

令和元年5月28日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10567

研究課題名(和文) システインの肝障害抑制に関する作用機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of the inhibitory effect of cysteine on liver damage

研究代表者

横山 幸浩 (YOKOYAMA, YUKIHIRO)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：80378091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラット肝星細胞においてシステインは肝星細胞の収縮を抑制し、エンドセリンによる細胞内カルシウムの上昇を強く抑制した。ラット敗血症性ショックモデルにおいてシステインにより血清ALT値が有意に低くなり、肝障害の抑制効果が示唆された。血清アルブミンは大腰筋面積と正の相関を示した。また手術前後の総大腿筋面積の筋肉量減少(サルコペニア)と術後在院日数、術後合併症発生数、腹腔内膿瘍、肝不全などの術後経過において、いずれにおいてもサルコペニア群での術後経過が不良であった。システインの共有結合部のほとんどがアルブミンに占められており、システインが手術に伴うサルコペニアの改善に有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、システインによる肝障害の抑制効果が示唆された。またシステインが手術に伴うサルコペニアの改善に有効である可能性も示唆された。新たな知見が明らかになっただけでなく、臨床応用への可能性も明らかにしており、本研究成果の学術的、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Cysteine suppressed the shrinkage of hepatic stellate cells and strongly inhibited the endothelin-induced elevation of calcium in hepatic stellate cells. The serum ALT level in the cysteine-administered group was significantly lower than that in the non-administered group in a rat sepsis model. Cysteine showed an inhibitory effect on rat liver damage caused by intraperitoneal administration of lipopolysaccharide (LPS). The serum albumin level was correlated with the area of the psoas major muscle. The hospitalization period was prolonged, and postoperative complications such as an abdominal abscess and liver failure increased in patients with decreased muscle mass (sarcopenia) of the total femoral muscle. Most covalent bonds in cysteine were formed with serum albumin. Our results suggested that cysteine was effective in improving sarcopenia after surgery.

研究分野：消化器外科学

キーワード：システイン 肝障害

## 1. 研究開始当初の背景

大量肝切除術を行う場合には、肝切離時に肝流入血である門脈と肝動脈を遮断するいわゆるプリングル法が用いられる。この手技は術中出血量を減らすのに有効ではあるが、同時に肝虚血・再灌流障害を引き起こす。また大量肝切除などの高度侵襲手術では術後に菌血症が容易に生じ、時に敗血症性ショックにまで至ることがある。肝虚血・再灌流や敗血症性ショックではいずれも肝障害が誘発される。そのため、この肝障害を抑制するための基礎研究、臨床研究がこれまでに数多く行われてきた。しかしながら、臨床の現場でこの肝障害を確実に抑制する手段はいまだ存在せず、大量肝切除術の安全性はいまだ十分に確保されていないのが現状である。

肝虚血・再灌流肝障害と敗血症性ショックに伴う肝障害では共通したメカニズムが存在する。それらは、1) 肝微小循環障害、2) 炎症反応亢進、3) 活性酸素過剰産生による臓器障害などである。もちろん臓器障害ではこれらが単独で起こるのではなく、各々が他の原因になったり結果になったりして、複雑な病態を呈する。上記いずれのメカニズムにおいても重要な役割を担う細胞が肝臓のレジデントマクロファージとして類洞内に存在するクッパー細胞と類洞と肝細胞の間にあるディッセ腔に存在する肝星細胞である。これらの細胞は、虚血・再灌流あるいは敗血症というストレスに反応して活性化し、様々な生理活性変化を肝臓にもたらす。例えばクッパー細胞は、活性化すると interleukin-6 (IL-6)、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などの炎症性サイトカインや endothelin-1、thromboxane A<sub>2</sub> などの血管収縮因子を過剰に産生する。また、これらに反応して肝星細胞も活性化される。肝星細胞が活性化されると endothelin-1 に過剰に反応して類洞を収縮させ、強い微小循環障害をもたらすとともにコラーゲン線維を過剰産生し肝線維化を起こす。これまでに、多くの研究でクッパー細胞や肝星細胞の活性化を抑制する薬剤が試されてきたが、その効果は限定的であり、真に臨床応用されているものは無い。

