

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業
難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究
分担研究報告書

小児期の門脈血行異常症に関する調査研究（門脈血行異常症分科会）
Fontan 関連肝疾患における酸化ストレスの関与についての病理学的検討

研究分担者 鹿毛 政義 久留米大学先端癌治療研究センター・分子標的部門 客員教授

研究協力者 考藤 達哉 国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター

研究センター長

研究協力者 草野 弘宣 久留米大学医学部病理学教室

研究分担者 大藤 さとこ 大阪公立大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨：門脈血行異常症分科会の取り組みとして、門脈血行異常症の1つである Fontan 関連肝疾患（FALD）の実態解明を目指し、疫学調査や臨床病理学的検討を行ってきた。

我々は FALD の肝疾患の病態を明らかにする目的で、肝生検組織を対象に病理学的検討を進めている。FALD の多くの症例で、酸化ストレスマーカーの 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine（8-OHdG）の免疫組織化学的検討の結果、肝細胞の核に一致して種々の程度に 8-OHdG が肝細胞発現していることを報告した。さらに、これらの免疫組織化学的の結果について画像解析を行い、FALD の肝臓における酸化ストレスの状態を客観的に評価した。研究方法は、DAB 発色した免疫組織化学標本のデジタル画像（200 倍）を作成し、画像解析ソフト WinROOF を用いて 8-OHdG の発現総面積を症例毎に求めた。その結果、FALD の肝細胞の 8-OHdG の発現面積は、対照症例に比べ高値を示し、かつ、その発現強度は症例により大きく異なった。

FALD の症例の中には肝臓が高酸化ストレス状態にあり、その状態は症例により大きく異なることが確認された。今後、症例間の酸化ストレス発現強度の違いの成因や酸化ストレス発現とうっ血性肝病変の組織学的関連について解明を進める予定である。

A. 研究目的

研究目的は、うっ血性肝疾患である Budd-Chiari 症候群（BCS）ならびに Fontan 関連肝疾患（FALD）の実態を解明して、診断と治療のガイドラインを作成し、患者の予後と QOL の改善を図ることである。

Fontan 術は先天性心疾患に行われる手術である。術後数年から数十年の経過を経て肝うっ血を基盤に肝病変が進展し、肝硬変

に至り肝細胞癌を合併することが報告されて、Fontan 関連肝疾患（FALD）と称されている。FALD の肝障害の病態について不明な点が多い。我々は FALD の病態解析を酸化ストレスの視点から試みてきた。

FALD の肝生検組織を対象に酸化ストレスマーカーの 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine（8-OHdG）の免疫組織化学的検索を行った結果、肝細胞に種々の程度に 8OHdG の発現

が観察されたことを報告した。さらに、これらの結果を画像解析ソフトを用いて解析した。

B. 研究方法

対象症例は、8-OHdG の免疫組織化学的検討を行った FALD の針肝生検組織の 22 検体並びに対照として大腸癌肝転移に対する肝切除症例の非癌組織の 4 検体である。なお用いた抗体は抗 8-OHdG 抗体（クローン N45.1；希釈倍率 1:40）である。8-OHdG の免疫組織化学を行い DAB 発色した標本のデジタル画像（200 倍）を対象に画像解析ソフト WinROOF を用いて解析した。DAB 発色部位に疑似カラーを設定し、発色細胞の抽出を行い、発色総面積、すなわち 8-OHdG 発現総面積を症例毎に求めた。

（倫理面への配慮）

本研究で収集した情報は、研究成果を報告するまでの間、個人情報漏洩、盗難、紛失が起らないよう研究責任者、実施分担者の所属施設において厳重に保管する。また、解析の際には情報を総て数値に置き換え、個人が特定できないようにする。本研究は「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に基づいて実施する。また対象者には、不利益を蒙ることなく協力を拒否できる機会を保障する。本研究の実施については、大阪市立大学大学院医学研究科・倫理審査委員会の承認を得た（承認番号：3774）。また、協力医療機関においても必要に応じて倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. FALD 症例 21 例の針肝生検肝の病理組織学的検討の結果、うっ血肝、うっ血性肝線維症、うっ血性肝硬変にいたる様々な程度のうっ血と肝線維化の進行が観察された。
2. 肝組織における 8-OHdG の発現状態

