

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20845

研究課題名(和文)有機アニオントランスポーター解析に立脚した大量肝切除法の開発

研究課題名(英文)Organic anion metabolism disorder when infectious liver failure after hepatectomy

研究代表者

木村 憲央(Kimura, Norihisa)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60436029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：70%肝切除群と比較して、lipopolysaccharide(LPS)+70%肝切除群において24時間後の肝逸脱酵素、総ビリルビン、および胆汁酸上昇が認められた。マイクロアレイでは、血中の胆汁酸、ビリルビンを取り込むOatp1、Ntcp、胆汁中へ胆汁酸を排泄するMrp2において、それぞれ24時間後に70%肝切除群より減少傾向が認められた。RT-PCRでも同様に発現低下傾向が確認された。総括すると、大量肝切除後にLPSが加わることにより、ABCトランスポーター障害が増強し、遷延性高ビリルビン血症の一因となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Transaminase, total bilirubin, and bile acid levels were elevated after 24 hours in the LPS + 70% hepatectomy group compared with the 70% hepatectomy group. In the microarray analysis, the levels of organic anion transporting polypeptides (Oatps), which are sinusoidal side transporters that extract the bilirubin in the blood, and sodium taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp) that uptakes the bile acids from the blood, and ATP binding cassette protein C2 (Mrp2) that excrete the bile acids into bile duct, tended to decrease compared with the 70% hepatic resection group. In the RT-PCR, the similar decrease trend was confirmed. This study suggested that during liver regeneration in the case of infection after hepatectomy versus normal hepatectomy, the organic anion transporter impairments on the hepatocyte membrane might be enhanced and hyperbilirubinemia would be prolonged.

研究分野：肝臓外科

キーワード：肝再生 遺伝子 マイクロアレイ 感染性肝不全 肝切除 生体肝移植 有機アニオントランスポーター

1. 研究開始当初の背景

化学療法や分子標的薬などの有効な抗がん治療が発展してきた今も、肝悪性腫瘍に対する唯一の根治治療は肝切除術であることは言うまでもない。近年、手術手技や周術期管理の進歩により、残肝容量 30% までは安全に大量肝切除が可能となったが、肝再生過程で感染により助長されて生じる急性肝不全は極めて致死적であり治療に難渋する。一方で、ビリルビン、胆汁酸、コレステロールなどの腸肝循環機構は、胆汁生成に必須の過程であり、肝臓を中心として代謝及び排泄調節を行う重要なホメオスタシスの典型例である。近年、腸肝循環を担う分子として、肝細胞、胆管上皮細胞、腸管細胞における種々のトランスポーターの実体が明らかにされてきた¹⁾²⁾。これらのトランスポーターは、胆汁酸や各種薬剤を含む有機アニオンの細胞膜輸送を担っており、それらの障害は、先天性、二次性を問わず、様々な疾患で肝内胆汁うっ滞の直接的な病因として重要視されている。

申請者らは、「肝再生不全を伴う高ビリルビン血症（肝不全）」の病態に着目し、肝再生時の各種トランスポーターの解析を行ってきた。近年、ラット大量(90%)肝切除モデルを用いて有機アニオンの1つであるビリルビンの類洞側取り込みトランスポーターである Oatp1-4(organic anion transporting polypeptide 1-4)と、胆管側排泄トランスポーターである Mrp2(multidrug resistance protein 2)の down-regulation と、類洞側排泄トランスポーターである Mrp1, Mrp3 の up-regulation が肝再生時に生じ、肝再生不全の誘因であることを明らかにした³⁾。また、同モデルを用いて、胆汁酸の類洞側取り込みトランスポーターである Ntcp(Na+/taurocholate cotransporting polypeptide)と、胆管側排泄トランスポーターである Bsep(bile salt export pump) の down-regulation と、類洞側排泄トランスポー

ターである Mrp4 の up-regulation が肝再生不全に関わることを明らかにした⁴⁾。申請者らは以上の研究結果より、ビリルビンや胆汁酸などの有機アニオン排泄経路の変更によるこれらの肝内蓄積や、それに伴う高ビリルビン血症・高胆汁酸血症が肝再生不全に深く関わっている可能性について指摘した。しかし、実際の臨床で致死的な経過をたどることの多い、肝切除後感染性肝不全時における、有機アニオン排泄経路異常を解析した研究は、いまだ存在しない。急性肝不全における有機アニオントランスポーター解析は、致死性肝不全の病態解明に寄与する可能性があり、胆汁酸の代謝異常研究、劇症肝炎の病態研究にとっても基礎となる研究課題である。

2. 研究の目的

肝切除後急性肝不全では、胆汁酸代謝異常や高ビリルビン血症などの有機アニオン代謝異常がみられ、肝再生不全から肝不全が遷延し、致死的な経過を辿ることが多いがその病態はいまだ解明されていない⁵⁾⁶⁾。本研究の目的を以下に記載する。

(1) ラット肝切除後に lipopolysaccharide(LPS)を静脈内投与し、肝切除後感染性肝不全モデルを作成し、肝組織における有機アニオントランスポーター発現解析を行い、肝切除後感染性肝不全時における有機アニオン代謝異常と肝再生不全の機序の解明を目指す。

