必要などの点が挙げられている。6)

今回、対照として感染性の検体を用いることができなためPBC症例を用いたが、健常者の方が疾患の特徴が明確に現れるかもしれない。今回の症例ではIPHで全例一致したパターンを示したタンパク質はなく、そのことは本疾患が単一の病態を示すものでない可能性がある。そのためIPHの症例数を増やしてさらなる検討を加える必要がある。さらに、単一のタンパクではなくクラスター解析などによりタンパクのパターンでみた方がよいのかもしれない。そして、最終的にはカラムや電気泳動を用いて精製を行なう必要がある。また、精製されたタンパク質はトリプシンなどで分解して分解産物の分子量を測定し、データベース上のタンパク質配列を用いて解析することにより同定する必要がある。

- 1) 黒木哲夫、塩見 進、森川浩安ほか：門脈血行異常症検体保存センター構想. 厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成9年度研究報告書1998:82-83.
- 2) 塩見 進、森川浩安、西口修平ほか：特発性門脈圧亢進症の遺伝子異常に関する研究. 厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成11年度研究報告書2000:17-19.
- 3) 塩見 進、森川浩安、西口修平ほか：特発性門脈圧亢進症の遺伝子に関する研究. 厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成12年度研究報告書2001:20-22.
- 4) Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359: 572-577.
- 5) Vlshou A, Schellhammer PF, Mendrinou S, et al. Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am J Pathol* 2001; 158: 1491-1502.
- 6) Forde CE, Gonzales AD, Smessaert JM, et al. A rapid method to capture and screen for transcription factor by SELDI mass spectrometry. *BBRC* 2002; 290: 1328-1335.

