

厚生労働省難治性疾患

門脈血行異常症調査研究班  
平成十五年年度研究報告書

平成 16 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。マイクロアレイなどの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のである。

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。

本年度は橋爪班としての活動が2年目になるが、各班員とも分子生物学的手法を駆使した基礎的研究から臨床研究まで幅広い内容を発表して頂いた。基礎的分野では、プロテインチップを利用したIPH病因の解析、IPHにおける肝内小型胆管消失の病理学的検討がなされた。また、IPHにて発現低下しているHO-1が肝組織のリモデリングに与える影響を、transcriptome analysesによる遺伝子発現変化から解析した。さらにBCSに関連している可能性があるFVR2haplotypeにおけるFVの凝固抑制機能のメカニズムも解析された。一方、臨床分野ではIPHの病期分類が臨床的に造影CTの画像診断で判定可能であるかの検討、長期経過からみたIPHにおける門脈血栓の検討、肝細胞癌を合併したBCSの検討、BCSに対するPTA、生体肝移植の検討など、門脈血行異常症に対する診断や治療に関する検討が多々行われた。今後、当研究班で作成された新基準「門脈血行異常症の診断と治療（2001年）」の妥当性の検討も必要になってくると思われる。

全国患者登録及び検体保存センターは今年7年目を迎えるが、IPH 98例、EHO 50例、BCS 39例の計187例の登録と検体の保存を完了した。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るようになった。そのため、全国患者からの症例登録が以前に比べ厳しい状況である。しかし、さらなる研究の進展と治療

への貢献のため、この検体保存センターの継続発展は今後も必要である。

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16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「難治性疾患」  
門脈血行異常症 平成15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

IPH および PBC 特異的タンパク質の解析

大阪市立大学大学院医学研究科核医学 塩 見 進 …… 5

Heme oxygenase-1誘導がマクロファージ機能に及ぼす影響と

その肝臓微小循環機能修飾効果の網羅的解析

慶應義塾大学医学部医化学教室 末 松 誠 …… 9

FV R2 haplotype およびプロテインC欠乏症に関する研究

国立名古屋病院 齋 藤 英 彦 …… 12

B. 病 理

Budd-Chiari 症候群に合併した肝細胞癌症例の検討

久留米大学病理学教室 鹿 毛 政 義 …… 14

特発性門脈圧亢進症およびその類縁疾患剖検例の全国調査

— 胆管病変を中心に —

金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学 中 沼 安 二 …… 18

IPH の病期分類 — 画像による推定と臨床応用の試み —

金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学 中 沼 安 二 …… 22

C. 病 態

門脈圧亢進症性胃症の創傷治癒障害におけるPTEN 発現異常と治療への応用

九州大学大学院災害・救急医学 橋 爪 誠 …… 27

ラット門脈圧亢進症胃粘膜におけるEndothelin receptor の発現と局在について

大分大学第一外科 北 野 正 剛 …… 30

早期肝硬変における門脈—大循環シャントのFischer 比に及ぼす影響

大阪市立大学大学院核医学 塩 見 進 …… 33

Budd-Chiari 症候群に対する生体肝移植後の血行動態

長崎大学大学院移植・消化器外科 兼 松 隆 之 …… 38

特発性門脈圧亢進症における門脈血栓の検討—長期経過との関連について

千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学 松 谷 正 一 …… 42

食道静脈瘤に対し遠位脾腎静脈シャント術後20年を 経過した特発性門脈圧亢進症の一例	九州大学大学院災害救急医学	橋 爪 誠	46
D. 全国調査・疫学			
全国検体保存センター登録の特発性門脈圧亢進症症例の臨床疫学像	大阪市立大学大学院公衆衛生学	廣 田 良 夫	49
全国検体保存センターの現況	九州中央病院	杉 町 圭 蔵	52
E. 臨 床			
門脈血行異常症に対する内視鏡的治療の成績について	大分大学第一外科	北 野 正 剛	54
当科における最近5年間の Hassab 手術症例の検討	順天堂大学肝胆膵外科	川 崎 誠 治	57
Budd-Chiari 症候群に対する IVR 治療の経験 — PTA 後の長期経過 —	北海道大学大学院医学研究科腫瘍外科	加 藤 紘 之	60
Ⅲ その他			
平成15年度門脈血行異常症班会議総会プログラム			65
平成15年度門脈血行異常症調査研究班名簿			68

# 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システムを用いて、IPH に特異的に発現するタンパク質の解析を行った。プロテインチップシステムを用いることにより、7770Da と 9290Da のタンパクが IPH 患者に特異的に発現していることが判明した。Tag Ident による検察の結果、7770Da と 9290Da のタンパクはそれぞれケモカインである CXCL4、CXCL7 とほぼ等しい分子量を有していた。ケモカインは白血球に対する遊走性をもつ低分子タンパク質で、アレルギーや自己免疫疾患などの炎症、免疫反応のみならず、免疫システムの構築、造血、ウイルス感染、成人病など多彩な整理、病理現象に関与している。今回同定された CXCL4、CXCL7 はいずれも CXC ファミ

