

- Disease Week (ASGE), San Diego CA. 2008.3.12-15
- 70) Ichimura S, Furuichi Y, Miyata Y, Metoki R, Kawai T, Moriyasu F Endoscopy with FICE is useful in early diagnosis of recurrent esophageal varices. 16th United European Gastroenterology Week "UEGW 2008" Vienna, Austria. 2008.10.18-22
- 71) 古市好宏、河合隆、市村茂輝、目時亮、森安史典 再発性食道静脈瘤診断におけるFICE併用内視鏡検査の有用性について 第75回日本消化器内視鏡学会総会 横浜 2008.5.24-26
- 72) 古市好宏、河合隆、市村茂輝、宮田祐樹、目時亮、森安史典 再発性食道静脈瘤診断におけるFICE 併用内視鏡検査の位置づけ 第15回日本門脈圧亢進症学会総会、福岡、2008.11.20-21
- 73) 渡部正夫、松原瑞浦、小西晃造、橋爪 誠 Proceedings of FEDSM2007 (ASME), CD-ROM, 2007
- 74) 渡部正夫、松原瑞浦、小西晃造、橋爪 誠 日本機械学会2007年度年次大会 講演論文集(6), pp.93-97, 2007
- 75) 渡部正夫、松原瑞浦、小西晃造、橋爪 誠 日本機械学会 第18回バイオフロンティア講演会 講演論文集, 2007
- 76) 渡部正夫、松原瑞浦、小西晃造、橋爪 誠 日本機械学会 第20回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, pp.257-258, 2007
- 77) Ohta M, Kai S, Endo Y, Eguchi H, Iwaki K, Hirashita T, Shibata K, Kitano S. Laparoscopic splenectomy aimed at interferon therapy in patients with chronic hepatitis C and hypersplenism. Endoscopic and Laparoscopic Surgeons of Asia (ELSA) 2008, 2008 9.5-6, Yokohama, Poster
- 78) 太田正之 門脈圧亢進症性胃症の病態-HSPを含めて 第15回日本門脈圧亢進症学会総会 2008 11.20-21、福岡 ランチョンセミナー
- 79) 江口英利、岩城堅太郎、甲斐成一郎、太田正之、北野正剛 胃静脈瘤に対するHistoacrylを用いた内視鏡的硬化療法の手技と成績 第15回日本門脈圧亢進症学会総会 2008 11.20-21、福岡、ビデオワークショップ
- 80) 平下禎二郎、太田正之、江口英利、遠藤裕一、岩城堅太郎、柴田浩平、甲斐成一郎、北野正剛 門脈圧亢進症における門脈血栓症の治療 第15回日本門脈圧亢進症学会総会 2008 11.20-21、福岡、一般演題
- 81) Sakaki M, et al. Intrahepatic regulatory T cells in autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis and hepatitis C. 5th JSH single topic conference "liver and immune disorder: new insights from pathogenesis to treatment". September 29-30, 2006, Nagasaki, Japan.
- 82) Sakaki M, et al. Intrahepatic status of regulatory T cells in autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, chronic hepatitis C, and chronic hepatitis B. 58th AASLD. November 2-6, 2007, Boston, USA.
- 83) Morikawa H, Tamori A, Kawamura E, Enomoto M, Takeda T, Habu D, Sakaguchi H, Nishiguchi S, Shiomi S, Kawada N. Induction of fibrotic gene expression by adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the rat liver. United European Gastroenterology Week 2007. (Paris) 2007年10月.
- 84) 森川浩安、田守昭博、塩見 進、他. 特発性門脈圧亢進症におけるCTGF発現について. 第11回日本肝臓学会大会(神戸) 2007年10月.
- 85) 藤森祐多、山田貴之、小嶋哲人ら: 第VIII因子遺伝子のイントロン22逆位解析法-DNAポリメラーゼの比較- 第9検査血液学会 三重 (2008.7)
- 86) Morikawa H, Shiomi S, Kawamura E, Kobayashi S, Iwai S, Enomoto M, Tamori A, Sakaguchi H, Kawada N. Induction of fibrotic gene expression by adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the rat liver. The 7th JSH Single Topic

Conference "Hepatic Hemodynamic Disorder", (Fukuoka) 2008年11月.