(2) 更に、Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) α のリガンドとして、同受容体の活性化作用を有するフィブラート系薬剤を投与することにより、有機アニオントランスポーター発現調整作用を解析し、肝不全治療に向けた病態基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) lipopolysaccharide(LPS)誘導肝切除後肝不全モデルの作成

週齢 6 週、180 ~ 220 g の Sprague-Dawley 雄性ラットを用い、全身麻酔下に開腹手術のみをおこなった Sham 手術群(), エンドトキシンとして LPS を下大静脈内へ投与した LPS 単独投与群(), 肝を 70% 切除した 70% 肝切除群(), 70% 肝切除の後に LPS を投与した LPS + 70% 肝切除群(, 肝再生時感染性肝不全モデル) の 4 群に分類する。各処置後、12, 24, 36, 48, 72, 168 時間後に各々肝組織、全血を採取する。血液検体から AST, ALT, NH₃, ビリルビン, 胆汁酸, エンドトキシン, Interleukin(IL)-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α 濃度を測定する。また、肝のホルマリ

ン固定パラフィン包埋切片を作成し、HE 染色を施行し、光学顕微鏡下に肝障害の程度を4段階（高度，中等度，軽度，なし）に評価する。

(2) 肝組織中の有機アニオントランスポーター遺伝子発現解析

マイクロアレイを用いた網羅的な核内シグナル解析に加え，以下の有機アニオントランスポーター遺伝子変動について解析する。更に，これらの遺伝子発現を RT-PCR で数値化した後，蛋白発現量を Western blot 法で測定する。

類洞側肝細胞膜（basolateral membrane）発現型トランスポーター

Ntcp(Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide), Oatp1-4(organic anion transporting polypeptide 1-4), Mrp1,3,4,6(multidrug resistance protein 1,3,4,6)

毛細胆管側肝細胞膜(canalicular membrane) 発現型トランスポーター

Mrp2(multidrug resistance protein 2), Bsep(bile salt export pump)

(3) 肝組織中の有機アニオントランスポーター蛋白発現と局在の検討

上記の有機アニオントランスポーターの蛋白発現量を定量するとともに，免疫組織化学的にこれらの機能蛋白が適切な細胞膜分布を呈しているかを検証する。

(4) 有機アニオン排泄能に関する in vivo での検討

有機アニオントランスポーターを介して特異的に胆汁中に排泄されるカルボキシフルオレセインを門脈内投与し，胆汁への排泄を共焦点蛍光顕微鏡で観察し，有機アニオントランスポーターの局在と機能を評価する。

(5) 有機アニオントランスポーター解析に基づく肝不全治療

Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) α のリガンドとして，同受容体の活性化作用を有するフィブラート系薬剤を投与することにより，有機アニオントランスポーター発現調整作用を検討する。即ち各種フィブラート製剤（clofibrate, bezafibrate, fenofibrate）投与により LPS 肝不全ラットの有機アニオントランスポーター発現調整と肝不全の軽減効果を評価する。

4. 研究成果

(1) 血液生化学検査（図1）

24 時間後の時点で，LPS + 70%肝切除群において Control である Sham 手術群と比較して肝逸脱酵素（AST, ALT）総ビリルビン，および胆汁酸上昇が認められた。中でも，ALT および胆汁酸では 70%肝切除群と比較

し，統計学的有意差を持って増加が確認された。72 時間後の時点では AST, ALT および胆汁酸において，Sham 手術群と LPS + 70%肝切除群の間に有意差が認められた。168 時間後ではいずれも差は認められず，定常化していた。どの時点においても LPS 単独投与群では Sham 手術群と比較して差

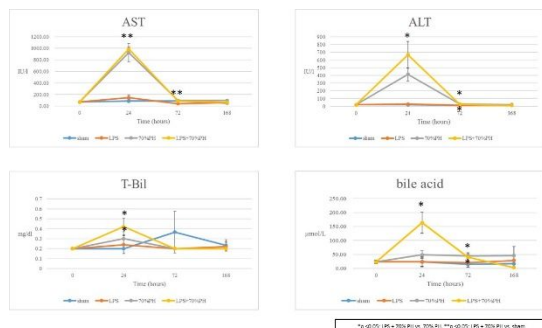


図1 Laboratory data

は認められなかった。

(2) マイクロアレイ分析（図2）

類洞側肝細胞膜発現型トランスポーターであり，胆汁酸，ビリルビンを肝細胞内に取り込む Oatp1, Ntcp において，70%肝切除群と比較して LPS + 70%肝切除群で 24 時間後にシグナルの減少傾向が認められた。同様に毛細胆管側肝細胞膜発現型トランスポーターであり，胆汁中へ胆汁酸を排泄する Mrp2 において，24 時間後に 70%肝切除群より減少傾向が認められた。その他，Bsep や Mrp1,3,4 などではシグナル変動は認められなかった。

