

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007 年度～2008 年度  
 課題番号：19591577  
 研究課題名（和文） 肝阻血再灌流障害時の臓器不全の解明と新規治療法の開発に関する研究  
 研究課題名（英文） Mechanistic investigation for hepatic ischemia/reperfusion injury and promising modality of prevention for organ failure  
 研究代表者  
 氏名（ローマ字）：吉留 博之（HIROYUKI YOSHIDOME）  
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・講師  
 研究者番号：10312935

## 研究成果の概要：

特に脂肪肝を中心とした障害肝における阻血再灌流障害の制御機構とその治療並びに臓器不全対策につき検討した。脂肪肝阻血再灌流後早期にはアポトーシスが惹起され、肝がエネルギー不足となり障害が強くなり惹起されることが判明した。閉塞性黄疸肝では FasL の関与と閉黄期間延長に伴い敗血症下ではアポトーシスが強く惹起され、ATP の減少と相まって臓器不全により致死率が上昇することが判明した。FasL knockout mice では有意に生存率の改善と障害の軽減を認めることが判明した。

## 交付額

（金額単位：円）

|       | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 19 年度 | 1,900,000 | 570,000   | 2,470,000 |
| 20 年度 | 1,600,000 | 480,000   | 2,080,000 |
| 年度    |           |           |           |
| 年度    |           |           |           |
| 年度    |           |           |           |
| 総計    | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科

キーワード：阻血再灌流・転写因子・アポトーシス・微小循環障害

## 1. 研究開始当初の背景

肝胆膵領域における阻血再灌流障害は肝切除・血行再建・肝移植において臨床的に重要な問題である。その機序は mediator の制御や酸化ストレスの関与などが解明されているが、障害肝における差異等の未だ解決しなくてはならない問題が多く、新規治療法の開発が必要である。

## 2. 研究の目的

障害肝（脂肪肝・黄疸肝）における阻血再灌流障害後の肝局所並びに遠隔臓器における臓器不全の解明とこれらを転写因子レベルでの制御や、障害を軽減するための遺伝子レベルでの軽減を図り、新規治療法の開発をすることを目的とした。また特に黄疸肝におい

ては障害のみならず易感染性の問題があり、これにより臓器障害の増強や肝再生不全の原因になることが推測されるため、この解明と制御も同様に検討した。

### 3. 研究の方法

脂肪肝阻血再灌流障害の解明には、db/db マウスを用いて 70%部分肝阻血を行い、再灌流後（8 時間まで）経時的に血液・肝組織を採取する。黄疸肝では胆管二重結紮切離を施行し、経時的に血液・肝組織を採取した。閉黄期間 3 または 14 日後の閉黄マウスに LPS を投与後経時的に同様に血液・肝組織等を採取した。

アポトーシス関連蛋白(caspases-3, 8, and 9) や NOS の発現を western blot にて確認し、同時に肝組織における TUNEL・PARP 染色を施行した。肝障害を肝組織像や血清 ALT 測定を行い評価した。また肝のエネルギーレベルとして ATP を測定した。LPS 投与後の生存率を検討し、FasL ノックアウトマウスを用いて障害の軽減を確認した。

### 4. 研究成果

1.脂肪肝における阻血再灌流後早期にはアポトーシス(caspases-3, 8, and 9 の変動)が惹起され、NOS の imbalance な発現により、肝がエネルギー不足となり、壊死へと導かれ障害が強く惹起されることが判明した。

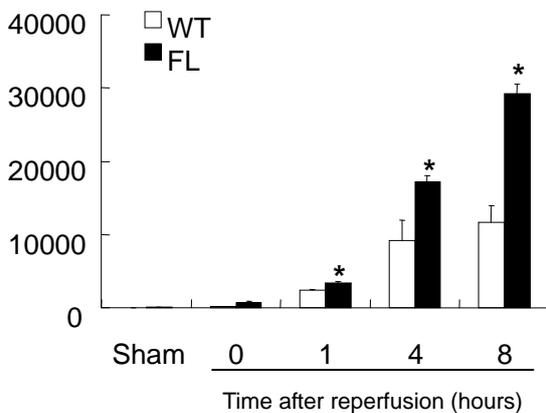


図 1 (脂肪肝では正常肝に比し有意に障害が増強した)

