

73. 門脈圧亢進症の分子機序解明と革新的肝硬変治療の開発

川中 博文

国立病院機構 別府医療センター 臨床研究部

Key words : 肝硬変症, 門脈圧亢進症, EndMT, 脾機能亢進症

緒 言

肝炎治療戦略会議により H24 年度からの肝炎研究 10 ヶ年戦略の目標のひとつとして、非代償性肝硬変における 5 年生存率を現状の約 25% から B 型肝炎由来では約 50% まで、C 型肝炎由来では約 35% まで改善することが掲げられている。非代償性肝硬変の生命予後の改善のためには、食道胃静脈瘤出血・門脈血栓・腹水貯留・肝性脳症・脾機能亢進症などの門脈圧亢進症の制御が重要である。本邦における食道胃静脈瘤に対する内視鏡治療や血管塞栓術 (B-RTO) は世界に誇れる治療法であるが、あくまでも局所的治療法である。現時点では、根本的に門脈圧亢進症を治癒する方法としては、肝移植以外に方法が無く、生体肝移植が中心の本邦においては、肝移植は誰もが享受できる肝硬変症の治療とはいえない。門脈圧亢進症の成因として、(1) 肝内微小循環障害による肝内血管抵抗増大、(2) 門脈血流増大、(3) 肝脾相関があり、さらに門脈圧亢進症の増悪因子として (4) 門脈血栓が考えられている。そこで、本研究では、門脈圧亢進症の成因を考慮した集学的治療法を開発することで、門脈圧亢進症の制御だけでなく肝硬変症の予後をも改善することを目的とした。

方 法

1. 肝内微小循環障害の分子機序解明と治療への展開～類洞内皮細胞における EndMT について

類洞血流は、Endothelin (ET) などの血管収縮物質と類洞内皮細胞より分泌される NO などの血管拡張物質による肝星細胞の収縮と弛緩のバランスにより調節されている。肝硬変症では、脾などによる高 ET 血症の状態¹⁾や類洞内皮細胞の機能障害による NO 分泌の低下により、肝星細胞が収縮し類洞血管抵抗が増大していると考えられている。我々は、肝硬変における NO 分泌障害に Akt や Rho kinase が関与していることを報告してきた^{2, 3)}。本研究では、肝硬変症における類洞内皮細胞機能障害のメカニズムとして、類洞内皮細胞における Endothelial-mesenchymal transition (EndMT) および Factor VIII 発現について検討する。

血管内皮細胞への炎症、mechanical stress、hypoxia、TGF- β 、FGF、EGF などの刺激が EndMT を引き起こすと考えられているが、類洞内皮細胞における EndMT の報告はない。肝硬変における類洞内皮細胞への shear stress の低下、hypoxia、高 TGF- β や高 ET、Rho kinase 活性化の状態は、まさに EndMT を引き起こしている可能性がある。そこで、肝硬変症における類洞内皮の機能障害の原因として、EndMT が関与しているかどうか検討する。

2. 肝脾相関のメカニズムの解明と脾機能制御による肝機能の改善についての検討

肝硬変では、脾静脈血流が増大し、脾腫が門脈圧亢進症の一因であることは知られているが、何故脾が腫大するかは不明である。100 年以上も前に Banti が提唱した脾毒説 (脾臓で産生された毒素が肝硬変を引き起こすと想定した) は現在まで否定されてきたが、本邦における脾摘症例の蓄積から、脾が肝硬変症や門脈圧亢進症の成因に積極的に関与しているという肝脾相関の存在が明らかとなっており¹⁾、本研究では、肝硬変症における脾摘術の臨床的意義について詳細に検討する。さらに、肝硬変症における脾腫大のメカニズムは不明であり、そのメカニズムを明らかにすることで、脾摘を行わない脾機能制御の方法についても検討する。

