

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791088

研究課題名（和文） 肝虚血再灌流障害における環状グアノシンーリン酸の関与

研究課題名（英文） Role of cyclic GMP in hepatic ischemia/reperfusion injury

研究代表者

山田 高成（YAMADA TAKASHIGE）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20348767

研究成果の概要：

肝臓は重要臓器の一つであるが、手術時、ショック時などに、虚血状態に曝される場合がある。長時間虚血での肝障害発生は明白であるが、短時間であっても血流再開後に障害が生じ（虚血再灌流障害）対処が必要である。本研究では心臓由来のホルモンが肝虚血再灌流障害を軽減することを確認した。またその機序は肝実質細胞ではなく肝臓に少数ある星細胞との関連が深いことを発見し、米国麻酔学会において発表した。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,100,000 | 0 | 1,100,000 |
| 2008年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,200,000 | 330,000 | 2,530,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：虚血再灌流障害、肝臓、cGMP

1. 研究開始当初の背景

肝臓における虚血再灌流障害の発生機序としては、1.再酸素化後の酸化ストレス、2.細胞内 pH の変動、3.虚血前後のミトコンドリア障害、4.再酸素化後の炎症担当細胞の活性化、5.細胞内 Ca²⁺濃度の変動、6.虚血中の p53、hypoxia inducing factor の誘導、7.再酸素化後の caspase 3 活性化によるアポトーシス、8.再酸素化後に発生する血管内細胞障害に起因する血流障害、など複数の

因子が *in vitro* において想定されている (Pathophysiology. 2003 Sep;9(4):229-240、J Gastroenterol Hepatol. 2003 Aug;18(8):891-902) が、依然未解明の部分が多い。

これまでの研究では、肝臓の虚血再灌流障害の発生機序として上記のように様々な原因を想定している。しかしながら、単独因子からのアプローチでは、*in vivo* における実際の肝機能障害を抑制するに至っていない。一方で、各因子と c-GMP の関連については、

c-GMP 濃度上昇が上記増悪因子の抑制につながるとの報告が散見される。(J Hepatol. 2003 38(4):490-8, Shock 2002 17(5):365-71, 他) 本研究は、虚血再灌流障害と c-GMP の関連に着目して研究を立案し、虚血再灌流障害の病態における cGMP の意義を検討し、さらに cGMP を制御することによって in vivo における虚血再灌流障害の予防に結びつけるという位置を占める。

これまでのところ、in vivo における c-GMP 変化と虚血再灌流障害の関連を検討した報告は見当たらず、早急な関連解明が待たれている。

2 . 研究の目的

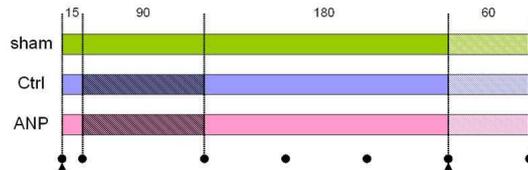
肝臓は生体における重要臓器の一つである。臨床では肝臓移植や、肝臓の手術時、ショック時などに、肝臓血流の途絶ないし乏少が生じ、虚血状態にさらされる場合がしばしばあり、対処が必要である。長時間の虚血で肝臓の障害が生じることは明らかであるが、短時間の虚血であっても虚血後に血流を再開すると臓器障害が生じる(虚血再灌流障害)。本研究の全体構想は、この肝虚血再灌流障害を、薬理学的前処置を施すことによって軽減し、またその軽減機序を解明することである。

具体的には、ウサギ肝臓虚血再灌流障害モデルにおいて、cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (c-GMP) レベルを高める前処置が、虚血再灌流障害を軽減することを明らかにする。cGMP レベル上昇による保護効果の機序を、細胞種別に検討することを目的とする。より具体的には、肝臓を構成する細胞のうち、主構成要素である3種の細胞、すなわち肝細胞、類洞血管内皮細胞、クッパー細胞についてそれぞれの変化を観察し、特に心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)による c-GMP 濃度上昇に着目して保護効果への関与程度を明らかにしていく。

