

令和 5 年 5 月 21 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09001

研究課題名（和文）障害肝に対する大量肝切除を目指した有機アニオントランスポーターの発現解析

研究課題名（英文）Expression of organic anion transporter after massive hepatectomy for liver impairment

研究代表者

木村 憲央（Kimura, Norihisa）

弘前大学・医学研究科・講師

研究者番号：60436029

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、肝障害下での肝切除による急性肝不全の発症における有機アニオントランスポーターの関与とその機序を明らかにすることである。ラット障害肝・肝切除後肝不全モデルを作製し、経時的に肝組織からmRNAを抽出しマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現と、RT-PCR法による有機アニオントランスポーター遺伝子変動について解析し、同病態に關与する種々の変動遺伝子を同定することができた。今後は、Western blot法および免疫染色にて機能について解析する予定である。有機アニオントランスポーター発現調整と肝不全の減弱に効果的な薬剤が解明できれば、肝不全治療に対する新規治療の基盤となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的により、ラット肝障害下での肝切除による急性肝不全の発症における有機アニオントランスポーターの関与とその機序について、遺伝子レベルではあるが解明できた。今後は、本研究結果を基盤とし、障害肝・肝切除後肝不全に關わる有機アニオントランスポーター発現調整と肝不全の軽減効果を評価する予定である。これらが達成できれば障害肝に対する大量肝切除法の開発に寄与できるのみならず、有機アニオントランスポーター発現変動調整という視点から新たな肝不全治療法の開発にもつながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to clarify the mechanism and involvement of organic anion transporter in the pathogenesis of acute liver failure induced by hepatic resection under hepatic injury. We analyzed the gene expression of organic anion transporter by microarray and RT-PCR, and identified various genes involved in the pathogenesis of acute liver failure after hepatectomy for hepatic injury. In the future, we plan to analyze the function of the genes by western blotting and immunostaining. The identification of agents that are effective in regulating the expression of organic anion transporters and attenuating liver failure may provide the basis for new treatments for liver failure.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：障害肝 大量肝切除 肝不全 肝再生 有機アニオントランスポーター マイクロアレイ ラット 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

化学療法や分子標的薬などの有効な抗がん治療が発展してきた今も、肝悪性腫瘍に対する唯一の根治治療は積極的な肝切除術である。近年、手術手技や周術期管理の進歩により、残肝容量30%までは安全に大量肝切除が可能となったが、化学療法後障害肝に対し大量肝切除を施行した場合、肝再生過程で生じる急性肝不全は極めて致死的原因であるため切除肝容量には限界がある。近年、肝不全状態で引き起こされる遷延性胆汁うっ滞に関連する因子として肝細胞における有機アニオントランスポーターの実体が明らかになってきた。これらのトランスポーターは、胆汁酸や各種薬剤を含む有機アニオンの細胞膜輸送を担っており、それらの障害は、様々な肝疾患における肝内胆汁うっ滞の直接的な病因として重要視されている。

一方で、Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) のリガンドであるフィブラート系薬剤の腎不全治療や抗がん剤代謝における有用性が知られている。近年、同薬剤の肝細胞トランスポーターに対する作用も報告されており、肝不全治療への応用が期待されている。

我々はこれまで、肝細胞における「有機アニオントランスポーター」に着目し、1)大量(90%)肝切除、および2)肝切除後感染性肝不全による有機アニオントランスポーター異常が、肝切除後の急性肝不全に関わることを、ラットを用いて明らかにした。近年の新規抗がん薬治療の開発により肝悪性腫瘍の治療成績は飛躍的に向上したが、肝切除が唯一の根治治療であることには変わりはない。したがって、現在の肝切除治療における最大の障壁は、化学療法による薬剤性肝障害をはじめとした「障害肝」の存在である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ラット障害肝モデルに大量肝切除を施行することによって生じた、極小肝の肝再生と障害肝が重複した致死性病態において、肝臓内の有機アニオントランスポーターの発現変動を解析し、障害肝に対する大量肝切除の適応拡大を目指すことである。

## 3. 研究の方法

【研究1】「ラット障害肝・肝切除後肝不全モデル」を作製し、肝組織における有機アニオントランスポーター発現解析を行い、肝切除後肝不全時における有機アニオン代謝異常と肝再生不全の機序の解明を目指す。

