

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462086

研究課題名(和文) 肝虚血再灌流障害における分枝鎖アミノ酸の新規分子機構の探索

研究課題名(英文) Analysis of a new molecular system of branched-chain amino acids in liver damage following ischemia and re-perfusion

研究代表者

菅原 元 (Sugawara, Gen)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：00402587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肝虚血/再灌流モデル(I/Rモデル)の肝組織においてBCAA (branched-chain amino acids) は炎症関連因子であるIL(Interleukin)-6, TNF (Tumor necrosis factor)- α , ET (endothelin)-1, ICAM (Intercellular Adhesion Molecule), の発現を抑制した。TLR4阻害剤は、肝虚血/再灌流モデル(I/Rモデル)だけでなく、肝虚血/再灌流モデル(I/Rモデル)への5FU追加投与、胆管結紮と肝虚血/再灌流を併用したラットモデルの肝障害に対しても有効であった。

研究成果の概要(英文)：BCAAs (branched-chain amino acids) suppress inflammatory factors, such as IL-6 (interleukin-6), TNF (tumor necrosis factor alpha), ET1 (endothelin 1), ICAM (intercellular adhesion molecule) and VCAM (vascular cell adhesion molecule), in liver tissue of a model of ischemia / re-perfusion (I/R) injury.

A TLR4 inhibitor prevented liver damage in an ischemia / re-perfusion (I/R) injury model with additional administration of 5-FU. A TLR4 inhibitor also prevented liver damage in a bile duct ligation I/R liver injury model.

研究分野：外科学

キーワード：肝虚血再灌流障害 分枝鎖アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

近年の外科周術期管理の進歩により、大量肝切除術は比較的安全に行える手術となった。しかしながら、術後合併症発生率はいまだ高く、さらなる周術期管理の改善が望まれる。重大な術後合併症の1つとして肝虚血再灌流後肝障害がある。肝切除術時には、出血をコントロールするために肝十二指腸間膜での肝臓への血流（門脈、肝動脈）を完全に遮断する虚血操作が必須であるが、この肝虚血により生じる肝虚血再灌流後肝障害は、時に重篤な病態を招く場合があり、予防法および治療法の開発が必要とされている。

われわれの施設では、肝切除に伴う周術期管理に関する研究として、外瘻ドレナージした胆汁の腸管内返還による腸管バリアー機能の改善が、良好な術後経過に有効であること

(Kamiya S, et al., Ann Surg,

2004;239(4):510-7)、シンバイオティクス(有用菌とその菌の栄養となる糖類の同時摂取)による良好な腸内環境の維持が、術後炎症反応の抑制に効果的であること

(Sugawara G. et al, Ann Surg,

2006;244:706-14)を報告している。また肝虚血再灌流に関する基礎的研究により肝虚血再灌流後肝障害の主なメカニズムは、肝類洞レベルでの微小循環障害であることを報告してきた(Yokoyama Y. et al, Arch Surg, 2005;140(8):801-7, Nakagawa A. et al, Br J Surg, 2012;99(8):1120-8)。

分枝鎖アミノ酸(BCAA)は、イソロイシン、ロイシン、バリンからなる必須アミノ酸で、臨床的には肝硬変患者BCAAを長期間投与することにより、肝硬変予後の改善がみられることが報告されている(Nakaya Y. et al, nutrition, 2007;23:113-20)。このようなBCAAの長期投与の有効性の報告はあるが、短期投与時の有効性に関する報告はほとんどない。

2. 研究の目的

肝臓手術の周術期に生じる合併症の1つである肝虚血再灌流障害は、時に重篤な病態を招く場合があり予防法、治療法が必要とされている。われわれは先行実験にて分枝鎖アミノ酸(BCAA)が肝虚血再灌流障害に有効であるという研究成果を得ている。BCAAの代謝機構に関しては多くの事が解明されているが、分子機構についてはほとんど明らかになっていない。本研究では肝虚血再灌流モデル(I/Rモデル)を用いて新たなBCAAの分子機構を明らかにし、肝虚血再灌流後肝障害に対する抑制的作用の詳細なメカニズムについて解明する。またヒト肝切除症例に対してBCAA術前投与を行い、その有効性の検討およびヒト肝臓における新たなBCAAの分子機構についても明らかにする。

3. 研究の方法

【肝虚血/再灌流モデル(I/Rモデル)における炎症関連因子の発現解析】

先行実験としてラットの肝虚血再灌流モデル(I/Rモデル)への短期投与の実験において。BCAAを虚血30分前に投与し、24時間後の肝機能評価でBCAA投与群では非投与群と比較して、血中AST、ALT、ヒアルロン酸の上昇が有意に抑制され、BCAAは短期投与においても肝障害抑制作用のあることが示唆されている。本研究においても肝虚血再灌流モデル(I/Rモデル)に対してBCAA (branched-chain amino acids)の投与量1gを至適投与量とした。またアミノ酸投与30分後に血中濃度が最大になるとの報告を参考に、肝虚血再灌流の1時間前に1回目のBCAAの投与を行なった。術後2-4時間の副腎皮質ホルモンの分泌亢進によるSurgical Diabetesを回避するために術後6時間後に2回目のBCAAの投与を行ない、術後24時間後の肝臓を採取した。肝組織で炎症関連因子であるIL(Interleukin)-6, TNF(Tumor necrosis factor)- α など、血管収縮因子であ

