

肝再生過程における低酸素応答システムの生物作用の解析

慶応義塾大学医学部医化学教室
末松 誠

共同研究者
慶応義塾大学医学部医化学教室
合田 巨人

研究要旨

門脈血行動態は生理的な食事摂取のみならず様々な病態下においても劇的に変化することが知られている。このような血流動態変化は肝小葉内の局所酸素環境に大きな影響を与え、臓器機能を維持するためにこの酸素濃度変化に応じた精密な細胞内調節システムを稼働させる。低酸素感受性転写制御因子 hypoxia inducible factor (HIF) -1は、全ての生体内の細胞が有する普遍的な低酸素応答システムの中心分子として近年注目されており、我々はこれまで本研究班においてその生物作用の一端を明らかにしてきた。そこで本年度は更に研究を進め、これまで得られてきた現象に絡む分子メカニズムを明らかにし、門脈血行動態変化を惹起する様々な肝病態、特に本研究では肝再生過程に焦点を絞り、その形成・進展プロセスにおける新たな低酸素応答システムの生物作用解明を目指した。その結果、HIF-1 α 遺伝子欠損マウス (HIFKO) における 70%肝切除後の再生初期過程遅延は、G1期から S期への移行に必須のサイクリン分子群の発現低下を伴っていた。一方、切除後 72時間には HIFKOの肝重量はコントロールマウスとほぼ同程度まで回復するが、これは肝実質細胞の増殖応答が持続したためでなく、主に個々の肝細胞サイズの増加によるものであることが明らかになった。これらの結果は、肝再生過程において HIF-1遺伝子が細胞増殖と適正な細胞サイズを制御する重要な制御因子として機能していることを示している。

はじめに

門脈血行動態は生理的な食事摂取のみならず、外科的手術、薬剤性あるいはウイルス性肝炎、肝硬変、肝癌など様々な病態下においても劇的に変化することが知られている。このような門脈血行動態変化は、肝小葉内微小酸素環境を激変させ、肝細胞の機能に大きな影響を与える。Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) は細胞内低酸素応答機構の中心に位置する転写制御因子として機能していることが知られている

が、肝臓におけるその生物作用についての知見は限られている。

我々はこれまで本研究班において、肝細胞特異的な HIF-1 α 遺伝子欠損マウスを用いて、HIF-1 が肝再生の正の制御因子として関与していることを明らかにしてきたが、その分子メカニズムについては十分に検討していなかった。そこで、本年度は分子生物学的手法を用いてより詳細な分子メカニズムの解明を目指した。

対象と方法

平成 16 年度報告書に記載したように HIF-1 α 遺伝子のエクソン 2 の前後のイントロンに loxP 配列を挿入した遺伝子改変マウス (コントロールマウス) とラットアルブミンプロモーターの制御下に Cre recombinase 蛋白質を発現するトランスジェニックマウスとの交配により、肝細胞特異的な HIF-1 α 遺伝子欠失マウス (HIFKO) を作成した。実験には 8 ~ 12 週齢の雄性マウスのみを使用した。

70% 部分肝切除術 (PH) は、エーテル麻酔下にて Higgins と Anderson らが確立した方法に準じて施行した。肝切除後経時的に、肝臓をサンプリングし秤量後解析まで -80°C に保存した。

細胞周期関連タンパク質発現を解析するために、肝臓を各種プロテアーゼ阻害剤を添加した RIPA buffer (20 mM HEPES, pH 7.8, 350 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 20% glycerol, 1% NP-40) 中でホモジナイズしタンパク質の抽出を行った。採取したタンパク質 50 μ g を 10% ゲルを用いて SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜上に転写後、CDK (cyclin-dependent kinase) 2、CDK4、サイクリン D、サイクリン E、サイクリン A に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

さらに、肝再生過程における HIF-1 α 遺伝子欠失による肝実質細胞サイズへの影響を比較検討するために、コラゲナーゼ灌流法および Percoll を用いた遠心により肝実質細胞を分離した。4% パラホルムアルデヒドで固定後、サポニンで細胞膜を処理、核 DNA を propidium iodide (PI) で染色し、FACSCalibur を用いて PI 染色強度に従い肝実質細胞を分画し細胞サイズを forward scatter 解析を行った。

倫理的配慮

実験動物に関しては、実験を試行し必要以上の苦痛を与えないように十分な配慮を行った。

結 果

これまでの研究成果で報告したように、HIFKO マウスにおける肝再生過程は、PH 後 24 時間まで全く認められず 36 時間後より遅延して開始する。肝重量はその後急速に増加し、術後 72 時間以降はコントロール群と同程度まで回復することを報告している。また、我々は、細胞周期 S 期に特異的に核内に取り込まれる BrdU を用いた免疫組織学的検討により、肝再生初期過程の肝重量回復遅延が肝実質細胞の増殖低下に起因することも報告している。そこで、本年度はこの HIF-1 α 遺伝子欠損による初期肝再生遅延の分子メカニズム解明を行うために、細胞周期の G1 期から S 期移行に重要なサイクリンおよび CDK のタンパク質発現をウエスタンブロット法により解析した。

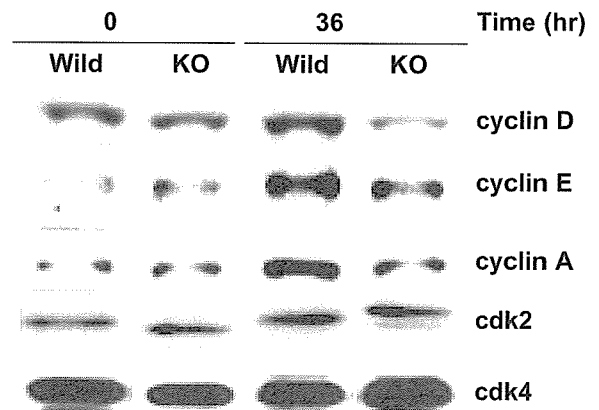


図1 部分肝切除後のサイクリンおよび CDK タンパク質発現解析

その結果、図 1 に示したように肝切除前では、HIF-1 α 遺伝子発現の有無に係わらず、サイクリン D、サイクリン E、サイクリン A の発現量に大きな差は認められなかった。また、これらのサイクリン分子と結合しキナーゼ活性を発揮する CDK2 および CDK4 の発現量も両者間で顕著な差は認められなかった。

PH 施行 36 時間後のコントロール肝臓では、BrdU の取り込みパターンと一致して解析したすべてのサイクリン発現が施行前と比較し増強されることが明らかになった。一方、HIFKO 再生肝ではこれらサイクリン分子群の発現増強が著しく抑制されていた。一方、

CDK タンパク質発現は、PH あるいは HIF-1 α 遺伝子発現の影響をまったく受けず、その発現に変化は認められなかった。これらの結果は、サイクリン分子のタンパク質発現低下が HIFKO マウスの再生肝重量回復遅延の原因として考えられた。

肝再生 72 時間後には、著しい肝実質細胞増殖抑制にも係わらず、HIFKO マウスにおいて肝重量はコントロールマウスの肝臓と同等の回復を示す。この現象は、体内代謝要求に再生肝が応えるために、残存している肝実質細胞が代償的にその細胞サイズを増大させていることが考えられる。そこで、それぞれのマウス再生肝よりコラゲナーゼ灌流法により肝実質細胞を分離し、flow cytometry を用いて個々の細胞のサイズを比較検討した。

その結果、図 2 に示したように、PH 施行前では単核の肝実質細胞群はサイズにある程度のばらつきはあるものの、HIF-1 α 遺伝子欠失による平均サイズとその分布に著名な変化は認められなかった。PH72 時間後には、コントロールマウスの肝実質細胞のサイズ分布が右に変位し、再生肝の肝実質細胞の大きさが増大していることが推察された。一方、HIFKO マウスでは、コントロールマウスの肝実質細胞と比較しさらに右に変位している、つまり増大していることが明らかになった。

