

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09174

研究課題名（和文）脂肪肝切除における肝不全と周術期の癌進展におけるメカニズム解析・新規治療法の開発

研究課題名（英文）Mechanism analysis and development of new treatment methods for liver failure during fatty liver resection and perioperative cancer progression

研究代表者

黒田 慎太郎（Kuroda, Shintaro）

広島大学・病院（医）・助教

研究者番号：30457246

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：脂肪肝は正常肝に比べ虚血再灌流障害(IR)を受けやすく、IR後に肝内再発を来しやすい。われわれはこれまで、癌とトロンボモジュリン(TM)との関連に着目し、特にTMの減少する脂肪肝IRモデルにおいて、癌が進展するメカニズムを研究してきた。その結果、脂肪肝IRにおいては、HMGB1を介した組織障害が大きな役割を来し、可溶性TM製剤（rTM）が肝障害を軽減しIR後の肝内再発を抑制できることが明らかになった。また、脂肪肝IR時には癌の生着も起こりやすく、rTMの投与により癌の生着を抑制できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓切除後の肝不全に対して、その決定的な予防法は存在しない。特に、増加傾向にある脂肪肝においては、術後肝不全のみならず、周術期の癌の生着による癌の再発リスクが高いとされる。今回のわれわれの研究において、そのメカニズムの一端がHMGB1を介したものであることを明らかにし、また、その治療法として、可溶性トロンボモジュリン製剤の使用により、術後肝不全のリスクを軽減し、更に、周術期の癌の生着を減じる効果があることを発見した。本研究結果により、脂肪肝を背景に持つ肝臓に対する外科的治療が、大きく発展し、更なる癌の制御や、生体肝移植の適応の拡大に踏み出せる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Fatty liver is more susceptible to ischemia-reperfusion injury (IR) than normal liver, and is more likely to cause intrahepatic recurrence after IR. We have focused on the relationship between cancer and thrombomodulin (TM), and have studied the mechanism by which cancer progresses, particularly in a fatty liver IR model in which TM is reduced. The results revealed that HMGB1-mediated tissue damage plays a major role in fatty liver IR, and that soluble TM preparations (rTM) can alleviate liver damage and suppress intrahepatic recurrence after IR. We also found that cancer engraftment is likely to occur during fatty liver IR, and that cancer engraftment can be suppressed by administering rTM.

研究分野：外科学

キーワード：脂肪肝 虚血再灌流障害 トロンボモジュリン HMGB1

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓に対する肝切除は、依然、肝臓治療の中心を占める。そして、肝切除の技術が発展した現在でも尚、障害肝臓に対する肝切除後肝不全のリスクは変わらず存在し、その決定的な予防法は存在しない。また、生体肝移植の脂肪肝グラフトは、やはり、グラフト不全のリスクがあるため、通常の適応基準と同等には扱うことが出来ない。

一方で、生活スタイルの変化により、全世界的に肥満や脂肪肝の割合は増加傾向であり、**2005**年には**33%**程度であった**BMI:25**以上の人口は、**2030**年には**57.8%**にも達するとの予想もある。それに伴い、非アルコール性脂肪性肝炎(**NASH**)や糖尿病に基づく、原発性肝癌や大腸癌をはじめとする転移性肝癌に対する肝切除の機会も、更に増えてくることが予想される。

肝切除後肝不全、あるいは生体肝移植後のグラフト不全は致命的であるが、その原因は、肝切除時のダメージ(虚血再灌流障害)と肝再生不良とである。正常肝と比較し、脂肪肝における虚血再灌流障害は多くの点でメカニズムが異なり、また、重篤化することが知られている。また、正常肝では期待できる術後の肝再生も脂肪肝では少ないことも知られており、脂肪肝切除後肝不全のリスクは高い。これらのメカニズムと治療法が不明である現在、脂肪肝切除や脂肪肝グラフトに対する生体肝移植の適応は、正常肝と比べ、安全性の観点から大きく手控えたものとなり、癌の根治性や生体肝移植での救命を大きく損なっている。加えて、脂肪肝の虚血再灌流障害は、残肝における微小肝転移の増大を促進することが過去に報告されており、同時に周術期の癌の進展抑制も考慮する必要がある。

