

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591499

研究課題名（和文） 血小板・クッパー細胞相互作用に着目した肝虚血再灌流障害抑制法の開発

研究課題名（英文） Prevention of ischemia-reperfusion liver injury through inhibiting the Platelets-Kupffer cell interaction.

研究代表者

近藤 匡 (KONDO TADASHI)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00375495

研究成果の概要（和文）：肝虚血再灌流障害において Kupffer 細胞と血小板のあいだにはなんらかの相互作用が働いていることが考えられているが、その類洞内動態は明らかとされていない。生体蛍光顕微鏡を用いて虚血再灌流後の肝類洞内における Kupffer 細胞と血小板動態を検討した。その結果、虚血再灌流後に肝類洞内で Kupffer 細胞は Zone1 を中心に分布し、血流再開後 120 分にわたり安定して in vivo で観察することができた。類洞内皮に膠着する血小板数は再灌流時間の経過とともに増加し、そのうち約半数の血小板は Kupffer 細胞と直接接着することが判明した。

研究成果の概要（英文）：Hepatic ischemia-reperfusion (I/R) leads to activation of Kupffer cells (KCs). We have evaluate the interaction between platelets and KCs in the hepatic microcirculation after I/R. In the I/R group, the number of adherent platelets increased significantly after I/R. More than 50% of the adherent platelets adhered to KCs. We succeeded in visualizing the dynamics of both KCs and platelets in the hepatic sinusoids. Liver ischemia induced the adhesion of platelets to KCs in the early period, which could play a key role in reperfusion injury of the liver.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝臓外科学、肝虚血再灌流、肝微小循環

1. 研究開始当初の背景

(1)生体蛍光顕微鏡(IVM)システムの構築：筑波大学内に構築した生体蛍光顕微鏡観察シス

テムで肝微小循環の経時的、定量的評価方法を確立し報告してきた。

(2)血小板と Kupffer 細胞(KC)の相互作用：血小板は白血球膠着よりも再灌流後の早い

段階で Kupffer 細胞が多く分布する Zone1 に膠着しはじめることを明らかとした。そこで「再灌流直後の Kupffer 細胞と血小板の間の相互作用が、その後の白血球膠着を調節しているのではないか」という仮説をたてた。Kupffer 細胞除去群では正常群と比較して血小板膠着は3分の1にとどまり、類洞血流は保たれて白血球膠着も抑制されることが明らかとなった。Kupffer 細胞の存在下で血小板は虚血再灌流後に類洞内皮と膠着し、微小循環障害へとつながることを明らかにした。

2. 研究の目的

(1) IVM による血小板、KC の類洞内相互作用について観察、評価する。

①録画画像をもとに膠着血小板数、微小血栓数、類洞灌流率、ならびに微小血管径について解析を行い Kupffer 細胞の部位との関連を明らかとする。

②サイトカイン接着分子、転写因子等の分子生物学的パラメーターとが灌流時間の経過と共にどのように変化していくか経時的評価を行う。さらに組織形態学的検討を行う

(2)血小板活性を抑制することによる肝虚血再灌流防止効果を検討する

抗血小板抗体投与により類洞内皮における血小板・Kupffer 細胞相互作用が抑えられ、その結果として効果的に肝虚血再灌流障害が抑制できるかどうかを評価する。

3. 研究の方法

(1)生体蛍光顕微鏡ビデオ観察

体重250~300gのSD Ratを使用した。蛍光色素をリポゾーム内に封入して貪色させることで実験に先立ちKupffer細胞を染色した。その後、全身麻酔を行い気管切開ののち人工呼吸を行った。頸部を切開剥離の後、頸部動静脈にカテーテルを挿入した。開腹し肝葉を脱転して特殊粘土上に固定し、生体蛍光顕微鏡を用いて肝微小循環を観察した。肝虚血は20分間の全肝虚血とした。生体蛍光顕微鏡による観察は再灌流後120分までとした。血小板は再灌流後30,60,120分時に蛍光標識血小板を投与し観察した。再灌流120分後の観察ののち、肝組織と血清を採取した。

(2)生化学的、組織学的検査

実験後に血液と肝組織を採取し血液生化学検査、組織形態学的検査ならびに分子生物学的検査を行う。さらに血小板活性化の抑制による肝虚血再灌流障害抑制効果について検討した。

4. 研究成果

研究の結果

(1) Kupffer 細胞の観察:虚血グループと非虚血グループでは Kupffer 細胞の分布や染色に変化が見られなかった。両者ともに観察された70%は Zone1 に存在する事が確認された。

(2)類洞内血小板膠着:虚血グループでは非虚血に比べておよそ2倍の血小板膠着がみられ、その50%は Kupffer 細胞と Zone1 で膠着することが判明した。有意に類洞内膠着血小板数が増加することがあきらかとなった。

(3)血清 ALT 値:肝臓の実質細胞の障害の指標として血清 ALT 値を測定した。虚血グループでは非虚血や血小板抗体投与群と比較して有意に上昇することが確認された。