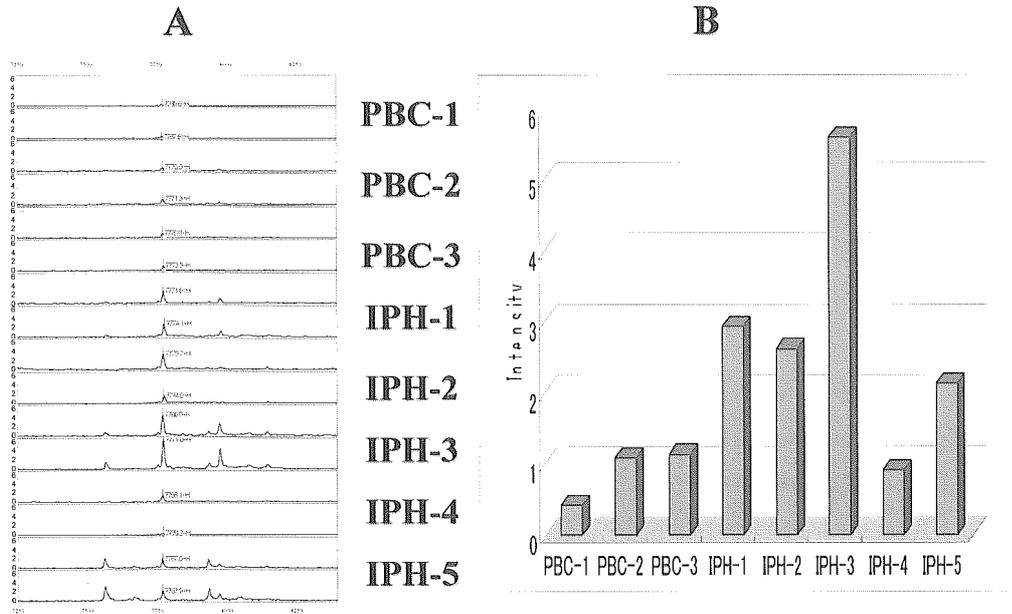


図1. IPHにて発現を認めたタンパク質

A: 陽イオン交換、pH6.0、変性条件において7770Daのタンパク質の発現を認めた。
B: 発現したタンパク量はIPH患者の5例中4例において上昇していた。

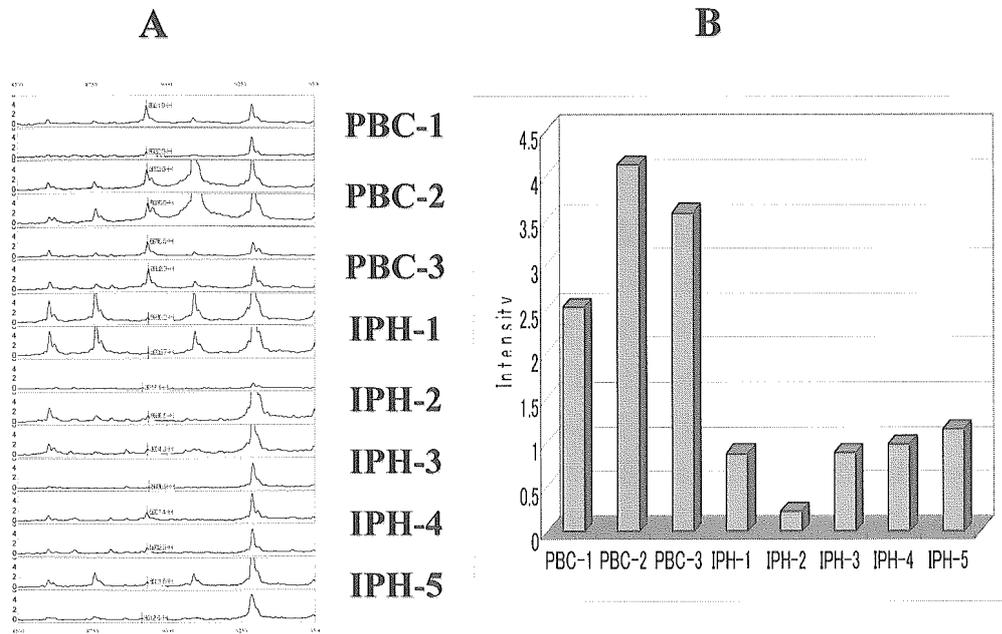


図2. PBCにて発現を認めたタンパク質

A: 陽イオン交換、pH6.0、非変性条件において8935Daのタンパク質の発現を認めた。
B: 発現したタンパク量はPBC患者全例において上昇していた。

血液凝固第V因子の新しい遺伝子多型 FV R2について

国立名古屋病院
齋藤 英彦

共同研究者
国立名古屋病院
山崎 鶴夫

はじめに

FV は重要な血液凝固促進因子であり、その欠乏症は出血傾向を呈することが知られている。ところが、1990年代の半ばに異常 FV (FV Leiden) による強い血栓傾向 (APC resistance) が報告され、世界中で FV と血栓症の関連が注目され始めた。ところが、その後の解析で FV Leiden は欧米人にのみ存在し、アジア系人種には存在しないことが明らかになった。その後 Dahlback らによって FV は血液凝固促進作用だけでなく、血液凝固抑制作用も持つことが明らかにされ、欧米諸国では FV に関する研究がさらに盛んになった。

1990年代の後半、イタリアのグループによって FV R2 haplotype と命名された特異な遺伝子多型が発見された。FV R2 haplotype は、ひとつの allele 上に10以上の遺伝子変異が互いにリンクして存在する特異な polymorphism であり (図1)、イタリア人、インド人、アフリカ人の5-10%が FV R2 haplotype の保因者であることが判明した。アフリカ人にも存在することから、FV R2 haplotype の起源は非常に古いと考えられ、日本人を含むアジア人にも存在すると推察されている。

近年、イタリア、フランス、オランダの各グループより、FV R2 haplotype は弱い血栓症のリスクファクターであること、そして、FV R2 haplotype の保因者は軽度の FV 欠乏症を呈することが報告されたが、その詳細なメカニズムは解明されていない。これに対し、イギリス、スウェーデンのグループは、

FV R2 haplotype と血栓傾向の関連を見出すことができず、各国のグループ間でマスキングの結果に矛盾が存在する。

既に報告されている FV R2 haplotype の保因者が持つ表現型は、本当に FV R2 haplotype によって生じたものであるか否かを確認するとともに、それらのメカニズムを分子生物学的に解析した。