(2-1) 肝硬変症における脾機能制御の臨床的意義

九州大学消化器総合外科において、1996 年より 2015 年 3 月までに脾摘術を施行した肝癌非合併ウイルス性肝硬変 295 例（B 型肝硬変 31 例、C 型肝硬変 264 例）の血小板・肝機能の変化、予後、食道胃静脈瘤出血の有無、C 型肝硬変におけるインターフェロン（IFN）、肝発癌について解析し、脾摘術が B 型・C 型肝硬変症の予後改善に寄与できるか検討した。また、18 症例において脾摘術後の門脈血行動態の変化について検討した。

(2-2) 血管新生からみた肝硬変における脾腫大の分子機序とその制御

肝硬変ラットモデルにおいて、腫大した脾の血行動態はうっ血であり、脾内の VEGF 蛋白発現も増加しており⁴⁾、側副血行路の発達にも VEGF が関連することがわかっている⁵⁾。また、低酸素は血管内皮細胞に HIF-1 α を誘導し、VEGF 蛋白発現を増加させることもわかっている⁶⁾。本研究では、VEGF 受容体阻害剤であるソラフェニブを用いて、脾腫が改善するかを評価し、脾機能制御が薬剤により可能か否か検討した。

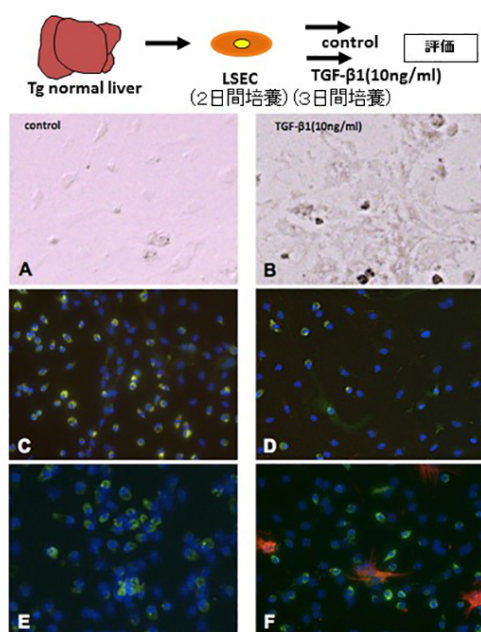
結 果

1. 肝硬変症における類洞内皮細胞の EndMT について

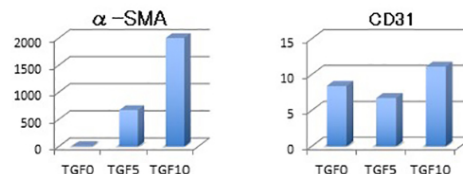
(1) 内皮細胞由来の細胞が生涯にわたり LacZ を発現するマウスを用いて検討を行った。LacZ の発現は、免疫組織学的評価において、 β -galactosidase (β -gal) の高発現にて同定された。初代培養した類洞内皮細胞に TGF- β を負荷したところ、CD31（内皮細胞マーカー）発現は低下し、 α -SMA（線維芽細胞マーカー）発現は増加したことより、類洞内皮細胞は TGF- β 刺激により EndMT を起こしうることが分かった（図 1-1）。

(2) 肝硬変モデルより、初代培養された線維芽細胞の多くが LacZ を発現しており、肝硬変由来の線維芽細胞には内皮細胞由来の細胞が含まれていることが確認できた（図 1-2）。