- 87) 宮脇由理、鈴木敦夫、田中亮子、中島大輔、藤森祐多、山田貴之、奥村 薫、高木 明、村手隆、松下 正、高松純樹、小嶋哲人：女性血友病Aの1例 第9回愛知県医学検査学会、豊橋
- 88) 小嶋哲人：シンポジウム2「血栓性素因の病態と診断の進歩」：血栓性素因のとしてのATとPC異常 第9回日本検査血液学会学術集会、津
- 89) 藤森祐多、山田貴之、奥村 薫、田中亮子、中島大輔、鈴木敦夫、宮脇由理、高木 明、村手隆、小嶋哲人：第VIII因子遺伝子のイントロン22逆位解析法—DNAポリメラーゼの比較— 第9回日本検査血液学会学術集会、津
- 90) 古畑彩子、村上真史、高 四強、木村有美、伊藤裕美、高木 明、小嶋哲人、安部明弘、直江知樹、村手 隆：GATA-1、GATA-2によるWT1発現調節の解析 第70回日本血液学会総会、京都
- 91) 柏木隆宏、松下 正、伊藤康友、高木 明、村手 隆、勝見 章、平島寛司、直江知樹、小嶋哲人：新規 Group I 変異 L1503R の von Willebrand 病 type 2A 発症における役割 第70回日本血液学会総会、京都
- 92) 宮田敏行、川崎富夫、辻 肇、窓岩清治、坂田洋一、小嶋哲人、村田 満、阪田敏幸、竹下聡、小久保喜弘、小亀浩一、岡田裕美、池田康夫：日本人の血栓症の遺伝的背景に関する調査研究 第70回日本血液学会総会、京都
- 93) 藤森祐多、奥村 薫、山田貴之、田中亮子、中島大輔、鈴木敦夫、宮脇由理、村手 隆、高木明、小嶋哲人：日本人における血栓性素因遺伝子変異データベースの作成 第70回日本血液学会総会、京都
- 94) 宮脇由理、鈴木敦夫、田中亮子、中島大輔、藤森祐多、山田貴之、奥村 薫、高木 明、村手隆、松下 正、高松純樹、小嶋哲人：女性血友病Aの分子病態解析 第31回日本血栓止血学会学術集会、大阪
- 95) 小嶋哲人：「抗血栓薬の最近の進歩」関連学会
- ジョイントシンポジウム 日本循環器学会 第31回日本血栓止血学会学術集会、大阪
- 96) 田中亮子、中島大輔、鈴木敦夫、宮脇由理、藤森祐多、山田貴之、奥村 薫、勝見 章、山本晃士、松下 正、高松純樹、高木 明、村手隆、小嶋哲人：先天性凝固第VII因子欠損症の分子病態解析 第31回日本血栓止血学会学術集会、大阪
- 97) 平島寛司、柏木隆宏、松下 正、伊藤康友、高木 明、村手 隆、勝見 章、直江知樹、小嶋哲人：新規 Group I 変異 L1503R の von Willebrand 病 type 2A 発症における役割 第31回日本血栓止血学会学術集会、大阪
- 98) H Ito, M Murakami, S Gao, A Furuhata, K Yoshida, Y Tagawa, S Sobue, A Takagi, T Kojima, M Suzuki, Y Banno, Y Nozawa, K Koizumi, T Murate: Regulatory mechanism of neutral sphingomyelinase 2 gene expression by daJnorubicin in MCF-7 cells. 第31回日本分子生物学会、神戸
- 99) S Gao, M Murakami, H Ito, A Furuhata, K Yoshida, Y Tagawa, S Sobue, A Takagi, T Kojima, Y Banno, M Suzuki, Y Nozawa, T Murate: Mutated Ras-induced, phospholipase D1 transcripton in a human colon adenocarcinoma cell line, DLD-1. 第31回日本分子生物学会、神戸
- 100) M Murakami, H Ito, S Gao, A Furuhata, K Yoshida, Y Tagawa, S Sobue, A Takagi, T Kojima, M Suzuki, Y Banno, Y Nozawa, T Murate: ATRA inhibits ceramide kinase transcription through an ATRA-related transcription factor, COU⁻TF1, in a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y cells. 第31回日本分子生物学会、神戸
- 101) 祖父江沙矢加、村上真史、坂野喜子、伊藤裕美、高 四強、古畑彩子、高木 明、小嶋哲人、野澤義則、村手 隆、市原正智：v-Src によるSPHK1 mRNA 安定化と発現増強 第31回日本分子生物学会、神戸

- 102) 稲福 斉、前田達也、中村修子、喜瀬勇也、上原 協、上原忠大、盛島裕次、仲栄真盛保、兼城隆雄、新垣勝也、平安恒男、山城 聡、國吉幸男. Budd-Chiari 症候群に対する直視下根治術. 第35回 沖繩肝臓研究会. 那覇. 2008. 2. 16.
- 103) 稲福 斉、前田達也、喜瀬勇也、盛島裕次、永野貴昭、新垣勝也、山城 聡、國吉幸男. Budd-Chiari 症候群の肝細胞癌に対しラジオ波焼灼を併用した肝部分切除症例の検討. 第108回 日本外科学会. 長崎. 2008. 5. 15.
- 104) 稲福 斉、前田達也、中村修子、喜瀬勇也、仲栄真盛保、盛島裕次、新垣勝也、山城 聡、國吉幸男. 肝静脈圧測定が有用であった Budd-Chiari 症候群に対する直視下根治術の1治療例. 第28回 日本静脈学会. 箱根. 2008. 6. 12.
- 105) 佐藤保則、北尾 梓、佐々木素子、原田憲一、中沼安二. 肝線維化における endothelial to mesenchymal transition (EndMT) の関与-基礎的検討. 第44回日本肝臓学会総会、2008年6月、愛媛.
- 106) 北尾 梓、佐藤保則、佐々木素子、原田憲一、中沼安二. 特発性門脈圧亢進症 (IPH) の末梢門脈枝閉塞機序に関する検討-Endothelial to mesenchymal transition (EndMT) の関与に注目して. 第44回日本肝臓学会総会、2008年6月、愛媛.
- 107) Nakanuma Y. Classification and pathological findings of non-cirrhotic portal hypertension. 18th World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists, October 2008, Istanbul, Turkey.
- 108) Nakanuma Y. Natural course of non-cirrhotic portal hypertension (idiopathic portal hypertension). 18th World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists, October 2008, Istanbul, Turkey.
- 109) Sato Y, Kitao A, Sawada S, Sasaki M, Harada K, Nakanuma Y. Endothelial-to-mesenchymal transition via transforming growth factor-beta1/Smad activation is essential for portal venous stenosis in idiopathic portal hypertension. 18th World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists, October 2008, Istanbul, Turkey.
- 110) Nakanuma Y. Pathology and pathogenesis of idiopathic portal hypertension. 第7回日本肝臓学会シングルトピックカンファレンス、2008年11月、福岡
- 111) 佐藤保則、北尾 梓、佐々木素子、原田憲一、中沼安二. 特発性門脈圧亢進症の病態形成における TGF- β 1 の関与-門脈内皮細胞の筋線維芽細胞様細胞への形質変換に着目して. 第15回日本門脈圧亢進症学会総会、2008年11月、福岡
- 112) 峯村莊子、水本英明、秦佐智雄、小林照宗、安藤 健、松谷正一. 胃食道静脈瘤治療後に増悪した直腸静脈瘤に対し経皮経肝塞栓術 (PTO) が有効であった1例. 第556回日本内科学会関東地方会 2008年 9月 東京
- 113) 松谷正一、福沢 健、水本英明、丸山紀史、横須賀収. 腹部エコーからみた門脈圧亢進症の病態-進行に伴った血行動態の変化について- 第15回日本門脈圧亢進症学会総会 2008年 11月 福岡
- 114) Okugawa H, Maruyama H, Kobayashi S, Yoshizumi H, Matsutani S, Yokosuka O. Therapeutic effect of balloon-occluded retrograde transvenous obliteration for gastric varices in relation to hemodynamics in the short gastric vein. Seventh JSH Single Topic Conference "Hepatic Hemodynamic Disorder". November 2008, Fukuoka Japan
- 115) 渡辺悠人、水本英明、辰巳優子、小林照宗、安藤 健、松谷正一. 経皮的血管形成術を施行したバッド・キアリ症候群の1例. 第302回日本消化器病学会関東支部例会 2008年 12月 東京

