

令和元年6月4日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10569

研究課題名(和文) 肝虚血再灌流障害におけるPAR-1とS1PR1の作用機序の解明

研究課題名(英文) The impact of PAR-1 and S1PR1 regulation for hepatic ischemia reperfusion injury

研究代表者

栗山 直久 (Kuriyama, Naohisa)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80525329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肝移植や拡大肝切除後の肝機能障害の大きな原因として、肝虚血再灌流障害がある。今回の実験で、マウス肝虚血再灌流障害が、Selective S1PR1 agonist (SEW2871)とPAR-1 receptor antagonist (SCH530348: Vorapaxar)にて抑制出来る事を実験的に証明する事が出来ました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

S1PR1とPAR-1の二つの新たなターゲットの創出の可能性が見出され、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。この実験結果で得られる成果の学術的、治療学的意義は非常に大きく、特に末期肝不全患者や、高度進行肝細胞癌および胆管癌患者において、手術適応と安全性の向上を図ることが可能となり、世界的に大きなインパクトを与えたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：S1PR1 agonist induces attenuation of hepatic IRI, which might be provided by preventing SEC damage. S1PR1 may be a therapeutic target for the prevention of early sinusoidal injury after hepatic IRI. Selective PAR-1 antagonist, vorapaxar, attenuates hepatic IRI, and reduces apoptosis notably. SECs, where PAR-1 expressions are mostly found, are one of critical targets of vorapaxar.

研究分野：肝虚血再灌流障害

キーワード：肝虚血再灌流障害 S1PR1 PAR-1 activated protein C

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

正常肝のみならず脂肪肝における肝虚血再灌流障害に対する活性化プロテイン C (activated protein C: APC) の有効性を報告してきたが^{1,2)}、臨床応用においては大きな問題が存在する。それは APC のもつ抗凝固作用である。特に肝移植や肝切除直後の凝固線溶系バランスが大きく障害されている状態では、APC 投与による出血のリスクが危惧される。そのため近年では、抗凝固活性が低下した組換え型 APC (3K3A-APC など) が開発され、米国で脳障害患者を対象とした臨床試験が行われている。

2. 研究の目的

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。そこで、この経路の中で、(EPCR)、PAR-1、S1PR1 をターゲットとなり得るため、それぞれ制御することで、抗凝固活性を有さないどのような細胞保護効果を示すかについて検証を行うことにした。

3. 研究の方法

研究①: マウス肝虚血再灌流障害における S1PR1 agonist の細胞保護効果について

モデル: マウス (C57BL6) 70%部分肝虚血再灌流

使用薬剤: Selective S1PR1 agonist (SEW2871)

研究②: マウス肝虚血再灌流障害におけ Thrombin をターゲットとした PAR-1 receptor antagonist の細胞保護効果について

モデル: マウス (C57BL6) 70%部分肝虚血再灌流

使用薬剤: PAR-1 receptor antagonist (SCH530348:Vorapaxar)

4. 研究成果

研究①: Selective S1PR1 agonist (SEW2871)

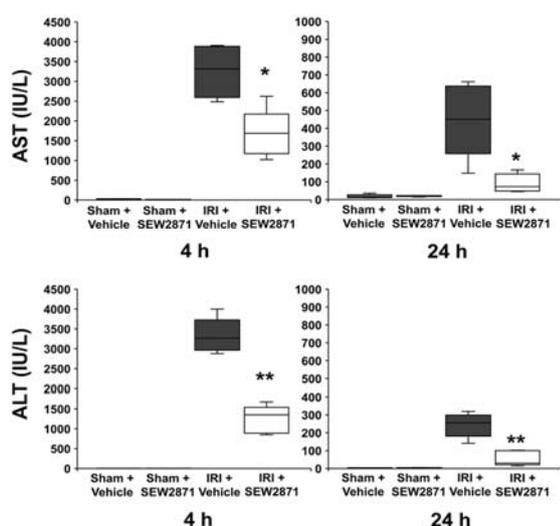


Fig. 1, 肝障害評価(AST, ALT)