考 察

今回の結果より、HIF-1 は 2 つの異なる、しかし相互に関連した生物作用を協調して発揮することで肝再生過程を制御することが示された。一つは、細胞周期 G1 期から S 期への移行における制御であり、もうひとつは細胞増殖に伴った細胞サイズの適正化である。これら 2 つのプロセスは正常な細胞分裂に非常に重要であり、この破綻はがんなどの様々な病態形成に関与している。細胞増殖抑制における HIF-1 の役割は、これまで主に細胞周期抑制分子である p21 や p27 に代表される CDK 抑制分子の発現亢進と低酸素環境下でも解糖系酵素群発現増強を介したエネルギー代謝維持機構が報告されている。今回我々が見出した HIFKO マウスにおける PH 後の肝実質細胞増殖遅延にサイクリン分子の発現低下が関与しているデータは、ある環境下では細胞周期を負に制御する分子群だけでなく正に制御する分子群の発現調節にも HIF-1 が機能していることを示唆している。今後更に HIF-1 が何を感じて細胞周期をどちらの方向に調節しているか明らかにする必要があると考えられる。

また、本研究で認められた HIFKO マウスにおける PH 後の肝実質細胞サイズの増強効果は、これまでの酵母などの実験結果より推察して、細胞増殖抑制による代償的な変化である可能性は否定できないが、残存肝が体内の代謝要求に応じて積極的に代謝機能を増強する合目的な生物応答である可能性も考えられる。実際、ショウジョウバエを用いた研究では、HIF-1 α 遺伝子のホモログである Sima の過剰発現による HIF-1 の恒常的な活性化により細胞サイズの減少が報告されている。ヒトをはじめ多くの哺乳類では、HIF-1 α タンパク質発現を制御する mTOR シグナルカスケードが細胞サイズの決定に重要な役割を演じていることが知られており、今後更にこの肝再生過程におけるこの 2 つの分子群の生物相互作用について詳細に検討する必要があると考えられる。

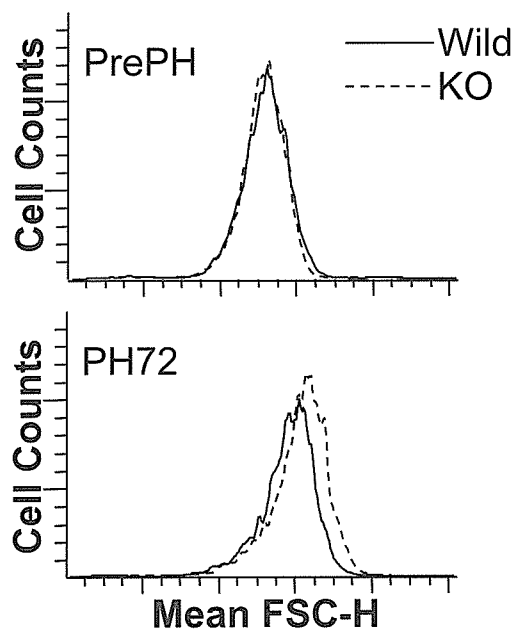


図2 再生肝における肝実質細胞サイズ解析

結 語

再生肝における HIF-1 の活性化は、肝実質細胞の調和のとれた細胞増殖応答に必須であると考えられた。肝臓の再生は、外科的切除後のみならず薬剤性あるいはウイルス性肝炎など門脈血行動態が劇的に変化する様々な病態下でも起きる。これらの状況下で、肝臓の臓器としての機能が早急に回復するためには、HIF-1 の活性化制御が重要な治療標的になりうるのではないかと期待される。今後、HIF-1 による制御機構の分子メカニズムの解明を目指し、さらに本研究を展開する必要があると考えられる。

文 献

- 1) Soga T, Baren R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, Sakuragawa T, Kakazu Y, Ishikawa T, Robert M, Nishioka T, Tomita M. Differential metabolomics mined ophthalmate as an oxidative stress biomarker indicating glutathione consumption. *J. Biol. Chem.* 281 (24) 16768–16776, 2006
- 2) Suganuma K, Tsukada K, Kashiba M, Tsuneshige A, Furukawa T, Kubota T, Goda N, Kitajima M, Yonetani T, Suematsu M. Erythrocytes with T-state-stabilized hemoglobin as a therapeutic tool for postischemic liver dysfunction. *Antioxid. Redox Signaling.* 8 (9–10) 1847–1855, 2006
- 3) Yasui Y, Nakamura M, Onda T, Uehara T, Murata S, Matsui N, Fukuishi N, Akagi R, Suematsu M, Akagi M. Heme oxygenase-1 inhibits cytokine production by activated mast cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 354 (2) 485–490, 2007

CTGF 組み換えアデノウイルス感染ラット肝組織における 網羅的遺伝子発現の解析

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核医学
川村悦史

大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学
森川浩安、田守昭博、羽生大記、河田則文

研究要旨

IPH の動物モデル作成を検討するため、connective tissue growth factor(CTGF) 組み換えアデノウイルス感染ラット肝組織における網羅的遺伝子発現の解析を行った。方法は Adenovirus Expression Vector Kit を用いて、human CTGF の cDNA をコスミドベクターの E1 領域に導入することにより CTGF 組み換えアデノウイルス (adeno-CTGF) を作成した。7 週齢 Wister 系雄性ラットに adeno-CTGF および大腸菌の β -galactosidase 遺伝子を導入したコントロール用アデノウイルスベクターを静注し、経時的に肝組織を採取した。CTGF は投与 3 日目に肝に発現していたが 7 日目には認められず、肝での発現は一過性であった。さらに肝組織を用いて、GeneChip による網羅的遺伝子発現の解析を行った。その結果、炎症に関する遺伝子発現は投与 3 日目では亢進し、7 日目では減衰していた。線維化に関する遺伝子発現は 3 日目、7 日目共に亢進していた。細胞増殖、細胞死に関する遺伝子は大きな変動を認めなかった。

はじめに

我々は特発性門脈圧亢進症 (IPH) 患者において connective tissue growth factor (CTGF) の異常高値を示す症例が存在し、IPH の肝組織中の in-situ hybridization を用いた mRNA レベルの発現の検討では、IPH の特異的病変である門脈線維化の周辺にシグナルが認められることを報告してきた^{1, 2)}。この CTGF の機能解析のため、CTGF 遺伝子組み換えアデノウイルス (adeno-CTGF) を用い、肝臓に CTGF

を発現させることにより惹起される肝組織の変化を検討した。adeno-CTGF 投与 3 日目の肝臓には CTGF を示す band を認めたが、7 日目、14 日目の肝臓では認めなかった。また、肝臓に関しては adeno-CTGF 投与 3 日目、7 日目は著変を認めなかった。同様に adeno-CTGF と TGF- β 併用投与、adeno-CTGF と TAA 併用投与の肝臓についていずれも著変を認めなかった³⁾。今回、この肝臓を用い GeneChip による網羅的遺伝子解析を行った。

対象および方法

アデノウイルスへの遺伝子導入は Adenovirus Expression Vector Kit (Takara Biochemical) を用いて行った。human CTGF の mRNA から cDNA を作製し、コスミドベクターの E1 領域に導入し、CTGF 組み換えアデノウイルス (adeno-CTGF) を作成した。コントロールとして大腸菌の β -galactosidase 遺伝子を導入したアデノウイルスベクター (adeno-LacZ) を使用した。動物として7週齢 SPF/VAF 雄性ラット(Wistar系) に静注し、adeno-CTGF 投与3日目、7日目および adeno-LacZ 投与3日目の肝臓を摘出した。肝臓を凍結状態のまま十分過剰量の Isogen へ浸漬、ポリトロンホモジェナイザーを用いて破碎し、ニッポンジーン社のマニュアルに従って Total RNA を調製した。分光光度計 (SmartSpec 3000, BioRad 社) を用いて RNA 濃度を測定し、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology 社) を用いた RNA クオリティチェックを行った。この RNA を用いた標準的 1 サイクル法により cDNA を合成し、ビオチン化 cRNA を合成した。これを GeneChip Array (Rat Genome 230 2.0 Array) へハイブリダイゼーションし、GeneChip 3000 Scanner により Array のスキャンを行い、画像データを所得した。GeneChip システムに標準装備されているデータ解析システム“GCOS”を用いて、取得した各サンプルの Array 画像データを数値抽出可