- 116) 濱崎幸司、江口 晋ら 門脈の一時的閉塞により肝組織はどの様に変化するか？ 第63回日本消化器外科学会 2008. 7/16-18 札幌.
- 117) 高槻光寿、江口 晋、兼松隆之ら、生体肝移植における門脈の血行異常 第15回日本門脈圧亢進症学会総会
- 118) Eguchi S, Kanematsu T et al. Acute Deterioration of Idiopathic Portal Hypertension Requiring Living Donor Liver Transplantation: A Case Report. 7th JSH Single Topic Conference "Hepatic Hemodynamic Disorder"
- 119) Yoshida H, Mamada Y, Taniai N, Tajiri T. New trend of surgical treatment for portal hypertension. JSH Single Topic Conference 2008.11.22

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ. 分担研究報告

【前期】

特発性門脈圧亢進症の病因・病態に関する解析と動物モデルの作製

分担研究者 塩見 進（大阪市立大学大学院医学研究科核医学教授）

研究要旨

研究要旨：特発性門脈圧亢進症 (IPH) の病因・病態解明のため IPH 特異タンパクの解析をPBCを対照として行った。血清を検体としてプロテインチップシステムを用い、タンパク重量の解析は TOF 型チップリーダーを使用した。IPH に特異的に発現していたのは 7770Da と 9290Da のタンパク質であり、PBC に特異的に発現していたのは 8935Da のタンパク質であった。今後肝組織についても同様の検討を行い、血清のデータとの比較を行いたい。さらに可能ならば IPH に多く発現しているタンパクの同定を行う予定である。

さらに、IPH の動物モデル作製の目的で、connective tissue growth factor (CTGF) 遺伝子組み換えアデノウイルスをラットに静注することにより、肝臓へのCTGF遺伝子導入を検討した。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。肝組織での遺伝子発現は炎症に関する遺伝子発現は3日目のみであったが、線維化に関する遺伝子発現は顕著に亢進し、その発現は3日目、7日目共に亢進していた。今後は TGF- β 併用投与や TAA 併用投与による遺伝子発現の解析も行い、CTGF 単独投与群との比較を行うことにより IPH における肝線維化の解析を進めていきたい。さらにIPH患者に関して、遺伝子解析のインフォームドコンセントを得られた検体において同様の解析を行う予定である。

共同研究者

川村悦史（大阪市立大学核医学 研究医）
森川浩安（大阪市立大学肝胆膵内科 講師）
榎本 大（同 講師）
田守昭博（同 准教授）
河田則文（同 教授）

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た。^{2) 3)} そのため CTGF を用いた動物モデル作製を計画した。すなわち human CTGF の mRNA から cDNA を作製し、アデノウイルスへの遺伝子導入を行った。このウイルスを肝臓に感染させることにより、CTGF を発現させ、動物モデルの作製を試みた。

A. 研究目的

特発性門脈圧亢進症 (IPH) の病因・病態の解析を行うことは将来の IPH に対する治療を行う上においても重要である。我々は検体保存センターの IPH 症例の血清を用い、ELISA 法にて測定した connective tissue growth factor (CTGF) 値は健常者や C 型慢性肝炎患者に比べ異常高値を示す症例が存在することを明らかにした。¹⁾ さらに、IPH の肝組織における mRNA の発現の検討では、IPH の特

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検出することができるようになってきた。IPH に特異的に発現するタンパクを解析するため、プロテインチップシステムを用いタンパク質の解析を検討した。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。このことにより IPH 特異タンパクの解析を試みた。

B. 研究方法

IPH 特異タンパクの解析: IPH の病因・病態の解析のためIPHに特異的に発現するタンパクの解析を行った。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。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。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。

IPH動物モデルの作製: 7週齢SPF/VAF雄性ラット(Wistar系)にCTGF遺伝子組み換えアデノウイルスを静注した。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)を作製した。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。

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、遺伝子解析を行った。Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technology社)を用いたRNAクオリティチェックを行い、このRNAを用いた標準的1サイクル法によりcDNAを合成し、ピオチン化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のスキャンを行った。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。

(倫理面への配慮)

本研究は大阪市立大学倫理委員会および実験動物委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

IPH 特異タンパクの解析: 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、pH 6.0、変性条件での7770Daおよび9290Daのタンパク質であった。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。

IPH動物モデルの作製: adeno-CTGF投与3日目の肝臓にはCTGFの発現を認めたが、7日目およびadeno-LacZ投与3日目、7日目の肝臓では認めなかった。肝組織に関してはadeno-CTGF投与3日目、7日目は著変を認めなかった。遺伝子発現に関して、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。炎症に関する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。線維化に関する発現遺伝子群は263遺伝子であり、投与3日目、7日目共に多くの遺伝子で亢進し、約半数が3日目より7日目に発現亢進していた。クラスター解析においても、線維化関連遺伝子群は亢進群の中でも7日目に亢進するクラスター内に多く含まれていた。

D. 考 察

我々はIPHに特異的に発現するタンパクを調べるためにIPH患者の血清を用いプロテインチップシステムとTOF型のチップリーダーによりタンパクの重量を測定した。プロテインチップを用いた測定には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。

今回、対照として 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。今後、肝組織でも同様の検討を行い、血清の解析で得られたデータとの比較検討が必要である。さらに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タンパクの同定を行いたい。

一方、CTGF の肝線維化における役割、機能解析を進めるためには動物モデルの作製が必要である。しかし、胚移植によるトランスジェニックマウスやノックアウトマウスの作製は発育・継代が困難であるため、アデノウイルスを用いた遺伝子導入法を検討した。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 日目では認めず、CTGF の発現は一過性であった。また、肝組織の検討においても炎症所見や線維化は認めなかった。網羅的遺伝子解析では線維化に関する遺伝子発現は 3 日目、7 日目共に亢進しており、3 日目と 7 日目を比較すると約半数が 7 日目の方が亢進していた。クラスタリング解析にても同様の結果であった。すなわち CTGF の肝臓での発現により一過性の炎症に関する遺伝子発現が起こるが、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 モデルの作製が可能であることが示唆された。遺伝子発現に関して、TGF- β や TAA 併用群において遺伝子発現の解析を行い、CTGF 単独投与群との比較を行うことにより IPH における肝線維化の解析を進めていきたい。さらに IPH 患者に関して、遺伝子解析のインフォームドコンセントを得ら

