

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591608

研究課題名(和文)

急性胆管閉塞にもなう肝障害における PPAR $\gamma$  の役割について

研究課題名(英文)

The role of PPAR $\gamma$  in bile duct ligation-induced hepatic injury in rats.

研究代表者

江畑 智希 ( Ebata Tomoki )

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：60362258

研究成果の概要(和文)：

本研究の目的は、胆管閉塞に伴う肝障害における PPAR $\gamma$  の役割を解明し、治療への可能性を検討するものである。ラットの胆管結紮モデルでは、作用薬である「15d-PGJ<sub>2</sub>」(以下 PGJ<sub>2</sub>) をラットに投与すると PPAR $\gamma$  が胆管結紮後の肝障害に重要な役割を果たしていることが確認された。さらに、胆管炎モデルにおいても、PGJ<sub>2</sub> を投与することは過剰な反応を抑制した。PPAR $\gamma$  の活性化は肝障害治療のターゲットとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

In this study, we sought to determine the effects of PPAR $\gamma$  modulation on bile duct ligation (BDL)-induced hepatic injury and on lipopolysaccharide (LPS)-induced acute obstructive cholangitis.

PPAR $\gamma$  activation with PGJ<sub>2</sub> can be a potent therapeutic option for hepatic injury under the condition of biliary obstruction and acute obstructive cholangitis

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：PPAR $\gamma$ 、15D-PGJ<sub>2</sub>

## 1. 研究開始当初の背景

PPARs (peroxisome proliferator-activated receptor) は、脊椎動物において発現している核内レセプターの一つである。最近の医学研究により、PPARs が糖尿病や肥満、アテローム性動脈硬化症、癌などを始め多くの病気に関与することが明らかになってきてい

る。PPARs にはサブタイプがあり、それぞれ異なる機能を担っている。特に PPAR $\gamma$  は、肝臓において重要な働きをし、炎症性反応の抑制、グルコースの取り込み、脂質生成や細胞増加を誘発する重要な因子であり、ストレス下における臓器障害調節の中心的役割を担うと報告されている。(Enomoto N, et al,

Alcohol Clin Exp Res,2004,29:216s-219s; Orfila C, et al, Histochem Cell Biol,2005,123(6):585-593; Colin M, et al, Eur J Pharmacol,2004,486(2):233-235)。

## 2. 研究の目的

現在我々の施設では、胆管閉塞を伴う肝門部胆管癌の手術を数多く行っており、胆管が閉塞されることによっておこる肝障害のある患者をいかに安全に手術するかが重要なテーマとなっている。そのため、胆管閉塞時における、肝障害のメカニズムを解明することが重要であると考えている。

これまでの研究で胆管閉塞状態に起こる強い肝障害のメカニズムとして、さまざまなことがわかってきている。すなわち胆管閉塞に伴う肝障害には、1) 炎症性反応の亢進

(Andus T, et al,

Hepatology,1991,13:364-375)、2) 活性酸素種の産生亢進 (Redmond HP, et al, Arch Surg,1996,131,1280-1288) 3) 血管収縮因子であるエンドセリンやトロンボキサンなど血管収縮因子の産生亢進 (Pannen BH, et al, Hepatology,1998,27:755-764) などが関与していると報告されている。しかしながら、これらの変化が PPAR $\gamma$  により制御されているかどうかについての報告は全くない。したがって本研究では、「PPAR $\gamma$  が胆管閉塞時の肝障害抑制に重要な役割を担っている」と考え、未だ報告の無い急性胆管閉塞時における PPAR $\gamma$  の役割を明らかにすることを目的にする。

## 3. 研究の方法

ラットの胆管結紮モデル (Bile duct ligation; 以下 BDL) を作成し、作用薬である「15d-PGJ2」(以下 PGJ2) をラットに投与し、これら薬剤の in vivo での影響を確認し

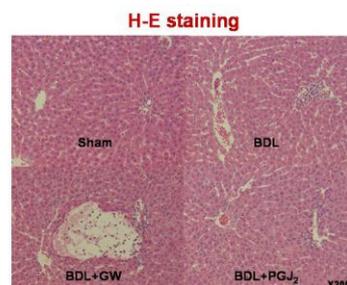
た。評価する項目は、肝障害の程度、炎症性サイトカイン、血管作動因子、肝臓の微小循環障害などとした。まずは、肝障害の程度を評価するために、肝組織の HE 染色を行った。さらに、肝障害の主要なメカニズムの評価をするために IL1- $\beta$ 、IL-6、IL-12、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカイン、またエンドセリンやトロンボキサンなど血管収縮因子の産生亢進について real time PCR 法でおこなった。さらに、肝臓の微小循環障害の程度を確認するために、イントラバイタルを用いて、評価した。