能な形式のファイルへ変換した。取得した GeneChip 数値データから、特定の生物学的現象に関連する遺伝子発現情報を抽出するために” Gene Ontology Database”を用いた。今回、生物学的用語として、extracellular matrix、inflammation、wound healing、cell growth、cell death の Term でデータ検索を試みた (図1)。

結 果

ラット肝からの cDNA を PCR 反応にて増幅し、CTGF の肝臓での発現を調べた。adeno-CTGF 投与3日目の肝臓には CTGF を示す band を認めたが、7日目および adeno-LacZ 投与3日目の肝臓では認めなかった。また、肝組織に関しては adeno-CTGF 単独投与3日目、7日目は著変を認めなかった。³⁾

Adeno-CTGF 投与3日目、7日目の GeneChip 数値データに対し、adeno-LacZ 投与3日目をコントロールとして比を求め、1.5 以上を亢進、0.67 以下を減衰とした。inflammation に関する 91 遺伝子の発現は投与3日目では多くの遺伝子で亢進していたが、7日目では減衰していた (図2)。extracellular matrix に関する 263 遺伝子の発現は投与3日目、7日目共に多くの遺伝子で亢進していた (図3)。wound healing に関する 8 遺伝子、cell growth に関する 83 遺伝子、cell death に関する 23 遺伝子は投与3日目、7日目共に大きな変動を認めなかった。

Gene Ontology Database	n
Extracellular Matrix (Fibrosis)	263
Inflammation	91
Wound healing	8
Cell Growth	83
Cell Death	23

図1 遺伝子発現情報の Gene Ontology Database による抽出

考 察

肝疾患に関して、胆道閉鎖症⁴⁾、慢性肝炎⁵⁾、non-alcoholic steatohepatitis (NASH)⁶⁾ などにおいて肝組織中に CTGF-mRNA の発現が報告されている。我々は IPH において CTGF-mRNA の発現が認められることを報告してきたが²⁾、CTGF の肝線維化における機能解析を進めるにはトランスジェニックマウスの作成が必要となる。アデノウイルスは主として肝臓や神経系に集まるため、組み換えアデノウイルスを用いれば目的のタンパクを肝臓に発現させることが可能である。我々の成績では投与 3 日目に肝臓に CTGF の発現を認めたが、7 日目、14 日目では認めず発現は一過性であった。肝病変の検討において adeno-CTGF 単独群、adeno-CTGF と TGF- β 併用群、adeno-CTGF と TAA 併用群すべてにおいて肝組織に有意な変化を認めなかった。そのため肝組織を用いて、GeneChip による網羅的遺伝子発現の解析を行った。³⁾

GeneChip 解析を行う前に肝組織より得られた RNA の定量とクオリティのチェックを行った。分光光度計を用いた各サンプルのデータ波形において、rRNA 18S および 28S 以外に目立つピークがなく、ベースラインが一定していることから RNA の分解が少ないことが示唆された。また rRNA 28S/18S の値が 1.2 ~ 1.3 で各サンプル間に開きがないことから、サンプル毎の RNA 抽出状況に大きな違いがないことが示唆された。さらに Agilent 2100 Bioanalyzer を用いて産物のクオリティをチェックを行った。cDNA、cRNA はそれぞれブロードなピークを持ち、各サンプルのピークの高さが一定以上でかつ比較的揃っていることから、各サンプルがほぼ均一に十分量生成されており cDNA 合成とそれに続く cRNA 合成プロセスが順調に進行した事が示唆された。

取得した GeneChip 数値データから、特定の生物学的現象に関連する遺伝子発現情報を抽出するために "Gene Ontology Database" を用いた。今回、生物学的用語として、fibrosis、Connective Tissue Growth Factor、inflammation、wound healing、cell growth、cell death 等の Term でデータ検索を

試みた。しかし fibrosis については、そのまま合致する Term が存在しなかったため、肝線維化の指標として知られている extracellular matrix をその代わりに対応する用語としてデータ検索に用いた。Connective Tissue Growth Factor に関して対応する遺伝子プローブは、今回使用した GeneChip Array には存在しなかった。CTGF 組み換えアデノウイルスをラットに静注し、経時的に肝組織の検討を行うことにより、CTGF は投与 3 日目に肝臓に発現していたが一過性であった。さらに、CTGF 組み換えアデノウイルス単独および TGF- β 、thiacetamide との併用効果を検討したが、いずれの場合も肝組織の変化は軽度であった。しかし、GeneChip 解析では線維化に関する遺伝子発現は 3 日目、7 とも日目共に亢進していた。このことより CTGF の肝臓での発現により一過性の炎症が起こるが、線維化に関する遺伝子発現はその後も持続しており、繰り返し投与することにより IPH モデルの作成可能であることが示唆された。

結 語

CTGF 組み換えアデノウイルスベクター感染ラット肝組織における網羅的遺伝子発現の解析を行い以下の結果を得た。炎症に関する遺伝子発現は投与 3 日目で亢進し、7 日目で減衰していたが、線維化に関する遺伝子発現は 3 日目、7 日目共に亢進していた。また、細胞増殖、細胞死等に関しては大きな変動は認めなかった。

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) 塩見 進、森川浩安、田守昭博ほか：CTGF 組み

換えアデノウイルス感染ラットにおける肝病変の検討. 厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班 平成 17 年度研究報告書 2006: 25-28

- 4) Tamatani T, Kobayashi H, Tezuka K, et al. Establishment of the enzyme linked immunosorbent assay for connective tissue growth factor (CTGF) and its detection in the sera of biliary atresia. *BBRC* 1998;251:748-796.
- 5) Paradis V, Dargere D, Vidaud M, et al.

Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. *Hepatology* 1999, 30: 968-976.

- 6) Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, et al. High glucose and hyper insulinemia stimulate connective tissue growth factor expression; a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2001; 34: 738-744.