るET(endothelin)-1やICAM(Intercellular Adhesion Molecule), VCAM(vascular cell adhesion molecule)の発現をリアルタイムPCR法にて検討した。

【肝虚血/再灌流モデル(I/Rモデル)を用いたTLR4の機能解析】

- 肝虚血再灌流モデル(I/Rモデル)に対するTLR4阻害剤の効果 -

TLR4の細胞内ドメインであるTIRドメインへの結合により、TRAMおよびTRAPへのシグナル伝達を阻害するTLR4阻害剤を用いて肝機能の検討を行った。マウスへのTLR4阻害剤投与1時間後に肝虚血(20分)/再灌流を行い、6時間後に血液生化学的検査(白血球数、赤血球数、血小板数、AST、ALT、ヒアルロン酸など)の検討を行った。腹腔内所見について検討した。

- 肝虚血再灌流モデル(I/Rモデル)への5FU追加投与に対するTLR4阻害剤の効果 -

肝虚血/再灌流モデルの重篤なモデルとしてバクテリアルトランスロケーションを付加した5FUを50mg/Kgで6日間連続投与する肝虚血再灌流/5FU連続投与群での検討を行った。マウスへ5FU6日間連続投与後にTLR4阻害剤投与し、その1時間後に肝虚血(20分)/再灌流を行い、6時間後の血液生化学的検査(白血球数、赤血球数、血小板数、AST、ALT、ヒアルロン酸など)の検討を行った。また肝虚血再灌流/5FU連続投与群でのTLR4阻害剤投与による肝組織におけるTNF α 、IL6、IL1 β 発現への影響についてreal timePCRにて検討した。

- 肝虚血再灌流モデル(I/Rモデル)へのCCL4追加投与に対するTLR4阻害剤の効果 -

肝虚血/再灌流モデルの肝障害の重篤なモデルとして肝虚血再灌流モデル(I/Rモデル)へのCCL4の2週間連続投与後のTLR4阻害剤の投与による肝機能について検討した。

【ラット胆管結紮モデルを用いたTLR4の機

能解析】

閉塞性黄疸の動物モデルであるラット胆管結紮モデルを作成した。胆管結紮1日モデルと胆管結紮7日モデルでの肝機能に関して血液生化学的検査(白血球数、赤血球数、血小板数、AST、ALT、ヒアルロン酸など)の検討を行った。

胆管結紮1日モデルと胆管結紮7日モデルに全肝虚血(20分)/再灌流を行い、6時間後の肝機能について血液生化学的検査(白血球数、赤血球数、血小板数、AST、ALT、ヒアルロン酸など)の検討を行った。

胆管結紮7日後/肝虚血再灌流モデルにTLR4阻害剤の投与を行ない、その肝機能について検討した。次に胆管結紮7日後/肝虚血再灌流モデルより切除した肝組織の病理学的検討を行なった。免疫染色にてTLR4の発現を検討した。胆管結紮7日後/肝虚血再灌流モデルより切除した肝組織でのPCRによりIL6およびIL1 β の発現を検討した。

4. 研究成果

【肝虚血/再灌流モデル(I/Rモデル)における炎症関連因子の発現解析】

肝虚血/再灌流モデル(I/Rモデル)のBCAA(branched-chain amino acids)非投与群の肝組織において炎症関連因子である

IL(Interleukin)-6, TNF(Tumor necrosis factor)- α , ET(endothelin)-1, ICAM

(Intercellular Adhesion Molecule),

VCAM(vascular cell adhesion molecule)の発現が亢進されていたが、BCAA投与群において

はIL-6, TNF- α , ET-1, ICAM, VCAMすべての発現が抑制されていた。また血液生化学的

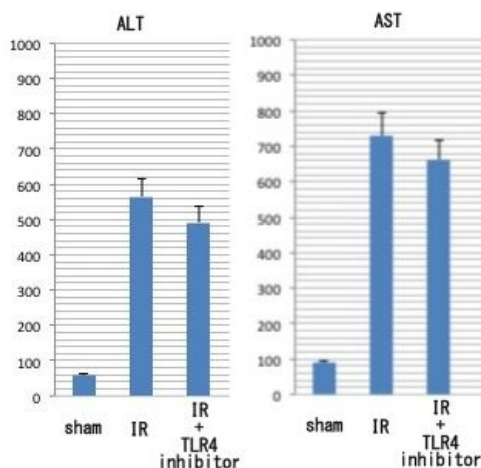
検査(白血球数、赤血球数、血小板数、AST、ALT、ヒアルロン酸など)においてもBCAA非