さらに次の実験として、LPS を胆管内に注入し、結紮することで胆管炎モデルを作成し (BDL+LPS group)、対象群として単開腹群と LPS の代わりに生食を注入した群を用いた。採血データ、門脈圧、炎症反応関連遺伝子の発現を検討した。さらに BDL+LPS group に対して、PGJ2 投与群、非投与群を作成し、生存率、炎症関連遺伝子の発現を検討した。

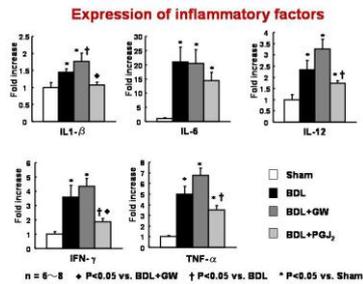
## 4. 研究成果

### 実験結果 1

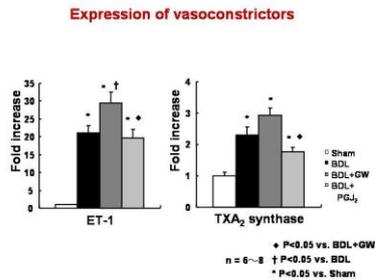
まずは、ラットの胆管結紮モデル (Bile duct ligation; 以下 BDL) を作成し、作用薬である「15d-PGJ2」(以下 PGJ2) をラットに投与し、これら薬剤の in vivo での影響を確認した。



肝障害の程度を評価した。



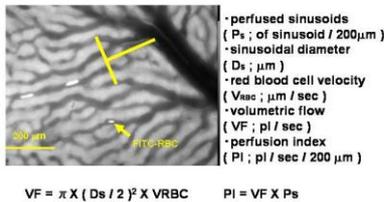
炎症性サイトカイン



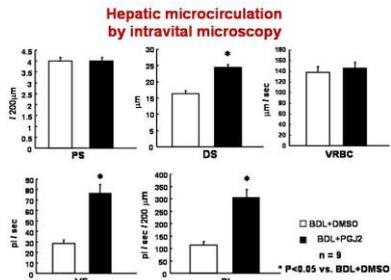
血管作動因子

肝障害の程度を評価、炎症性サイトカイン、血管作動因子、いずれも胆管結紮後に上昇し、PGJ2を投与すると下降することが確認された。

Estimation of hemodynamics by intravital microscopy

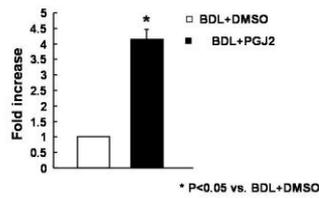


肝臓の血流量

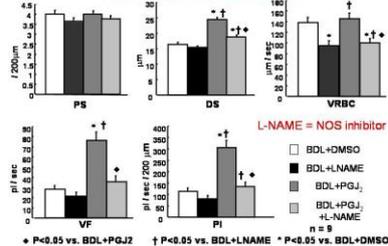


PGJ2投与後血流量が上昇し、改善されることが確認された。

Intrahepatic nitric oxide (NO) levels of living organism by NO monitor

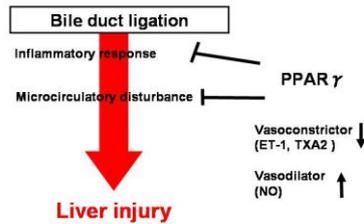


Hepatic microcirculation by intravital microscopy (with / without L-NAME)



この血流量の改善がNOによるものであることを確認するために、NOのinhibitor (L-NAME)を使用し、PGJ2を投与すると逆に肝臓の血流量が悪くなり減少することが確認された。

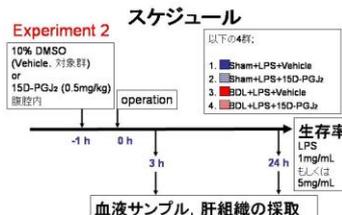
### Summary & Conclusion



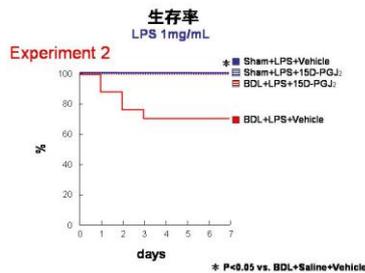
PPARγが胆管結紮後の肝障害に重要な役割を果たしていることが確認され、PPARγの活性化は胆管閉塞に伴う肝障害治療のターゲットとなりうる可能性が示唆された。