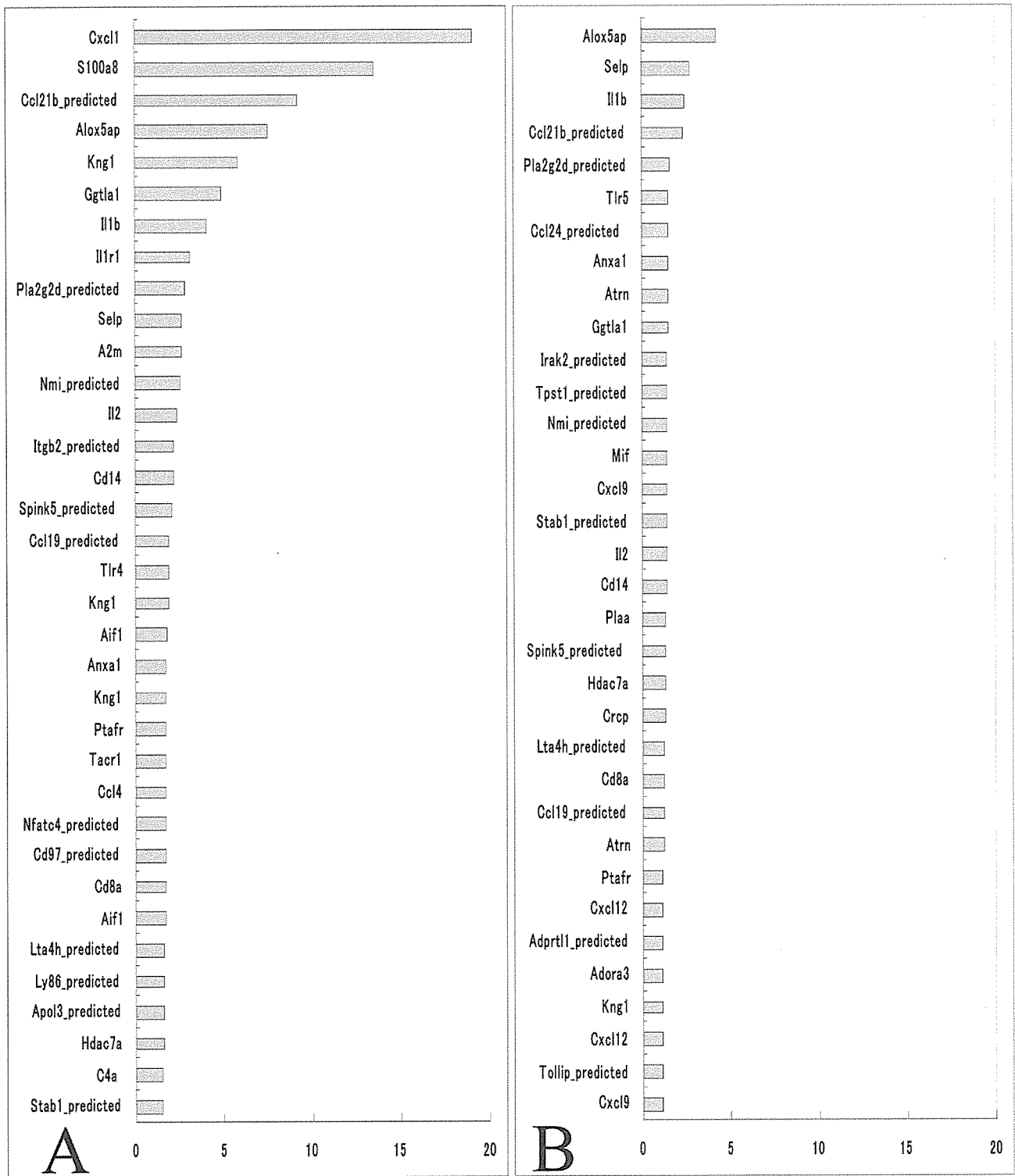


図2 Inflammation に関する遺伝子発現
 A:CTGF 投与 3 日目 / コントロール比、 B:CTGF 投与 7 日目 / コントロール比

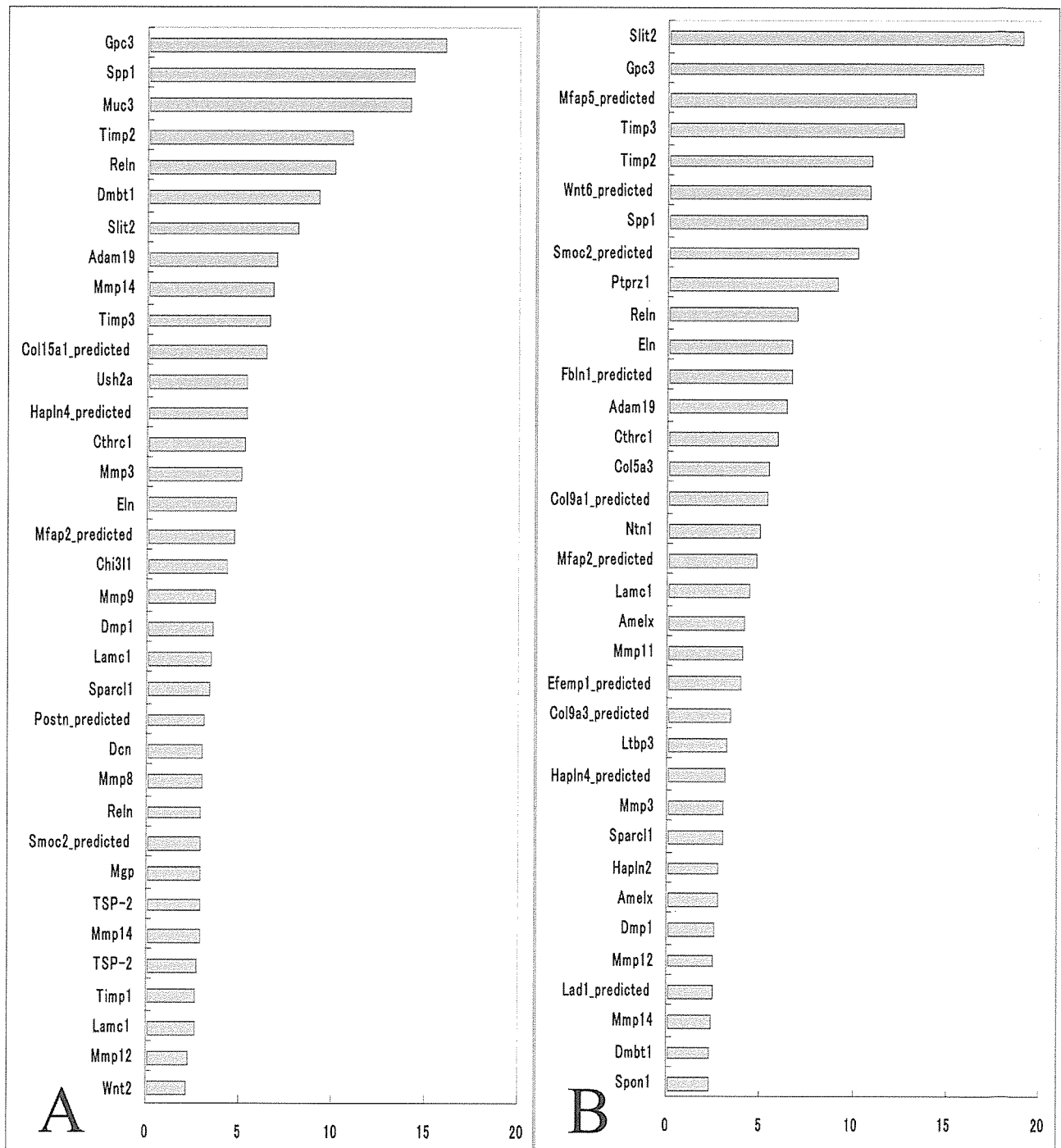


図3 Extracellular matrix に関する遺伝子発現
 A:CTGF 投与 3 日目 / コントロール比、B:CTGF 投与 7 日目 / コントロール比

Budd-Chiari 症候群の肝の酸化ストレス

久留米大学医学部病理学教室
鹿毛政義

共同研究者
久留米大学医学部病理学教室
秋葉 純、高須 修、谷川 健

研究要旨

Budd-Chiari 症候群 (BCS) の肝臓の酸化ストレスについて検討を行なった。ネパールの BCS41 症例の針生検肝を病理組織学的に検討した。肝臓の免疫組織化学の結果、BCS の肝臓では、多くの症例で酸化ストレス・マーカーである 8-OHdG の強発現が見られ、肝病変の進展とともに発現の増強が見られた。一方、抗酸化ストレス・マーカーの MnSOD も、8-OHdG と同様に発現が認められた。ネパールの BCS の肝臓では、高酸化ストレス状態にあることが示唆され、酸化ストレスが BCS の病態や肝病変の進展に深く関与している可能性が示唆された。

はじめに

Budd-Chiari 症候群 (BCS) は、進行性の慢性肝疾患であり、肝硬変に至ると肝細胞癌 (HCC) が高率に合併する。BCS の病態の基盤は肝うっ血であるが、肝病変の進展の病態や肝発癌機序は十分に明らかにはされていない。酸化ストレスは慢性肝疾患の病態形成や肝発癌に関与する可能性が指摘されている^{1, 2)}。今回、BCS における肝障害の酸化ストレスの関与について病理学的検討を行なった。

対象と方法

ネパールのカトマンズの Bir 病院で BCS 症例に対して施行された肝生検症例 41 例 (BCS 群) を対象とした^{3, 4)}。内訳は男 28 人、女 13 人であり、平均年齢は 38 才であった。対照として、C 型肝炎関