れた検体において同様の解析を行う予定である。

E. 結 論

IPH の病因・病態解明を行うため、IPH 特異タンパクの解析を IPH と PBC 患者の血清を用いて行ったが、健常者との比較や肝組織での解析も行う必要がある。さらにインフォームドコンセントを得た IPH 患者において gene chip を用いた遺伝子異常の検討を行う予定である。

IPH 動物モデルの作製に関して、CTGF 単独投与において線維化に関する遺伝子の持続的高発現を認めた。今後は TGF- β 併用投与や TAA 併用投与による遺伝子発現の解析も行い、TGF- β や TAA の相乗効果による遺伝子の発現の差異を検討する予定である。

F. 文 献

1. 塩見 進、森川浩安、西口修平、金田研司、滝川正春：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、中西 徹、滝川正春：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. Morikawa H, Tamori A, Nishiguchi S, Enomoto M, Habu D, Kawada N, Shiomi S. Expression of connective tissue growth factor in the human liver with idiopathic portal hypertension. *Mol Med* 2007;13: 240-245.

G. 研究発表

1. 論文発表

Morikawa H, Tamori A, Nishiguchi S, Enomoto M, Habu D, Kawada N, Shiomi S. Expression of connective tissue growth factor

in the human liver with idiopathic portal hypertension. Mol Med 2007;13. 240-245.

2. 学会発表

1. Morikawa H, Tamori A, Kawamura E, Enomoto M, Takeda T, Habu D, Sakaguchi H, Nishiguchi S, Shiomi S, Kawada N. Induction of fibrotic gene expression by adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the rat liver. United European Gastroenterology Week 2007. (Paris) 2007年10月。
2. 森川浩安、田守昭博、塩見 進、他. 特発性門脈圧亢進症における CTGF 発現について. 第11回日本肝臓学会大会（神戸）2007年10月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Budd-Chiari症候群の病理学的研究

—肝細胞癌の発癌機序における酸化ストレスに関する検討計画—

分担研究者 鹿毛 政義（久留米大学医学部病理学教室教授）

研究要旨

Budd-Chiari症候群（BCS）は、進行性の慢性疾患であり、肝硬変に至ると肝細胞癌が高率に合併する。しかしながら、BCSにおける発癌については、不明な点が多い。我々は、BCSの肝臓の酸化ストレスについてネパールのBSCを対象とした免疫組織化学の結果、BCSの肝臓では、高酸化ストレス状態にあり、酸化ストレスが本症の病態形成や病変の進行に関与することを報告してきた。今回、琉球大学のBCSを対象にBCSの発癌の機序を酸化ストレスの観点から検討する予定である。

共同研究者

秋葉 純、高須 修、緒方俊郎

（久留米大学医学部病理学教室）

國吉幸男（琉球大学医学部機能制御外科学分野）

報告してきた¹⁾。高酸化ストレス状態が、肝細胞癌の発生に促進的に作用することが報告されており²⁾、今回、BCSの肝発癌を酸化ストレスの観点から検討することとした。

はじめに

Budd-Chiari症候群（BCS）に肝細胞癌が合併することはよく知られている。BCSの肝細胞癌の合併頻度は、約40%と高率の報告¹⁾もあるが、平成3年度の厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班の全国調査では、6.4%と報告されている。一方、琉球大学医学部機能制御外科学分野の症例では、BCS症例46例中11例（24%）に肝細胞癌の合併を認めている。また、肝細胞癌を合併するBCSの非腫瘍部では、通常慢性ウイルス性肝疾患に見られるdysplasia²⁾やうっ血性肝硬変あるいは種々の程度の肝線維症が観察される³⁾。

これまでに我々は、ネパールのBCS症例を対象にBCSでは、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)の発現が亢進していることを

対象と方法

琉球大学機能制御外科学講座で、外科的切除されたBCSにて手術が施行された46例を対象とする。46例の内訳は、男：女=16：30、平均年齢48.9歳。そのうち11例に肝細胞癌の合併を認めた。これら肝細胞癌を合併したBCS症例は、男：女=5：6、平均51.1（27～76）歳であった。対照として久留米大学病院にて外科的に切除されたC型肝炎関連肝細胞癌症例45例の非腫瘍部を用いる。琉球大学の症例は、琉球大学の倫理委員会を経て、患者のインフォームドコンセントが得られた症例で、当研究班検体保存センターに登録されている症例を用いる。

切除された組織をホルマリン固定後、パラフィンに包埋する。パラフィンブロックを薄切したのち、HE、Azan、鍍銀染色標本作製、BCS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型に分類する。さらに酸化ストレスマーカーであ

る 8-OHdG および抗酸化ストレスマーカーである MnSOD の免疫染色を ABC 法にて行う。免疫染色の結果について、8-OHdG と MnSOD の発現の強度をそれぞれの症例について、0: 発現なし、1: 軽度、2: 中程度、3: 高度の4段階に評価した。Mann-Whitney のU検定を用い、肝細胞癌の有無、BCS 群と対照群および BCS の病期間の 8-OHdG と MnSOD の各々の発現強度の比較を行う。