本研究の最大の問いは、脂肪肝などの障害肝臓を背景に持つ肝臓に対する外科的治療が、現在の「ある程度確立されたレベル」にとどまるのか、あるいは、本質的なメカニズム解析を経た上で大きく発展し、更なる癌の制御や、生体肝移植の適応の拡大に踏み出せるかという点である。そのためには、臨床での治療法開発まで見据えた、脂肪肝虚血再灌流障害と肝再生不良のメカニズムの解明が必須である。

## 2. 研究の目的

以下に挙げる2つの課題について解析を行うことを目的とした。

脂肪肝虚血再灌流障害における新たなメカニズム解析と治療法の開発：脂肪肝の虚血再灌流障害(**IR**)において、**HMGB1**の関与を解明する。また、トロンボモジュリン製剤による治療法を開発する。

脂肪肝切除周術期の癌の進展の機序の解明：脂肪肝周術期の癌の進展と**HMGB1**との関与による機序の解明と治療法の開発を行う。

**HMGB1**は細胞の核内に蓄積されたタンパクであり、感染や炎症などにより細胞外に放出され、炎症性サイトカインとして炎症反応を促進し、しばしば播種性血管内凝固症候群(**DIC**)など重篤な病態の一因となる。われわれは、正常肝の**IR**における血液凝固異常と**HMGB1**の関連を検討してきた。その結果、マウスの**IR**には少なからず**HMGB1**が関与しており治療のターゲットになり得ること、そして**DIC**治療薬として用いられるトロンボモジュリン製剤が正常肝マウス**IR**を抑制することを明らかにした。これは、過去の報告のようにトロンボモジュリンの**N**末端レクチン様ドメインが**HMGB1**と選択的に結合し、抗炎症活性を示したためと考える。**1)**さらに、事前に行った予備実験で、正常肝マウスと比べ、複数のマウス脂肪肝モデルにおいて、肝組織中のトロンボモジュリン(**TM**)の発現が著明に低下していることも明らかになった。このことは、脂肪肝では**HMGB1**が原因として**IR**を重篤化させている可能性を示している。

さらに、最近の報告では、アセトアミノフェンによる肝障害後の肝再生を**HMGB1**が阻害していることが明らかになった。**2)**一方で、その詳しいメカニズムは明らかにされておらず、メカニズムの解明は非常に興味深いものである。また、以上の**HMGB1**を介するメカニズムが、脂肪肝の虚血再灌流障害や肝再生に、どのように関わっているかは明らかではない。

実臨床においても使用可能なトロンボモジュリン製剤が存在する現在、仮に脂肪肝の**IR**の一因として、発現の低下したトロンボモジュリンが病状悪化に関与しているとする、血中に溶出した**HMGB1**をトロンボモジュリン製剤(**rTM**)の使用で阻害し、周術期の病態を改善する可能性がある。このことは脂肪肝肝切除の高率な肝不全に対する現実的な解決策となり得るため、国内のみならず国際的にも大きなインパクトを持つ。

**1) Nakamura K, Uemoto S, et al. Soluble thrombomodulin attenuates sinusoidal obstruction syndrome in rat through suppression of high mobility group box 1. Liver Int 34:1473-87, 2014.**

**2) Runkuan Y, et al. High mobility group B1 impairs hepatocyte regeneration in acetaminophen hepatotoxicity. BMC Gastroenterol 12: 1471-230X, 2012.**

## 3. 研究の方法

本研究では、以下の実験を行った。

脂肪肝**IR**への**HMGB1**の関与

われわれは、脂肪肝**IR**後の**HMGB1**の亢進と肝障害の関与を小動物並びに分子生物学的に検討した。また、われわれは、脂肪肝**IR**時のトロンボモジュリン製剤による**HMGB1**の抑制効果を検討した。正常肝をコントロールに、コリン欠乏(**CCD**)食誘導**NASH**モデルマウス、肝組織におけるトロンボモジュリンの発現を免疫組織学的に、またウェスタンブロットで比較した。また、それぞれの肝**IR**後の経時的な血性**HMGB1**濃度の推移を比較し、また、血液生化学的検査、組織学的な検査により肝障害の程度を測った。また、術後の生存率の比較により、正常肝と脂肪肝モデルマウスとの**IR**の機序の違いと、トロンボモジュリン製剤による治療効果を検討した。また、**HMGB1**ノックアウトマウスによるコリン欠乏食誘導**NASH**モデルマウスも作成して同様の試験を行い、本病態における**HMGB1**の関与を調べた。