連肝細胞癌外科手術症例 45 例 (CH 群) を検討した。内訳は男 41 人、女 4 人であり、平均年齢は 69 才であった。

BCS 症例は針生検肝組織、外科手術症例の切除肝組織 (非癌部) を用い、HE, Azan, 鍍銀染色標本を作成し鏡検し、BCS 症例の病期をうっ血肝、うっ血性肝線維症、うっ血性肝硬変症の 3 型に分類した。さらに、酸化ストレス・マーカーである 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)、および抗酸化ストレス・マーカーである manganese superoxide dismutase (MnSOD) について免疫組織化学を行なった。免疫組織化学の結果について、8-OHdG と MnSOD の発現の強度を夫々の症例について、0; 発現なし、1; 軽度、2; 中等度、3; 高度の 4 段階に評価した。Mann-Whitney の U 検定を用い、BCS 群と CH 群間および BCS 群の病期間の 8-OHdG と MnSOD の各々の発現強度の比較を行った。

結 果

< BCS 症例の病型分類 >

BCS 症例の病型の内訳は、うっ血肝 19 例、うっ血性肝線維症 16 例、うっ血性肝硬変症 6 例であった。

8-OHdG の免疫組織化学結果

肝細胞の発現：肝細胞の核と細胞質に発現が見られた。BCS 群と CH 群の 8-OHdG の発現の比較（図 1）：BCS 群は、CH 群に比べ高度に発現していた。BCS 病期と発現の比較（図 2）：8-OHdG の発現は、どの病期においても強発現が見られた。8-OHdG 発現の小葉内分布（表 1）：びまん性に強く発現した症例が全体症例の 80% を占めた中心帯壊死を伴う高度のうっ血肝では、壊死の周囲の zone 2 の肝細胞に発現の増強が観察された。一方、CH 群では、強発現した症例は少なく、びまん性に発現した症例は 5% であった。発現の分布も辺縁帶領域に限局する傾向が見られ、多くの症例では、主に門脈域近傍の肝細胞に発現が認められた。

< MnSOD の免疫組織化学結果 >

肝細胞の発現：肝細胞の胞体に発現が見られた。BCS 群と CH 群の MnSOD の発現の比較（図 3）：BCS 群には強発現した症例が多く、他方、CH 群には中等度ないしは軽度発現した症例が多く、両群間に有意な差が認められた BCS 病期と MnSOD の発現の比較（図 4）：BCS の発現は、肝病変の進行とともに増強する傾向を呈した。MnSOD 発現の小葉内分布（表 1）：BCS 群では、びまん性に発現した例と中心帶領域に発現した例が夫々約半数であった。中心帶領域と門脈域周囲の辺縁帶領域に発現の増強が見られた BCS 症例が 2 例あった。

考 察

今回の検討で、BCS 群の肝臓では 8OHdG が強発現していることが明らかになった。興味深いことに、肝細胞癌を合併した CH 群の非癌部の 8-OHdG の発現と比べ、BCS 群では、明らかに個々の肝細胞の 8OHdG の発現は強く、かつ、その発現細胞

の分布も、多くの症例で肝小葉全体に亘っていた。すなわち BCS 群の肝臓では極めて強い酸化ストレスの状態にあることが示唆される。8-OHdG は、DNA 酸化障害の指標となるバイオマーカーであり、酸化ストレスと老化、肝硬変、発癌などとの関連で注目を集めている。酸化ストレスが BCS の病変の進展や肝細胞癌の発癌に関与する可能性が推測される。ミトコンドリア特有の抗酸化ストレス物質の MnSOD の発現の増強は、酸化ストレスに対し防御的に誘導された反応と推察される。肝臓では、様々なコンデションで酸化ストレスが生じることが知られている^{1,2)} が、うっ血肝の酸化ストレスについて詳細に、免疫組織化学的に検討した報告はない。BCS 群の発癌機序を酸化ストレスの面から明らかにするには、通常肝細胞癌を合併しない心不全などによるうっ血肝の酸化ストレスについての検討も必要と考える。

今回はネパールの BCS の症例を対象に検討を行った。ネパールの BCS では、細菌感染を契機に発症することはすでに報告され、感染による下静脈の血栓性静脈炎が成因として重視されている^{3,4)}。これらの肝臓の病理組織学的検討では、非特異性肝炎の所見が見られ、ネパールの BCS の成因に細菌感染が深く関与している可能性が推察されている。また、ネパールの BCS の症例には、アルコール性中毒患者が多く含まれており、病理組織学的にもアルコール性肝炎をはじめとしてアルコール肝障害像を呈する症例がある。感染症やアルコール性肝障害が BCS の酸化ストレスに影響を与えている可能性が高く、BCS の酸化ストレスと基礎疾患との関連は今後の検討課題である。また、今回はネパールの BCS 症例の肝臓の酸化ストレスについて検討を行ったが、本邦の BCS 症例についても病理学的検討を行う予定である。

結 語

ネパールの BCS の肝臓では、酸化ストレスが亢進している可能性が示唆された。

文 献

- 1) Kurose I, Higuchi H, Miura S et al: Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication. *Hepatology* 25: 368-378, 1997
- 2) Moriya K, Nakagawa K, Santa T et al: Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer*

Res 61: 4365-4370, 2001

- 3) Shrestha SM, Okuda K, Uchida T, et al: Endemicity and clinical pictures of liver disease due to obstruction of the hepatic portion of inferior vena cava in Nepal. *J Gastroenterol Hepatol* 11: 170-179. 1996
- 4) Shrestha SM: Membranous obstruction of the hepatic portion of inferior vena cava: Is this an underdiagnosed entity in developing country? *Am J Gastroenterol* 90: 303-306. 1995