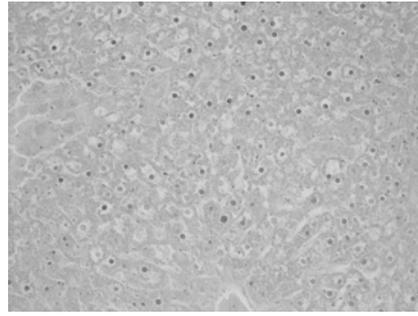


図 2 (脂肪肝では有意にアポトーシスを認めた)

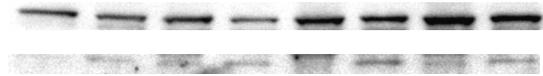


図 3 (下段は活性化 caspase 3 で再灌流後に脂肪肝でより強い活性化を認めた)

これらの改善を図るために遺伝子導入や siRNA により制御する方法を検討中である。また脂肪肝の改善効果の可能性のある薬剤投与により遺伝子レベルでの障害軽減効果があるかを検討している。また再灌流後の肝再生についても今後検討予定である。また遠隔障害（肺）における IL18 の役割を検討し Journal of Surgical Research に accept された。

2.閉塞性黄疸肝の易感染性に関しては、

cytokine, chemokineの発現と好中球集積並びに臓器不全との関係を検討し、易感染性の機序の解明を転写因子の発現やその後の蛋白発現より検討した。黄疸の遷延に伴い抗アポトーシスの働きを持つ nuclear factor-kappaB の活性化が認められた。LPS 投与により肝障害は強く惹起され致死率も上がることが判明した。また、閉黄延長に伴い肝内リンパ球集積の subset に変化を来し、抗炎症性 cytokine の発現が更新していた。これらの結果は、Journal of Surgical Research に accept された。

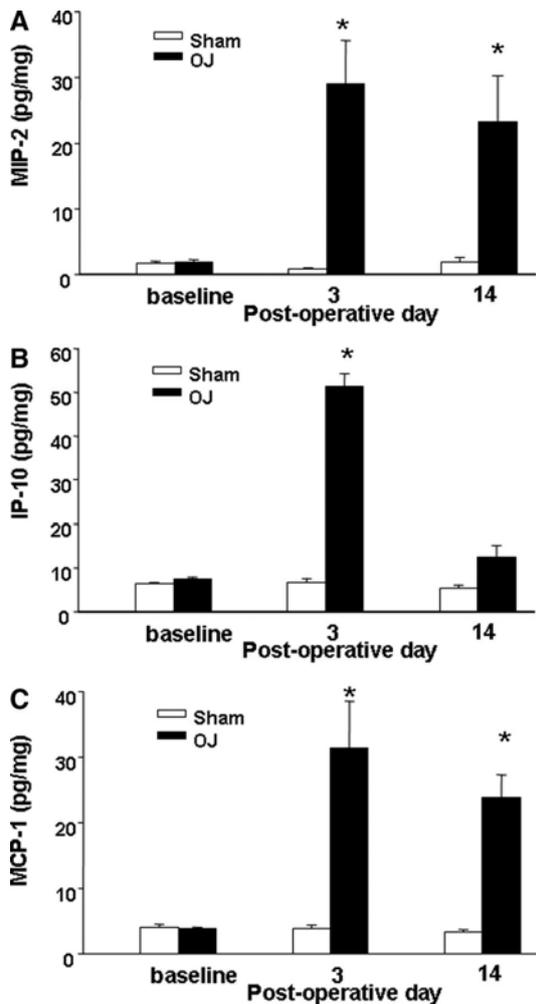


図4 (閉黄期間におけるcytokine, chemokineの発現)