脂肪肝切除周術期の癌の進展と**HMGB1**の関与

**hepa1-6**肝癌細胞株をマウス脾動脈注射し、肝内多発転移モデル作成後、正常肝をコントロールに脂肪肝で**IR**モデルを作成し、周術期の癌の進展と、**HMGB1**の測定を比較した。また、同様に、トロンボモジュリンによる**HMGB1**ブロッキング効果により癌の進展抑制を調べ、**HMGB1**ノックアウトマウスを用いて効果を確かめた。

## 4. 研究成果

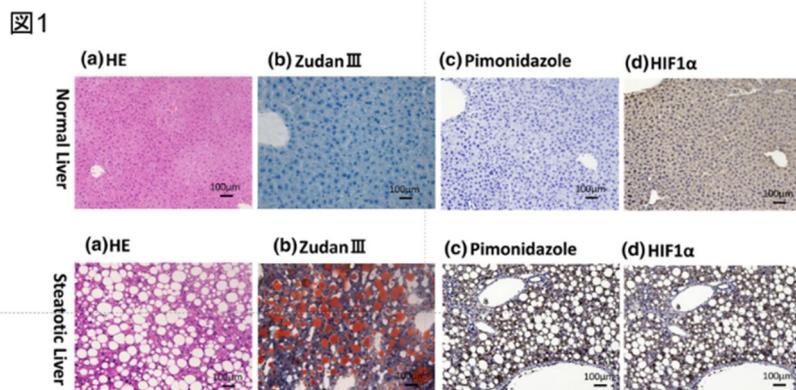
われわれは、研究成果を論文化し発表した。**3)**詳細は下記に示す。

3) Yamaguchi M, Kuroda S, et al. Downregulation of thrombomodulin contributes to ischemia-reperfusion injury in mice with steatotic liver. *Hepatology Res.* 2022. 52:762-772.

CDD 食は脂肪肝、低酸素微環境、TM 発現の減少、血清 HMGB-1 の増加を誘発した。

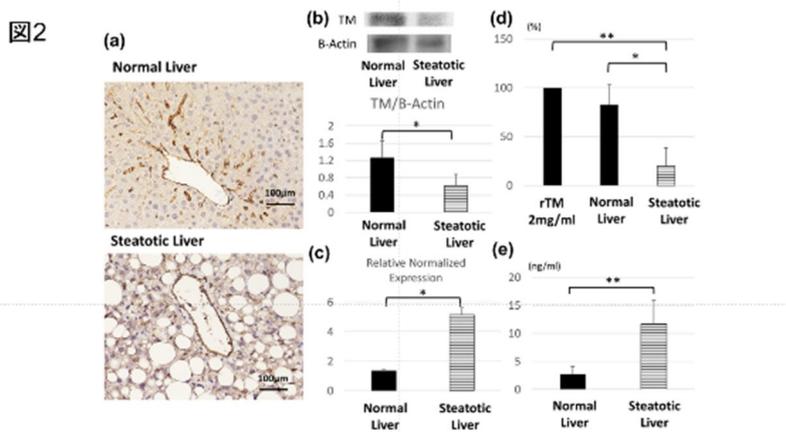
脂肪肝において TM が発現低下していることを確認するために、マウスに CDD 食を与えて脂肪肝と肝細胞の低酸素症を誘導した。4 週間の CDD 食により重度の脂肪肝 (60%脂肪的) が生じた(図 1a)。肝細胞における脂質蓄積の増加は、Zudan III 染色を使用して確認した(図 1b)。通常食のコントロールと比較して、CDD 食マウスは、肝臓における低酸素の検出に使用されるピモニダゾールの増加を示した(図 1c)。免疫組織染色により、コントロールと比較し、CDD 食マウスでは特に静脈周囲領域で HIF1 $\alpha$  の染色域が増加していた(図 1d)。