1) 8-OHdG の発現は肝細胞の核に一致して見られた。FALD の症例の 8-OHdG の発現例を図 1 に示す。（図 1 A: 強発現例、図 1 B: 弱発現例）

2) 肝組織における 8-OHdG の発現の結果

FALD ならびに対照の各症例の肝組織における 8-OHdG の発現面積を症例毎に示す（図 2）。FALD の肝細胞の 8-OHdG の発現面積は症例により大きく異なった。対照症例の 8-OHdG の発現面積はいずれの症例も低値を示した。

3) FALD 症例 (FALD 群) と対照症例 (対照群) の肝組織の 8-OHdG の発現面積の比較

8-OHdG の発現面積の平均は、FALD 群では、 998.9 ± 1154.66 、対照群では 59.73 ± 55.94 であり、FALD 群は対照群に比して 8-OHdG の発現が高度であった（図 3）。

D. 考察

今回の FALD の肝細胞の 8-OHdG の発現状態は症例により大きく異なり、低発現症例から高発現症例まで多様であった。対照肝の 8-OHdG の発現状態は明らかに弱く、FALD の肝細胞が高酸化ストレス状態にあることが客観的に確認された。

8-OHdG は酸化ストレスマーカーであり、活性酸素種に DNA が酸化損傷を受けて生成される物質である。酸化ストレスの亢進は、細胞の代謝障害を惹起することが知られ、がんの発生要因ともみなされている。FALD の症例の中には肝臓が高酸化ストレス状態にある症例の存在が確認された。FALD 肝の酸化ストレスと肝障害の病態ならびに肝発癌との関連についての解明は今後の課題である。

E. 結論

我々の検討により FALD の肝病態に酸化ストレスの関与が確認され、かつ酸化スト

レス発現強度の症例間の違いが明確になった。症例間の酸化ストレスの発現違いが何に起因するのか、その病態は不明であり、検討すべき課題である。今後より多くの FALD 症例について臨床病理学的検討を行い、酸化ストレスの視点から FALD の病態の解明を試みたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 鹿毛政義、古市好宏、大藤さところ、隈部力、草野弘宣、近藤礼一郎、矢野博久、緒方俊郎、江森啓悟、井上博人、黒松亮子、於保和彦、田中篤. 【肝の希少疾患】特発性門脈圧亢進症. 消化器・肝臓内科 2021;9(5):555-566.

2) Kawai H, Osawa Y, Mtasuda M, Tsunoda T, Yanagida K, Hishikawa D, Okawara M, Sakamoto Y, Shimagaki T, Tsutsui Y, Yoshida Y, Yoshikawa S, Hashi K, Doi H, Mori T, Yamazoe T, Yoshio S, Sugiyama M, Okuzaki D, Komatsu H, Inui A, Tamura-Nakano M, Oyama C, Shindou H, Kusano H, Kage M, Ikegami T, Yanaga K, Kanto T*. Sphingosine-1-phosphate promotes tumor development and liver fibrosis in mouse model of congestive hepatopathy. Hepatology. 2021Dec2. doi:10.1002/hep.32256.

3) 徳原 大介, 江原 英治, 趙 有季, 山本 晃, 磯浦 喜晴, 義之 愛子, 草野 弘宣, 水落 建輝, 桑江 優子, 木岡 清英, 村上 洋介 【小児期発症慢性肝疾患における移行期医療の現状と課題-小児と成人のダイアログ-】 FALD(Fontan-associated liver disease) Fontan-associated liver disease (FALD)を中心とした Fontan 術後消化器合併症における多科連携の重要性. 肝胆膵 2021;82(3)(0389-4991):441-449.