予想される結果および考察

欧州での BCS 症例は、急性発症型が多く、予後も不良である⁹⁾と報告されているが、アジア、アフリカなどで見られる BCS の多くは一般的には慢性に経過するとされる。ともに下大静脈閉塞が、その原因であるが、慢性に経過する本邦の BCS 症例では、肝血流うっ滞による肝線維症あるいは肝硬変がみられる。我々のこれまでのネパールの BCS 症例での検討では、8-OHdG と MnSOD の発現は、ともに亢進しており、特に MnSOD 発現は、肝線維化の進行とともに亢進していた⁹⁾。また、HCV 関連の慢性肝炎を対象にした検討でも、8-OHdG の高発現が肝発癌の risk-factor であることが報告されている¹⁰⁾。これらのことから、今回我々が使用する BCS 症例でも酸化ストレスマーカーや抗酸化ストレスマーカーの発現が亢進していることが予測され、肝細胞癌の発生を伴う BCS と肝細胞癌の発生を欠く BCS での違いを検討することは非常に有益であると考えられる。また、これまでの検討から今回使用する症例の非腫瘍部では、旺盛な肝再生を示唆する dysplasia が顕著である¹¹⁾。BCS における酸化ストレスの亢進および旺盛な肝再生機転が、単独あるいは複合的に作用し、発癌に関与するものと想像され、BCS における発癌の機序を理解する一助になるものと思われる。

参考文献

- 1) Kew MC, Mcknight A, Hodgkinson J, Bukofzer S, Esser JD. The role of membranous obstruction of the inferior vena cava in the etiology of hepatocellular carcinoma in Southern African Blacks. *Hepatology*. 1989 Jan;9(1):121-5.
- 2) 鹿毛政義 沖縄の Budd-Chiari 症候群の肝病理形態. 厚生労働省特定疾患、門脈血行異常症調査研究班研究報告書 2005
- 3) 鹿毛政義 Budd-Chiari 症候群に合併した肝細胞癌症例の検討. 厚生労働省特定疾患、門脈血行異常症調査研究班研究報告書 2004: 14-17
- 4) 鹿毛政義、秋葉 純、高須 修、谷川 健 Budd-Chiari 症候群の肝の酸化ストレス. 厚生労働省特定疾患、門脈血行異常症調査研究班研究報告書 2007: 25-28
- 5) Tanaka H, Fujita N, Sugimoto R, Urawa N, Horiike S, Kobayashi Y, Iwasa M, Ma N, Kawanishi S, Watanabe S, Kaito M, Takei Y. Hepatic oxidative DNA damage is associated with increased risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Br J Cancer*. 2008 Feb 12;98(3):580-6.
- 6) Pasic M, Senning A, Von Segesser I, Carrel T, Tunira M. Transcaval liver resection with hepatoatrial anastomosis for treatment of patient with Budd-Chiari syndrome. Late results. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1993; 106: 275-82.

門脈圧亢進症における肝内の血管内皮細胞の関与 - Endothelial to mesenchymal transition (EndMT)の観点から TGF- β が門脈圧亢進症の病態に及ぼす影響

分担研究者 中沼 安二（金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学教授）

研究要旨

我々は特発性門脈圧亢進症（IPH）における肝内末梢門脈枝の硬化・潰れには、TGF- β 1/Smadを介した門脈血管内皮細胞の筋線維芽細胞様細胞への形質変換（endothelial to mesenchymal transition, EndMT）が関与している可能性を報告してきた。今回、培養血管内皮細胞（human dermal microvascular endothelial cell, HMVEC）を用いたEndMTの可逆性に関する基礎的検討、およびIPH患者における血清TGF- β 1濃度の定量を行った。HMVECをTGF- β 1で刺激すると細胞形態が類上皮様から紡錘形へと変化し、pSmad2の発現誘導と培養上清におけるコラーゲン濃度の有意な増加を認めた。TGF- β 1刺激を取り除くことによりHMVECの細胞形態は再び類上皮様となり、pSmad2の発現と培養上清中のコラーゲン濃度も低下した。また、IPH患者血清中のTGF- β 1濃度は 53.0 ± 23.4 ng/ml（ $n = 66$ ）であり、健常成人の 40.3 ± 17.6 ng/ml（ $n = 16$ ）と比較して有意に高値を示した。以上より、EndMTは可逆性の変化でありEndMTの抑制がIPHの治療標的となる可能性が示唆された。また、IPHで生ずる門脈血管内皮細胞のEndMTには血中TGF- β 1濃度の上昇が関与していると考えられた。

A. 研究目的

昨年度の本班会議で、我々は特発性門脈圧亢進症（IPH）における肝内末梢門脈枝の硬化・潰れには、門脈血管内皮細胞の筋線維芽細胞様細胞への形質変換（endothelial to mesenchymal transition, EndMT）が関与していることを提唱した（1,2）。EndMTはtransforming growth factor- β 1（TGF- β 1）とSmadの活性化を介した反応であり（3）、我々のこれまでの検討では、培養血管内皮細胞にTGF- β 1を作用させると血管内皮マーカー（CD34）の発現減少、筋線維芽細胞マーカー（S100A4, α -SMA）の発現誘導がみられ、血管内皮細胞におけるコラーゲン産生が有意に増加した（1）。さらに、

IPH症例の肝組織切片を用いた免疫組織化学的検討でも、IPHの末梢門脈内皮細胞でEndMTが生じていることを支持する成績を得ている（2）。

今回、IPHの末梢門脈枝の硬化・潰れにおけるEndMTの関与をさらに検討する目的で、培養血管内皮細胞を用いたEndMTの可逆性に関する基礎的検討、およびIPH患者における血清TGF- β 1濃度の測定を行った。

B. 研究方法

培養血管内皮細胞としてhuman dermal microvascular endothelial cell（HMVEC）を使用した。HMVECをTGF- β 1（10 ng/ml）存在下で5日間培養しEndMTを誘導した後、さらにTGF- β 1

非添加培地で7日間培養し、細胞形態の変化、pSmad2 (TGF- β 細胞内シグナル伝達分子) 陽性率、培養上清中のコラーゲン濃度を検討した。また、IPH 患者血清 (末梢血, $n = 66$) における TGF- β 1 濃度を ELISA 法にて測定し、健常成人 ($n = 16$) との比較を行った。統計学的解析は Mann-Whitney U -test によった。

C. 研究結果

HMVEC を TGF- β 1 存在下で5日間培養すると、細胞形態が類上皮様から紡錘形へと変化した (図1)。ここで TGF- β 1 を取り除きさらに7日間培養したところ、細胞形態が再び類上皮様に变化した (図1)。免疫細胞化学により HMVEC における