IRI Vehicle (コントロール群) に比べて, Selective S1PR1 agonist (SEW2871) 投与群で有意に肝機能の改善を認めた。

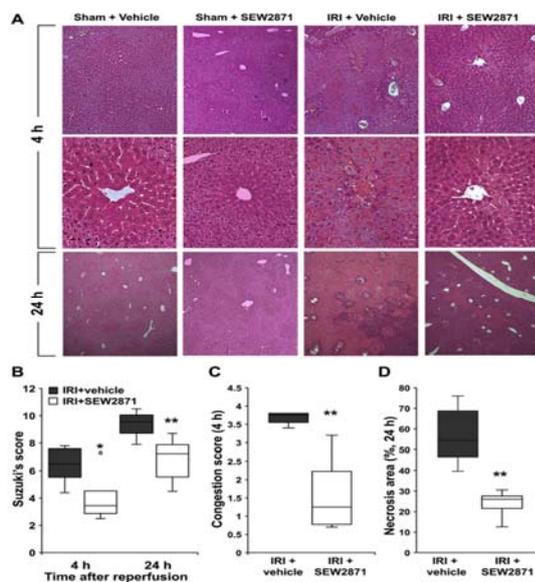


Fig. 2, 組織学的障害度評価(H.E 染色, Suzuki 肝障害度スコア)

(A, B) SEW2871 投与群で IRI 障害は組織学的に改善されていた。

(C, D) SEW2871 投与群では, 有意に IRI 後 4 時間で鬱血が改善されて, 24 時間でも壊死範囲も減少していた。

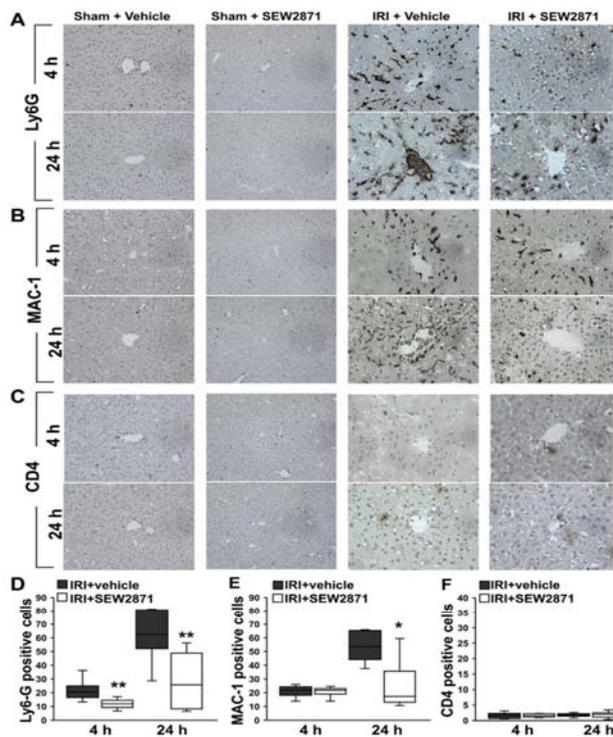


Fig. 3. 炎症細胞浸潤評価(免疫染色)
 (A, B) SEW2871 投与群で有意に Ly6G および MAC-1 陽性細胞浸潤を抑制していた。
 (D) リンパ球浸潤に関しては、差がなかった。