2. 学会発表

1) 入江理恵、坂元亨宇、草野弘宣、鹿毛政義、徳原大介、乾 あやの、考藤達哉. うっ血肝の肝生検における肝線維化評価法確立にむけた検討の臨床疫学特性の検討. 日本消化器関連学会週間 (JDDW 2022) 福岡 2022 年 10 月 27 日

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

図1 FALD 例の肝細胞の 8-OHdG 発現状態

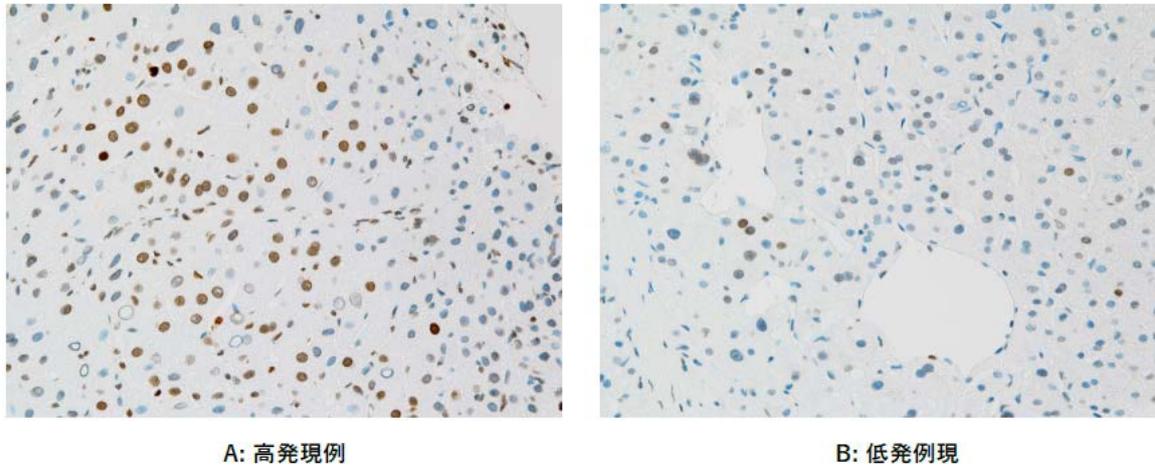


図2 FALD 例と対照例、夫々の肝組織の 8-OHdG 発現面積

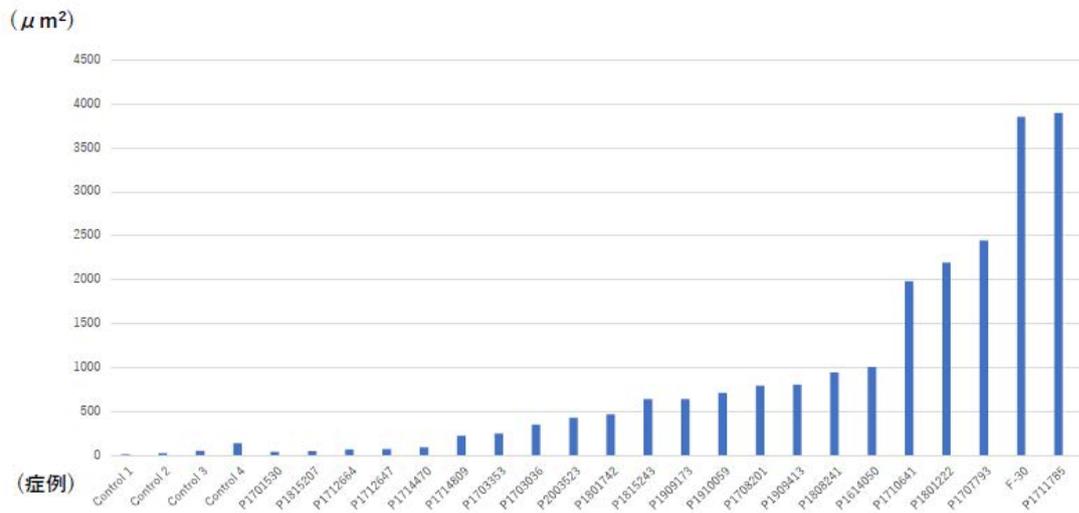


図3 FALD例と対照例の肝の8-OHdG発現面積の比較