<1-1 類洞内皮細胞にTGF- β 1を負荷>



A,B :位相差顕微鏡にて観察
C,D :GFP (緑)、CD31 (赤)による蛍光二重免疫
E,F :GFP (緑)、 α -SMA (赤)による蛍光二重免疫



<1-2 線維芽細胞培養、X-gal染色>

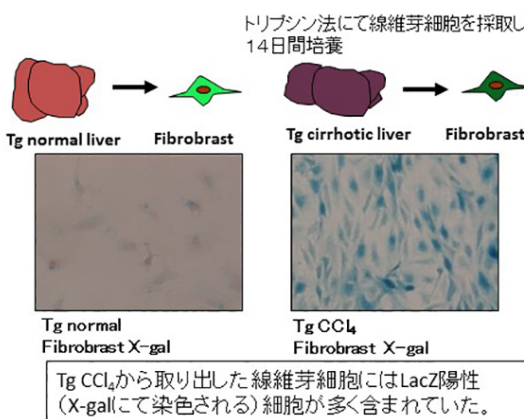


図 1. 類洞内皮細胞における EndMT

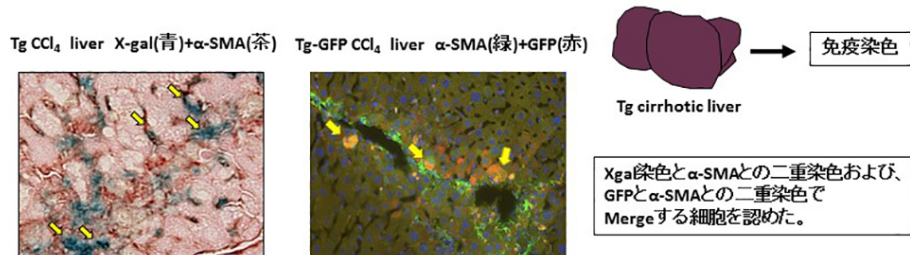
(1-1) 類洞内皮細胞における TGF- β 1 による EndMT。

(1-2) 硬変肝の線維芽細胞における X-gal 染色。

(3) *in vivo*においても、硬変肝の類洞周囲に、内皮細胞と線維芽細胞の両方の表面マーカーを有する細胞が認められた(図2-1)。

(4) しかし、マウス肝硬変から採取した類洞内皮細胞のFACSでは、EndMTを来したと考えられる(LacZ陽性かつCD31陰性)細胞の増加がTie2-LacZマウスでは認められなかったが、Tie2-GFPマウスではEndMTを来したと考えられる(GFP陽性かつCD31陰性)細胞の増加が微量だが確認できた(図2-2)。肝硬変症における類洞内皮細胞の機能障害のメカニズムの一つとしてEndMTが関与していることが示唆された。

<2-1 硬変肝におけるEndMTの確認、免疫組織染色>



<2-2 硬変肝におけるEndMTの確認、FACS>

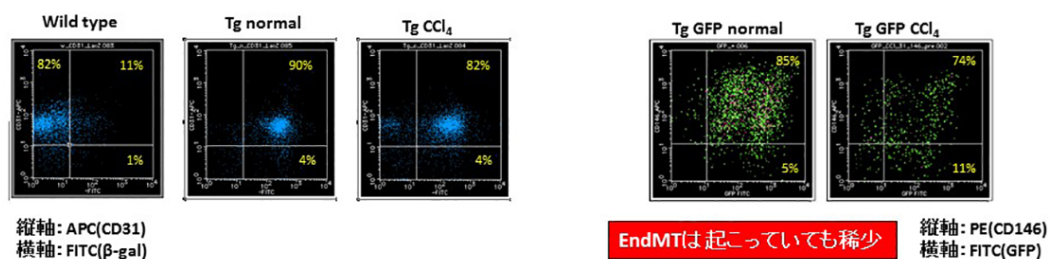


図2. 硬変肝における EndMT の確認

(2-1) 免疫組織染色による硬変肝組織における EndMT。

(2-2) FACS による硬変肝組織における EndMT。

2. 肝脾関連のメカニズムの解明と脾機能制御による肝機能の改善についての検討

(2-1) 肝硬変症における脾機能制御の臨床的意義

1) B型肝硬変症の累積生存率は、5年82%、10年68%、C型肝硬変症では、5年86%、10年65%であり、肝機能別では、Child-Pugh Aで5年96%、10年78%、Child-Pugh Bで5年82%、10年62%、Child-Pugh Cで5年52%、7年42%と良好であった(図3)。また、食道胃静脈瘤を有しない肝硬変症における10年非出血率は98%であり、出血例や破裂の危険性のある肝硬変症でもであっても、10年非出血率は90%であった。