図1 TGF- β 1 投与による培養血管内皮細胞の細胞形態の変化

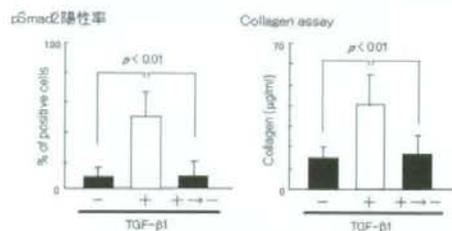


図2 TGF- β 1 投与による培養血管内皮細胞の pSmad2 陽性率と培養上清コラーゲン濃度

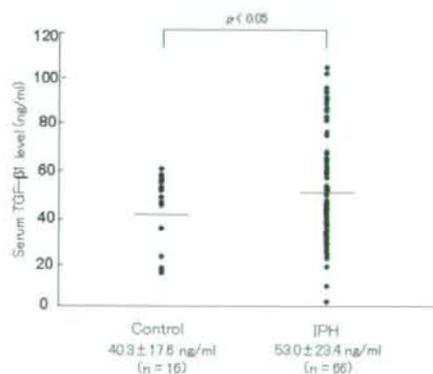


図3 IPH患者血清 (末梢血) における TGF- β 1 濃度

pSmad2 陽性率を検討した結果、TGF- β 1 存在下では pSmad2 陽性率は TGF- β 1 非存在下と比較して有意な増加を示したが、TGF- β 1 を取り除くことで pSmad2 陽性率は再度低下した (図2)。培養上清中のコラーゲン濃度も pSmad2 陽性率と同様の傾向を示した (図2)。

IPH 患者血清中の TGF- β 1 濃度は 53.0 ± 23.4 ng/ml (mean \pm SD, $n = 66$) であり、これは健常成人の 40.3 ± 17.6 ng/ml ($n = 16$) と比較して有意に高値であった (図3)。

D. 考察

今回の培養血管内皮細胞を用いた基礎的検討から、TGF- β 1 による血管内皮細胞の EndMT は可逆性の変化である可能性が示された。IPH での末梢門脈枝の硬化・潰れが EndMT によると仮定した場合、EndMT が可逆性であるということは、EndMT の阻害により IPH での門脈圧亢進症が改善する可能性を示唆しており、これは IPH の治療という観点から重要な結果であると考え、TGF- β 1 による EndMT の抑制分子として TGF- β アンタゴニストである bone morphogenic protein 7 (BMP-7) が同定されており (3)、今後、IPH の治療標的としての EndMT という観点から、BMP-7 に着目した検討も行っていきたい。

今回の検討で IPH 患者血清中の TGF- β 1 濃度は健常成人に比して有意に高い値を示した。現在まで IPH 患者における血清 TGF- β 1 濃度に関する論文報告はないが、慢性ウイルス性肝炎/肝硬変における患者血清中の TGF- β 1 濃度は健常人の約2倍と報告されている (4,5)。IPH において血清 TGF- β 1 値が健常人より有意に高値であることは、IPH における EndMT の関与を支持する興味深い成績である。

我々の以前の検討で、正常肝では免疫組織化学的に pSmad2 の発現はほとんどないが、IPH では約7割の症例において門脈血管内皮細胞に pSmad2 の陽性所見を認めた (2)。また、門脈血管内皮細胞が pSmad2 陽性を示す症例の大部分は、肝細胞もびま

ん性に pSmad2 陽性であった。今回の検討で IPH では血中 TGF- β 1 濃度が有意に上昇していることが明らかとなり、pSmad2 陽性を示す症例は肝全体において TGF- β シグナリングが亢進している可能性が示唆された。TGF- β は肝細胞に対して増殖抑制効果とアポトーシス誘導効果を有しており (6,7)、IPH でみられる肝萎縮に TGF- β 1 が関与している可能性も考えられる。

今後、上述した BMP-7 に関する検討に加えて、IPH における TGF- β 1 産生臓器・産生細胞の同定や、血清 TGF- β 1 レベルと門脈圧亢進症の程度・長期予後との関連について検討していきたい。加えて我々は以前、肝移植の適応となった予後不良 IPH 症例は肝線維化が進行した傾向にあることを報告したが (8)、こうした予後不良 IHP 症例を TGF- β シグナリングの観点から再度検証したいと考えている。

E. 結 論

IPH では、TGF- β 1 による門脈血管内皮細胞の EndMT が病態形成に深く関与している可能性がある。

謝辞

稿を終えるにあたり IPH 患者血清をご供与いただきました大阪市立大学肝胆膵病態内科学 森川浩安先生に深謝いたします。

F. 文 献

1. 中沼安二、門脈血行障害に関する基礎的検討。厚生労働省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成19年度報告書。
2. 中沼安二、特発性門脈圧亢進症 (IPH) における末梢門脈枝閉塞機序の成因に関する検討。厚生労働省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成19年度報告書。
3. Zeisberg EM et al. Endothelial to mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 2007;13:952-61.

4. Kirmaz c et al. Serum transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in patients with cirrhosis, chronic hepatitis B and chronic hepatitis C. *Eur Cytokine Nets* 2004;15:112-6.
5. Guido M et al. Effects of interferon plus ribavirin treatment on NF-kappaB, TGF-beta1, and metalloproteinase activity in chronic hepatitis C. *Mod Pathol* 2006;19:1047-54.
6. Nguyen LN et al. Transforming growth factor-beta differentially regulates oval cell and hepatocyte proliferation. *Hepatology* 2007;45:31-41.
7. Oberhammer F et al. Effect of transforming growth factor beta on cell death of cultured rat hepatocytes. *Cancer Res* 1991;51:2478-85.
8. 中沼安二、予後不良 IPH 症例の臨床病理学的検討—肝移植例を中心に、厚生労働省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成17年度報告書。

G. 研究発表

学会発表

1. 佐藤保則、北尾梓、佐々木素子、原田憲一、中沼安二、肝線維化における endothelial to mesenchymal transition (EndMT) の関与—基礎的検討。第44回日本肝臓学会総会、2008年6月、愛媛。
2. 北尾梓、佐藤保則、佐々木素子、原田憲一、中沼安二、特発性門脈圧亢進症 (IPH) の末梢門脈枝閉塞機序に関する検討—Endothelial to mesenchymal transition (EndMT) の関与に注目して、第44回日本肝臓学会総会、2008年6月、愛媛。