(図 1 説明) CDD 食は脂肪肝と肝臓の低酸素状態を引き起こした。マウスには CDD 食または通常食を 4 週間与えた。正常および



脂肪肝の肝切片の(a) H&E 染色、(b) Zudan III 染色、(c) ピモニダゾール染色、および (d) HIF1 $\alpha$  染色。元の倍率、100 $\times$ 、スケールバー: 200  $\mu$ m

次に、肝臓における TM の発現と血清 HMGB-1 濃度を調べた。免疫組織染色により、通常食マウスと比較し、CDD 食マウスの類洞内層および中心静脈における TM の染色域が減少していることが明らかになった(図 2a)。同様に、ウェスタンブロットティングでは、通常食マウスと比較し、CDD 食マウスの肝臓における TM の発現の低下が示された(図 2b)。TM によって介される重要なタンパクである活性化プロテイン C の活性は、CDD 食マウスでは 20%未満に大幅に低下した。rTM (12,800 U)、100%。正常肝



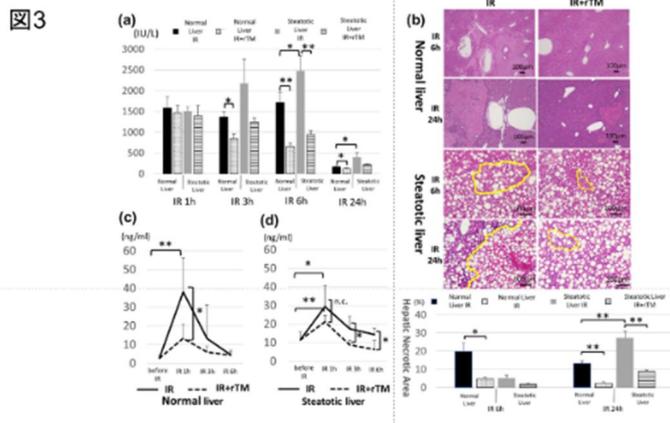
(100 mg)、82.9%。脂肪肝 (100 mg)、19.9%(図 2d)。しかし、qRT-PCR では、TM mRNA レベルが正常肝よりも脂肪肝の方が有意に高いことが示された(図 2c)。逆に、HMGB-1 の血清濃度は、通常食マウスよりも CDD 食マウスの方が有意に高かった(図 2e)。その結果、長期にわたる CDD 摂取は低酸素状態を誘発し、脂肪肝の TM タンパクレベルが低下するが、代償として TM mRNA レベルが増加することが示された。

(図 2 説明) CDD 食は肝臓における TM の発現を低下させた。通常食 (ND) または CDD 食を 4 週間与えたマウスは、それぞれ正常肝または脂肪肝を呈した。(a) 正常肝および脂肪肝切片の TM 染色 (元の倍率、100 倍、スケールバー: 200  $\mu$ m)。(b) 正常肝および脂肪肝における TM および  $\beta$ -アクチンのウェスタンブロット。TM/ $\beta$ -アクチンバンドのシグナル強度 (n = 5)。\*p < 0.05。(c) TM の qRT-PCR。GAPDH 遺伝子発現と比較した(n = 5)。\*p < 0.05。(d) rTM (12,800 U/ml)、正常肝(100 mg)、および脂肪肝(100 mg)からの活性化プロテイン C の活性(p-ニトロアニリン生成%) (n = 5)。\*p < 0.05、\*\*p < 0.01。(e) 正常肝または脂肪肝マウスの血清 HMGB-1 レベル (n = 5)。\*\*p < 0.01