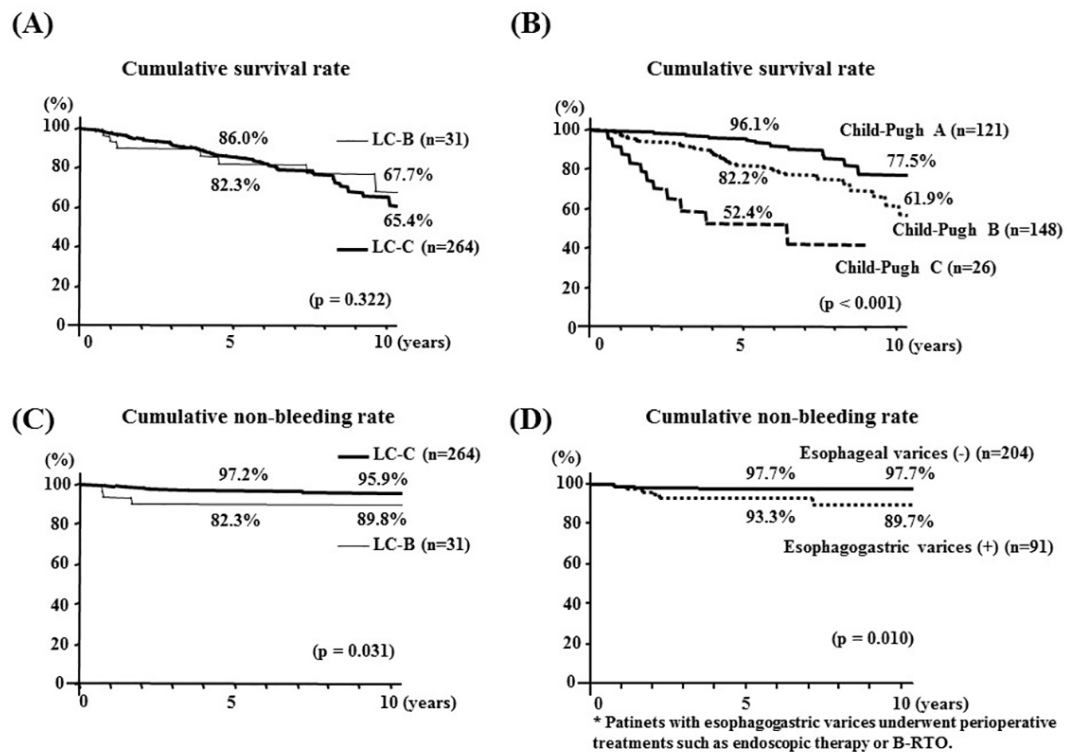


図3. ウイルス性肝硬変における脾摘後の予後および静脈瘤出血

- (A) B型およびC型肝炎硬変症における予後。
- (B) 肝機能別の予後。
- (C) B型およびC型肝炎硬変症における累積非出血率。
- (D) 術前食道静脈瘤の有無における累積非出血率。

2) IFN 治療を完遂したC型肝炎硬変症例143例中54例(38%)でウイルスが駆除(SVR)でき、3剤治療を受けた26例中22例(85%)にSVRが得られた。術後肝癌発生率は、全体で5年26%、10年48%であった。IFN治療を受けていない症例では、肝発癌は10年51%であったが、SVRが得られた群では、肝発癌は5年6%、10年20%と非常に低かった(図4)。また、SVRを得られた症例の累積生存率は、Child-Pugh Aで10年100%、Child-Pugh Bで10年92%と良好であった。