対象と方法

図1に示す FV R2 haplotype に含まれる変異のうち、機能的に重要と考えられる4つの変異を導入したりコンビナント FV R2 を *in vitro* の発現系で発現させ、個々の変異が異常蛋白質の発現に及ぼす影響を解析した。細胞培養上清中に発現したりコンビナント FV R2 量を ELISA によって測定した。また、pulse-chase を用いて、リコンビナント FV R2 の細胞内輸送、細胞内修飾について詳細に解析した。

結果および考察

Asp 2194 → Gly 変異の存在が、リコンビナント FV R2 分子の粗面小胞体 (ER) から Golgi 体への細胞内輸送を障害し (図2)、細胞培養上清中への最終的な発現量を低下させることが判明した (図3)。本研究の *in vitro* の実験系は、FV R2 haplotype の保因者が軽度の FV 欠乏症を呈するとした *in vivo* のデータを支持するものであった。

以前より、アジア人では欧米人に比べて血栓症の

発症頻度が低いことが知られていた。近年の研究により、FV Leiden の有無が血栓症の発症頻度に大きな影響を与えていることが判明した。先に述べたように、本邦では FV と血栓症の関連に注目した研究はほとんどなされていないが、実際には FV R2 haplotype のように、本邦においても FV の異常と血栓症には少なからず関連があると推察される。今後、門脈血行異常症との関連について研究を進める予定である。

文 献

- 1) Yamazaki T, et al.: Molecular basis of quantitative factor V deficiency associated with factor V R2 haplotype. Blood 100: 2515-2521, 2002.

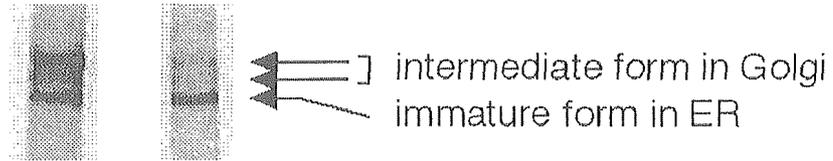
Mutations in FV R2 haplotype

| | | | |
|----------------|-----------------------|-------------------|----------|
| Exon 4 | Ser156 to Ser | TCG to TCT | silent |
| Exon 8 | Met385 to Thr | ATG to ACG | |
| Exon 13 | Ile708 to Ile | ATT to ATC | silent |
| Exon 13 | Asn717 to Asn | AAC to AAT | silent |
| Exon 13 | Glu735 to Glu | GAA to GAG | silent |
| Exon 13 | Ser739 to Ser | TCG to TCA | silent |
| Exon 13 | Asn789 to Thr | AAC to ACC | linkage? |
| Exon 13 | Lys830 to Arg | AAA to AGA | linkage? |
| Exon 13 | His837 to Arg | CAT to CGT | linkage? |
| Exon 13 | Lys897 to Glu | AAG to GAG | linkage? |
| Exon 13 | Ser1240 to Ser | TCC to TCT | silent |
| Exon 13 | Leu1257 to Ile | CTT to ATT | linkage? |
| Exon 13 | Leu1288 to Leu | CTT to CTC | silent |
| Exon 13 | His1299 to Arg | CAT to CGT | |
| Exon 16 | Met1736 to Val | ATG to GTG | |
| Exon 25 | Asp2194 to Gly | GAT to GGT | |

図 1

Impaired transport from ER to Golgi

WT D2194G



2 hrs cell lysates

图 2

Expression levels (ELISA)