知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

バッドキアリ症候群機序解明のための イメージベースド CFD による流体力学的解析

分担研究者 橋爪 誠（九州大学大学院医学研究院災害・救急医学教授）

研究要旨

肝静脈一下大静脈合流部の狭窄症であるバッドキアリ症候群の主原因は、これらの血管内で発生する血栓である可能性が高い。またこの部位での血栓の形成には、高壁面せん断応力・よどみ域の形成などの流体力学的な因子が関与している可能性が以前より指摘されている。本研究では医療画像を用いた数値流体解析を行うことでこれらの血管内流れ場の再現を行い、血栓形成に寄与する流体力学的因子の調査を行う。

共同研究者

渡部正夫、松原瑞浦（九州大学大学院工学研究院）

小西晃造（九州大学大学院医学研究院）

Fluid Dynamics: CFD) による非定常解析を行い、主要肝静脈一下大静脈内流れ場の再現を図る。

C. 研究結果

A. 研究目的

Budd-Chiari 症候群の主原因であるとされる、主要肝静脈および下大静脈合流部付近での血栓形成原因を調査するため、医用画像を用いたイメージベースド CFD により、この部位での内部流れ場の再現を行い、血栓形成に寄与する流体力学的因子の調査を行う。

数値流体解析を行った結果、すべての協力者の血管モデルで、流速の増加に伴い、主要肝静脈一下大静脈合流部付近に強い壁面せん断応力が働くことが分かった（図1、2）。また、流速の増加に伴い、下大静脈背面にも強いせん断応力が働くことが分かった（図3）。また流線を可視化したところ、時刻によって、主要肝静脈からの流れが下大静脈内の流れを乱すことが分かった。

B. 研究方法

健常協力者の MRI の撮影を行い、高精度な境界面追跡法であるレベルセット方を用いて、主要肝静脈一下大静脈合流部の血管モデルを3次元的に構築してきた。今回、同協力者に対して超音波ドップラー血流速度測定を行い、主要肝静脈および下大静脈内血流速度の時間変化を測定し、その結果を血管の入口流速として設定し、数値流体解析 (Computational

D. 考 察

流速の増加と共に主要肝静脈一下大静脈合流部付近に強い壁面せん断応力が働く理由として、下大静脈上流からの流れが主要肝静脈一下大静脈合流部上側壁面にぶつかり、この部位での速度勾配が大きくなることが挙げられる。また主要肝静脈からの流れも、主要肝静脈一下大静脈合流部上側壁面を沿って下大静脈内へと流れていくが、このこともこの部位

での速度勾配が大きくなる理由として挙げられる。流線の乱れは特に主要肝静脈と下大静脈の流れの方向が異なる場合、顕著に見られる。

E. 結 論

3名の健常協力者のMRI画像から血管モデルを構築し、CFDによる非定常解析を行った結果、流速の増加と共に主要肝静脈-下大静脈合流部および下大静脈背面に強い壁面せん断応力が働くことが分かった。また時刻によって、主要肝静脈からの流れが下大静脈内の流れを乱すことが分かった。特に主要肝静脈と下大静脈内の流れの方向が異なる場合、下大静脈内に非常に複雑な流れが生じることが分かった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Mizuho MATSUBARA, Masao WATANABE, Satoshi WATANABE, Kozo KONISHI, Shohei YAMAGUCHI, Makoto HASHIZUME, Fluid Dynamic Study on Budd Chiari Syndrome: Sensitivity Study of Vessel Reconstruction on Image-Based Simulation, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*,

2(2): pp.69-80,2007

2. 学会発表

- (1) 渡部正夫、松原瑞浦、小西晃造、橋爪 誠
Proceedings of FEDSM2007 (ASME), CD-ROM, 2007
- (2) 渡部正夫、松原瑞浦、小西晃造、橋爪 誠 日本機械学会2007年度年次大会
講演論文集(6), pp.93-97, 2007
- (3) 渡部正夫、松原瑞浦、小西晃造、橋爪 誠 日本機械学会 第18回バイオフロンティア講演会
講演論文集, 2007
- (4) 渡部正夫、松原瑞浦、小西晃造、橋爪 誠 日本機械学会 第20回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, pp.257-258,2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