リーであるが、両者は血小板から産生されることより、IPH の病態から考えてもその関連性が疑われた。

末松らは Kupffer cell においては CO を生成する heme oxygenase (HO) の誘導型アイソザイムである HO-1 が恒常的に発現し、IPH では発現低下、肝硬変では発現増加が起きることをヒト生検標本で証明した。そして、HO-1 の発現変動が肝臓組織のリモデリングに及ぼす影響を詳細に調べるために、HO-1 高発現ヒト単球細胞株 U937 細胞を用いて、transcriptome analyses により downstream で変動する遺伝子の解析を行った。HO-1 酵素活性依存性変化は CD11a、IL-8、MCP-1 の発現低下として mRNA、Protein level で証明できた。また一方、elastase は酵素活性非依存性に変化している可能性が示唆された。さらに、肝臓微小循環機能解析として、分離還流肝臓の微小循環系を倒立型レーザー共焦点顕微鏡で観察した。肝臓を 8hr cold storage-reperfusion などの侵襲を加えると蛍光消失速度は著明に遅延した。この遅延は genetic に mrp2 を欠損しているラットで著明であったが、Kupffer cell を deplete できる薬剤で処理した場合、あるいは Kupffer cell が存在しても thromboxane synthase inhibitor を処理した肝臓ではこの post-cold ischemic injury が著明に抑制された。Kupffer cell が thromboxane の resource として mrp2 の分泌機能を規定している可能性が示唆された。

齋藤らは、FV R2 haplotype における FV の凝固抑制機能のメカニズム、我が国における FV R2 haplotype の頻度を検索した。日本人 44 人より提供されたゲノム DNA 88 alleles において、9 alleles が FV R2 haplotype であった。また、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リコンビナント FV 分子では APCcofactor 活性は4つの各変異単独では何の影響も見られなかったが、M385T+D2194G または H1299R+M1736V が同時に存在すると有意な低下を示した。

#### 【病 理】

鹿毛らは、肝炎ウイルスの関与がない肝細胞癌を合併した BCS について検討した。肝炎ウイルスマーカー陰性の肝細胞癌を合併した BCS の4症例では、発癌までの病期期間は約10~40年と長く、非癌部では1例がうっ血性肝硬変、ほかはうっ血性肝線維症を呈していた。そのうち、1例の線維化は軽度であった。慢性肝うっ血は単独で肝細胞癌のリスクファクターになりうる可能性が示された。また、肝細胞癌は必ずしも肝硬変を基盤とせず、軽いうっ血性肝線維症の状態からも発生することが明らかとなった。中沼らは、IPH でみられる肝内小型胆管消失像について、Peribiliary Vascular Plexus(PVP)の異常との関連性を検討した。肝内胆管は、肝動脈枝からの分枝であると呼ばれる血管網により栄養されているが、IPH 症例には門脈血流異常があるため胆管消失に関係している可能性がある。著明な胆管消失像をみた IPH 剖検肝3例において、小型門脈域の PVP 数計測を行った。胆管消失像が著明な症例においては、ほかの症例よりも PVP 数が減少している傾向があった。

また、IPH の病期分類が臨床的に造影 CT にて判定可能であるかどうか検討した。肝被膜下の萎縮が画像で判断されれば本分類が臨床的に応用可能である。下大静脈から P5/8分岐点までの距離を、下大静脈から肝表までの距離で除したものを peripheral atrophy index(%)とし、“肝末梢域の萎縮”の指標として検討した。peripheral atrophy index が55%以上であれば、放射線科専門医の判断と72.7%で一致した。造影 CT にて臨床的に IPH の病期分類を行い、high risk 群を選定し得る可能性が示唆された。

#### 【病 態】

橋爪らは、ラット門脈圧亢進症胃粘膜(PHG)の創傷治癒障害における PTEN の発現異常およびその治療応用の可能性について検討した。PHG 胃粘膜創傷治癒遅延は PTEN の活性上昇による Akt 活性の低下が関与している可能性が示唆された。PHG 胃粘膜は TNF- $\alpha$  蛋白発現が持続的に上昇しており、エタノール投与によりさらに発現が上昇する。これがその下流にあたる PTEN 活性上昇を引き起こしている可能性が考えられた。TNF- $\alpha$  中和抗体投与で、ラット PHG 胃粘膜の PTEN 活性、Akt 活性が改善し、エタノール障害後の胃粘膜障害面積および胃粘膜上皮再生率が改善された。TNF- $\alpha$  中和抗体投与は、今後 PHG 胃粘膜に対するあらたな治療応用の可能性が示唆された。

北野らは、ラット門脈圧亢進症胃粘膜における胃粘膜の ET receptor 発現およびその局在について検討した。免疫組織学的染色により ETAR および ETBR の発現の局在を検討したところ、ETAR は PHT 胃粘膜の表層から深層の毛細血管内皮および胃粘膜上皮に発現がみられ、粘膜下の血管内皮・血管平滑筋、さらに固有筋層にも発現がみられた。ETBR は粘膜深層の毛細血管内皮および粘膜下の血管内皮・血管平滑筋に発現を認め、粘膜表層での発現はわずかしら認められなかった。このことは ET の作用として粘膜表層では ETAR を介する血管収縮を、また、粘膜深層から粘膜下では ETBR を介して nitric oxide の血管拡張を促進していると考えられ、PHT 胃粘膜の血管形態の変化に ET が関与していることを示唆した。

塩見らは、ChildA の早期肝硬変における Fischer 比と門脈大循環シャントとの関連性に関し径直腸門脈シンチグラフィーを用いて解析した。アミノ酸代謝異常の指標として Fischer 比に変わって、BCAA/Tyrosine 比(BTR)を用いた。BTR は、有効肝血流の指標である ICGR-15値と最も良く相関し、ついで門脈-大循環短絡を表すと考えられる SI と強く相関を示した。AAA の上昇に関して、早期肝硬変であっても SI を表す門脈-大循環シャントが一定の関与があることを示した。