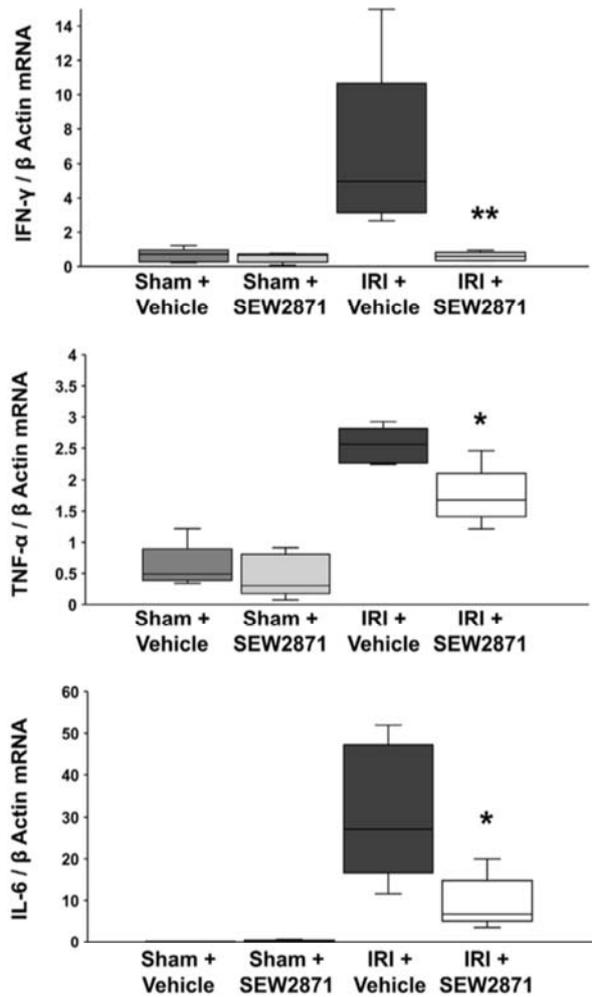


Fig.4. 炎症性サイトカイン評価 (Real-time PCR)
 SEW2871 投与群では有意に炎症性サイトカインである IFN γ , TNF α , IL-6 の分泌を抑制していた。

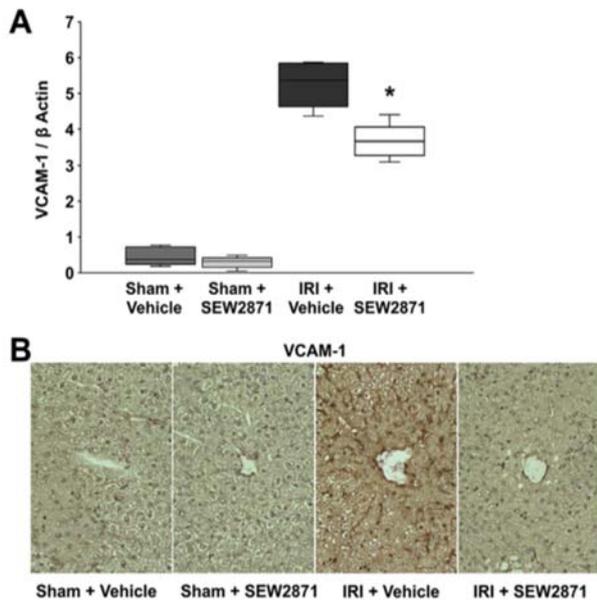


Fig. 5. 接着因子評価(VCAM-1, 免疫染色)
 SEW2871 投与群では有意に VCAM-1 の発現を抑制していた。

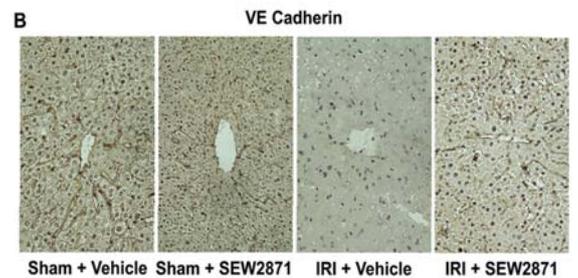
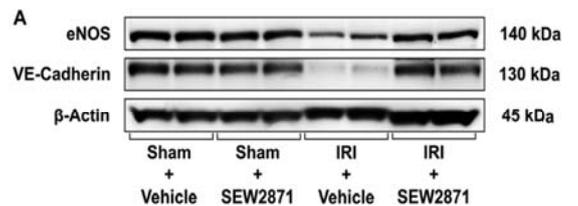
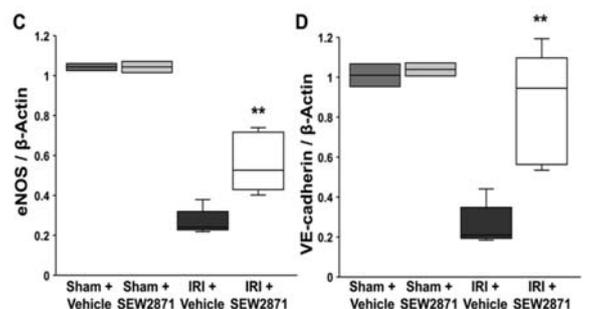