3 . 研究の方法

従来より当研究室で用いている家兎虚血再灌流モデル (Anesthesiology. 2003 Jun;98(6):1407-14. 他) を使用し、再灌流後 3 時間にわたって肝機能を評価する。(Fig.1)

Figure 1. Experimental protocol



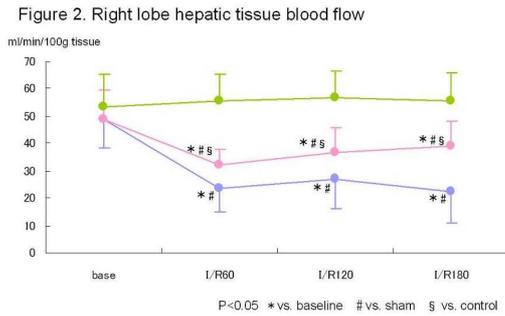
Three experimental groups (n=10, each) underwent either 90min of right lobe ischemia (dark shaded bar) or sham procedure. After 180 reperfusion period, all three groups underwent galactose clearance measurement (light shaded bar).

肝機能の評価としては定時採血(虚血後 60, 120, 180 分)によるトランスアミナーゼ等生化学的指標のほか、水素クリアランス法を用いた組織血流量、ガラクトースクリアランス法、ヒアルロン酸を用いた機能検査を行う。また、摘出肝臓組織標本を用いて、肝組織 c-GMP 濃度の定量、HE 染色による形態学的評価、及び TUNEL 法を用いてアポトーシスの抑制程度を評価する。

星細胞で特異的に産生される ADAMTS13 の活性変化を測定し、同細胞の受ける影響を評価する。

4. 研究成果

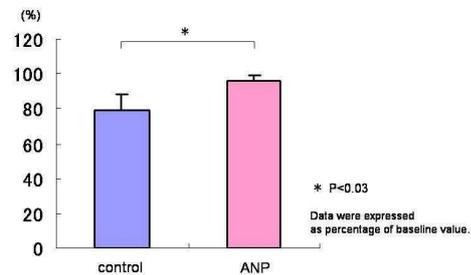
ウサギ肝臓虚血再灌流障害モデル（部分肝虚血 90 分）において、持続 ANP 投与（0.1mcg/kg/min）群（n=10）と、対照群（n=10）とを比較した。ANP 投与群では再灌流 3 時間後の組織血流量の低下が軽減された（ $40.0 \pm 9/100\text{g/min}$ vs $22.4 \pm 11\text{ml}/100\text{g/min}$ $p < 0.05$ ）（Fig.2）



また、引き続き、個体数を増やしてアポトーシスの関与について検討した。具体的には、再灌流後に摘出組織標本を作製し、TUNEL 染色によりアポトーシス細胞数を計数した。HE 染色による組織学的検討では ANP 投与群での組織障害軽減が認められた一方、TUNEL 陽性細胞数は両群間に有意な差は見られなかった。再灌流 3 時間の本モデルにおいては、ANP の作用機序として、肝実質細胞のアポトーシス軽減が有意な機序ではない可能性が高い。

続いて、ANP の肝非実質細胞へ与える影響について検討した。本モデルにおいては組織血流の変化が認められている。そこで、微小肝血流の調節に与る星細胞を対象として検討した。具体的には、星細胞で特異的に産生される ADAMTS 13 に着目し、再灌流時の経時的変化を測定した。静脈血中の ADAMTS 13 活性は再灌流に伴い、ANP 投与群では変化しなかったが、対照群において低下した（ $95.8 \pm 3.9\%$ vs $79.7 \pm 8.7\%$ $p < 0.05$ ）（Fig.3）

Figure 3. ADAMTS 13 activity 180 min after reperfusion



肝虚血再灌流により ADAMTS 13 活性は低下し、さらに ANP は再灌流時の活性低下を抑制することが示された。

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 1 件)

Takashige Yamada, “ANP reduces ischemia-reperfusion induced hepatic microcirculatory failure and ADAMTS13 inactivation”, American Society of Anesthesiologists Annual Meeting, 2008/10/18, Orlando

〔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
山田 高成 (YAMADA TAKASHIGE)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20348767

(2)研究分担者

(3)連携研究者