### ラット障害肝・肝切除後肝不全モデルの作製

週齢6週、180~220gのSprague-Dawley雄性ラットを用い、全身麻酔下に肝障害誘導薬としてThioacetamide(200mg/kg)を腹腔内投与(2回/週、5週間)し、ラット肝障害モデルを作成する。更に、肝を70%切除し障害肝・肝切除後肝不全モデルを作成する。24、72、168時間後に肝組織と全血を採取する。血液検体からAST、ALT、NH<sub>3</sub>、T-Bil、bile acid、endotoxin、Interleukin(IL)-1、IL-6、IL-8、IL-12、TNF- $\alpha$ 濃度を測定する。また、肝のホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、HE染色を施行し光学顕微鏡下に肝障害の程度を4段階(高度、中等度、軽度、なし)に評価する。比較対照として、Sham手術群(コントロール)、Thioacetamide単独投与群、70%肝切除単独群をおく。

### 肝組織中の有機アニオントランスポーター遺伝子発現解析

で採取した肝組織(24、72、168時間後)を用いてマイクロアレイを用いた網羅的な核内シグナル解析に加え、以下の有機アニオントランスポーター遺伝子変動を解析する。さらに、これらの遺伝子発現をRT-PCRで数値化し測定する。

- ) 類洞側肝細胞膜(basolateral membrane)発現型トランスポーター  
NTCP(Na<sup>+</sup>/taurocholate co-transporting polypeptide)  
OATP1-4(organic anion transporting polypeptide 1-4)  
MRP1,3,4,6(multidrug resistance protein 1,3,4,6)
- ) 毛細胆管側肝細胞膜(canalicular membrane)発現型トランスポーター  
MRP2(multidrug resistance protein 2)  
BSEP(bile salt export pump)

### 肝組織中の有機アニオントランスポーター蛋白発現と局在の検討

で採取した肝組織(24、72、168時間後)を用いて上記の有機アニオントランスポーターの蛋白発現量をWestern blot法で定量するとともに、免疫組織化学的にこれらの機能蛋白が適切な細胞膜分布を呈しているかを検証する。

【研究 2】障害肝・肝切除後肝不全ラットに、PPAR のリガンドで、有機アニオン腸肝循環機構を促進すると言われているフィブラート系薬剤を投与することにより、有機アニオントランスポーター発現調整作用を解析し、肝不全治療に向けた病態基盤を明らかにする。

#### 有機アニオントランスポーター調整による肝不全治療 (in vivo)

障害肝・肝切除後肝不全ラットに対し、肝切除前にフィブラート系薬剤 (clofibrate, bezafibrate, fenofibrate) を経口投与 (100 mg/kg, 1 週間) し、70%肝切除後、24, 72, 168 時間後に採取した肝組織を用いて と同様に、RT-PCR および Western blot 法で有機アニオントランスポーター発現変動を検討する。即ち各種フィブラート製剤投与により、障害肝・肝再生時肝不全ラットの、有機アニオントランスポーター発現調整と肝不全の軽減効果を評価する。

### 4. 研究成果

#### 1) 血液生化学検査 (図 1)

24 時間後の時点で、障害肝 + 70%肝切除群において Control である Sham 手術群と比較して肝逸脱酵素 (AST, ALT)、総ビリルビン、および胆汁酸上昇が認められた。中でも、ALT および胆汁酸では 70%肝切除群と比較し、統計学的有意差を持って増加が確認された。72 時間後の時点では AST, ALT および胆汁酸において、Sham 手術群と障害肝 + 70%肝切除群の間に有意差が認められた。168 時間後ではいずれも差は認められず、定常化していた。どの時点においても障害肝群では Sham 手術群と比較して差は認められなかった。

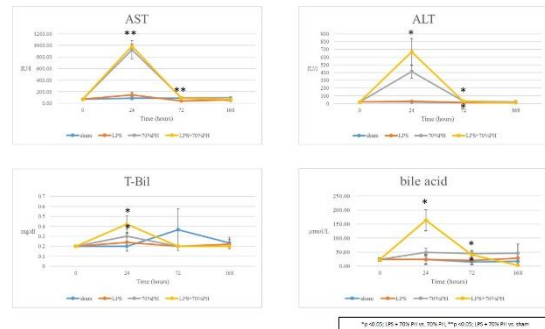
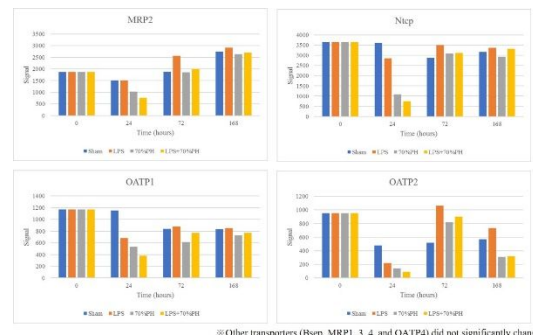