兼松らは、生体肝移植を受けた Budd-Chiari 症候群症例について血行動態を検討した。まず肝静脈の流出障害により短肝静脈系からのドレナージが発達し、それに伴い尾状葉が肥大したものと考えられた。その後、血栓の進展によって下大静脈自体の閉塞が生じ、主肝葉はうっ血性に萎縮をきたし門脈血流は遠肝性を呈するに至ったものと推定された。この時点では、機能体である肝臓は肝内血行路が不可逆的に再構築され肝不全状態となり、原因である流出路の治療だけでは改善しない状態に陥っている。流出路の形成と肝置換を行う肝移植は根治的で血行動態・肝機能ともに正常の構築を取り戻すことが可能であった。

松谷らは、長期経過からみた IPH における血栓の発生と、その臨床病態につき検討を行った。対象 23 例中 11 例 (47.8%) と高率に門脈血栓を認め、血栓の診断時期は初診後  $8.9 \pm 5.1$  年であった。血栓と内視鏡的硬化療法との関連性は認められなかった。また、観察最終時期における検討では血栓合併例では非合併例に比べ、アルブミン値、血小板数の低下、脾腫、腹水の合併が、高度であった。門脈血栓の経過は持続例が高率であった。

橋爪らは、食道静脈瘤に対し遠位脾腎静脈シャント術後 20 年を経過した特発性門脈圧亢進症の一例の検討から、DSRS with splenopancreatic disconnection の治療効果を再検討した。当科における DSRS with SPD の治療成績を検討したところ、術後累積生存率は 10 年で 49%、20 年で 24% であり、術後累積選択性喪失率は 10 年で 40%、20 年で 69% と、非常に高率に選択性が喪失された。今回の DSRS 後 20 年を経過した症例においても、シャント選択性は喪失していた。しかし食道静脈瘤の再発もなく、20 年前と比較して肝機能も保たれていた。また、肝性脳症の発達も認めなかった。当科での治療成績においても、確かに術後累積選択性喪失率は高率であるが、術後累積生存率は 10 年で 49% と非常に良好な成績をおさめている。IPH などの肝機能良好例においては、多少の選択性喪失があろうと、一度の治療で長期にわたり食道静脈瘤の消滅が得られる可能性があり、DSRS with SPD は非常に QOL の

高い手術であると考えられた。

#### 【全国調査・疫学】

廣田らは、全国検体保存センターに登録されている IPH95 例に対して、患者基本情報を収集し、1999 年に実施した全国疫学調査と比較するとともに、生体試料からの情報との関連を検討した。解析時における回収率は 58% (55/95) であった。登録時年齢は  $57 \pm 17$  歳と 1999 年調査時より平均 1~2 歳上昇していた。確定診断時年齢は前回調査時と差がなかった。診断時合併症では食道静脈瘤が 35 例 (69%) と一番多く、膠原病 8 例 (16%) と続いた。1999 年時より膠原病合併の割合が高かった。診断時血液検査は前回調査時と差がみられなかった。診断時の画像所見では血管造影のしだれ柳状所見、肝静脈相互間吻合が 1999 年調査時より 2 倍以上高かった。肝組織所見では、門脈枝の潰れ、肝線維化が前回より高頻度であった。また、血清 CTGF 値との関連が有意な差を示すものは、喫煙習慣と肝性脳症の 2 変数であった。CTGF 低値群では全例が非喫煙者で、肝性脳症の合併もなかった。

#### 【全国検体保存センターの現状】

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)、パ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、協力していただける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、症例登録数に比べ、消費等による検体自体不足が目立ってきている。そのためには、協力施設との連携が必要不可欠である。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16年3月31日現在、IPH 98例、EHO 50例、バッドキアリ症候群 39例の計187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。そして、本年度も新たに協力を各施設に依頼した。依頼した施設は651施設、研究協力に同意した施設は160施設であり、同意を得られない施設は101施設であった。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」によると、協力施設で症例が発生した場合、各協力施設で倫理審査委員会にあたる委員会で承認を得て、各協力施設で患者の匿名化の対策をたてた上で、同意書を取得しないとイケない。研究協力施設の負担の増加が、協力施設の減少、登録症例の減少につながっている可能性が考えられる。

## 【臨床】

北野らは、門脈血行異常症の食道静脈瘤に対する内視鏡的治療の成績を検討した。対象はIPH 11例、EHO 1例、BCS 1例であった。13例中10例は、以前に手術を施行した静脈瘤再発症例であった。内視鏡的治療はfree-handによる内視鏡的硬化療法(EIS)で、治療目標を静脈瘤完全消失とした。食道静脈瘤の非再発率は5年41%、10年27%であった。また、非出血率はそれぞれ100%と良好であった。門脈血行異常症の食道静脈瘤に対する内視鏡的治療は有効であり、特に、手術後の再発症例に有用であると思われた。