Fig. 6. 内皮細胞障害評価 (in vivo)
 (A) Western blots. (B) 免疫染色。
 (A, B) sham 群では常に発現している eNOS や VE-cadherin が、IRI 後にはコントロール群で有意に発現が低下し、内皮細胞障害を来しているが、SEW2871 投与群では有意に発現が上昇しており、内皮障害が緩和されていることが示唆された。



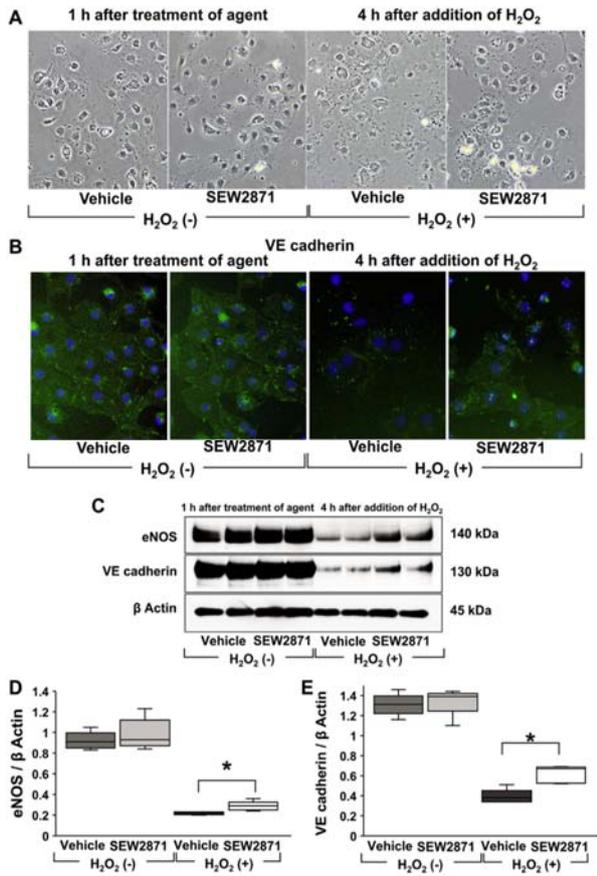


Fig.7. 内皮細胞障害評価 (in vitro)

(A)細胞実験 (B) 蛍光免疫染色 (C) Western blots
 In vivo 実験同様に、SEC 細胞を用いた in vitro 実験でも、コントロール群に比べて SEW2871 投与群では、有意に eNOS, VE-cadherin 発現が上昇しており、内皮障害が緩和されていることが示唆された。

