

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591621

研究課題名（和文）

閉塞性黄疸肝における阻血再灌流障害後の肝組織リモデリングと再生シグナルの解明

研究課題名（英文）

Analysis of the role of hepatic remodeling and signal of hepatic regeneration after hepatic ischemia/reperfusion injury in obstructive jaundice

研究代表者：加藤 厚 (KATO ATSUSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：70344984

研究成果の概要（和文）：

閉塞性黄疸肝阻血再灌流後の肝障害増強の機序としてendothelin-1の産生増加と肝星細胞の活性化による内皮細胞障害にともなう肝微小循環不全が関与していることが示唆された。また拡大肝葉切除後の肝不全症例では肝再生は遅延し、肝細胞機能障害、肝浮腫の指標としての肝CT値は有意の低下を認めていた。門脈塞栓術後の肝再生の誘導にはVEGFが関与しており、肝再生予測因子として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Cholestasis of the liver is known to be an important risk factor for surgical morbidity and mortality after major hepatectomy. However, the mechanism of liver injury in cholestatic liver is not fully understood. Our data suggests that hepatic stellate cell activation and increased endothelin-1 production play a crucial role in hepatic ischemia/reperfusion injury in cholestatic liver. To identify predictive factors for postoperative liver regeneration after major hepatectomy, clinical factors and liver volumetric changes determined by CT volumetry and CT attenuation values (CT-AVs) were compared in patients with and without postoperative hepatic failure. Postoperative lower CT-AV was the only independent risk factor of postoperative hepatic failure. Preoperative portal vein embolization (PVE) is an effective means of creating hypertrophy of future remaining liver, which leads to safety of extensive hepatectomy for hepatic malignancies. Plasma VEGF levels were increased markedly after PVE and were maximal after 7 days of PVE. Measurement of plasma VEGF levels after PVE may be a predictive factor of potential liver regeneration and may provide useful information to decide on the schedule of subsequent hepatectomy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
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：閉塞性黄疸、阻血再灌流、肝再生、転写因子、肝星細胞

## 1. 研究開始当初の背景

閉塞性黄疸肝や硬変肝などの障害肝では正常肝に比べ、より強い障害が惹起されることにより、肝切除術後の合併症の発生率が高いことが知られている。特に閉塞性黄疸を有する肝門部胆管癌患者における肝切除後の合併症率は38~81%と報告されており、致命的合併症である肝不全は8~28%に認め、さらに10%前後の高い死亡率が報告されている。こうした閉塞性黄疸肝に対する肝切除は、手術手技や術前術後管理が向上した現在でも、依然として手術リスクの高い術式であり、その適応が限られている。その要因として、切除による残肝予備能の低下が肝不全発症に強く関連していることが考えられている。さらに、術中出血量を減少させ肝切除を安全に行い得る有用な方法である肝血行遮断(Pringle法)にともなう阻血時間の多寡が、術後の肝不全発症に関与していることが知られており、いわゆる肝阻血再灌流障害がこの要因の一つとされる。

## 2. 研究の目的

肝阻血再灌流後の肝再生に関する諸問題と本研究の目的

術後の肝再生の抑制が閉塞性黄疸肝に対する肝切除後の肝不全の増悪や多臓器不全の発症に大きく関与していることが示唆されている。特に阻血再灌流をとともなう肝障害では広範な肝壊死とアポトーシスが誘導されるため、肝再生においては障害組織の排除と肝組織のリモデリングが平行して起こる必要がある。星細胞は、肝再生においても各種メディエータの産生細胞として注目されており、内皮細胞や肝細胞との相互作用が重要であるが、肝阻血再灌流障害後の特殊環境下における肝再生のシグナルに関しては、いまだ不明な点が多い。

このため閉塞性黄疸肝における阻血再灌流障害の機序を検討するとともに、星細胞を介した肝障害および肝再生シグナルを解明し、転写因子制御を介した肝再生促進作用について検討することを本研究の目的とする。

**Oncostatin M**を介した肝再生シグナルの解明

肝再生初期のシグナルとして **Tumor Necrosis Factor (TNF) α** や **Interleukin-6 (IL-6)** が重要や役割を果たしていることが報告されている。おのおの **Nuclear Factor kappa B (NFκB)**、**Signal Transducers and Activators of Transcription-3 (STAT3)** といった転写因子の関与により、各種肝再生因子の転写活性化をもたらす。

近年同定された **IL-6**ファミリーに属するサイトカインである **Oncostatin M**は、障害肝細胞内の肝非実質細胞により発現誘導され、肝細胞上の **Oncostatin M receptor**を介してパラクライン的に肝再生初期のシグナルに関