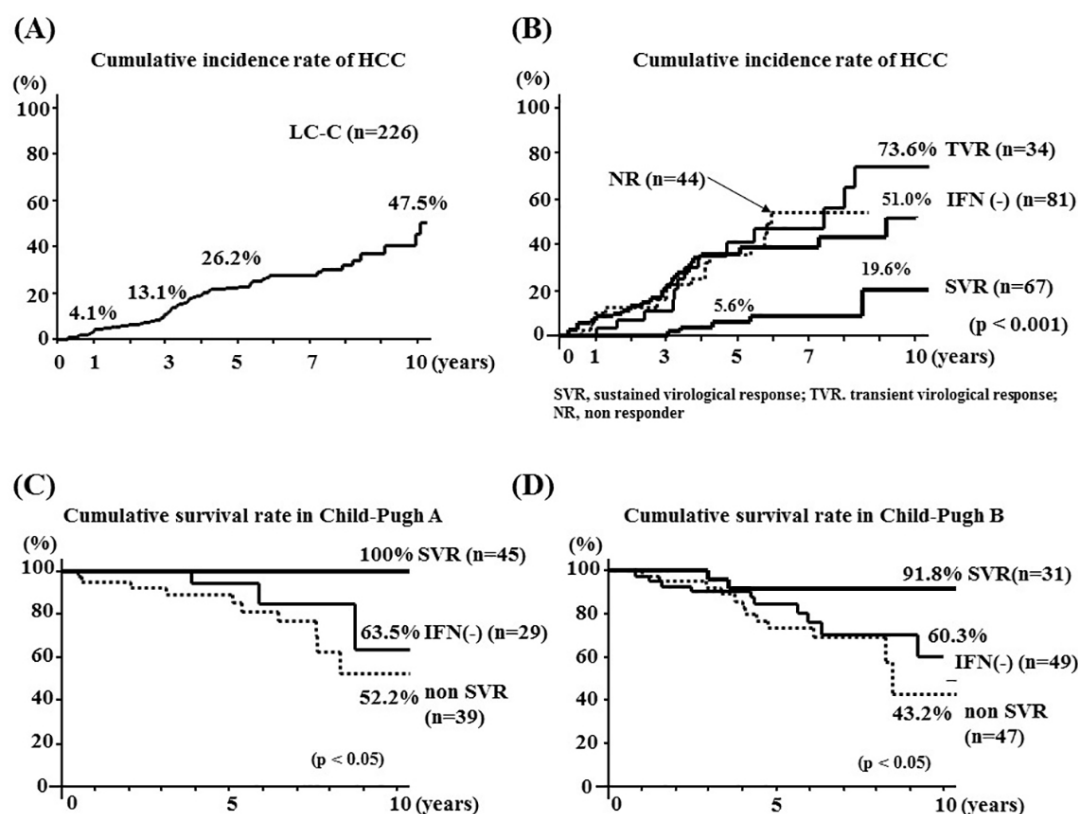


図4. C型肝硬変症における脾摘後の予後および肝発癌

- (A) C型肝硬変症における肝発癌。
- (B) 抗ウイルス治療の結果と肝発癌。
- (C) Child-Pugh AにおけるSVR症例の予後。
- (D) Child-Pugh BにおけるSVR症例の予後。

3) 摘術後、門脈圧 (HVP) は術前と比べ約 25%低下し、同様に肝内門脈血管抵抗も約 21%の低下していた。肝内類洞血流は、ET-1 などの vasoconstrictive agents による hepatic stellate cells (HSCs) の収縮と liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) からの NO などの vasorelaxing agents による HSCs の弛緩のバランスによって調節されている。肝硬変症においては、肝内の ET-1 が増加し、LSECs dysfunction により NO 分泌が低下していることにより、HSCs が収縮していることに加えて、HSCs 周囲の線維化も加わり、肝内の類洞血管抵抗が増大し、類洞血流が低下している。本研究において、脾摘により肝静脈血中 ET-1 が低下し、肝静脈血中 NOx が増加しており、脾摘術により肝内門脈血管抵抗が改善したものと考えられた (図 5)。