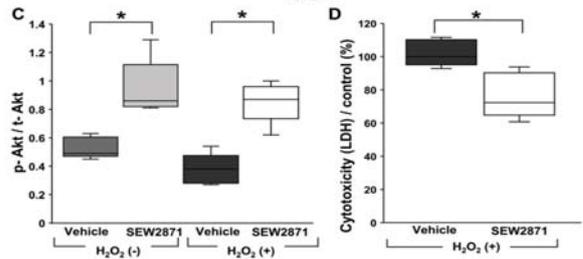
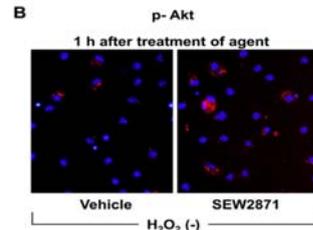
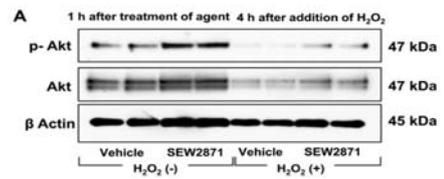
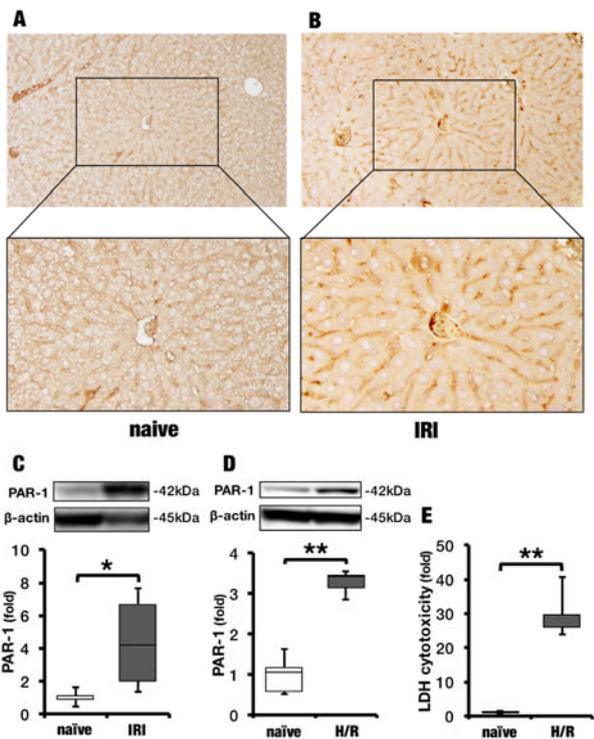


Fig.8. 生存シグナル評価 (in vitro)

(A) Western blots (B) 蛍光免疫染色
 SEW2871 投与群で、有意に生存シグナルである Akt が上昇し、細胞毒性を示す LDH が現象していた。

結語：これらの結果から、Selective S1PR1 agonist (SEW2871) を投与することで、内皮障害を抑制し、炎症反応を抑えることで、肝 IRI を制御することが可能であり、新たな治療ターゲットとなり得ると考えられた。

研究②: PAR-1 receptor antagonist (SCH530348:Vorapaxar)



PAR-1 の活性化には、APC による β -arrestin-2-dependent signaling (cleavage site Arg46) を介する細胞保護 (抗炎症) 作用と、一方トロンビンによる G protein-dependent signaling (cleavage site Arg41) を介する炎症作用が存在する。当初は cleavage site Arg46 に対しては peptide-agonist を使用し、細胞保護作用を誘導し、また cleavage site Arg46 に対しては PAR-1 receptor antagonist (SCH79797) を使用し、炎症作用を阻害する予定であったが、予想の結果が得られなかった。

Fig. 9, 肝障害による PAR-1 発現

A, B) 免疫染色. C, D) Western blots
 そこで Fig. 9 に示すように、肝障害後の PAR-1 の発現をみてみると、有意に発現が更新していたため、PAR-1 receptor antagonist (SCH530348: Vorapaxar) 投与し、IRI がどうなるか研究を行った。

