

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 4 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861153

研究課題名(和文) 生体肝移植におけるmarginal donor graft適当拡大に関する研究

研究課題名(英文) Study of expanding indication of marginal donor in living donor liver transplantation

研究代表者

栗山 直久 (Kuriyama, Naohisa)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80525329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：活性化プロテインC (APC)が脂肪肝でのIRIを抑制するかは明らかでない。脂肪肝と正常肝でのIRIにおいてAPCの効果を比較検討。

[方法]通常食(ND)と高脂肪食(HD)を与えたマウスを、control群とAPC投与群とに分け、IRIモデルを作成し、比較。[成績]NDマウスではAPC投与は4hで肝障害や炎症細胞浸潤を減少させたが、HDマウスではAPCは24hで肝障害や炎症細胞浸潤を減少させた。NDマウスのみAPCは内皮傷害を抑制した。HDマウスのみAPC投与でAMPK活性が上昇した。In vitroではAPCを加えると肝細胞の生存率が高く、AMPK活性と細胞内ATPも増加していた。

研究成果の概要(英文)：We compared the cytoprotective effects of Activated protein C (APC) in non-steatotic and steatotic liver ischemia reperfusion injury (IRI).

Methods: Mice were fed either normal diets (ND mice) or high fat diets (HF mice), were treated with APC or saline (control) and were performed IRI. In an in vitro study, primary steatotic hepatocytes were either untreated, or were treated with APC, then incubated with H2O2. Results: APC reduced serum transaminase levels and the inflammatory cells infiltration at 4 h in ND mice, while at 24 h in HF mice. APC inhibited sinusoidal endothelial injury in only ND mice. APC activated AMPK phosphorylation in only HF mice. In the in vitro study, APC increased AMPK phosphorylation, ATP concentration and survival rates of hepatocytes. Conclusion: In normal liver, APC attenuated initial damage by inhibiting inflammatory cell infiltration and sinusoidal endothelial injury. However, in steatotic liver, APC might attenuated late damage via activation of AMPK.

研究分野：肝胆膵・移植外科

キーワード：肝虚血再灌流障害 脂肪肝 抗炎症作用

## 1. 研究開始当初の背景

生体肝移植の過小グラフト問題や脂肪肝における肝虚血再灌流障害(IRI)を克服することは急務である。我々は、過小グラフトに関して、ラットを用いた過小グラフト(20%)肝部分移植モデルを作成し、臓器灌流保存液中に抗凝固作用(活性化凝固第Ⅲ因子阻害作用)と抗炎症作用を有する活性化プロテインC(activated protein C: APC)を添加することにより、移植後の生存率の向上と、肝障害の軽減を図ることに成功している(1, 2)。

## 2. 研究の目的

我々は脂肪肝に対する肝IRIにおけるAPCと脂肪分解作用をもつnoradrenalin(NA)を加えることの有効性と細胞保護効果について検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 通常食(ND)と高脂肪食(HD)を9週間与えたマウスを、control群とAPC投与群とに分け、肝の70%を60分間虚血後再灌流するIRIモデルを作成し、再灌流後4, 24hに肝傷害や炎症細胞浸潤の程度、AMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)の活性化を比較した。またin vitroでのAPC投与の効果を検討するため、脂肪肝マウスから採取した初代培養肝細胞をH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在下で培養し、APCを投与しないcontrol群とAPC投与群とで24時間後の生存率、細胞内ATPの量、AMPKの活性化を比較した。

(2) HDを9週間与えたマウスから脂肪肝を摘出し、門脈からNAを含有する臓器保存液(HTK液)で灌流し、2時間後に脂肪肝中の脂肪滴の状態を検討した。

## 4. 研究成果

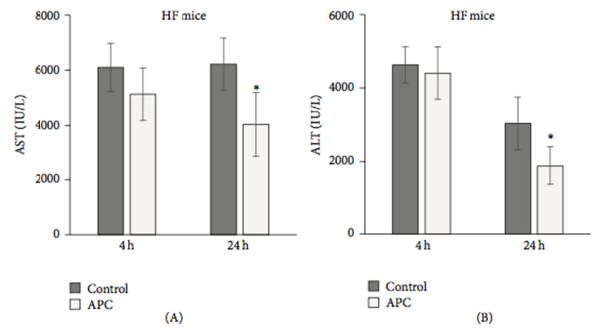
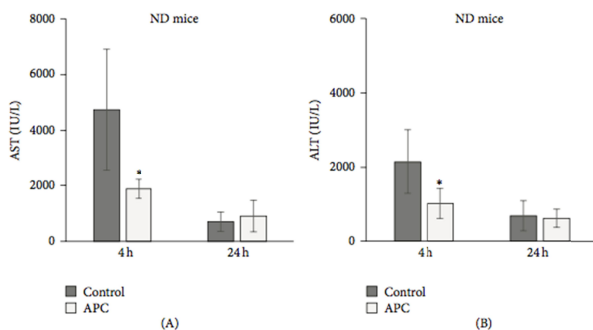