我々は以前に行ったラットの研究において分岐鎖アミノ酸を投与したラットでは、肝臓の微小循環がより良好に保たれていた。またマウスのマクロファージ細胞株である RAW cell に LPS を投与し、20 種類全てのアミノ酸の endothelin-1 mRNA に対する発現抑制効果を検討した結果、システインに最も強い発現抑制効果を認め、同様の効果を IL-6 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカイン mRNA の発現にも認めている。

## 2. 研究の目的

本研究では「肝臓にストレスが加わった時に生じるクッパー細胞や肝星細胞の過剰な活性化はシステイン投与により抑制され、その作用が肝障害を抑制することにつながる」という仮説を立て、システインの肝虚血・再灌流や敗血症性ショックに伴う肝障害の抑制効果に関するメカニズムを詳細に検討するとともに、アミノ酸製剤の臨床応用への可能性を模索することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 【肝星細胞株を用いた実験】

ラット肝星細胞 80 万個をコラーゲンコートしたディッシュ上にまき、シート状に培養した。培養 24 時間後に L-Cysteine 40mM を投与し、30 分後に肝星細胞の収縮誘発因子であるエンドセリン 100nM を投与した。その 4 時間後に肝星細胞の収縮を調べた。対照群としては生理的食塩水を投与した。

ラット肝星細胞に対して L-Cysteine 40mM を投与し、30 分後に肝星細胞の収縮誘発因子であるエンドセリン 100nM を投与した。L-Cysteine の投与群と非投与群において細胞内カルシウム濃度を経時的に検討した。

#### 【システインを用いた in vivo 実験】

ラットへのリポポリサッカライド (LPS) の腹腔内投与によりラット敗血症性ショックモデルを作成した。ラット敗血症性ショックモデルへの L-Cysteine の静脈内投与後に血液生化学検査を行い、LPS 投与後に生じる肝障害について検討した。対照群としては生理的食塩水を投与した。

#### 【システインのサルコペニアとの関連性に関する検討】

患者 CT 画像を用いて大腰筋面積の筋肉量減少 (サルコペニア) と血清アルブミン値の相関を検討した。また、手術前後の患者 CT 画像を用いて第 3 腰椎レベルでの総大腿筋面積 (total psoas area: TPA) の筋肉量減少 (サルコペニア) と術後在院日数、術後合併症発生数、腹腔内膿瘍、肝不全などの術後経過について検討した。手術前後の第 3 腰椎レベルでの総大腿筋面積 (total psoas area: TPA) の測定により筋肉量低下と術後在院日数、術後合併症発生数、腹腔内膿瘍、肝不全などの術後経過について検討した。

## 4 . 研究成果

#### 【肝星細胞株を用いた実験】

ラット肝星細胞のシート培養 24 時間後に L-Cysteine を 40mM と肝星細胞の収縮誘発因子であるエンドセリン 100nM の連続投与を行ない、4 時間後に肝星細胞の収縮を検討した。生理的食塩水を投与した対照群に比べて、L-Cysteine を投与した群では肝星細胞の収縮が抑制された。

ラット肝星細胞へのエンドセリン 100nM 投与前の L-Cysteine 40mM の事前投与の有無による細胞内カルシウム濃度について検討した。肝星細胞においてエンドセリン投与により細胞内カルシウム濃度が上昇し、L-Cysteine の事前投与はエンドセリン投与後の細胞内カルシウム濃度の上昇を強く抑制した。

#### 【システインを用いた in vivo 実験】

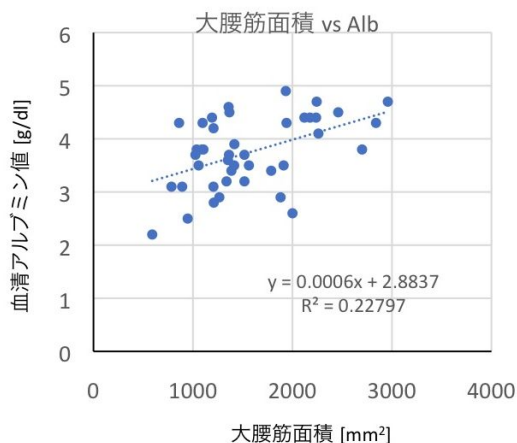
リポポリサッカライド (LPS) を腹腔内へ投与したラット敗血症性ショックモデルに L-Cysteine を静脈内投与し、LPS 投与後に生じる肝障害を検討した。生理的食塩水を投与した対照群に比べて、事前に L-Cysteine を静脈内投与した群において血清 ALT 値が有意に低い結果が得られた。L-Cysteine の肝障害への有用性が示唆された。