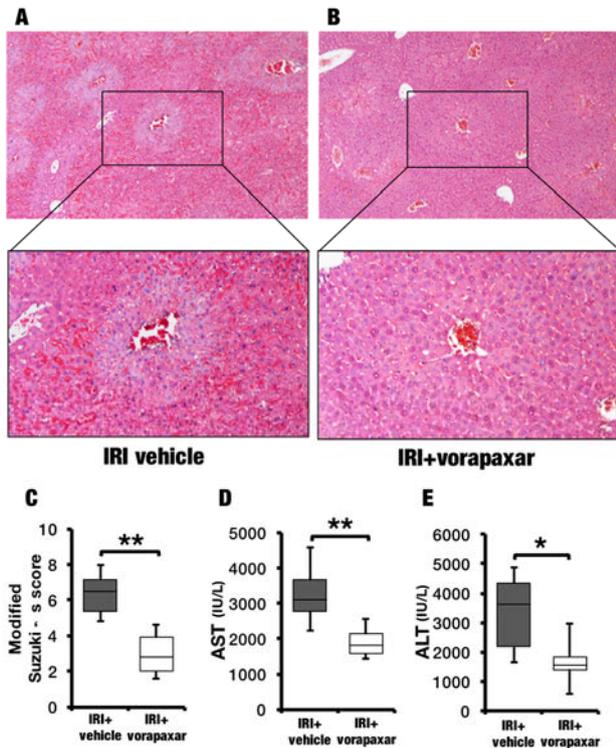


Fig. 10, 組織学的障害と肝機能評価 (A, B) H. E 染色. (D, E) 血清 AST, ALT vorapaxar 投与群で, 有意に IRI 障害は組織学的に改善され, 肝機能も減弱されていた。

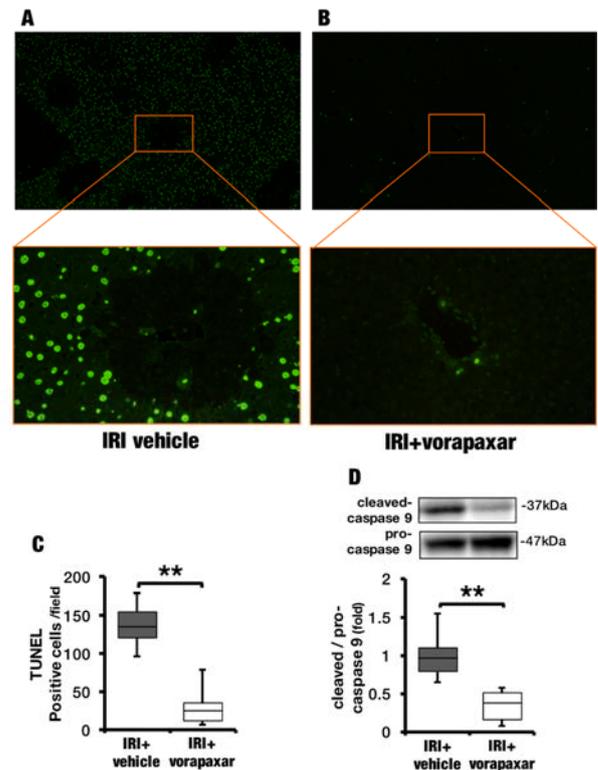


Fig. 11, アポトーシス評価 (A, B, C) 蛍光 TUNEL 染色. (E) Western blots vorapaxar 投与群で, 有意にアポトーシスは抑制されていた。

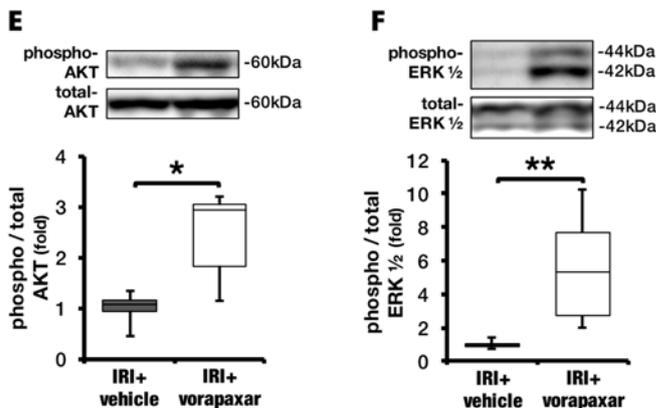


Fig. 11, 生存シグナル評価 (Western blots) 生存シグナルに関与する Akt や ERK が有意に vorapaxar 投与群で上昇していた。