Fig.1 ND mice と HF mice の肝障害評価(AST, ALT)  
(1) ND マウスではAPCの投与後4hにおいてAST, ALT や炎症細胞浸潤を有意に減少させた。一方, HD マウスではAPCは24hにおいてAST, ALT や炎症細胞浸潤を有意に減少させた(Fig.1)。

(2) ND マウスではAPCはPECAM-1の発現は維持し、内皮傷害を抑制したが、HD マウスではその効果は得られなかった(Fig.2)。

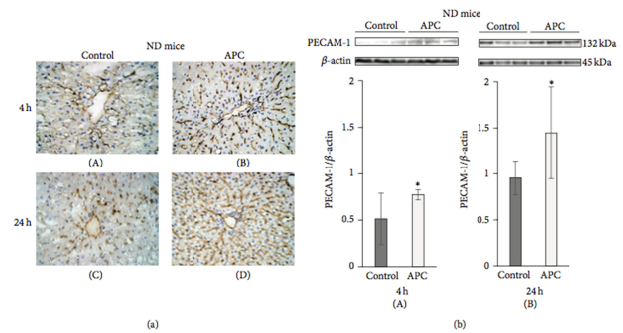


Fig.2 ND mice の内皮障害評価(PECAM-1 発現)。

(a)免疫染色 (b) Western blots

(3) ND マウスでは、APCはAMPKのリン酸化に影響を与えなかったが、HD マウスではAPC投与でAMPKのリン酸化が有意に上昇した(Fig.3)。

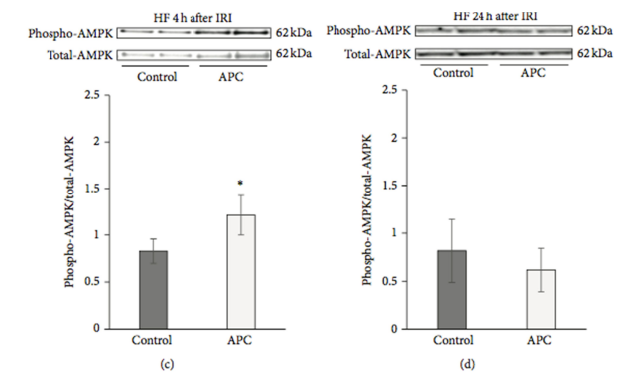


Fig.3 HF mice のAMPK評価(Western blots)。

(4) In vitro ではAPCを加えると肝細胞の生存率が有意に高くなり(Fig.4), AMPKのリン酸化が増加し、細胞内のATPも増加していた(Fig.5)。

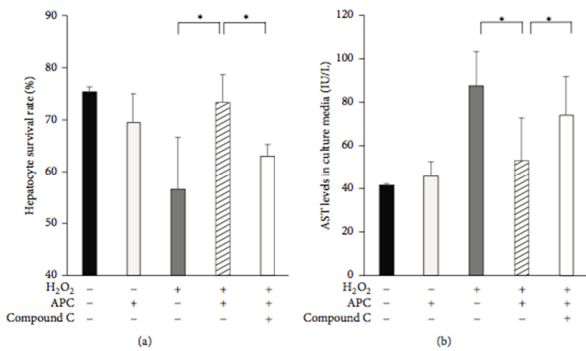


Fig.4. 肝細胞の生存率と肝障害度 (AST)

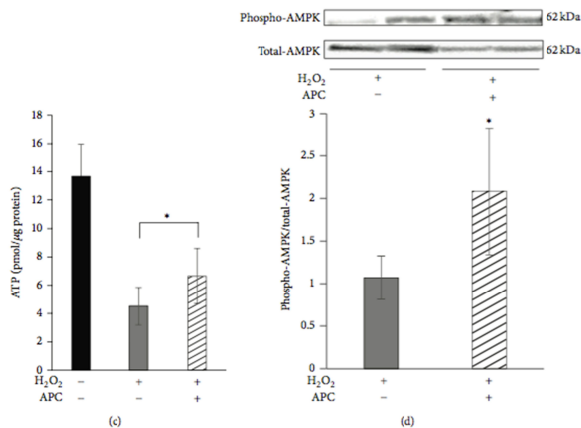


Fig.5 肝細胞の AMPK 評価と ATP 評価

(a) ELISA. (b) Western blots.