与している可能性が示唆されているものの、肝再生における役割はいまだ不明な部分が多い。そこで我々は肝細胞、肝星細胞および肝類洞内皮細胞における **Oncostatin M**やそのレセプターの発現、さらに転写因子である **JAK-STAT**系の活性化を検討することで阻血肝障害後の肝再生初期における増殖シグナルを解明する。

さらに **Oncostatin M**は障害肝における組織破壊に中心的役割を果たしている好中球の浸潤に関与するケモカインの産生を阻害したり、プロテアーゼ阻害因子を誘導することで、炎症による組織破壊を軽減し、破壊された組織の再構築に深く関与している可能性が示唆されており、阻血再灌流後の肝組織のリモデリングにおける **Oncostatin M**の多様な役割について検討する。

肝阻血再灌流障害後の肝再生シグナルに関する転写因子相互作用の解明とその制御  
将来的な展開としては、転写因子を制御することで再生シグナルをコントロールし、肝再生促進作用および肝障害軽減作用を基礎的、臨床的に応用することを目指している。とりわけ注目しているのは転写因子レベルでの相互作用である。

転写因子は細胞質内で活性化されると核内に移行し、その標的遺伝子の発現活性化を誘導するが、なかでもコアクチベーターと呼ばれる共役因子は転写因子とエンハンサー結合因子を橋渡しするブリッジングファクターとして作用している。コアクチベーターは **CREB binding protein (CBP) /p300**、**SRC-1/TIF2/AIB1**ファミリータンパクなどが知られているが、それ自身が **histone acetyl transferase**であり、ヒストンにアセチル基を付加する活性をもつとされている。すなわちコアクチベーターは積極的にクロマチンをアセチル化することでクロマチン構造を解離させ、より転写が起こりやすい環境を作り出しているものと考えられている。このように、基本転写因子およびコアクチベーターの機能解析を *in vitro*の系にて検証し、タンパク発現誘導とりわけ肝再生に関与するサイトカインの転写促進誘導について検討する。一般に転写因子の作用としては、こうしたコアクチベーターを介した転写活性促進 **Transactivation**とともに、転写因子の競合阻害による **Transrepression**が重要な調節機構の一つと考えられており、転写因子の相互作用の解析は転写因子を介した遺伝子発現調節と再生シグナルの制御に有用な知見をもたらすものと考えられる。

## 3. 研究の方法

1. 閉塞性黄疸肝における肝阻血再灌流障害の機序とその制御に関する検討 (1) 胆管結紮切離によるマウス閉塞性黄疸肝に対して70%領域の肝阻血を90分間施行し、その後再

灌流を行い、経時的に肝組織および血清を採取。(2) NFkB、AP-1、STAT familyなどの転写因子の活性化およびDNA結合能について Electrophoretic Mobility Shift Assay

(EMSA)を用いて検討。(3) 肝星細胞 (Hepatic stellate cell)、Kupffer cell、類洞内皮細胞をエルトリエーション遠心機により細胞分離し、転写因子の活性化および産生サイトカインの誘導状況について検討。

2. 肝阻血再灌流後の肝組織リモデリングの機序と転写因子を介した肝再生シグナル調節制御の解明 (1) 肝阻血再灌流障害後の肝再生の程度を、BruUの取り込みにより検討、PCNAを用いた免疫染色法によりDNA合成能を解析する。さらに障害肝組織のアポトーシスの程度を定量化する。(2) 肝組織のリモデリング、特に阻血障害と血管新生に着目し検討する。阻血肝組織における転写因子HIF

(hypoxia inducible factor) の発現を Western Blot法を用いて定量的解析を行う。また、HIFの標的遺伝子である血管増殖因子 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) のmRNAの発現をlight cycler (Roche) を用いたreal time PCR法を用い検討。(3) 障害肝ならびに肝再生初期のOncostatin Mの役割を検討するため、肝組織中のOncostatin Mの発現及びOncostatin M receptor  $\beta$

(OSMR  $\beta$ ) の発現をreal time PCRで定量化、発現の局在をin situ hybridization法および免疫染色法にて検討。(4) Oncostatin Mのシグナル伝達機構の解明のため、核内転写因子であるSTATの活性化およびDNA結合能についてEMSAにて検討。(5) 組織破壊軽減と組織再構築におけるOncostatin Mの役割を検討するため、プロテアーゼ阻害因子である $\alpha$ 1-protease inhibitorや $\alpha$ 1-antichymotrypsinの発現を検討する。また細胞外マトリックス (ECM) を構成するType IV collagenを免疫染色法にて確認、またECMの破壊生成に関与するMatorix metalloproteinase (MMP) -2、MMP-9およびTissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP) の発現を検討。