川崎らは、最近5年間に施行したHassab手術において、経内視鏡的マイクロバスキュラードップラー静脈瘤血流速度計(EMDS)を用いての静脈瘤血流速度変化を測定した。EMDSにより測定した食道静脈瘤の平均血流速度はHassab手術単独症例では術前 $10.5 \pm 1.5$ cm/sから術後 $1.9 \pm 0.3$ cm/sに減弱した。Combined Therapyを施行した症例では術前 $15.2 \pm 1.7$ cm/sからHassab手術後 $4.2$ cm/sに減弱し、その後EISによる追加治療を行い、 $0.7 \pm 0.5$ cm/sに減弱した。また、胃静脈瘤では術前 $13.3 \pm 1.6$ cm/sからHassab手術後 $0.8 \pm 0.6$ cm/sに減弱した。よって、Hassab手術は静脈瘤血流速度の速い高度食道静脈瘤では遺残、再発する可能性があるが追加治療は容易で、胃静脈瘤に対しては非常に有効であると考えられた。

加藤らは、肝静脈主幹の狭窄によるバッドキアリ症候群に対し計3回のPTAを施行し、その長期経過が観察可能であった症例を報告した。経皮的血管形成術(PTA)の有用性が報告されているが、長期的効果に関しての報告は少ない。当症例においては、初回PTAから約5年の間に計3回のPTAを行うことで、その後の約6年間は特に処置を要さずに経過しており、合併症も認めなかった。IVC病変を伴わないBCSに対するPTAバルーン拡張は、複数回の施行が必要となる可能性が高いが、安全かつ有効性も高いと考えられた。

## II 分担研究報告

# IPH および PBC 特異的タンパク質の解析

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

田守昭博、羽生大記、武田 正、西口修平

## はじめに

我々は Altas cDNA micro array 法により IPH 患者の肝臓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<sup>1)</sup>。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 IPH の病態と関連している可能性があることを報告してきた<sup>2)</sup>。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。今回、我々はプロテインチップシステムを用い、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

タンパク質の解析はプロテインチップシステム (サイファージェン・バイオシステムズ社製) を用い行った。方法は患者血清を直径 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。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。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使用した。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変性条件以外に urea buffer で希釈し、変性条件でも行った。対照として PBC 患者の血清を用い IPH 患者の血清について本法を用い検討を行った。さらに、得られたデータを元に TagIdent のデータベースを用いて検索し、それに相当するタンパク質を検索した。

## 結 果

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 および 9290Da のタンパク質であった (図 1)。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 9193Da のタンパク質であった (図 2)。

それぞれに相当するタンパク質を同定するため、TagIdent による検索を行った。7770Da に相当するタンパクとして CXCL4 がほぼ等しい分子量を持っていることが判明した。9290Da に関しては Down syndrome criteria protein 10 および CXCL7 がほぼ等しい分子量を持っていることが判明したが、IPH の病態から考察して CXCL7 が最も疑われた

(図3)。また、9193Da に関しては haptoglobin 1 がほぼ同じ分子量を有していた。

## 考 察

プロテインチップシステムを用いることにより、7770Da と9290Da のタンパクが IPH 患者に特異的に発現していることが判明した。さらに、TagIdent による検索の結果、7770Da と9290Da のタンパクはそれぞれケモカインである CXCL4、CXCL7 とほぼ等しい分子量を有していた。ケモカインは白血球に対する遊走性をもつ低分子タンパク質で、アレルギーや自己免疫疾患などの炎症、免疫反応のみならず、免疫システムの構築、造血、ウイルス感染、成人病など多彩な生理、病理現象に関与している。これまでに40種類以上同定されているケモカインは構造的にも類似し、4つのシステインが保存されている。これらシステインのうち N 末端側の2残基の位置関係により、CC ケモカイン、CXC ケモカイン、CX3C ケモカイン、C ケモカインの4つのサブファミリーに分類される。メインのサブファミリーは CC および CXC で、CC は主に単球やリンパ球に対して遊走活性を有し、CXC は主に好中球やリンパ球に対して遊走能をもつ<sup>3)</sup>。今回同定された CXCL4 および CXCL7 はいずれも CXC ファミリーである。両者は血小板から産生されることより、IPH の病態から考えてもその関連性が疑われた。CXCL4 (platelet factor 4 precursor) はオンコスタチン A であり、胎生期の肝分化因子であるオンコスタチン M と類似の構造を示す。また、CXCL7 (connective tissue-activating peptide III) は typeIV コラーゲンをプロテアーゼの攻撃から守るヘパラン硫酸を分解するグルコサミニダーゼ活性を有しており、IPH における線維化との関連性が示唆される。さらに、これらのケモカインは互いに制御し合っており、両者は密接に関連しあっているとの報告がある<sup>4)</sup>。また、我々が以前より IPH との関連性を報告している CTGF と CXCL7 (CTAP III) は共に結合組織に対し類似の働きをすることが考えられる。

プロテインチップを用いた測定は少ないサンプル量でも測定可能であり、他の方法に比べスループットが高いことや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、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ことや発現解析のためのデータの蓄積が少ないなどの難点もある<sup>5)</sup>。今回、対照として感染性の検体を用いることができないため PBC 症例を用いたが、その結果、PBC に特異的に高発現するタンパクとして haptoglobin1 が、IPH に特異的に発現するタンパクとして CXCL4 および CXCL7 のサイトカインが疑われた。これらタンパクが PBC や IPH に特異的に発現しているかは最終的には抗体を用いた確認やカラムや電気泳動を用いた精製を行なう必要がある。今後これらの検討を行い、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。

## 文 献

- 1) 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.
- 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.
- 3) 野見山尚之：ケモカインスーパーファミリーの構造と機能。臨床免疫 2002; 38: 121-128.
- 4) Schenk BI, Peterson F, Flad HD, Brandt E. Platelet derived chemokines CXC chemokine ligand (CXCL)7, connective tissue activating peptide III, AND CXCL4 differentially affect and cross regulate neutrophil adhesion and transendothelial mitogen. J Immunol 2002; 169: 2602-2610.
- 5) 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.