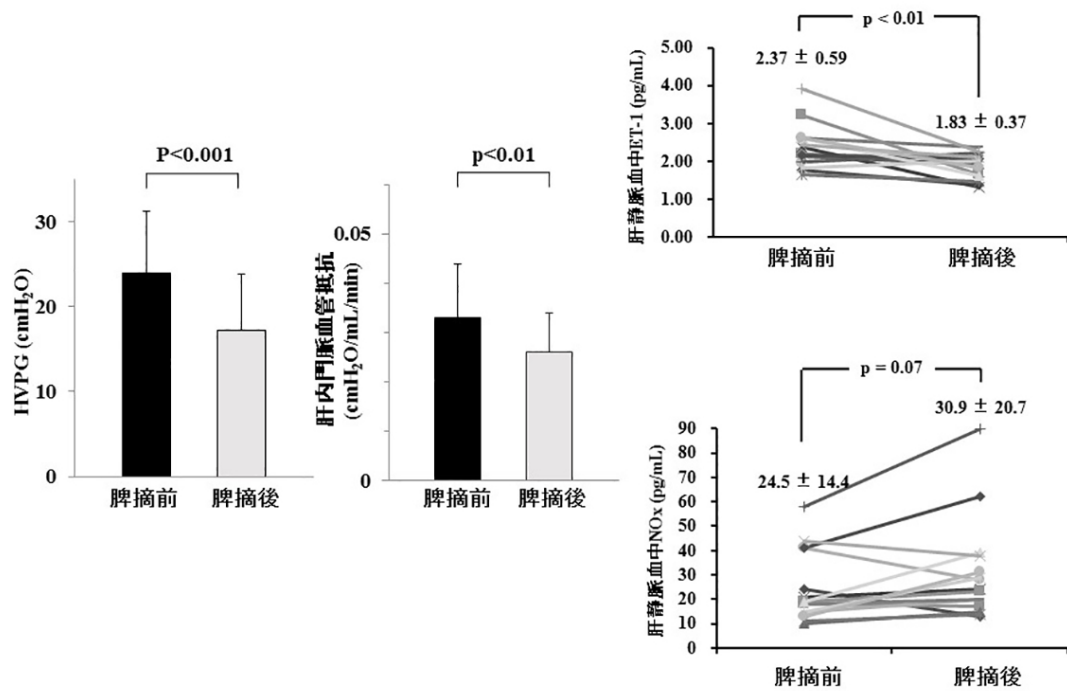
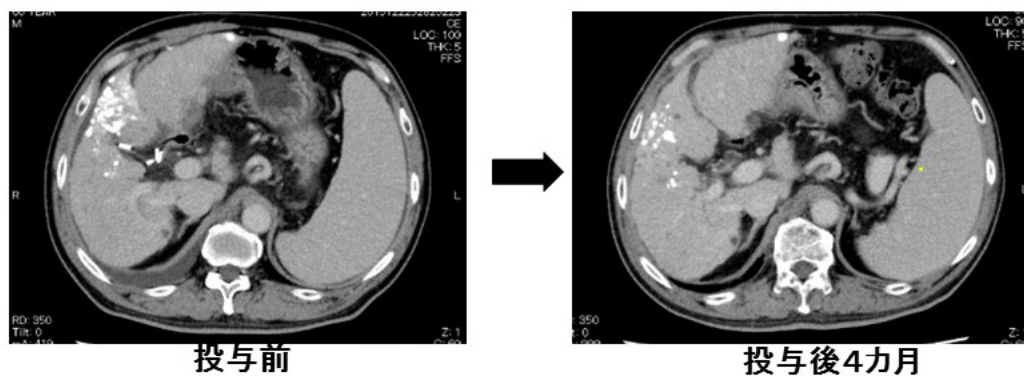


図 5. 脾摘前後の門脈血行動態の変化

脾摘前後の HVPG (門脈圧)、肝内門脈血管抵抗、肝静脈血中 ET-1 (endothelin-1) および肝静脈血中 NO_x の変化 (paired Student's t-test)

(2-2) 血管新生からみた肝硬変における脾腫大の分子機序とその制御

VEGF 受容体などの阻害剤であるソラフェニブを投与された進行肝細胞癌症例 11 例 (平均 70.1 歳、男性 11 例、Child-Pugh A/B: 9/2) において、投与後 3 ~ 6 カ月で、CT による脾サイズは平均 $55 \text{ cm}^2 \rightarrow 43 \text{ cm}^2$ と平均 14% 縮小し ($p < 0.001$)、脾静脈径は平均 $9.0 \text{ mm} \rightarrow 7.8 \text{ mm}$ と平均 15% 縮小した ($p < 0.001$)。また、脾サイズの縮小とともに、収縮期血圧および拡張期血圧も有意に増加した。以上より、VEGF 受容体などの血管新生シグナルが肝硬変症における脾腫の原因の一つであり、血管新生の制御により脾腫は改善し、さらには全身の血圧が上昇したことから systemic circulation の hyperdynamic state も改善する可能性があることが判明した (図 6)。