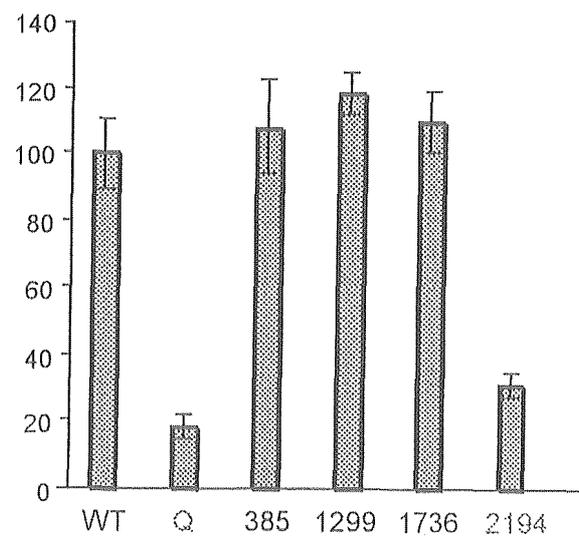


图 3

肝臓・門脈循環機能の heme oxygenase-CO 系による調節機構

慶應義塾大学医学部医化学教室
末松 誠

はじめに

Heme oxygenase (HO-1) は肝臓、脾臓に豊富に発現し、ヘムの酸素添加反応による解毒を行い還元鉄、biliverdin および一酸化炭素 (CO) を生成する酵素である。我々は CO が肝臓で構成的にかつ大量生成することにより類洞血管を恒常的に拡張し、臓器の低い血管抵抗を維持するのに重要な役割を果たしていることを世界で初めて報告し、以来このガス分子が肝臓-門脈循環の調節因子として大きな役割を果たしていることを明らかにしてきた。一方、ヒト HO-1 を認識するモノクローナル抗体を用いた免疫組織学的解析により肝硬変症では Kupffer cell における発現増加と肝細胞におけるびまん性増加、あるいは特発性門脈圧亢進症 (IPH) では Kupffer cell における発現の著明な低下が起こることを初めて明らかにした。今年度からの分担研究では HO-1 が門脈圧亢進病態のマーカーとして重要であるばかりでなく、この病態における組織のリモデリング機構としてなんらかの重要な意味を持つと考え、その機構の解明を目的として研究展開を行った。

対象と方法

ヒト由来マクロファージ細胞株として U937 細胞を選び、ラット HO-1 cDNA を pEFneo plasmid vector につなぎ細胞に transfection を行った。コントロールとして vector のみの transfection したものの、あるいは基質である protoheme-IX が結合して、軸配位子となる N 末端から 25 番目の histidine を alanine に変換した H25A mutant cDNA を同じ vector に繋いだ construct を transfection したものをそれぞれ

cloning した。タンパク質の発現量の異なる複数のクローンを分離した。これらのうち最も発現量が多いもので且つ H25A mutant と同等のタンパクを発現している細胞を選別し、それらの mRNA を分離して、Affimetrix 社の Gene chip によりヒトの 11,000 種類の mRNA の発現量変化を解析した。

結 果

樹立した各細胞株を解析した結果、HO-1 を発現させた細胞では MCP1 や IL-8 の発現が低下していた。これらの変化は H25A mutant HO-1 の高発現株では認められなかったことから、変化には HO-1 の酵素活性の関与が不可欠であることが証明された。これらの変化はタンパク質レベルでも確認され、HO-1 高発現細胞は Boyden chamber における遊走反応も著しく低下していた。また connective tissue growth factor の発現も低下していた。一方、興味深いことに elastase-1 は HO-1, H25A mutant HO-1 の双方の細胞株で同様に発現増加を示し、しかもタンパク質レベルでも増加が確認された。これらの結果から HO-1 の発現に伴う細胞機能のリモデリングの機構に酵素活性によらないものが存在することが示唆された。

考 察

HO-1 はストレスで誘導されるため、その組織保護作用が注目されてきたが、CO 以外の生成物が多彩な生理活性物質であり、抗酸化物質である bilirubin の前駆物質を供給し、レドックス調節物質である還元鉄を生成するため、多彩な生物活性を発揮すると思われるがその作用の全貌は明らかになっていない。

ヒトマクロファージ細胞株 U937を用いて HO-1c DNA を transfection してどのような遺伝子に発現変化が起こるかを網羅的解析法 (transcriptome analysis) により解析した。HO-1の発現に伴いマクロファージでは MCP-1の低下など炎症反応の低下に関与するものばかりでなく、Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1の低下や CTGF の低下など組織の再生や線維化抑制に関与する可能性を示唆する反応が認められた。この解析法により HO-1誘導に伴う細胞機能リモデリングのメカニズムが明らかになった。Kupffer cell の HO-1は肝硬変で増加、IPH で低下することをヒトで報告してきたが、今回の解析でその病態生理学的意義の一端が明らかにされた。肝硬変において HO-1が発現増加する背景には門脈圧亢進による消化管からの bacterial translocation や類洞血管における wall shear stress が関与する可能性があり、事実血管平滑筋細胞を shear stress の存在下で培養すると HO-1の誘導が検出できることが報告されている。IPH では前類洞性血管収縮がその本態と考えられており、類洞の shear stress は逆に低下すると考えられる。通常このような状況では肝臓実質領域への酸素供給が低下する可能性があり、酸素濃度を感知する転写因子である Hypoxia inducible factor-1 (HIF1 α) などの