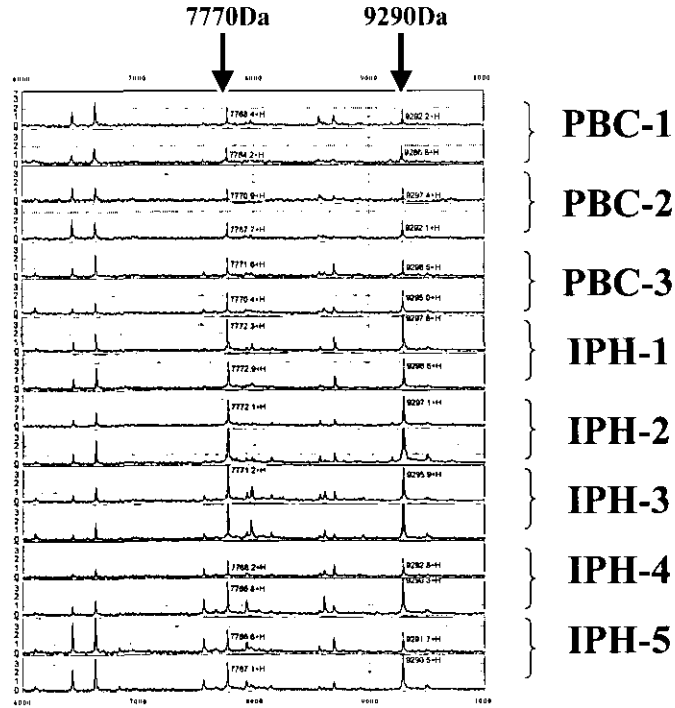


図1 IPHにて発現を認めたタンパク質

陽イオン交換、pH6.0、変性条件において7770Da および9290Da のタンパク質の発現を認めた。

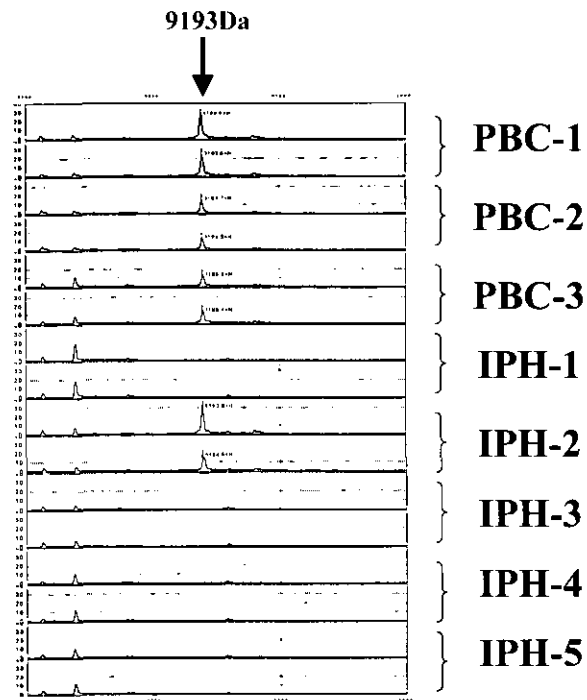


図2 PBCにて発現を認めたタンパク質

陽イオン交換、pH6.0、非変性条件において9193Da のタンパク質の発現を認めた。

The search in Swiss-Prot has been launched with the following values:

pI = 7  
Mw = 7770  
delta-pI = 10.00  
delta-Mw = 7  
OS or OC = HUMAN  
KW keyword = ALL

Scan done on 07-Oct-2003.  
Swiss-Prot Release 41.26 of 04-Oct-2003: 135090 entries

	Swiss-Prot
Number of proteins found in the specified pI/Mw ranges	1

Scan in Swiss-Prot database (135090 entries)

1 proteins found in the specified pI/Mw ranges

PLF4 HUMAN (P02776)

Platelet factor 4 precursor (PF-4) (CXCL4) (Oncostatin A) (Troplact).  
pI: 8.80, MW: 7769.18 PLATELET FACTOR 4.

The search in SWISS-PROT has been launched with the following values:

pI = 7  
Mw = 9290  
delta-pI = 10.00  
delta-Mw = 9  
OS or OC = HOMO SAPIENS  
KW keyword = ALL

Scan done on 26-Sep-2002.  
SWISS-PROT Release 40.28 of 19-Sep-2002: 114033 entries

	SWISS-PROT
Number of proteins found in the specified pI/Mw ranges	2

Scan in SWISS-PROT database (114033 entries)

2 proteins found in the specified pI/Mw ranges

DS10 HUMAN (P59022)

Down syndrome critical region protein 10.  
pI: 5.35, MW: 9285.92

SZ07 HUMAN (P02775)

Platelet basic protein precursor (PBP) (Small inducible cytokine B7) (CXCL7) [Contains: Connective-tissue activating peptide III (CTAP-III); Low-affinity platelet factor IV (LA-PF4); Beta-thromboglobulin (Beta-TG); Neutrophil-activating peptide 2 (NAP-2)]  
pI: 7.84, MW: 9291.74 LA-PF4 / CTAP-III.