結 語 : これらの結果から, PAR-1 receptor antagonist (SCH530348: Vorapaxar)を投与することで, 生存シグナルを活性化し, 肝 IRI を制御することが可能であり, 新たな治療ターゲットとなり得ると考えられた。

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。そこで今回は APC 伝達路である PAR-1 と S1PR1 に関する作用機序を解明し, その有用性を示すことが出来た。今後は臨床応用に向けてのさらなる検討を行うことが必要である。

<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) Takahiro Ito, Naohisa Kuriyama, Hiroyuki Kato, Akitoshi Matsuda, Shugo Mizuno, Masanobu Usui, Hiroyuki Sakurai, Shuji Isaji.

Sinusoidal protection by sphingosine-1 phosphate receptor 1 agonist in liver ischemiareperfusion injury. Journal of Surgical Research 2017; 222: 139-152. 査読有

〔学会発表〕(計10件)

1) Takahiro Ito, Naohisa Kuriyama, Hiroyuki Kato, et al. Endothelial sphingosine-1 phosphate receptor 1 mediates protection from early injury after hepatic ischemia-reperfusion injury in a mouse model.

15th Congress of the Asian Society of Transplantation (フィリピン)

2) 野口大介, 栗山直久, 伊藤貴洋, 他. マウス肝虚血再灌流障害における protease activated receptor-1 の抑制による肝保護効果.

第118回日本外科学会定期学術集会 2018(東京)

3) Daisuke Noguchi, Naohisa Kuriyama, Takahiro Ito, et al. Selective inhibition of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces up-regulation of anti-apoptotic protein ERK1/2 against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice.

第30回日本肝胆膵外科学会学術集会 2018(横浜)

4) Daisuke Noguchi, Naohisa Kuriyama, Takehiro Fujii, et al. Selective inhibition of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in mice.

13th IHPBA World Congress 2018 (スイス)

5) 伊藤貴洋, 栗山直久, 加藤宏之, 他. 肝虚血再灌流障害における類洞内皮保護としての sphingosine-1-phosphate receptor 1 の役割.

第35回日本肝移植研究会 2017 (大阪)

6) 伊藤貴洋, 栗山直久, 加藤宏之, 他. マウス肝虚血再灌流障害における protease-activated receptor 1 活性化の細胞保護効果と biased agonism.

第72回 日本消化器外科学会 2017 (金沢)

7) Takahiro Ito, Naohisa Kuriyama, Shuji Isaji, et al.

Sphingosine-1 Phosphate Receptor 1 Agonist SEW2871 Ameliorates Hepatocellular Injury on Ischemic Reperfusion in Mice: A New Therapeutic Target

American Transplant Congress 2016 (米国).

8) 伊藤貴洋, 栗山直久, 伊佐地秀司, 他. マウス肝虚血再灌流障害における sphingosine-1 phosphate receptor 作動薬の細胞保護効果について

第116回日本外科学会定期学術集会 2016 (大阪市)

9) 伊藤貴洋, 栗山直久, 伊佐地秀司, 他. マウス肝虚血再灌流障害におけるスフィンゴシン 1 リン酸受容体作動薬の細胞保護効果

第71回日本消化器外科学会総会 2016 (徳島市)

10) Takahiro Ito, Naohisa Kuriyama, Hiroyuki Kato, et al. Role of protease activated receptor 1 and sphingosine-1-phosphate receptor 1 in mice hepatic ischemia-reperfusion injury for targeting cell signal pathways of activated protein C.

American Transplant Congress 2016 (米国).

6. 研究組織

研究協力者: 伊藤 貴洋 (ITO, Takahiro)

三重大学 医学(系)研究科(研究院)

病態修復医学講座 肝胆膵・移植外科学所属

(現在: 米国留学中)

新貝 達 (SHINKAI, Toru)

三重大学 医学(系)研究科(研究院)

救命救急・総合集中治療センター, 助教

野口 大介 (NOGUCHI, Daisuke)

三重大学 医学(系)研究科(研究院)

地域医療支援センター, 助教

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