### 実験結果 2

LPSを胆管内に注入し、結紮し胆管炎モデルを作成し、作用薬であるPGJ2をラットに投与し、これら薬剤のin vivoでの影響を確認した。

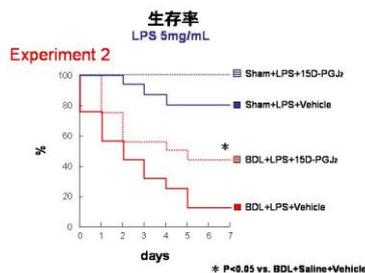


急性閉塞性胆管炎に PPAR $\gamma$  の最も強力なりガンドである PGJ2 を投与することによって、肝障害が軽減するかどうかを調べた。



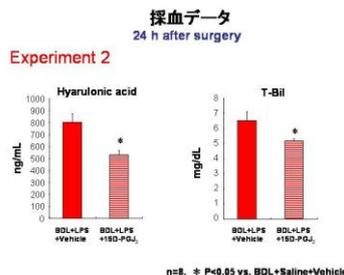
LPS1mg/mLでの生存率。

BDL+LPS 群では 15D-PGJ2 を投与することで、生存率が 100%になり、有意に改善した。

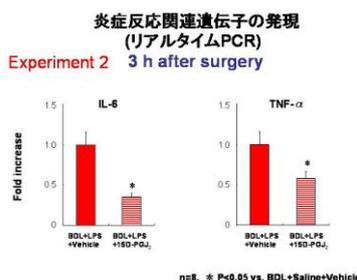


Sham+LPS 群で PGJ2 を投与することで、生存率が改善した。

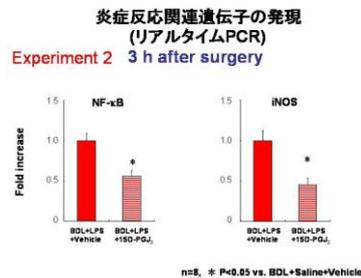
BDL+LPS 群では生存率が有意に改善した。



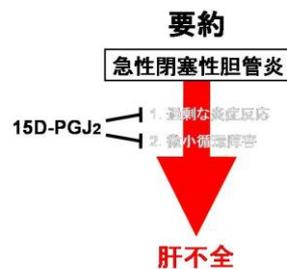
PGJ2 を投与することで血管内皮障害の指標になるヒアルロン酸や T-Bil が有意に低下した。



PGJ2 を投与することで IL-6 や TNF- $\alpha$  が有意に低下した。



NF k B や iNOS も有意に低下した。



急性閉塞性胆管炎では、過剰な炎症反応や微小循環障害から肝不全となることが分かった。PGJ2 を投与することでこれらを抑制し、肝不全を軽減することがわかった。

**結語**

PPAR $\gamma$  のリガンドである 15D-PGJ<sub>2</sub> は急性閉塞性胆管炎による肝不全の治療に有用となりうる可能性があることが、示唆された。

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 1 件)  
Watanabe K, Yokoyama Y, Kokuryo T, Kawai K, Kitagawa T, Seki T, Nakagawa A, Nagino M.  
15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 prevents inflammatory response and endothelial cell damage in rats with acute obstructive cholangitis.  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2010 Mar;298(3):G410-8. 査読有

〔学会発表〕（計 2 件）

1. Tomomi Kitagawa, Yukihiro Yokoyama, Toshio Kokuryo, Kiyotaka Kawai, Katsutaka Watanabe, Masato Nagino. The mechanism of protective effects of PPAR $\gamma$  activation on bile duct ligation-induced hepatic injury in rats, 60 th American association for the study of liver diseases, 2009. 11.1, Boston

2. Yukihiro Yokoyama, Katsutaka Watanabe, Toshio Kokuryo, Kiyotaka Kawai, Tomomi Kitagawa, Takashi Seki, Akifumi Nakagawa, Masato Nagino. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 prevents the inflammatory response and improves the survival in rats with acute obstructive cholangitis, 60 th American association for the study of liver diseases, 2009. 11.1, Boston

〔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  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

江畑智希 (Ebata Tomoki)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：60362258

### (2) 研究分担者

國料俊男 (Kokuryo Toshio)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教  
研究者番号：60378023

横山幸浩 (Yokoyama Yukihiro)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座  
講師  
研究者番号：80378091

榎野正人 (Nagino Masato)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20237564

菅原 元 (Sugawara Gen)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：00402587

(3) 連携研究者  
なし