投与群と比較してBCAA投与群においてもデータの改善を認めた(図1)。BCAAは肝虚血

再灌流モデル(I/Rモデル)の肝障害抑制に対しても有効であった。BCAA投与群において

IL-6, TNF-a の抑制効果より、その上流因子である TLR4 に注目した。

図 1 肝虚血・再灌流(IR)への TLR4 阻害剤投与



【肝虚血/再灌流モデル (I/Rモデル) を用いたTLR4の機能解析】

- 肝虚血再灌流モデル (I/Rモデル) に対する TLR4阻害剤の効果 -

TLR4阻害剤はTLR4の細胞内ドメインである TIRドメインへの結合により、TRAMおよびTRAP へのシグナル伝達を阻害する作用を持つ。肝虚血再灌流モデル (I/Rモデル) へのTLR4阻害剤の投与群ではASTおよびALTの上昇が抑制された。腹腔内所見ではTLR4阻害剤の非投与と比較して肝障害の改善は認めなかったが、腸管浮腫についてはTLR4阻害剤の投与により改善傾向を認めた。

- 肝虚血再灌流モデル (I/Rモデル) への5FU追加投与に対するTLR4阻害剤の効果 -

肝虚血再灌流/5FU追加投与群において肝虚血再灌流単独群同様のASTおよびALTの上昇を認め、TLR4阻害剤の投与により5FU連続投与によるASTおよびALTの上昇抑制が可能であった。また肝虚血再灌流/5FU連続投与群でのTLR4阻害剤投与による肝組織におけるTNFa、IL6、IL1b発現への影響についてreal timePCRにて検討した。肝虚血再灌流単独群と比較して肝

虚血再灌流/5FU連続投与群においてTNFa、IL6、IL1bの発現は亢進していた。しかし、TLR4阻害剤はこの5FUの連続投与によるTNFa、IL6、IL1bの発現亢進に関しても抑制が可能であった。

- 肝虚血再灌流モデル (I/Rモデル) への CCL4追加投与に対する TLR4 阻害剤の効果 -

肝虚血/再灌流モデルの肝障害の重篤なモデルとして肝虚血再灌流モデル (I/Rモデル) への CCL4 の 2 週間連続投与後の TLR4 阻害剤の投与による肝機能について検討した。TLR4 阻害剤の非投与と比較して TLR4 阻害剤の投与による肝障害の軽減効果はなかった。

【ラット胆管結紮モデルを用いた TLR4 の機能解析】

胆管結紮 1 日モデルと胆管結紮 7 日モデルでは、胆管結紮 1 日モデルのほうが肝障害は重篤であった。胆管結紮 1 日モデルと胆管結紮 7 日モデルに全肝虚血 (20 分) /再灌流を行った場合、胆管結紮のみでは肝障害が軽度であった胆管結紮 7 日モデルのほうが肝虚血再灌流により肝障害が重篤化していた。胆管結紮 7 日後/肝虚血再灌流モデルに対して TLR4 阻害剤の投与により肝機能の軽減を認めた。胆管結紮 7 日後/肝虚血再灌流モデルの切除した肝組織の HE 染色にて肝組織内に壊死と膿瘍を認め、胆管結紮モデルで認められた壊死、膿瘍よりも広範囲に及んでいた。免疫染色にて TLR4 の発現は減弱していた。胆管結紮 7 日後/肝虚血再灌流モデルより切除した肝組織での PCR での検討では IL6 および IL1b の発現が亢進していた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Takagi T, Yokoyama Y, Kokuryo T, Yamaguchi J, Nagino M. Liver regeneration following experimental major hepatectomy with

cholechojejunostomy. Br J Surg. 2015 Oct;102(11):1410-7. doi: 10.1002/bjs.9908. (査読有)
Sugawara G, Ebata T, Yokoyama Y, Igami T, Mizuno T, Nagino M. Management strategy for biliary stricture following laparoscopic cholecystectomy. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2014 Dec;21(12):889-95. doi: 10.1002/jhbp.151. (査読有)
Yokoyama Y, Ebata T, Igami T, Sugawara G, Mizuno T, Nagino M. The adverse effects of preoperative cholangitis on the outcome of portal vein embolization and subsequent major hepatectomies. Surgery. 2014 Nov;156(5):1190-6. doi: 10.1016/j.surg.2014.04.036. (査読有)
Oya S, Yokoyama Y, Kokuryo T, Uno M, Yamauchi K, Nagino M. Inhibition of Toll-like receptor 4 suppresses liver injury induced by biliary obstruction and subsequent intraportal lipopolysaccharide injection. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2014 Feb;306(3):G244-52. doi: 10.1152/ajpgi.00366.2013. (査読有)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

菅原 元 (SUGAWARA, GEN)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号 : 00402587

(2)研究分担者

榎野 正人 (NAGINO, MASATO)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号 : 20237564

横山 幸浩 (YOKOYAMA, YUKIHIRO)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 80378091

國料 俊男 (KOKURYO, TOSHIO)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号 : 60378023

板津 慶太 (ITATSU, KEITA)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号 : 90534842

(平成 26 年 5 月まで分担)