

平成 21 年 4 月 8 日現在

研究種目：基礎研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591477  
 研究課題名 (和文) 劇症肝炎における肝性脳症のメカニズムの解明と治療の確立を目指して  
 研究課題名 (英文) Matrix metalloproteinase-9 in the pathogenesis of brain edema in fulminant hepatic failure  
 研究代表者  
 山本 智 (YAMAMOTO SATOSHI)  
 新潟大学・医学部系・助教  
 研究者番号：30345508

## 研究成果の概要：

現在のところ、劇症肝炎において生じる肝性脳症および脳浮腫の発生メカニズムは、アンモニアの関与が強く疑われているが、どのように Blood Brain Barrier が障害されるのかは明らかにされていない。本研究は、マウス劇症肝炎モデルにおいて、肝性脳症進行のメカニズムのひとつとして、壊死した肝臓内で産生された MMP-9 が肝細胞の脱落とともに血液中に放出され、蓄積した MMP-9 が Blood Brain Barrier の Tight junction にわずかな障害を加えることにより、脳浮腫を増悪させていることを解明した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

## 研究分野：医学薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：移植外科学

## 1. 研究開始当初の背景

劇症肝不全は、現在のところ、肝移植以外には有効な治療法が確立されていない致死的な肝疾患である。随伴する肝性脳症は、劇症肝不全における主要な死亡原因の一つになっている。肝性脳症における脳浮腫は、Blood Brain Barrier (BBB) の透過性の亢進に起因すると以前に報告された。しかしながら、過去の報告において、電子顕微鏡で Astrocyte の腫脹を認めるのみで、BBB の障害などははっきりせず、そのメカニズムに関しては、未だ十分に解明されてい

ない。肝移植の普及により、劇症肝不全の救命率が劇的に改善してきたが、アメリカにおいては、劇症肝移植待機患者の 25% が肝性脳症のため肝移植を受けることができずに待機中に亡くなられている。故に、肝性脳症の成因の解明とその治療法の確立は、肝移植待機患者の待機時間を延長させることにより、更なる救命率の改善をもたらすものである。しかしながら、その有効な治療法は未だ確立されていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

1) マウス劇症肝炎モデルにおいて肝性脳症の進行度に伴い、血清中 MMP-9 が上昇し、TIMP-1 が減少することを明らかにする。また、肝性脳症の進行とともに BBB の透過性が亢進することを Evans Blue (EB) extravasation にて、また、脳内の水分量が増加することを Specific gravity method を用いて証明する。

2) 血清中の MMP-9 が、劇症肝炎における脳浮腫の一因であることを明らかにするために、MMP 阻害薬 (GM6001) および MMP-9 抗体を投与することにより、Evans Blue extravasation が減少し、脳内の水分量も減少することを証明する。

3) 劇症肝炎において、肝臓と脳における Active MMP-9 活性を *In situ* zymography を用いて測定することにより、脳内で発生された MMP-9 ではなく、壊死した肝臓内から血清中に放出された MMP-9 が BBB を障害していることを明らかにする。

## 3. 研究の方法

**Azoxymethane** 投与による劇症肝炎マウスモデルを用いる。

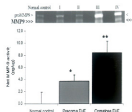
1) コントロールマウスおよび肝性脳症 I~IV 度のそれぞれのマウスより、血清、肝臓および脳を採取し、Gelatin zymography を用いて proMMP-9 および active MMP-9 の濃度が測定する

2) コントロールマウスおよび肝性脳症 I~IV 度の脳血管開門の透過性亢進やそれに伴う脳浮腫を測定する。BBB の透過性は、EB の静注後の脳内の EB 測定により、脳浮腫は specific gravity method を用いて測定する。また、EB に関しては、蛍光顕微鏡および画像解析ソフトを用いて、EB が脳内にどのように分布しているかを確認し、同時に定量を行う。血清中 MMP-9 活性の増加と脳症の進行の相関が確認できた場合には、MMP-9/MMP-9 阻害薬 (GM6001) または、抗 MMP-9 モノクローナル抗体 (MMP-9 Ab) 投与の脳血管開門の透過性亢進やそれに伴う脳浮腫に対する抑制効果を見る。

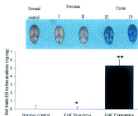
3) 劇症肝炎モデルより、肝臓、脳を摘出し、*in situ* zymography を用いて、肝臓と脳の MMP-9 活性を観察する。

## 4. 研究結果

1) マウス劇症肝炎モデルにおいて、コントロールと比較して脳症 I~IV 度に有意に上昇した。脳症 III~IV 度 (肝性昏睡) においては、血清中の proMMP-9 および activeMMP-9 濃度は、さらに急激な増加した。

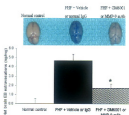


血清中の proMMP-9 および activeMMP-9 濃度に相対するように脳症の進行に伴い、脳内の EB 量および水分量が増加した。その増加は、やはり脳症 III~IV 度 (肝性昏睡) になると急激な増加を示した。これは、activeMMP-9 が肝性昏睡を引き起こす原因である可能性を強く示唆するものと考えられる。

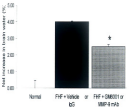


しかしながら、肝臓中においては、コントロールでは、MMP-9 はほとんど検出されなかったが、肝性脳症 I 度においてももっとも MMP-9 濃度の上昇を認め、脳症の進行とともに減少した。この事実より、肝臓の壊死による肝細胞の脱落とともに、MMP-9 が血清中に放出され、脳症を引き起こしていると推測される。脳内においては、コントロールにおいても、脳症においても MMP-9 は検出されなかった。この事実も、肝臓内で発生された MMP-9 が原因であることを示唆するものである。

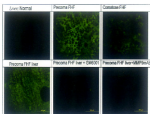
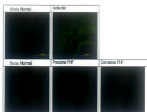
- 2) マウス慢性肝炎モデルにおける MMP 阻害薬：GM0001 や MMP-9 Ab の投与は、脳内の EB 量および水分量の増加を抑制した。これは、MMP-9 が BBB の透過性を亢進させることによって脳浮腫を進行させていることを強く示唆するものである。



1



- 3) In situ zymography において脳内では全く、Active MMP-9 は検出されなかったが、肝臓内では MMP-9 活性が著明に増加していた。肝性脳症 I 度において肝臓内で最も MMP-9 活性が高く、これは、前述の結果と相関するものであり、肝臓内で産生された Active MMP-9 が脳症 I 度の時期に血中に大量に放出されることにより、BBB の透過性を亢進させ、脳浮腫を進展させ、肝性昏睡の状態へ導いているというわたしたちの仮説を改めて非常に強く証明する結果である。実際、脳症血障害モデルにおいては、脳内に MMP-9 活性が増加することが確認されており、虚血によるメカニズムとは、違うものである。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 0 件)

(学会発表) (計 0 件)

(図書) (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 智 (YAMAMOTO SATOSHI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 30345508

(2)研究分担者

(3)連携研究者