核内移行を介して HO-1が増加するような応答が起こるはずである。IPH ではこのような低酸素応答は少なくともヒト症例では起きていなかった。このような微小環境の違いが Kupffer cell の応答の違いをもたらす可能性とその分子基盤についてヒト由来細胞を用いて解析する一方、HIF-1 α の conditional knock out mice による実験的肝臓リモデリングの修飾機構についても併せて検討することにより、門脈圧亢進病態における肝臓のリモデリング機構を包括的に解析する予定である。

文 献

- 1) Hori R, Kashiba M, Toma T, Yachie A, Goda N, Makino N, Soejima A, Nagasawa T, Nakabayashi K, Suematsu M. Gene transfection of activity-lacking H25A mutant heme oxygenase-1 protects against hydroperoxide-elicited cytotoxicity in human monoblastic leukemia U937 cells. *J Biol Chem* 277, 10712-10718, 2002.
- 2) 末松 誠 Gas Biology: ガス分子による生体制御の生物学. *生化学*74, 1317-1328, 2002

生体肝移植前後の病態からみた門脈血行異常

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科移植・消化器外科
兼松 隆之

共同研究者

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科移植・消化器外科
江口 晋、矢永勝彦、杉山 望、奥平定之、古井純一郎

はじめに

肝移植の対象となる肝疾患はいずれも末期状態にある。このような究極の状態では画像上門脈の血行異常を示すことも少なくない。さらに、末期肝疾患の生体肝移植症例を経験するに従い、移植後の門脈血行異常も経験するようになってきた。術前の門脈血行異常は生体肝移植手術および術後肝機能、さらには肝再生因子などの変動を通じて肝再生に少なからずも影響する可能性もある(1)。

今回、門脈血行異常の解析を、肝移植周術期の画像、血流所見の見地から試みた。

対象と方法

対象は当科にて生体肝移植を施行した24例(1997年8月~2002年11月)で、平均29.2歳(6カ月~63歳、男:女=12:12、成人:小児=17:7)であった。疾患の内訳は劇症肝炎7例、各種原因による肝硬変17例であった。小児例には外側区域グラフトを、成人例には1例の拡大左葉グラフトを除いては全例右葉グラフトを用いた。術前にドップラーエコー、CT、血管造影を行い門脈・肝動脈の血行を把握するとともに、術後はドップラーエコー、CTを行い移植肝の血行動態と肝再生を解析した。

結 果

1. 術前門脈血行異常

生体肝移植術前の門脈血行異常は24例中4例(16.7%:門脈完全途絶2例、門脈狭小化1例、門脈狭小化+逆流1例)に認めた。4例全例で肝動脈結紮後に求肝性の門脈血流が確認され、再灌流後に十分な求肝性門脈血流が得られた。器質的門脈病変は1例のみで、最終的に全例で門脈グラフトを必要としなかった。

また、術前門脈血行異常につき成人慢性肝硬変例のみ(n=11)を検討すると、異常群3例、正常群8例であり、両群間に年齢、性比、食道静脈瘤の有無、肝萎縮の程度(標準肝容積比)で有意差を認めなかった。また全例に病理学的に肝門部で門脈硬化、動脈増生がみられたが、両群間で明らかな相異を認めなかった。

2. 生体肝移植術周術期の門脈血行動態と肝再生

病態別の移植前門脈流速は、劇症肝炎群(FHF群:n=5)では 16.9 ± 4.4 (14.3-24.8cm/s)で、全症例で求肝性門脈血流を認めた。肝硬変群(LC群:n=11)では 8.9 ± 7.5 cm/s (0-21.4)と低下しており($p < 0.05$ vs FHF群)、2例で求肝性門脈血流を認めなかった。肝移植後に門脈血流が途絶・逆流を認めたのはLC群の2例(全体の8.3%)で、ともに肝生検にて中等度の拒絶反応を認めた。