図3 TagIdentによる検索結果

7770Daに相当するタンパクとしてCXCL4がほぼ等しい分子量を持っていることが判明した。9290Daに関してはDown syndrome criteria protein 10およびCXCL7がほぼ等しい分子量を持っていることが判明した。

# Heme oxygenase-1誘導がマクロファージ機能に及ぼす影響と その肝臓微小循環機能修飾効果の網羅的解析

慶應義塾大学医学部医化学教室  
末松 誠

## 研究要旨

Kupffer cell は類洞内に常在するマクロファージであり、多彩なメディエータを分泌して類洞血流の調節を行うことが知られている。我々は赤血球の turnover の結果生じる遊離ヘムを分解して biliverdin と CO を生成する heme oxygenase (HO) の誘導型アイソザイムである HO-1がこの細胞に恒常的に発現し、IPH では発現低下、肝硬変では発現増加が起こることをヒト生検標本で証明したが、HO-1の発現変動が肝臓組織のリモデリングに及ぼす影響を詳細に調べるために HO-1高発現ヒト単球細胞株を U937細胞を用いて樹立し、transcriptome analyses により解析することにより、downstream で変動する遺伝子の解析を行った。また HO-1遺伝子に site-directed mutagenesis により酵素活性を欠失させた mutant transfectant も作成し、両者の transcriptome を比較することにより、酵素活性依存性に変動する遺伝子のスクリーニングをあわせ行った。解析の結果、HO-1の誘導による細胞機能修飾効果には酵素活性依存性機構のほか非依存性機構が存在することが明らかになった。また Kupffer cell を介した類洞微小循環の調節機構として、thromboxane 合成系の関与を明らかにしたので併せて報告する。

## はじめに

赤血球の turnover の結果生じる遊離ヘムは heme oxygenase (HO) による酸素添加反応により分解して biliverdin と CO を生成する。我々は

1994年に肝臓で大量に CO が生成され、伊東細胞に発現する soluble guanylate cyclase を活性化することにより、類洞血管が恒常的に拡張し、低い血管抵抗を維持することが、静脈灌流系であるこの臓器の血流を維持するために必要であることを示した。HO は肝細胞では構成型である HO-2, Kupffer cell では誘導型の HO-1が発現し、各種の stressor への暴露により HO-1は肝細胞、類洞壁細胞などにさらに誘導される。

ヒト門脈血行異常症では HO-1発現に著明な変化が起こることは、我々の本研究班での研究により初めて明らかにされた。すなわち IPH では発現低下、肝硬変では発現増加が起こることをヒト生検標本で証明した。

今年度の研究では HO-1の発現変動が肝臓組織のリモデリングに及ぼす影響を詳細に調べるために HO-1高発現ヒト単球細胞株を U937細胞を用いて樹立し、transcriptome analyses により解析することにより、downstream で変動する遺伝子の解析を行った。また HO-1遺伝子に site-directed mutagenesis により酵素活性を欠失させた mutant transfectant も作成し、両者の transcriptome を比較することにより、酵素活性依存性に変動する遺伝子のスクリーニングをあわせ行った。また Kupffer cell を介した類洞血流・肝臓実質機能調節機構を in vivo, in vitro で解析を進め、この細胞における thromboxane synthesis が肝細胞の organic anion transporter でありグルタチオン、ビリルビン代謝に重要な ABC transporter である mrp2の機能の modulator であることを明らかにした。これらの成績は門脈血行異常症における類洞壁細胞の機能修飾が肝臓実質組織の機能的、形態的リ



モデリングにおいて重要な役割を果たしていることを示唆する知見として重要であると考えられる。

### 対象と方法

B-1. Human monoblastic leukemia cell line U937による HO-1 高発現細胞株の樹立と transcriptome analyses.

研究者らが2002年に報告した方法に従い (Hori, et al. JBC 2002)、ヒト由来単球由来細胞株 U937 細胞を用いて、恒常的に rat HO-1cDNA を発現する細胞株を樹立した。また N 末端から25番目の histidine を alanine に置換できるコンストラクトを発現させた細胞株も樹立した。各細胞株 (mock transfectant, HO-1, H25A mutant HO-1高発現細胞株) の mRNA を分離し、Affimetrix 社の gene chip により human 11K transcriptome を解析した。

### B-2. 肝臓微小循環機能解析法の確立

ラット肝臓辺縁を麻酔下に腹腔外に展開し、分離灌流肝臓の微小循環系を倒立型レーザー共焦点顕微鏡で観察した。肝臓にはあらかじめ10micro M carboxyfluorescein (CF) diacetate を10分間負荷し、肝細胞実質に蛍光を loading した。顕微鏡光路には CF 蛍光を画像化する488nm のアルゴンレーザーの緑色蛍光を撮像するフィルターを実装した。フィルターなしの状態でも透過光線像の取得も可能とした。顕微鏡光路に高感度 CCD カメラ (C5810 浜松ホトニクス製) を装着し、画像はすべて DV 画像として8-bit のカラーデジタル保存を行った。

記録した蛍光画像をもとにけっかん肝細胞から毛細胆管へ分泌された蛍光の分布と量の半定量的解析を行った。蛍光の強度は8-bit gray level (0-255) で測定した。