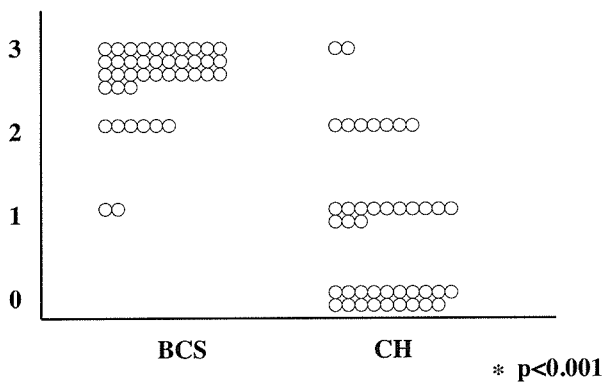


図1 BCS群とCH群の8-OHdG発現。数字は発現強度のスコア。○は症例を示す。

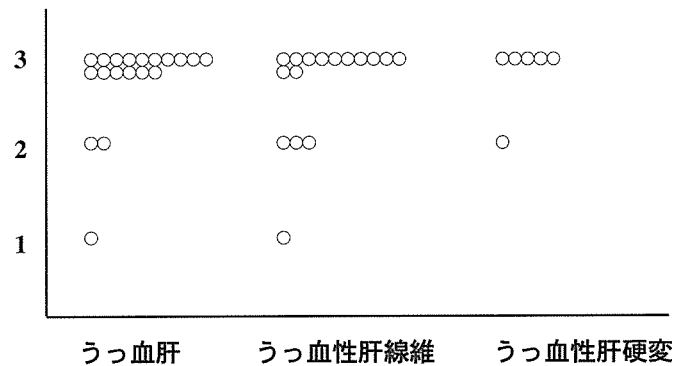


図2 BCS群とCH群のMnSOD発現

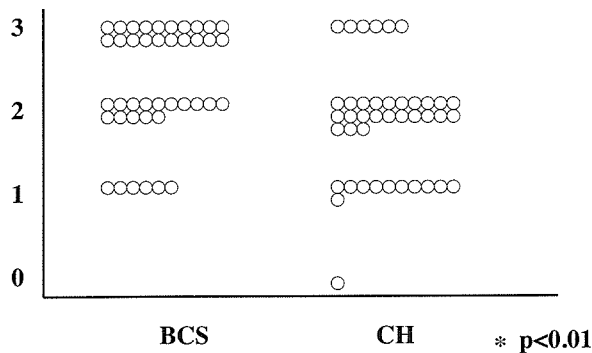


図3 BCS群の病期と8-OHdG発現

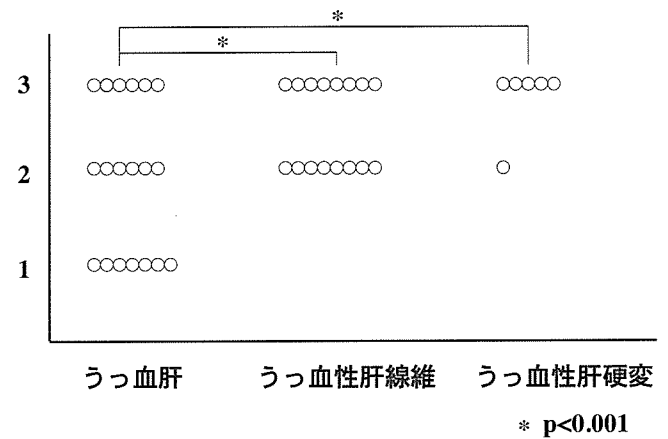


図4 BCS群の病期とMnSOD発現

	8-OHDG		MnSOD	
	P	Z	P	Z
B C S	33 (80)	8 (20)	20 (49)	21 (51)
C H	2 (5)	20 (49)	29 (71)	11 (27)

(%)

P : Panlobular distribution

Z : Zonal distribution

表1 8-OHDG と MnSOD の発現の肝小葉内分布

バッドキアリ症候群発症機序解明に向けた 血管形状セグメンテーションとモデル構築

九州大学大学院医学研究院災害・救急医学
橋爪 誠

共同研究者
九州大学大学院工学研究院機械科学部門
渡部正夫、渡邊 聡

九州大学大学院工学府機械科学専攻
松原瑞浦

九州大学大学院医学研究院災害・救急医学
小西晃造、山口将平、吉田大輔

琉球大学医学部機能制御外科学分野
稲福 齊、國吉幸男

研究要旨

バッドキアリ症候群（BCS）の主原因は血栓であるとされるが、健常者の肝静脈一下大静脈付近の血流は非常に高速であり、血栓の生じにくい部位であると考えられる。BCS患者には肝静脈一下大静脈血管形態が及ぼす血液流れ場に、健常者とは異なる何らかの流れ学的な特徴があり、それが原因となって血栓形性が誘発されている可能性は否定できない。そこで本研究ではバッドキアリ症候群（BCS）の発症に及ぼす肝静脈一下大静脈合流部付近の血流の流体力学的な因子に着目し、医用画像解析と数値流体力学的手法を用いて流体力学的に肝静脈一下大静脈合流部付近の流れ場を解析することを目的としている。本年度は、実際の BCS患者に対する比較対象として健常者の肝静脈一下大静脈血管形態に着目し、MRI画像より肝静脈一下大静脈合流部付近の血管形状を医用画像処理の手法を用いて抽出した。さらに、得られた血管形状より、3次元血管形状計算格子を構築し、超音波 CTにより得られた血流速度を代表速度として用い、定常血流動の仮定の下で血流の流れ場シミュレーションを行った。その結果、肝静脈一下大静脈合流部付近で複雑流れ場が形成されていることが観察された。また合流部付近の壁面に強いせん断応力が働く傾向があることが分かった。

はじめに

バッドキアリ症候群（BCS）^{1,2)}の発症の原因、すなわち肝静脈一下大静脈合流部付近での血栓形成の原

因として、血管内皮障害や、血液の凝固系の異常などの遺伝的な問題が指摘されてきたが、それらの要因に加えて、肝静脈一下大静脈合流部付近の血流の流体力学的な因子が指摘されてきた。血栓は本来であれば血流のよどみ部で形成するが、健常者の肝静脈一下

大静脈付近の血流は非常に高速であり、血栓の生じにくい部位であると考えられる。従って、BCS 患者には肝静脈一下大静脈血管形態が及ぼす血液流れ場に、健常者とは異なる何らかの流れ学的な特徴（よどみ部の形成、内皮細胞に対する壁面せん断応力の刺激等）があり、それが原因となって血栓形性が誘発されている可能性が否定できない。

そこで、本研究では医用画像解析と数値流体力学的手法を用いて、バッドキアリ症候群（BCS）の発生機序を解明するために、BCS 発症部位である肝静脈一下大静脈合流部位における流れ場および壁面せん断応力分布を流体力学的に調査することを目的とする。

対象と方法

本研究では肝静脈一下大静脈における血栓形成メカニズムを明らかにするために、まずは健常者における肝静脈一下大静脈内の流れ場を解明することを目的として、健常者4名（test001 – test004、男性3名、女性1名、年齢：23～43歳）の協力を得て肝静脈および下大静脈のMRI画像（図1）の撮影を行った。次にそれらのMRI画像から血管境界の分割を行い、3D level set method を用いて3次元的に血管壁面の描写を行った³⁾。次に作成したを3次元的な血管モデルを再構築し計算格子を作成した、この計算格子を用いて血流流れ場の数値解析を行った。以下に詳細を示す。

図1に本研究で用いたMRI画像の一例を示す。撮影したMRI画像から下大静脈および下大静脈に合

流する3本の主要な肝静脈が鮮明に写っている画像を連続的に選出した後、下大静脈および主要肝静脈の領域を分割し、2値化を行った。なお、3本の主要肝静脈には更に細い肝静脈が合流しているが、本研究ではこれらの細い肝静脈を無視している。

分割および2値化を終えた後、3D level set 法を用いて3次元的に血管壁面の描写を行った³⁾。Level set 法⁴⁾は、もとは流体力学分野で境界面を捉えるために発展した手法であり、画像認識工学においては物体表面を2次元的小および3次元的に効率よく高精度に抽出できる手法として、現在広く用いられている。また本研究では level set method を測地的動的輪郭（GAC）法⁵⁾と組み合わせることにより、血管壁のスムージングを可能にしている。

Level set 法により血管壁面の抽出を行った後、血管壁面を Marching Cube 法⁶⁾を用いて細かい三角形に分割し、STLファイルに変換した。次にSTLファイルを計算格子生成ソフトICEM – CFDに入力し、有限体積法に適応した血管形状非構造格子を作成した後、数値解析ソフトCFX – 10.0を使用して肝静脈一下大静脈内の流れ場を解いた。数値解析条件として、壁面を滑りなしの剛体壁とし、流れをニュートン流体、また定常流として層流解析を行った。流体の密度として1050 [kg/m³]、粘度として0.0042 [Pa*s]を仮定した。入口境界条件には一様流を仮定し、平均流速を下大静脈で0.2878[m/s]、肝静脈で0.0550[m/s]とした。なお入口平均流速の値としては、健常者一名に対して超音波ドップラー血流速度測定を行った結果を用いた。

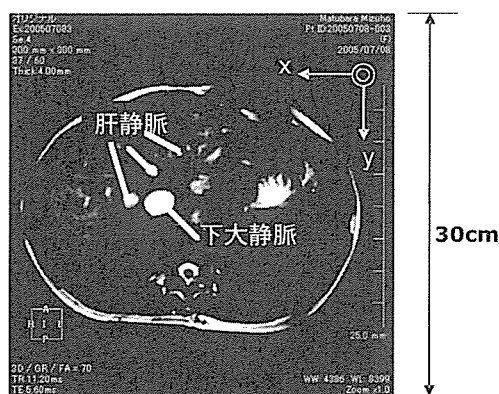


図1 MRI画像
(healthy 24-year-old female, 1.17mm/Pixel, slice thickness 2mm)

結果と考察

血管形状

図2に level set 法 を用いて作成した test001 から test004 の血管モデルを示す。各血管モデルにおいて、左側の図は血管を前面から見た場合を、右側の図は背面から見た場合を表しており、左側の図で、つまり血管を前面から見た場合、最も左にある肝静脈を右肝静脈、右側にある肝静脈を左肝静脈と呼ぶ。図2中の各モデルの赤いマスクは、血管を補正した部分である。この結果から、肝静脈—下大静脈の血管径および血管形状には個体差があることが伺える。肝静脈血管壁