右葉グラフト移植後(術後合併症を認めなかった13例)の門脈流速は、LC群でPV流速、流量ともに2週目まで徐々に上昇し、FHF群、対照群(ド

ナー)に比し約2倍と有意に高値であった ($p<0.01$)。FHF群では対照群に比し術後1、3日目に高値であったが ($p<0.05$)、その後は漸減し2ヶ月まで対照群との有意差を認めなかった。右葉グラフト肝の標準肝容積比はLC群がFHF群より迅速、高値で、1ヶ月後にて両群間に有意差があった ($p<0.05$)。対照群での肝再生はFHF群とほぼ同様であった。術後3、7日目の門脈流速と右葉グラフトの標準肝容積比は有意な相関を認めた。

考 察

門脈血行動態から見ると肝移植は基本的には端側の門脈下大静脈吻合であり、そのシャントに移植肝の機能が付与されたと捉えることができる。つまり、肝移植は究極の門脈圧減圧手術ともいえる。

今回、肝移植周術期の門脈血行異常を移植前後に分けて、その病態を解析したところ、術前の門脈血行異常は4例(16.7%)に認めた。その要因としては以前から報告されている如く 1. 肝硬変進行による器質的門脈血流障害、2. 全身循環、局所循環亢進状態から肝動脈血液量の増加による肝内細血管レベルでの門脈圧上昇、3. 肝硬変進行での肝動脈優位性(A-P shuntを含む)などが考えられる(2-4)。自験例では全例で門脈グラフトなしで吻合可能であった。このように低圧の正常肝の移植による減圧で、血行郭清を付加せずとも十分な求肝性血流が確保しうると考えられた。

しかし、術後に門脈血流が途絶・逆流した自験2例より考えると、本邦で広く施行されている部分肝移植では移植肝(血管床)が相対的に小さく、急性拒絶などによる抵抗増加で容易に門脈血行動態の異常をきたしうると考えられた。部分肝移植と急性拒絶の頻度との関係は controversial で今後の検討が望まれる(5-8)。

肝移植後の門脈血行動態については、肝硬変症例の hyperdynamic state (高門脈流速) は全肝移植と同様に術後3ヶ月程まで持続し、術後グラフト肝再生と相関を認めることが明らかとなった。部分肝移植後の肝再生とこのような portal kinetics との

関連は十分には検討されておらず、興味ある結果であると考えられた。劇症肝炎群での肝再生はドナーとほぼ同様な経過で、また門脈血流変動もドナー同様軽微であったことより、normokinetic state では部分肝グラフト再生は正常肝切後と同様であることが明らかとなった。

文 献

- 1) Eguchi S, Okudaira S, Azuma T, et al. Changes in liver regenerative factors in a case of living-related liver transplantation. Clin Transplant 1999;13:536-44.
- 2) Piscaglia F, Zironi G, Gaiani S, et al. Systemic and splanchnic hemodynamic changes after liver transplantation for cirrhosis: A long-term prospective study. Hepatology 1999; 30: 8-64.
- 3) Huang TL, Cheng YF, Chen TYC, et al. Portal hemodynamics in living-related liver transplantation: quantitative measurement by doppler ultrasound. Transplant Proc 1998; 30: 3186-7.
- 4) Bolognesi M, Sacerdoti D, Bombonato G, et al. Changes in portal flow after liver transplantation; effect on hepatic arterial resistance indices and role of spleen size. Hepatology 2001; 35: 601-8.
- 5) Kiuchi T, Kasahara M, Uryuhara K, et al: Impact of graft-size mismatching on graft prognosis in liver transplantation from living donors. Transplantation 1999; 67: 321-327.
- 6) Shiraishi M, Csete ME, Yasunaga C, et al. Regeneration-induced accelerated rejection in reduced-size liver grafts. Transplantation 1994; 57: 336-340.
- 7) Astarcioglu I, Cursio R, Reynes M, Gugenheim J. Increased risk of antibody-mediated rejection of reduced-size liver allografts. J Surg Res 1999; 87: 258-62.

8) Omura T, Nakagawa T, Randall HB, Lin Z, Huey M, Ascher NL, Emond JC. Increased im-

mune responses to regenerating partial liver grafts in the rat. *J Surg Res* 1997; 70: 34-40.