### 結果及び考察

C-1. Human U937 cell における HO-1発現効果の網羅的解析

HO-1の高発現により、接着分子である CD11a 発現の著明な低下が起これ、これは蛋白レベルでも立証された。また U937が CD11a/CD18を用いて PMA 刺激により惹起される細胞凝集反応も HO-1 の発現株では著明に抑制された。このような変化は H25A mutant HO-1発現株では認められなかった。すなわち CD11a の発現低下は HO の酵素活性依存性に起こる事象と考えられた。このような酵素活性依存性の変化は IL-8の発現低下、MCP-1の発現低下などでも mRNA, Protein level で証明できた。

一方、興味深いことに wild-type でも mutant でも同様に mRNA の発現が変化するものとして elastase, proteinase-3が挙げられた。Elastase については細胞内の蛋白貯蔵量を酵素活性として測定できるためこれを試行したところ、HO-1, mHO-1 発現群で同様に増加が認められた。このことは HO-1誘導に伴う細胞機能制御機構に酵素活性非依存性機構が存在することを示唆した。

### C-2. 肝臓微小循環機能解析法による Kupffer cell を介した肝臓実質細胞機能制御の解明

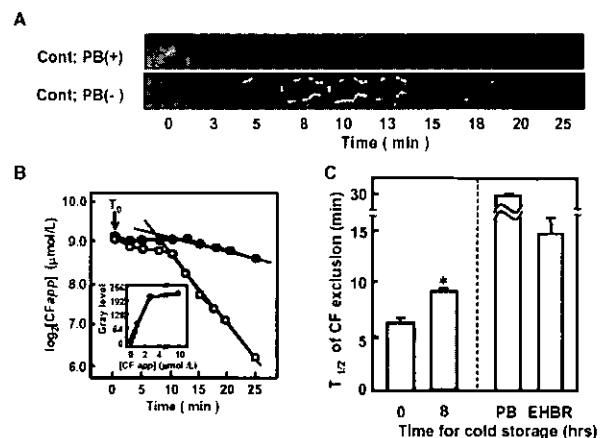


図 肝臓における carboxyfluorescence の分泌動態解析法の確立 (文献1より引用)。

A : 高倍率で画像化した単一肝細胞から毛細胆管への CF 分泌動態。 B : 蛍光消失の時間変化と cold ischemia-reperfusion による色素消失の遅延。 C : 蛍光消失半減期の比較 (コントロール、8 時間 cold ischemia, probenecid による mrp2 阻害実験、Eisai hyperbilirubinemia rat: EHBR)

本実験手法により、上図に示すように肝細胞から CF が時間とともに毛細胆管に分泌される様子が画

像化された。ここでは perfusate に 1.5 mM の probenecid を添加し、mrp2の機能を阻害した状態で蛍光強度の baseline を測定し、probenecid を wash out することにより CF の分泌をスタートさせている (図 B : 10 min)。肝細胞における蛍光強度を gray level で測定し、濃度既知の CF 溶液による蛍光強度で calibration を行い見かけ上の CF 濃度 (CFapp) をプロットした。肝臓を 8-hr cold storage-reperfusion などの侵襲を加えると蛍光消失速度は著明に遅延した。この遅延は genetic に mrp2 を欠損しているラット (Eisai Hyperbiliruminemic Rat : EHBR) で著明であった。ラットを Kupffer cell を deplete できる薬剤 (liposome chrodrone) で処理した場合、あるいは Kupffer cell が存在しても thromboxane synthase inhibitor (OKY-046) を処理した肝臓ではこの post-cold ischemic injury が著明に抑制された。OKY-046 は正常肝臓における CF 分泌になんら影響を与えなかった。以上のことから Kupffer cell が thromboxane の resource として mrp2 の分泌機能を規定している可能性が示唆された。

今後この系を用いて門脈血行異常モデルにおける実質細胞機能のリモデリングとその組織再構築における役割をさらに検討する予定である。

#### 研究発表

1. Kudo A, Kashiwagi S, Kajimura M, Yoshimura Y, Uchida K, Arii S, and Suematsu M. Kupffer cells alter organic anion transport through multidrug resistance protein 2 in the post-cold ischemic rat liver *Hepatology*. In press, 2004.
2. Katagiri H, Ito Y, Ishii K, Hayashi I, Suematsu M, Yamashina S, Murata T, Narumiya S, Kakita A, and Majima M. Role of thromboxane derived from COX-1 and -2 in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia in mice. *Hepatology*. 39: 139-150, 2004.
3. Suematsu M, Suganuma K, Kashiwagi S. Mechanistic probing of gaseous signal transduction in microcirculation. *Antioxid Redox Signal*. 5: 485-492, 2003.
4. Norimizu S, Kudo A, Kajimura M, Ishikawa K, Taniai H, Yamaguchi T, Fujii K, Arii S, Nimura Y, and Suematsu M. Carbon monoxide stimulates mrp2-dependent excretion of bilirubin-IXalpha into bile in the perfused rat liver. *Antioxid Redox Signal*. 5:449-456, 2003.
5. Suematsu M. Quartet signal transducers in gas biology. *Antioxid Redox Signal*. 5: 435-437, 2003.