面に見られる凹凸は、更に細い肝静脈の合流部であると思われる。test001 から test003 においては、3本の肝静脈は下大静脈に対して 90° 以下の角度で合流しているが、test004 では左肝静脈はほぼ垂直な角度で下大静脈に合流している。また test001 から test003 では、肝静脈—下大静脈合流部付近で下大静脈は左肝静脈側に屈曲している様子が伺える。test002 および test003 では、肝静脈—下大静脈合流部の MRI 画像が不鮮明であり血管の分割ができなかったため、合流部にも血管の補正を施している。肝静脈—下大静脈合流部で画像が不鮮明になる理由として、呼吸による横隔膜の振動が考えられる。

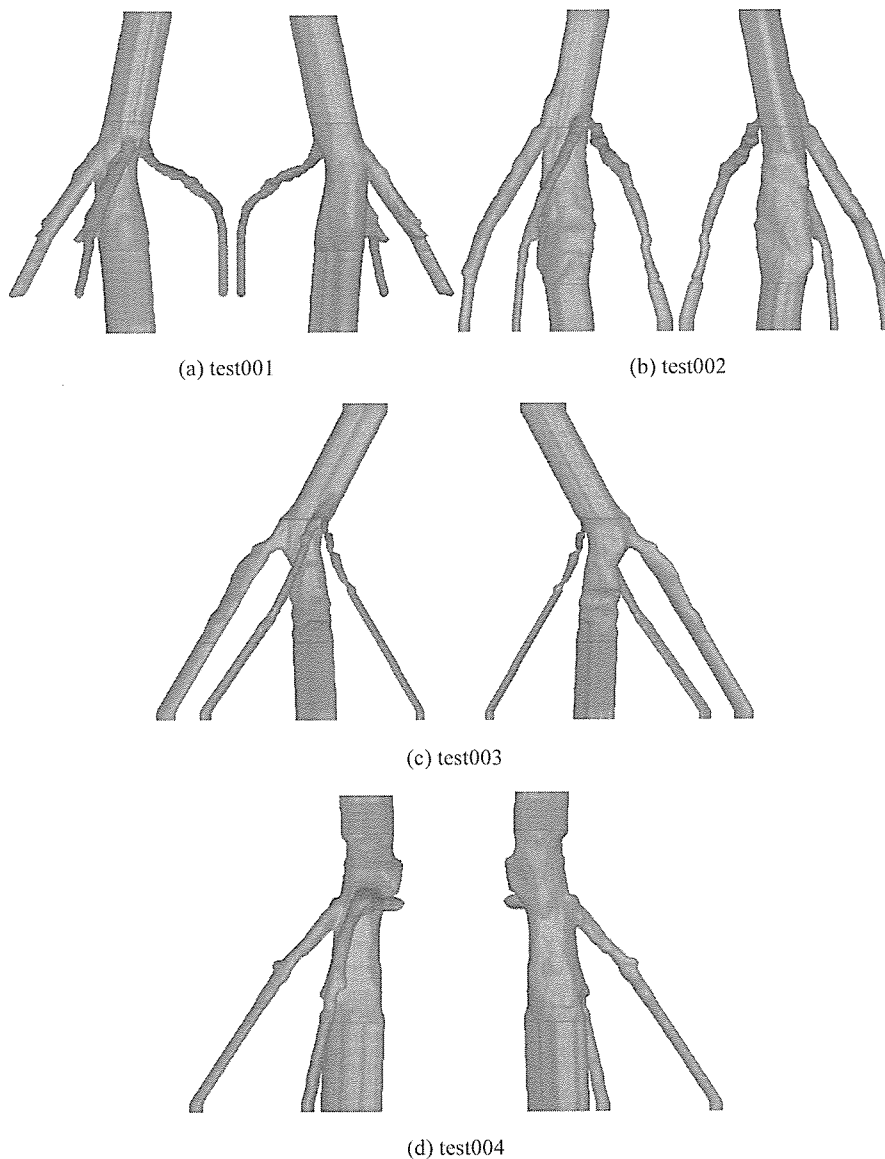


図2 肝静脈—下大静脈血管モデル形状

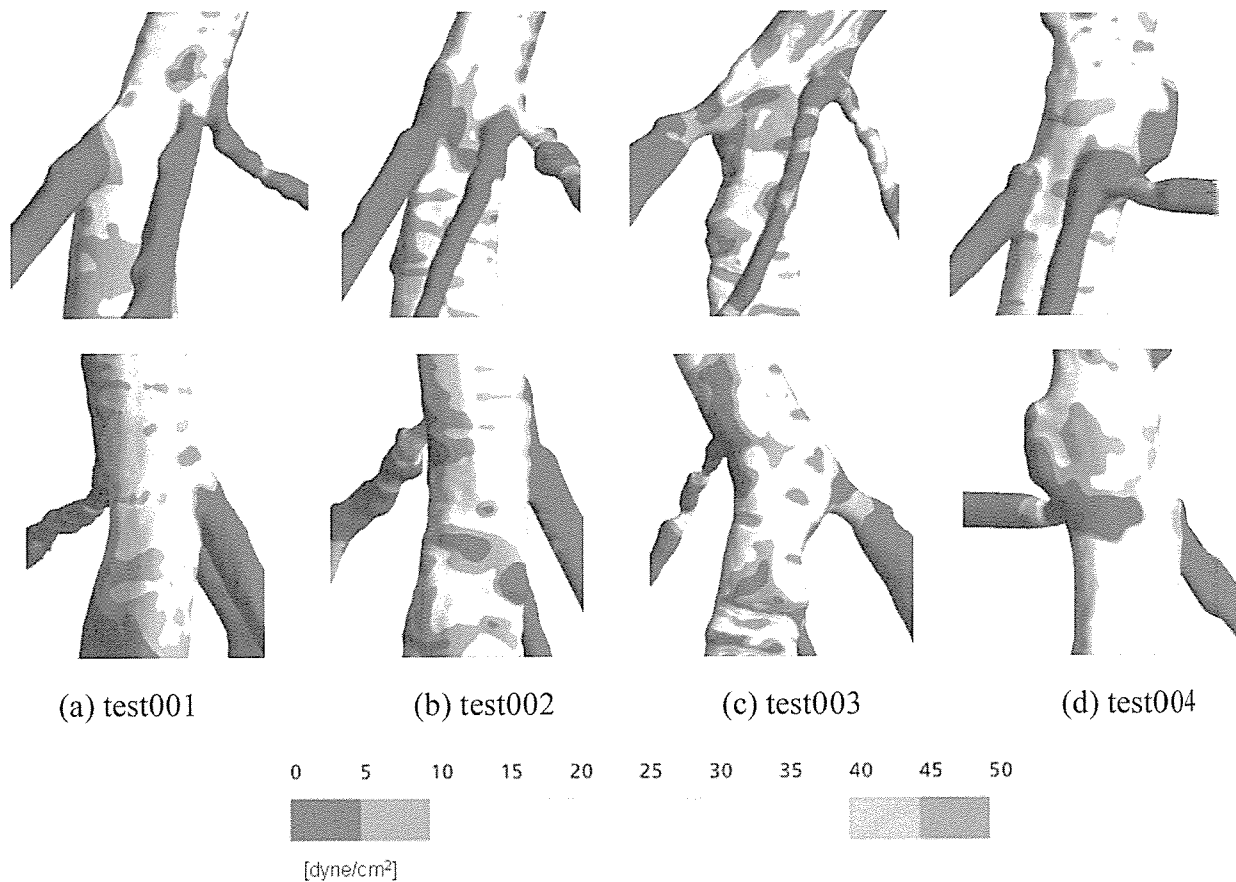


図3 血管モデルに働く壁面せん断応力分布（背面）

数値解析結果

数値解析結果として、各血管モデルに働く壁面せん断応力分布およびモデル管内の内部流れ場を示す。BCS 発症部位は肝静脈—下大静脈合流部付近であることから、以下では主に肝部下大静脈と肝静脈の合流部付近の数値解析結果について述べる。