#### 4. 研究成果

##### 1. 閉塞性黄疸肝における肝阻血再灌流障害の実験的検討

胆管結紮後のマウス閉塞性胆汁うっ滞肝に阻血再灌流障害を加えると、胆汁うっ滞肝での肝阻血再灌流後の血清ALTは有意に上昇し、血球のpluggingと凝固壊死主体の組織障害を広範に認めるが、好中球浸潤はむしろ低下していることが確認された。黄疸肝では肝微少循環に関与する肝組織中および血清中endothelin-1の産生増強を認め、さらにhepatic stellate cell (肝星細胞)の活性化を認めたことより肝阻血再灌流後の肝障

害増強の機序として、好中球主体の肝障害とは異なり、endothelin-1の産生増加と肝星細胞の活性化による内皮細胞障害にともなう肝微少循環不全が関与していることが示唆された。

##### 2. 大量肝切除後および門脈塞栓術後の肝再生に関する臨床的検討

胆道癌に対する拡大肝葉切除後の肝再生の検討では、肝切除後に残肝は急速に再生増大するが、肝不全症例では肝再生の程度は遅延しており、また肝細胞機能障害、肝浮腫の指標としての肝CT値を測定すると、術後高ビリルビン血症および肝不全症例では有意にCT値の低下を認めていた。また、門脈塞栓術後の肝再生の誘導にはVEGFが関与しており、肝再生予測因子として有用である可能性が示唆された。さらに、黄疸肝症例では減黄の有無に関わらず肝再生が誘導され、拡大肝切除を予定する胆道癌症例に対する門脈塞栓術は黄疸の有無にかかわらず安全に施行できる手技であると考えられた。

##### 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8件)

① Suzuki T, Yoshidome H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Takeuchi D, Kato A, Furukawa K, Yoshitomi H, Iida A, Dochi T, Miyazaki M. Hepatocyte apoptosis is enhanced after ischemia/reperfusion in the steatotic liver. 査読有 J Clin Biochem Nutr. 48:142-8, 2011

② Nagai H, Kato A, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Furukawa K, Nozawa S, Yoshitomi H, Mitsuhashi N, Takeuchi D, Suda K, Yoshioka I, Miyazaki M. Endothelin-1 aggravates hepatic ischemia/reperfusion injury during obstructive cholestasis in bile duct ligated mice. 査読有 J Surg Res 162: 46-53, 2010

③ Takeuchi D, Yoshidome H, Kurosawa H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Miyazaki M. Interleukin-18 exacerbates pulmonary injury after hepatic ischemia/reperfusion in mice. 査読有 J Surg Res 158: 87-93, 2010

④ Shimizu H, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Miyazaki M. Aggressive surgical resection for hilar cholangiocarcinoma of the left-side predominance: radicality and safety of left-sided hepatectomy. 査読有 Ann Surg 251: 281-6, 2010

⑤ Miyazaki M, Kimura F, Shimizu H,

Yoshidome H, Otuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Takeuchi D, Takayashiki T, Suda K, Takano S. One hundred seven consecutive surgical resections for hilar cholangiocarcinoma of Bismuth types II, III, IV between 2001 and 2008. 査読有 J Hepatobiliary Pancreat Sci 17: 470-5, 2010  
⑥ Shimizu H, Kataoka M, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Miyazaki M. Role of Kupffer cells in tolerance induction after portal venous administration of alloantigen. 査読有 Hepatogastroenterology 56: 783-7, 2009  
⑦ Kusashio K, Shimizu H, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Fukada T, Miyazaki M. Effect of excessive acute-phase response on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. 査読有 Hepatogastroenterology 56: 824-8, 2009  
⑧ Shimizu H, Sawada S, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Miyazaki M. Clinical significance of biliary vascular anatomy of the right liver for hilar cholangiocarcinoma applied to left hemihepatectomy. 査読有 Ann Surg 249: 435-9, 2009

[学会発表] (計2件)

- ① 岡庭 輝、加藤 厚、木村 文夫、清水 宏明、吉留 博之、大塚 将之、吉富 秀幸、古川 勝規、宮崎 勝、他、胆道癌における拡大肝切除後の肝不全発症に肝再生は関係するか? 第110回 日本外科学会定期学術集会 2010年4月9日 名古屋
- ② 加藤 厚、木村文夫、清水宏明、吉留博之、大塚 将之、吉富 秀幸、古川 勝規、宮崎 勝、他、肝胆道系悪性腫瘍に対する門脈塞栓術後の肝再生促進因子に関する検討 第108回日本外科学会定期学術集会 2008年5月15日 長崎

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 厚 (KATO ATSUSHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：70344984

### (2) 研究分担者

宮崎 勝 (MIYAZAKI MASARU)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：70166156  
清水 宏明 (SHIMIZU HIROAKI)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号：80272318

吉留 博之 (YOSHIDOME HIROYUKI)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号：10312935  
古川 勝規 (FURUKAWA KATSUNORI)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：00400987

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：