# FV R2 haplotype およびプロテインC欠乏症に関する研究

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

門脈血行異常症の病因天性血栓傾向（凝固亢進状態）が考えられている。欧米では Factor V Leiden、プロトロンビン多型 (G20210A)、プロテインC欠乏症、プロテインS欠乏症などと門脈血行異常症との関連が報告されているが、我が国に於いてはこの分野の研究はあまり進んでいない。我々は血液凝固第V因子と抗凝固因子であるプロテインCに注目して研究をしている。

血液凝固第V因子（FV）は凝固促進反応と凝固抑制反応の両方において重要な役割を果たしており、その異常は出血傾向だけでなく血栓傾向の原因となることが知られるようになった。そのきっかけとなったのは異常FV (FV Leiden) による血栓傾向 (APC resistance) の発見であり、異常FVによる血栓症は世界中の研究者から注目されるようになった。ところが、FV Leidenは西洋人のみに存在し、我々日本人を含む東洋人には存在しないことが明らかになると、我が国におけるFVに対する興味は急速に失われてしまい、FVに関する研究報告は皆無となってしまった。

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、弱い血栓傾向のリスクファクターであるとされている。FV R2 haplotype は FV Leiden とは異なり、世界中のほぼすべての人種に存在すると予想されており、我が国においても血栓症の発症に何らかの関連を持っている可能性が

ある。FV R2 haplotype の保因者において軽度のFV欠乏症、およびFVの凝固抑制機能の低下が認められているが、その詳細な分子生物学的メカニズムは明らかではなかった。我々はFV R2 haplotype が軽度のFV欠乏症をきたすメカニズムを解析し、昨年度の本班会議において報告した。本年度は、FVの凝固抑制機能が低下するメカニズム、および我が国におけるFV R2 haplotype の頻度を検索した。

## 対象と方法

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 (M385T, H1299R, M1736V, D2194G およびこれらの組み合わせ) を導入したリコンビナントFV分子を *in vitro* の発現系で発現させた。個々の変異がFVの凝固促進機能、および凝固抑制機能に及ぼす影響を解析するため、トロンビンによる活性化効率、活性化後の安定性、活性化プロテインCによる不活性化効率、活性化プロテインCが活性化第VIII因子を不活性化する際の補酵素活性 (APC cofactor 活性) について、精製蛋白を用いた測定系において野生型FVと詳細に比較検討した。

インフォームドコンセントを得た後、健常人ボランティアよりゲノムDNAの提供を受け、FV遺伝子の exon 13 領域をPCRにて増幅した。得られたPCR産物を制限酵素 RsaI で処理し (PCR-RFLP法)、H1299R変異の有無を検討することによって、本邦におけるFV R2 haplotype の遺伝子頻度を解析した。

1) 日本人に於ける FV R2 haplotype の頻度

日本人44人より提供されたゲノム DNA 88 alleles において、H1299R 変異をマーカーにて FV R2 haplotype の頻度を検索したところ、9 alleles の FV R2 haplotype であった。

2) FV R2 haplotype の凝固機能抑制能

すべてのリコンビナント FV 分子において、トロンビンによる活性化効率、活性化後の安定性、活性化プロテインCによる不活性化効率は野生型 FV と同等の値を示した。APC cofactor 活性は4つの各変異単独では何の影響も見られなかったが、M385T+D2194G または H1299R+M1736V が同時に存在すると有意にな低下を示した (図1)。

考 察

日本人では FV R2 haplotype の遺伝子頻度はおよそ10%前後であり、理論的には日本人の100人にひとりが FV R2 haplotype のホモ接合体と予想される。今後は、FV R2 haplotype の保因者と非保因者において、バッドキアリ症候群などの様々な血栓症の頻度について詳細な比較検討が必要と考えられる。

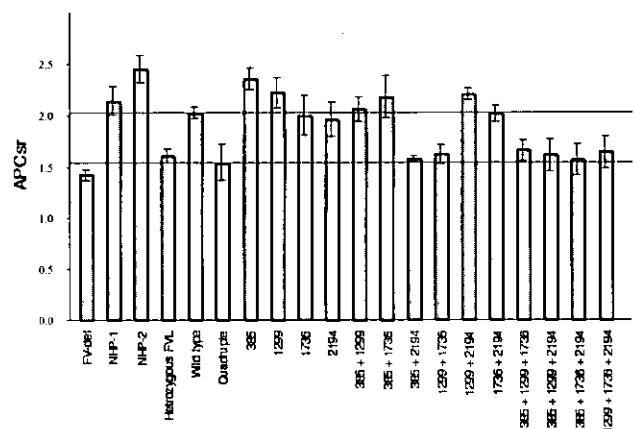
我々の実験によって、FV R2 haplotype が FV の凝固抑制機能を低下させることが明らかとなった。しかし、なぜ M385T+D2194G または H1299R+M1736V の組み合わせが FV の凝固抑制機能を低下させるのか不明な点も多く、さらなる検討が必要である。

1) 山崎鶴夫：Factor V を見直そう：Factor V R2 haplotype と血栓症。日本血栓止血学会誌 14：310-315, 2003.

学会発表

- 1) Brugge, T Yamazaki, G Tans, B Dahlback, J Rosing, GAF Nicolaes.: Functional characterization of recombinant factor V molecules mimicking the R2-haplotype. International Society on Thrombosis and Haemostasis, Birmingham, England; July 2003.
- 2) T Yamazaki, GAF Nicolaes, KW Sorensen, B Dahlback.: Inefficient secretion and intracellular degradation of factor V. International Society on Thrombosis and Haemostasis, Birmingham, England; July 2003.

Anticoagulant activity of FV



各リコンビナント FV の凝固抑制機能を示す。M385T+D2194G または H1299R+M1736V が同時に存在すると、FV の凝固抑制機能は低下する。