まず、図3に各血管モデル壁面に働くせん断応力分布を示す。図3で、上側の図が各血管モデルの前面を、下側の図が背面を表している。図3より、右肝静脈—下大静脈合流部上側壁面で比較的高いせん断応力が働くことがわかる。この傾向は特に test001 と test003 で顕著に見られる。内部流れを観察したところ、被験者 test001、test002 および test003 においては、下大静脈は肝静脈合流部付近で左肝静脈側に屈曲しているため、下大静脈上流からの流れは右肝静脈—下大静脈合流部上側壁面に衝突している様子が見られた。また test004 では、右肝静脈からの流れは合流部付近で下大静脈上流からの流れと衝突し、右肝静

脈—下大静脈合流部上側壁面に沿って下大静脈内へと流れ込んでいく様子が見られた。このような流れは右肝静脈—下大静脈合流部上側壁面の周辺の数値勾配を上昇させ、その結果、この付近で高い壁面せん断応力が働くと考えられる。

次に、図4に各血管モデル内の流線および縦渦を示す。縦渦は、主流方向とは垂直の方向で回転する渦のことで、縦渦の強さの指標としてヘリシティ \vec{h} を用いた。 \vec{h} は以下の式で表される。

$$\vec{h} = \vec{v} \times \vec{\omega}$$

ここで、 \vec{v} および $\vec{\omega}$ は速度ベクトルおよび渦ベクトルをそれぞれ表している。図4には、下大静脈上流および3本の主要肝静脈からの流線と、縦渦の等値面を示している。オレンジ色の等値面が値 25 [m/s²]、青い等値面が値 -20 [m/s²] の縦渦を示している。すべての血管モデルにおいて、特に test003 で、右肝静脈

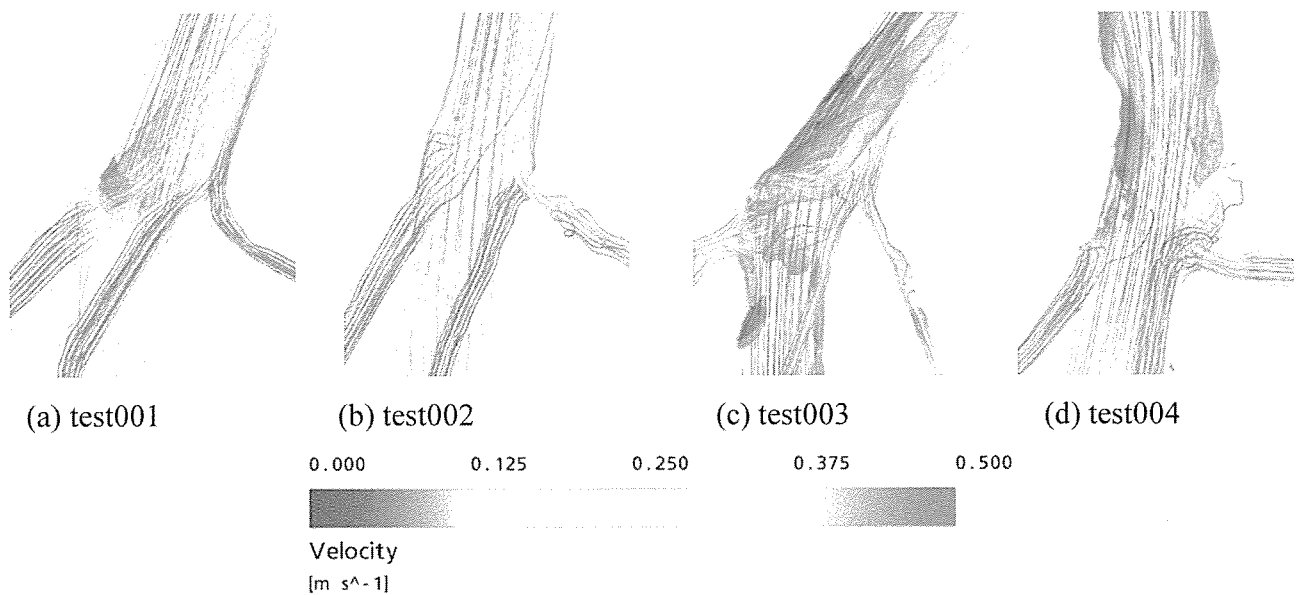


図4 流線および縦渦

出口付近で流線は非常に乱れ、その結果、下大静脈内の右肝静脈側には強い縦渦が生じている様子が伺える。test001 および test002 では、右肝静脈からの流れは下大静脈前面に沿って、下大静脈下流へと流れていく。test003 では右肝静脈からの流線はらせん状に渦巻きながら下大静脈下流へと流れていく。その結果、test003 では、右肝静脈からの流れは下大静脈内の流れを大きく乱している。test004 では、左肝静脈からの流れはほぼ垂直に下大静脈内へと流れ込み、その際に中央肝静脈からの流れと合流して複雑な流れ場を誘起している。そのため test004 では、下大静脈の右肝静脈側だけでなく、左肝静脈側の流れも大きく乱され、強い縦渦が生じている様子が観察される。この結果から、肝静脈—下大静脈の合流形態は肝部下大静脈内の流れに強い影響を与えることがわかる。

結 語

本研究では肝静脈—下大静脈合流部付近のMRI画像から、下大静脈および3本の主要肝静脈の血管領域分割を行った後、3D level set 法を用いて3次元血管モデルの作成を行った。またそれらの血管モデルを用いて数値解析を行い、血管モデル内の流れ場を算出した。その結果、右肝静脈—下大静脈合流部上

側壁面に強いせん断応力が働くこと、また右肝静脈からの流れが下大静脈内の流れを乱すことが確認された。このような傾向を持つ流れが、BCSの発症と関わりを持つかどうかは現在のところまだ不明であるが、奥田ら²⁾は、肝静脈から下大静脈へと垂直に入る流れによってもたらされる渦が、肝部下大静脈での血栓の発達に寄与している可能性があるとして指摘している。今後、本研究ではBCS患者に対しても上記のような調査を行い、健常者との血管形態および血管内流れ場の違いを明らかにしたうえで、BCS発症に寄与すると思われる流体力学的な因子について調査を行う予定である。しかしながら現在までの研究過程で、肝静脈—下大静脈のMRI撮影は呼吸による横隔膜の振動の影響を受けやすく、画像が不鮮明になる場合があることが分かった。肝静脈—下大静脈合流部の血管形態は下大静脈内の流れ場に大きな影響を与えるため、今後の課題として、より鮮明に肝静脈—下大静脈合流部付近の医用画像撮影を行う必要があると思われる。また数名の被験者において、肝部下大静脈の血流は、心臓からの逆流により脈動流れとなることが確認された。今後本研究では肝部下大静脈内の血流波形の詳細な調査を行い、将来的には非定常脈動解析を行うことを検討している。

参考文献

- 1) Jensenn, H. L. A., et. al., Budd-Chiari syndrome : a review by an expert panel, *J.Hepatology*, Vol. 38 (2003) , 364–371
- 2) Okuda,K.,et.al., Proposal of a new nomenclature for Budd-Chiari syndrome: hepatic vein thrombosis versus thrombosis of the inferior vena cava at its hepatic portion, *Hepatology*, Vol. 28, No. 5 (1998) , 1191–1198
- 3) Watanabe. M., et.al., Level set-based integration of segmentation and computational fluid dynamics for flow correction in phase contrast angiography, *Academic.Radiology*, Vol. 10 (2003) , 364–371
- 4) Sussman,M., et.al., A level set approach for computing solutions to incompressible two-phase flow, *J.Comp.Phys*, Vol.114 (1994) , 146–156
- 5) Casseles,V., et.al., Geodesic Active Contours, *Int.J.Comp.Vision*, Vol.22, No.1 (1997) , 61–79
- 6) William,E., et.al., Marching cubes : a high resolution 3d surface construction algorithm, *Comp. Graph*, Vol.21, No.4 (1987) , 163 – 169