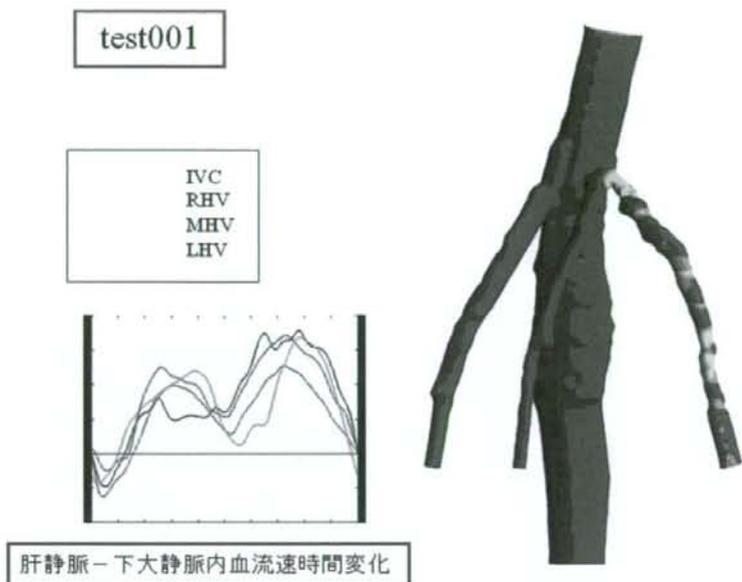


図1 - 壁面せん断応力の時間変化

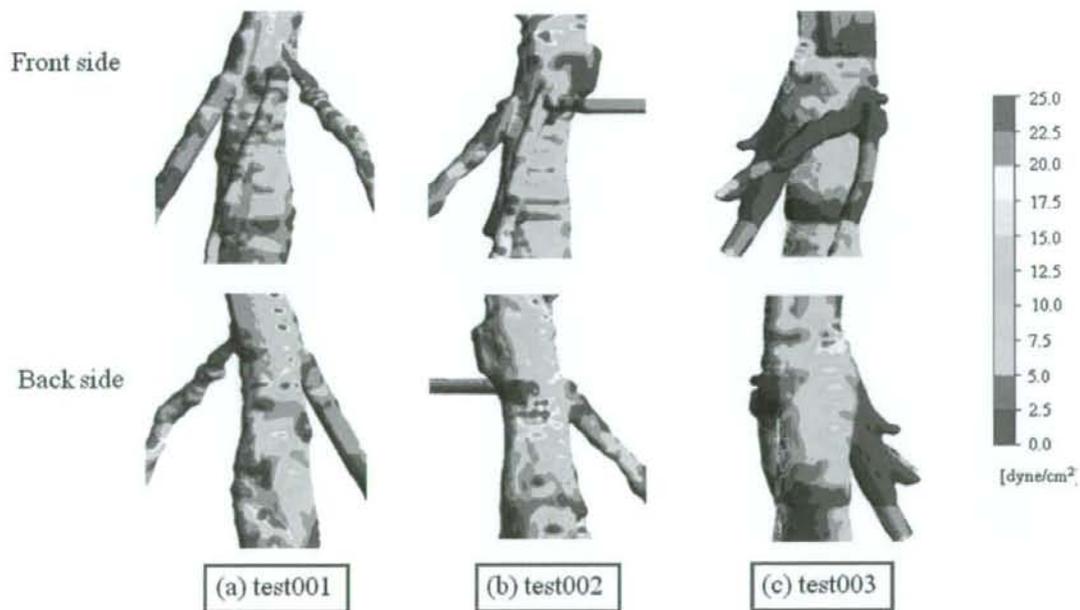


図2 - 下大静脈内最大流速時の壁面せん断応力

流线 + 縦渦

縦渦とは、主流方向の
軸周りを回転する渦

オレンジの等値面: 10m/s^2
青の等値面: -10m/s^2

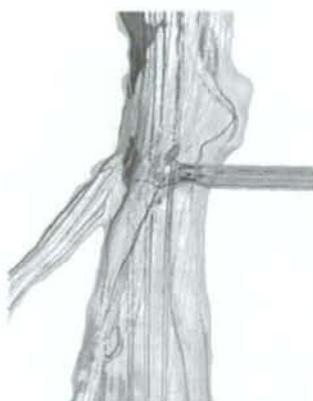


$$\vec{h} = \vec{v} \times \vec{\omega}$$

\vec{h} : 縦渦, \vec{v} : 速度, $\vec{\omega}$: 渦度



(a) test001



(b) test002



(c) test003

0.4
0.2
0.0
[m/sec]

図3 - 下大静脈内最大流速時の内部流れ場

特発性門脈圧亢進症における免疫異常 —FOX・P3遺伝子多型との関連—

分担研究者 馬場 俊之（昭和大学内科学講座消化器内科学部門講師）

研究要旨

特発性門脈圧亢進症（IPH）では免疫異常の関与が推測されている。我々の検討ではIPHの肝組織、脾組織内では制御性T細胞（Treg）が減少しており、IPHの自己免疫現象に関与している可能性が考えられた。今後、さらにTregがIPHにおける免疫異常にどのように関与しているか、①肝疾患における脾組織内のTreg、②末梢血中のTreg、③FoxP3のSNPsなどについて研究を進めていく予定である。

A. 研究目的

特発性門脈圧亢進症（IPH）では自己免疫疾患の合併（12%）、自己抗体陽性（40%）、高ガンマグロブリン血症（26%）などが高頻度に認められ、免疫異常の関与が推測されている。免疫の調節機構にはヘルパーT細胞（Th）1、Th2、制御性T細胞（Treg）、Th17などが複雑に関与している。IPHでは相対的にTh1優位と報告されており、Tregは減少していると予想される。

これまで我々は、IPHにおける肝組織および脾組織内のTregについて検討してきた。肝浸潤単核球中のTregの割合は、自己免疫性肝炎（AIH）、C型慢性肝疾患（HCV-CLD）、転移性肝腫瘍の正常肝組織よりも低かった。また脾組織内単核球中のTregは、腭粘液性嚢胞腺腫の正常脾組織では少数認められたが、IPHで殆ど認められなかった。以上よりIPHの肝および脾組織ではTregの減少が推測され、IPHの自己免疫現象に関与している可能性が考えられた。

今後、さらにTregがIPHにおける免疫異常にどのように関与しているか研究を進めていく予定である。

B. 研究方法

以下の研究課題について検討する予定である。

- ① AIH、HCV-CLDの脾臓におけるTreg（FoxP3陽性細胞）の解析。
- ② AIH、HCV-CLD、健常者、IPHの末梢血における制御性T細胞（4型葉酸受容体陽性細胞）の解析。
- ③ AIH、HCV-CLD、健常者、IPHにおけるFoxP3の一塩基多型（SNPs）の解析。

倫理面への配慮：検体提供者に対し十分な説明を行い、文書での同意を得る。

C. 研究結果

今後の研究結果による。

D. 考察

今後の研究結果による。

E. 結論

今後の研究結果による。

F. 文献

1. Saito K et al. Non-specific immunological

abnormalities and association of autoimmune diseases in idiopathic portal hypertension. A study by questionnaire. Hepatogastroenterology 40: 163-166, 1993

2. Tokushige, K. et al. Predominant T helper 1 cells in patients with idiopathic portal hypertension. J Gastroenterol Hepatol. 15: 1312-1317, 2000

G. 研究発表

【論文発表】

- (1) Sakaki M, et al. Intrahepatic status of regulatory T cells in autoimmune liver diseases and chronic viral hepatitis. Hepatol Res 38: 354-361, 2007

【学会発表】

- (1) Sakaki M, et al. Intrahepatic regulatory T cells

in autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis and hepatitis C. 5th JSH single topic conference "liver and immune disorder: new insights from pathogenesis to treatment". September 29-30, 2006, Nagasaki, Japan.

- (2) Sakaki M, et al. Intrahepatic status of regulatory T cells in autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, chronic hepatitis C, and chronic hepatitis B. 58th AASLD. November 2-6, 2007, Boston, USA.

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。