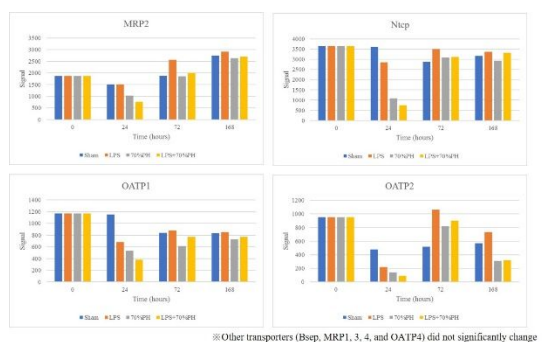


図2 Microarray analysis

(3) RT-PCR（図3）

マイクロアレイで変化が認められた Mrp2, Ntcp および Oatp1,2 に対して RT-PCR を施行した。Mrp2, Ntcp および Oatp1 において有意差は認めなかったが，マイクロアレイの結果と同様に 70%肝切除群と比較して LPS + 70%肝切除群で 24 時間後に遺伝子発現の低下傾向が確認された。Oatp2 においては前述の差は認められなかった。72 時間後の時点では，いずれのトランスポーターにおいても LPS+70%肝切除群が他の群と比較して発現増加が認められた。肝切除群

では 168 時間が経過した段階でも平素の状態までの回復は認められなかった。

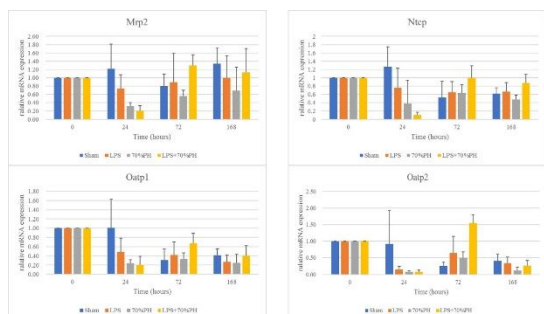


図3 RT-PCR

(4) 考察

LPS による細胞傷害性は類洞に存在する Kupffer 細胞の Toll-Like-Receptor 4 (TLR4) へのシグナル伝達を介して産生された種々のサイトカインあるいはケモカインが関与しているとされる⁷⁾。今回の実験で確認された ABC transporter の減少は LPS による transporter への直接作用なのか、あるいは LPS による細胞傷害性による二次的な変化であるのかは現時点では不明であり、さらなる検討が必要である。だが、本実験により肝切除後肝再生期の感染状態が ABC transporter 障害を惹起し、胆汁うっ滞の増悪の一因となっている可能性が示唆された。

<引用文献>

- 1) 上田和光, et al. ABC トランスポーター - 生体防御の ABC. 2002
- 2) Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 2004;126:322-342.
- 3) Norihisa Kimura, Kenichi Hakamada, Shojiro-Kazunori Ikenaga, et al. Gene expression of ATP-binding cassette transporters during liver regeneration after 90% hepatectomy in rats. *International Journal of Molecular Medicine* 2012; 30; 28-34
- 4) Takuya Miura, Norihisa Kimura, Toshiyuki Yamada, et al. Sustained repression and translocation of Ntcp and expression of Mrp4 for cholestasis after rat 90% partial hepatectomy. *Journal of Hepatology* 2011; 55; 407-414
- 5) Emond JC, Renz JF, Ferrell LD, et al. Functional analysis of grafts from living donors. Implications for the treatment of older recipients. *Annals of surgery* 1996;224:544-552.
- 6) Kawasaki S, Makuuchi M, Matsunami H, et al. Living related liver transplantation in adults. *Annals of surgery* 1998;227:269-274.
- 7) Yang P, Zhou W, Li C, Zhang M, et al. Kupffer-cell-expressed transmembrane TNF- α is a major contributor to lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced liver injury *Cell and tissue research*. 2015;363:371-383.

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 4 件)

発表者名: Yusuke Wakasa, Norihisa Kimura, et al.

発表標題: Organic anion metabolism disorder when infectious liver failure after hepatectomy

学会等名: 27th Annual Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2018) (国際学会)

発表年: 2018 年

発表者名: 若狭 悠介, 木村 憲央, 他
 発表標題: ラット肝切除後肝再生期感染性肝不全モデルにおける肝細胞有機アニオントランスポーター解析

学会等名: 第 79 回日本臨床外科学会総会
 発表年: 2017 年

発表者名: 若狭 悠介, 木村 憲央, 他
 発表標題: ラット肝切除後肝再生期感染性肝不全モデルにおける肝細胞有機アニオントランスポーター解析

学会等名: 第 72 回日本消化器外科学会総会
 発表年: 2017 年

発表者名: 若狭 悠介, 木村 憲央, 他
 発表標題: ラット肝切除後肝再生期感染性肝不全モデルにおける肝細胞有機アニオントランスポーター解析

学会等名: 第 117 回日本外科学会定期学術総会
 発表年: 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 国内外の別:

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 憲央 (KIMURA, Norihisa)
弘前大学医学研究科 ・ 講師
研究者番号：60436029

(2)研究分担者

()

(3)連携研究者

若狭 悠介 (WAKASA, Yusuke)
弘前大学医学部附属病院 ・ 医員
研究者番号：70770783

(4)研究協力者

()