脂肪肝は IR 損傷を増大させるが、rTM は肝臓の IR 損傷を軽減する

IR後の肝細胞傷害のマーカーである血性ALT値を、60分間の部分肝虚血とそれに続く1、3、6、および24時間の再灌流後に測定した。IR後3、6、および24時間のALTレベルは、脂肪肝マウスの方が正常肝マウスよりも有意に高かった(図3a)。正常肝から6時間後に採取した肝標本では、より大きな肝壊死領域が見られた。ただし、肝壊死領域は、再灌流後6時間と比較し、再灌流後24時間では増加しなかった(図3b)。再灌流後24時間の脂肪肝の壊死領域は、IR後6時間の肝臓壊死領域と比較して有意に増加した。再灌流後24時間の肝壊死領域は、正常肝より脂肪肝の方が大きかった(図3b)。これらの結果は、脂肪肝は正常肝に比べIR損傷を受けやすく、脂肪肝では正常肝に比べてIR損傷がゆっくりと悪化することを示している。

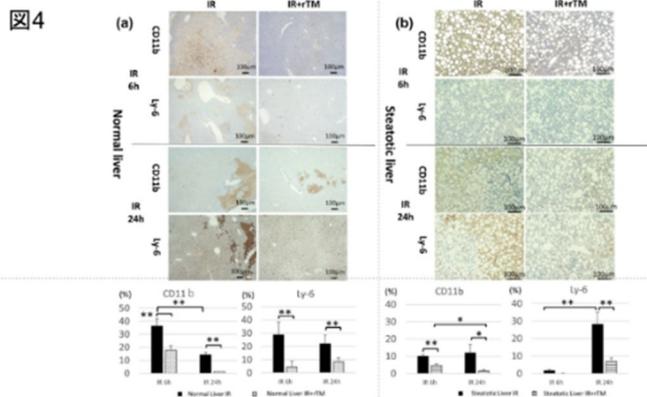
(図3説明)rTMは、正常肝および脂肪肝のIRを改善した。正常肝または脂肪肝マウスを、60分間部分肝虚血とした。マウスには、IRの30分前にrTM(6mg/kg)を投与した。(a)虚血後の1、3、6、および24時間の再灌流後の正常肝または脂肪肝マウス



における血清ALT値。n = 12。\*p < 0.05、\*\*p < 0.01。(b)正常肝または脂肪肝マウスに対して60分間の虚血再灌流後、6時間および24時間で肝標本を採取した。肝切片のH&E染色(倍率400倍)。肝壊死領域の定量化を行った。n = 12。\*\*p < 0.01。(c)正常肝マウス、および(d)再灌流後0、1、3、および6時間の脂肪肝マウスにおける血清HMGB-1値。(c、d) n = 5。\*p < 0.05、\*\*p < 0.01

次に、免疫組織染色により、正常肝のCD11b陽性(マクロファージ)およびLy-6陽性(好中球)の領域は再灌流6時間後に増加したが、24時間後には減少したことが明らかになった(図4a)。さらに、脂肪肝の再灌流後6時間でCD11b陽性およびLy-6陽性のまばらな領域が示され、24時間で有意に増加した(図4b)。再灌流後24時間の時点では、正常肝と脂肪肝の間でCD11b陽性領域とLy-6陽性領域に有意差は認めなかった。

(図4説明)rTMは、正常肝と脂肪肝の両方におけるIR誘発性の白血球とマクロファージ集積を改善した。正常肝または脂肪



肝マウスを60分間虚血後、再灌流6時間および24時間で観察した。マウスの一部には、IRの30分前にrTM(6mg/kg)を投与した。正常肝(a)または脂肪肝(b)におけるCD11b+マクロファージおよびLy-6+好中球の代表的な免疫組織染色(倍率400倍)。肝臓のCD11b+マクロファージおよびLy-6+好中球の集積の定量化。n = 12。\*\*p < 0.01