(5) HD マウスから脂肪肝を摘出し、門脈から NA を灌流し、2 時間後に脂肪肝中の脂肪滴の状態を検討したが、残念ながら、両者に有意差を認めなかった。

我々のこれまでの実験結果から生体肝移植の過小グラフト問題や脂肪肝における IRI に対して APC の細胞保護効果が示され (Fig. 6) 有用な薬剤であること可能性が示唆された。

**Cytoprotective mechanism of APC**

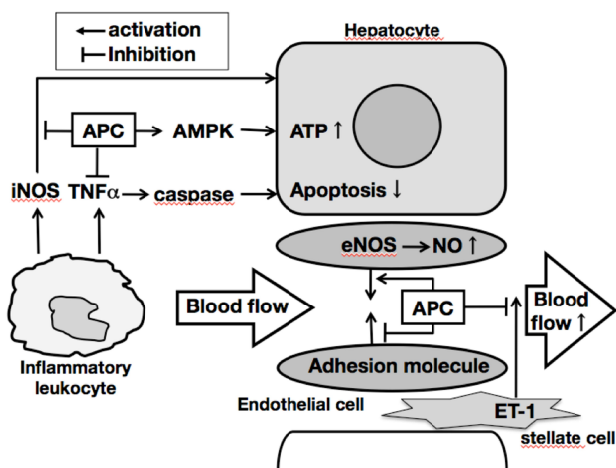


Fig.6 APC の細胞保護効果の機序

**今後の展望**

肝切除や生体肝移植後の肝虚血再灌流障害や肝再生障害において、抗凝固活性とともに細胞保護効果を有する APC は非常に有効な薬剤であるが、重篤な合併症として出血が危惧される。そこで APC 伝達路である PAR-1 と S1PR1 に関する作用機序を解明し、術後の肝障害に対する抗凝固活性を有さない細胞保護効果を示す新たなターゲット(薬剤)の可能性を解明することが臨床応用に向けての次なるステップと考えられる。

APCは血管内皮の endothelial PC receptor (EPCR) に結合し、protease-activated receptor-1 (PAR-1) を活性化する。その刺激によって細胞内の sphingosine kinase1 (SphK1) が活性化され、生成された sphingosine-1-phosphate (S1P) が細胞外に遊離し、その細胞膜受容体 1 (S1PR1) が活性化され、細胞保護効果を発揮することが示唆されている。

従って PAR-1 と S1PR1 をターゲットとした実験が現在進行中であり、抗凝固活性を有さない APC と同様の細胞保護効果のみを有した新たなターゲットの創出の可能性が見出されれば、凝固線溶系バランスが大きく変動している術後早期にも安全に使用出来るだけでなく、手術関連死亡率の改善と手術適応拡大が期待でき、多大な恩恵を与えるものと考えられる。

<引用文献>

1) Kuriyama N, Isaji S, Hamada T, Kishiwada M, Ohsawa I, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Hayashi T, Suzuki K. The cytoprotective effects of addition of activated protein C into preservation solution on small-for-size liver graft in rats. Liver Transpl 2010; 16: 1-11.  
 2) Kuriyama N, Isaji S, Hamada T, Kishiwada M, Ohsawa I, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Suzuki K, Uemoto S. Activated protein C prevents hepatic ischaemia-reperfusion injury in rats. Liver Int 2009; 29: 299-307.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1) Matsuda A, Kuriyama N, Kato H, Tanemura A, Murata Y, Azumi Y, Kishiwada M, Mizuno S, Usui M, Sakurai H, Isaji S. Comparative Study on the Cytoprotective Effects of Activated Protein C Treatment in Nonsteatotic and Steatotic Livers

under Ischemia-Reperfusion Injury.

Biomed Res Int.2015;2015:635041. doi: 10.1155/2015/635041. Epub 2015 Oct 11. ( 査読あり )  
[学会発表](計3件)

1) 松田明敏、栗山直久、伊佐地秀司、他 正常肝および脂肪肝マウスにおける活性化プロテインCの肝虚血再灌流障害抑制効果の比較検討

第115回日本外科学会定期学術集会(2015年4月16～18日:名古屋国際会議場 愛知県・名古屋)

2) Akitoshi Matsuda, Naohisa Kuriyama, Shuji Isaji et al. Activated protein C treatment protects steatotic and nonsteatotic livers under ischemia-reperfusion injury in different manner. American Transplant Congress 2015 (May 2-6, 2015 Philadelphia, PA, USA)

3) 松田明敏、栗山直久、伊佐地秀司、他 脂肪肝マウスにおける活性化プロテインCの肝虚血再灌流障害抑制効果 JDDW2015 (2015年10月8～11日:グランドプリンスホテル新高輪 東京都・港区)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者: 栗山直久(KURIYAMA, Naohisa)

三重大学 医学(系)研究科(研究院)

病態修復医学講座 肝胆膵・移植外科学, 講師

研究者番号: 80525329

(2) 研究協力者: 藤井武宏(FUJII, Takehiro)

三重大学 医学(系)研究科(研究院)

病態修復医学講座 肝胆膵・移植外科学, 助教

松田明敏(MATSUDA, Akitoshi)

三重大学 医学(系)研究科(研究院)

病態修復医学講座 肝胆膵・移植外科学, 医員

日々妙美(HIBI, Tamami)

三重大学 医学(系)研究科(研究院)

病態修復医学講座 肝胆膵・移植外科学, 実験助手