図1 Laboratory data

#### (2) マイクロアレイ分析 (図 2)

類洞側肝細胞膜発現型トランスポーターであり、胆汁酸、ビリルビンを肝細胞内に取り込む Oatp1, Ntcp において、70%肝切除群と比較して障害肝 + 70%肝切除群で 24 時間後にシグナルの減少傾向が認められた。同様に毛細胆管側肝細胞膜発現型トランスポーターであり、胆汁中へ胆汁酸を排泄する Mrp2 において、24 時間後に 70%肝切除群より減少傾向が認められた。その他、Bsep や Mrp1, 3, 4 などではシグナル変動は認められなかった。



※Other transporters (Bsep, Mrp1, 3, 4, and OATP4) did not significantly change

図2 Microarray analysis

#### (3) RT-PCR (図 3)

マイクロアレイで変化が認められた Mrp2, Ntcp および Oatp1, 2 に対して RT-PCR を施行した。Mrp2, Ntcp および Oatp1 において有意差は認めなかったが、マイクロアレイの結果と同様に 70%肝切除群と比較して、障害肝 + 70%肝切除群で 24 時間後に遺伝子発現の低下傾向が確認された。Oatp2 においては前述の差は認められなかった。72 時間後の時点では、いずれのトランスポーターにおいても、障害肝 + 70%肝切除群が他の群と比較して発現増加が認められた。肝切除群では 168 時間が経過した段階でも平素の状態までの回復は認められなかった。

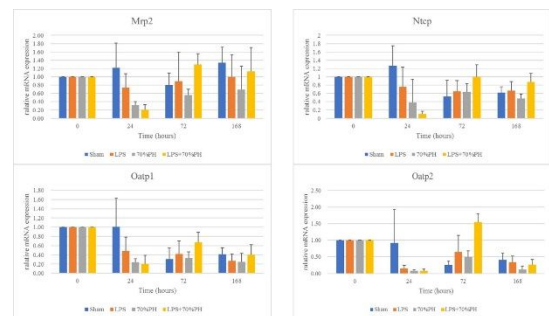


図3 RT-PCR

#### (4) 考察

今回の実験で確認された ABC transporter の減少は背景肝すなわち障害肝の存在そのものによる影響なのか、あるいは障害肝に対する肝切除負荷による二段階的な影響であるのかは現時点では不明であり、さらなる検討が必要である。だが、本実験により肝切除後肝再生期の背景肝の障害状態が ABC transporter 障害を惹起し、胆汁うっ滞の増悪の一因となっている可能性が示唆された。

今後は、今までの研究成果を基盤とし、RT-PCR 法で得られた変動遺伝子が実際に機能しているかを、Western blot 法にて蛋白発現量を解析し、免疫染色にて局在分布を明らかにする予定である。最終的に各種フィブラート製剤投与により、障害肝・肝再生時肝不全ラットの、有機アニオントランスポーター発現調整と肝不全の軽減効果を評価する予定である。これらが達成できれば肝不全治療に対する新規治療の基盤となる可能性がある。本研究の最終結果は、学会発表および紙面による国内外への発信を考えている。

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〕

〔その他〕

-

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	袴田 健一  (Hakamada Kenichi)  (30271802)	弘前大学・医学研究科・教授   (11101)	
研究分担者	三浦 卓也  (Miura Takuya)  (30722136)	弘前大学・医学部附属病院・講師   (11101)	
研究分担者	石戸 圭之輔  (Ishido Keinosuke)  (00436023)	弘前大学・医学研究科・准教授   (11101)	
研究分担者	長瀬 勇人  (Nagase Hayato)  (10750862)	弘前大学・医学部附属病院・助教   (11101)	

	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
研究協力者	若狭 悠介  (Wakasa Yusuke)	弘前大学・医学部附属病院・助教   (11101)	

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
---------	---------