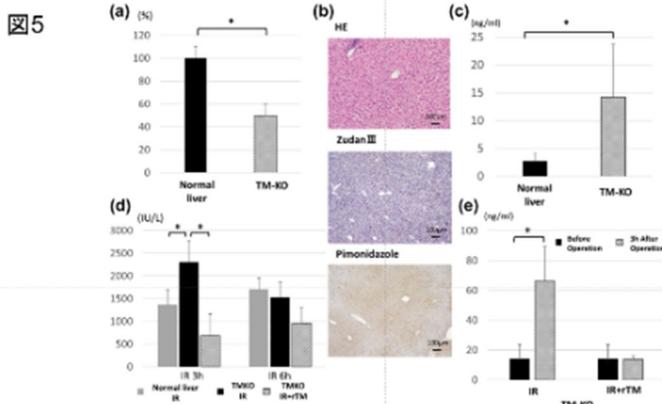
次に、rTM前処理の効果を調べた。rTM投与は、正常肝および脂肪肝マウスにおいて、IR後6時間および24時間でALTレベルを有意に低下させた(図3a)。rTM未処理マウスと比較して、rTM前処理マウスは肝臓壊死領域(図3b)およびCD11b陽性およびLy-6陽性領域(図4a、b)の有意な減少を示した。肝臓IRにおける損傷と炎症の初期メディエーターである血清HMGB-1のレベルを、IR後1、3、および6時間で測定した。IR1時間後のHMGB-1濃度は、正常肝のrTM投与マウスより正常肝未治療マウスの方が有意に高かった。ただし、血清HMGB-1濃度は、IR後3時間と6時間では有意差はなかった(図3c)。対照的に、IR1時間後の血清HMGB-1濃度は、脂肪肝rTM未治療マウスとrTM治療マウスの間で有意な差はなかった。血清HMGB-1は、脂肪肝rTM未治療マウスがrTM治療マウスよりも有意に高かった。IR後3時間および6時間の脂肪肝(図3d)。これらの結果は、rTM投与が脂肪肝および正常肝における虚血再灌流障害および肝組織の炎症を軽減することを示している。

TM-KOマウスは肝虚血再灌流障害を増悪させる。

肝臓の肝虚血再灌流障害に対するTMの影響を評価するために、TM+/-マウスに通常食を与え、肝虚血再灌流障害を与えた。TM+/-マウスは、PCRおよびシーケンスを使用して野生型マウスと区別した。活性化プロテインC活性は、野生型マウスと比較して、TM+/-マウスでは約50%まで減少した(図5a)。TM+/-マウスの肝標本は、ピモニダゾールの蓄積がほとんどなく、軽度の脂肪変性を示した(図5b)。一方で、HMGB-1血清濃度は、野生型マウスよりもTM+/-マウスの方が有意に高かった(図5c)。これらの結果

を総合すると、**TM+/-**マウスは肝臓で軽度の低酸素状態を呈していることが示された。

(図5説明) **TM** ノックアウトマウスでは、肝虚血再灌流障害が増悪された。正常肝を持つ野生型マウスまたは **TM-KO** マウスが **60** 分間部分肝虚血を受けた。マウスの一部には、**IR** の **30** 分前に **rTM (6mg/kg)** を投与された。(a) 野生型および **TM-KO** マウスの正常肝における活性化プロテイン **C (n = 5)**。\***p < 0.01**。(b) **TM-KO** マウスの肝切片の **H&E**、**Zudan III**、およびピモニダゾール染色。(元の倍率、**100x**、スケールバー：**200 μm**) (c) **TM-KO** マウスと野生型マウスの血清 **HMGB-1** レベル (**n = 5**)。\***p < 0.01**。(d) 部分間虚血、再灌流 **3, 6** 時間後のマウス血清 **ALT** 値。**n = 12**。\***p < 0.05**。(e) **TM-KO** マウスにおける **IR** 前後と、**rTM**