また本障害において、FasLの関与が示唆された。閉黄期間延長に伴いLPS投与後の肝細胞アポトーシスが強く惹起され、同時にATPの減少と相まってnecroptosis (secondary necrosis)が強く惹起されて、臓器不全により致死率が上昇することが判明した。FasL knockout miceを用いて、障害の軽減効果を検討したところ、knockout miceでは有意に生存率の改善と障害の軽減を認めることが判明した。本内容はShockに投稿しacceptされた。

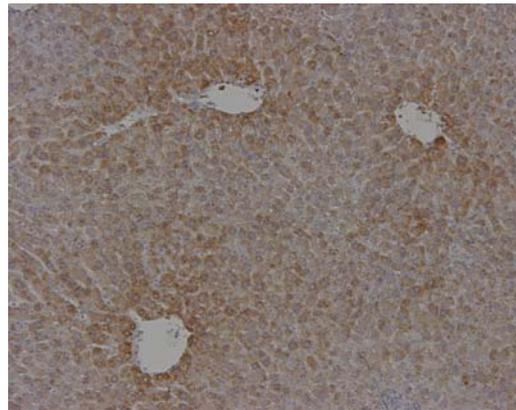


図5(閉黄14日目にLPSを投与すると著明に肝細胞アポトーシスが惹起された。)

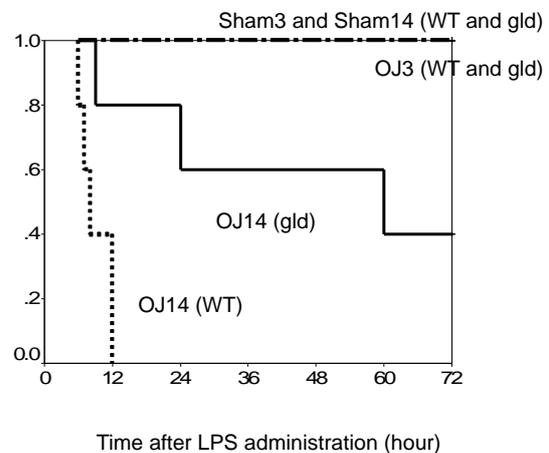


図6(閉黄3または14日目マウスにLPSを投与後の生存率。FasLノックアウトマウスでは生存率の有意な改善を認めた。)

## 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. Morita Y, Yoshidome H, Kimura F, Takeuchi D, Miyazaki M, et al.

Excessive inflammation but decreased immunological response renders liver susceptible to infection in bile duct ligated mice. *J Surg Res* 2008;146:262-270.

(査読あり)

2. Yoshidome H, Kimura F, Kato A, Miyazaki M, et al. Interval period tumor progression:

Does delayed hepatectomy detect occult metastases in synchronous colorectal liver metastases? J Gastrointes Surg 2008;12:1391-8  
( 査読あり )

3. Iida A, Yoshidome H, Kimura F, Takeuchi D, Miyazaki M, et al. Does prolonged Biliary obstructive jaundice sensitize the liver to endotoxemia? Shock (in press) ( 査読あり )

4. Takeuchi D, Yoshidome H, Kimura F, Miyazaki M, et al. Interlukin-18 exacerbates pulmonary injury after hepatic ischemia/reperfusion in mice. J Surg Res (in press)  
( 査読あり )

[学会発表](計2件)

1. 飯田文子、吉留博之、木村文夫、宮崎勝 他 閉塞性黄疸時のアポトーシス発現と肝障害・易感染性の検討(閉黄期間による相違) 第108回日本外科学会定期学術集会

2008年5月15日 長崎

2. 竹内男、吉留博之、木村文夫、加藤厚、吉富秀幸、宮崎勝 他 肝阻血再灌流障害におけるMacrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) の関与の検討 第62回日本消化器外科学会定期学術集会 2007年7月 東京

[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

吉留博之 (HIROYUKI YOSHIDOME)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 10312935

(2) 研究分担者

宮崎 勝 (MASARU MIYAZAKI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 70166156

木村文夫 (FUMIO KIMURA)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 70344208

加藤 厚 (ATSUSHI KATO)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号: 70344984

吉富秀幸 (HIDEYUKI YOSHITOMI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 60375631

竹内 男 (DAN TAKEUCHI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 20400822

(3) 連携研究者

なし