#### 【システインのサルコペニアとの関連性に関する検討】

システインの共有結合部のほとんどがアルブミンに占められており、システインとアルブミンの関連性が報告されている。アルブミンは肝臓にて合成され、分泌される 585 個のアミノ酸残基からなるタンパクである。17 対のジスフィルド結合のうち、N 末端から 34 番目のシステイン残基のみが、遊離チオール基を有し、この遊離チオール基がフリーかどうかで還元型か酸化型となり機能している。システインとアルブミンの関連性よりアルブミンと高齢に伴う筋肉量

減少（サルコペニア）について検討した。患者 CT 検査にて、高齢になるにしたがって大腰筋面積が著しく低下することが明らかになった。また血液検査項目では、血清アルブミン値が大腰筋面積と最も強く正の相関を示すことが明らかとなった（図 1）。

図 1



さらに血清アルブミン値も年齢とともに低下することも明らかになった。高齢に伴う筋肉量減少（サルコペニア）を防ぐためには、血清のアルブミン値を高く維持すること、すなわちタンパク質の摂取を積極的に行うことが重要であることを示唆された。

手術前後の CT 画像を用いて第 3 腰椎レベルでの総大腿筋面積 (total psoas area: TPA) の筋肉量減少（サルコペニア）と術後在院日数、術後合併症発生数、腹腔内膿瘍、肝不全などの術後経過について検討した。術後在院日数は非サルコペニア群において 30 日、サルコペニア群において 39 日、術後合併症発生数は非サルコペニア群において 37%、サルコペニア群において 54%、腹腔内膿瘍は非サルコペニア群において 18%、サルコペニア群において 29%、肝不全は非サルコペニア群において 16%、サルコペニア群において 33%であった。サルコペニア群と比較して非サルコペニア群において良好な術後経過を認めた。

手術前後の第 3 腰椎レベルでの総大腿筋面積 (total psoas area: TPA) の測定により筋肉量低下と術後在院日数、術後合併症発生数、腹腔内膿瘍、肝不全などの術後経過について検討した。術後男性において 5.0%以上、女性で 2.6%以上の低下を筋肉量低下と定義した。術後在院日数は非筋肉量低下群において 32 日、筋肉量低下群において 35 日、術後合併症発生数は非筋肉量低下群において 33%、筋肉量低下群において 64%、腹腔内膿瘍は非筋肉量低下群において 18%、筋肉量低下群において 29%、肝不全は非筋肉量低下群において 18%、筋肉量低下群において 31%であった。筋肉量低下群と比較して非筋肉量低下群において良好な術後経過を認めた。

手術に伴う筋肉量減少（サルコペニア）を防ぐためにも、血清のアルブミン値を高く維持すること、すなわちタンパク質の摂取を積極的に行うことが重要であることを示唆された。またシステインとアルブミンの関連性より、システインの投与が手術に伴う筋肉量減少（サルコペニア）の改善に有効である可能性が示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：榑野 正人

ローマ字氏名：(NAGINO,masato)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 20237564

研究分担者氏名：江畑 智希

ローマ字氏名：(EBATA,tomoki)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 60362258

研究分担者氏名：國料 俊男

ローマ字氏名：(KOKURYO,toshio)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 60378023

研究分担者氏名：伊神 剛

ローマ字氏名：(IGAMI,tsuyoshi)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部附属病院

職名：病院講師

研究者番号(8桁): 50420378

研究分担者氏名：山口 淳平

ローマ字氏名：(YAMAGUCHI, junpei)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁): 00566987

研究分担者氏名：菅原 元

ローマ字氏名：(SUGAWARA, gen)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部附属病院

職名：病院講師

研究者番号(8桁): 00402587

(2)研究協力者

なし