(4)組織学的検討:虚血再灌流120分後に組織を採取して HE 染色で組織変化を検討した。虚血群では肝細胞周囲の空胞変成や類洞柵状構造の狭小化がみられた。一方で非虚血群や血小板抗体投与群では組織変化は見られなかった。また電子顕微鏡検査では Kupffer 細胞と接触する血小板像を捉える事ができた。

(5)アポトーシスの評価:虚血群で虚血再灌流120分後に Zone1 を中心に TUNEL 陽性細胞が多く確認された。同時に cleaved caspase-3 の発現についても測定したところ、非虚血群では見られなかったが、虚血群では有意に高値を示す事がわかった。

成果の意義と位置づけについて

これまで生体蛍光顕微鏡では白血球、血小板などの血球動態をとらえることはできたが、Kupffer 細胞を可視化することができず、白血球や血小板との相互作用を確認することができなかった。本研究では Kupffer 細胞を生体内で蛍光染色することにはじめて成功し、既報のとおりに類洞内 Zone1 を中心に分布

することが確認された。また Kupffer 細胞と血小板との膠着現象を *in vivo* で捉える事に成功した。また電子顕微鏡検査では Kupffer 細胞と血小板の直接接触することを確認した。過去の研究では肝虚血再灌流障害は類洞内の白血球と内皮細胞の相互作用により引き起こされる事が考えられていたが、それより早期の段階で、血小板と Kupffer 細胞の直接接触ならびに相互作用が類洞内炎症反応の引き金となっている可能性が示唆された。

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 4 件)

- (1) Ogawa K, Kondo T, Tamura T, Matsumura H, Fukunaga K, Oda T, Ohkohchi N, Influence of Kupffer cells and platelets on ischemia-reperfusion injury in mild steatotic liver. *World J Gastroenterol.* 19(9):1396-404.2013 . 査読有 .doi: 10.3748/wjg.v19.i9.1396.
- (2) Tamura T, Kondo T, Ogawa K, Fukunaga K, Ohkohchi N. Protective effect of heme oxygenase-1 on hepatic ischemia-reperfusion injury through inhibition of platelet adhesion to the sinusoids. *J Gastroenterol Hepatol.* 28(4):700-6.2012.査読有 doi: 10.1111/jgh.12075
- (3) Tamura T, Kondo T, Pak S, Nakano Y, Murata S, Fukunaga K, Ohkohchi N. Interaction between Kupffer cells and platelets in the early period of hepatic ischemia-reperfusion injury--an *in vivo* study. *J Surg Res* 178(1):443-51. 2012.査読有 doi: 10.1016/j.jss.2011.12.010.
- (4) Pak S, Kondo T, Nakano Y, Murata S, Fukunaga K, Oda T, Sasaki R, Ohkohchi N. Platelet adhesion in the sinusoid caused hepatic injury by neutrophils after hepatic ischemia reperfusion. *Platelets.* 21(4):282-8. 20

10.査読有 doi: 10.3109/09537101003637265.

[学会発表] (計 8 件)

- (1) Ogawa K. The influence of the mild degree steatotic liver in ischemia reperfusion injury. The 22nd World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists. 2012 年 12 月 04 日～2012 年 12 月 09 日.バンコク(タイ)
- (2) 小川光一. Kupffer 細胞と血小板の類洞内動態に着目した軽度脂肪肝における肝虚血再灌流障害の検討. 第 19 回幹細胞研究会. 2012 年 6 月 29 日～2012 年 6 月 30 日.札幌医科大学 (札幌)
- (3) 小川光一. 軽度脂肪肝における肝虚血再灌流障害は正常肝に比べて軽度である. 第 48 回日本肝臓学会総会.2012 年 6 月 7 日～2012 年 6 月 8 日.石川県立音楽堂(金沢)
- (4) Tamura T. *In vivo* evidence of interaction between Kupffer cells and platelets in the early period of hepatic ischemia-reperfusion injury. IASGO 2011.2011 年 11 月 9 日～2011 年 11 月 12 日. 京王プラザホテル (東京)
- (5) 田村孝史. 肝虚血再灌流後の Kupffer 細胞と血小板の類洞内動態の解明. 第 18 回幹細胞研究会. 2011 年 6 月 24 日～6 月 25 日. 東京ガーデンパレス (東京)
- (6) 田村孝史. 肝侵襲後の類洞内血球動態. 日本外科代謝栄養学会第 48 回各術集会. 2011 年 7 月 7 日～8 日.名古屋国際会議場 (名古屋)
- (7) 田村孝史. Hemeoxygenase-1 による虚血再灌流障害予防メカニズムの解明. 第 47 回日本肝臓学会. 2011 年 6 月 2 日～3 日. ホテルグランパシフィック LE D AIBA (東京)
- (8) 田村孝史. 肝虚血再灌流時の Kupffer 細胞と血小板の動態の解明. 第 111 回日本外科学会定期学術集会. 2011 年 5 月 26 日～2011 年 5 月 28 日. 東京国際フォーラム (東京)

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 匡 (KONDO TADASHI)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00375495

(2)研究分担者

大河内 信弘 (OHKOHCHI NOBUHIRO)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40213673

福永 潔 (FUKUNAGA KIYOSHI)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：20361339