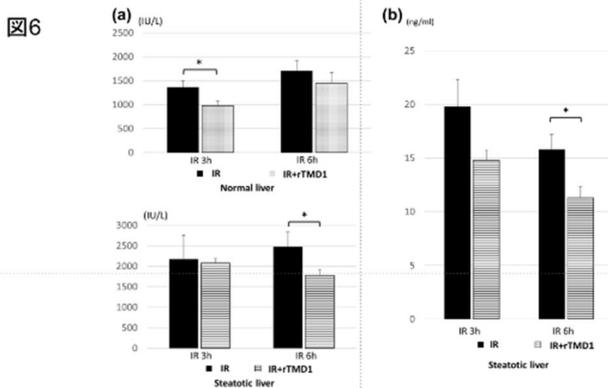


投与した **TM-KO** マウスにおける **IR** 前後の血清 **HMGB-1** レベル (**n = 5**)。

次に、**60** 分間の部分虚血、再灌流 **3, 6** 時間後の血清 **ALT** 値を測定した。**IR** 後 **3** 時間の **ALT** 値は、野生型マウスよりも **TM+/-** マウスの方が有意に高かったが、**6** 時間後では有意差はなかった。**rTM** 未投与の **TM+/-** マウスと比較して、**rTM** 投与された **TM+/-** マウスは、**IR** 後 **3** 時間で **ALT** 値の有意な減少を示した(図 5d)。同様に、**TM+/-** (図 5e) マウスは **IR** 後 **3** 時間で血清 **HMGB-1** 濃度の有意な増加を示したが、野生型では示さなかった。(図 3d) この増加は **rTM** を投与された **TM+/-** マウスでは観察されなかった(図 3d)。これらの結果は、**TM** の制御が肝虚血再灌流障害に対する感受性を促進することを示した。

**rTM** はレクチン様ドメイン(**D1**)を通じて肝臓の虚血再灌流障害を軽減する

**rTM** は、プロテイン **C** の活性化を介し、**EGF** 様ドメイン(**D2**)の作用で抗凝固活性を發揮する。更にレクチン様ドメイン(**D1**)を介して抗炎症活性を發揮すると言われる。肝虚血再灌流障害の改善におけるドメイン別の役割を検討するため、肝 **IR** を受けたマウスに、**rTM** の抗炎症活性 (**10 mg/kg**) に相当する用量 (**2.2 mg/kg**) で **rTMD1** を投与した。血性 **ALT** 値は、**60** 分間の部分虚血、再灌流後 **3, 6** 時間で測定した。**IR** 後 **6** 時間の血清 **ALT** 値は、正常肝 **rTMD1** 投与マウスの方が、正常肝 **rTMD1** 未投与マウスよりも低い傾向があったが、有意差はなかった。ただし、脂肪肝マウスでは、**IR** 後 **6** 時間の **ALT** 値は、**rTMD1** 未投与マウスよりも **rTMD1** 投与マウスの方が有意に低かった(図 6a)。同様に、**IR** 後 **3, 6** 時間の **HMGB-1** 血清濃度は、**rTMD1** 未投与の脂肪肝マウスよりも、**rTMD1** 治療脂肪肝マウスの方が有意に低かった (図 6b)。



(図6説明) **rTM-D1** は脂肪肝における肝 **IR** 損傷を改善する。脂肪肝マウスに **60** 分間部分肝虚血を行った。マウスの一部には、**IR 30** 分前に **rTM-D1 (2.5mg/kg)** を投与した。(a) 虚血再灌流後 **3, 6** 時間後の脂肪肝マウスにおける **ALT** 値を示す。**n = 12**。\***p < 0.05**。(b) 再灌流後 **3, 6** 時間 (**rTM-D1** の有無にかかわらず) の脂肪肝マウスの血清 **HMGB-1** レベル (**n = 5**)。\***p < 0.05**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamaguchi Megumi, Tashiro Hirotaka, Kuroda Shintaro, Okimoto Sho, Kobayashi Tsuyoshi, Hinoi Takao, Ohdan Hideki	4. 巻 52
2. 論文標題 Downregulation of thrombomodulin contributes to ischemia reperfusion injury in mice with steatotic liver	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 762 ~ 772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13802	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口 恵美, 田代 裕尊, 黒田 慎太郎, 沖本 将, 小林 剛, 大段 秀樹
2. 発表標題 脂肪肝におけるトロンボモジュリンの発現低下は肝虚血再灌流障害を増悪させる
3. 学会等名 日本外科学会定期学術集会抄録集122回
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

特記事項なし
--------

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田代 裕尊  (Tashiro Hirotaka)  (90359894)	独立行政法人国立病院機構（呉医療センター臨床研究部）・ その他部局等・その他   (85402)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------