60歳、男性、HCV、multiple HCCs
WBC 2640、Plt 4.4万、Child-Pugh B, score 8

因子	投与前	投与後	p value
脾断面積 (cm ²)	55.0 ± 15.8	42.6 ± 15.5	<0.001
脾静脈径 (mm)	9.0 ± 2.3	7.8 ± 2.6	<0.001
収縮期血圧 (mmHg)	121 ± 16	133 ± 21	<0.05
拡張期血圧 (mmHg)	71 ± 7	80 ± 12	<0.05

図 6. 肝硬変症におけるソラフェニブ投与の効果

脾サイズ（CT による脾最大断面積および脾静脈径）および血圧の変化（paired Student's t-test）

考 察

肝硬変症における類洞内皮細胞機能障害のメカニズムの一つとして、類洞内皮細胞における Endothelial-mesenchymal transition (EndMT) が関与することが示唆された。次なるステップとして、類洞内皮細胞の EndMT を制御する方法についての研究を進めている。また、肝硬変症における脾機能制御の意義が明らかとなり、VEGF をはじめとする血管新生シグナルを制御することで、摘脾をしなくとも脾機能制御が制御できる可能性が示唆された。

共同研究者

本研究の共同研究者は、九州大学医学研究院災害救急医学の赤星朋比古および九州大学医学研究院消化器・総合外科の播本憲史、伊藤心二である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Kawanaka H, Akahoshi T, Kinjo N, Iguchi T, Ninomiya M, Yamashita YI, Ikegami T, Yoshizumi T, Shirabe K, Maehara Y. Effect of laparoscopic splenectomy on portal haemodynamics in patients with liver cirrhosis and portal hypertension. Br J Surg. 2014 Nov;101(12):1585-93. doi: 10.1002/bjs.9622. Epub 2014 Sep 9. PMID: 25200126.
- 2) Kawanaka H, Jones MK, Szabo IL, Baatar D, Pai R, Tsugawa K, Sugimachi K, Sarfeh IJ, Tarnawski AS. Activation of eNOS in rat portal hypertensive gastric mucosa is mediated by TNF-alpha via the PI 3-kinase-Akt signaling pathway. Hepatology. 2002 Feb;35(2):393-402. doi: 10.1053/jhep.2002.30958. PMID: 11826414.
- 3) Anegawa G, Kawanaka H, Yoshida D, Konishi K, Yamaguchi S, Kinjo N, Taketomi A, Hashizume M, Shimokawa H, Maehara Y. Defective endothelial nitric oxide synthase signaling is mediated by rho-kinase

activation in rats with secondary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2008 Mar;47(3):966-77. doi: 10.1002/hep.22089. PMID: 18167063.

- 4) Yamaguchi S, Kawanaka H, Yoshida D, Maehara Y, Hashizume M. Splenic hemodynamics and decreased endothelial nitric oxide synthase in the spleen of rats with liver cirrhosis. *Life Sci*. 2007 May 8;80(22):2036-44. doi: 10.1016/j.lfs.2007.03.009. Epub 2007 Mar 23. PMID: 17481668.
- 5) Tsugawa K, Hashizume M, Tomikawa M, Migou S, Kawanaka H, Shiraishi S, Sueishi K, Sugimachi K. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the rat portal hypertensive gastropathy. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001 Apr;16(4):429-37. PMID: 11354282.
- 6) Jones MK, Szabó IL, Kawanaka H, Husain SS, Tarnawski AS. von Hippel Lindau tumor suppressor and HIF-1alpha: new targets of NSAIDs inhibition of hypoxia-induced angiogenesis. *FASEB J*. 2002 Feb;16(2):264-6. Epub 2001 Dec 28. doi: 10.1096/fj.01-0589fje. PMID: 11772947.