

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08663

研究課題名(和文) The Significance and Mechanism of TF-FXa-Thrombin Signaling Cascade in Hepatic Ischemia Reperfusion Injury

研究課題名(英文) The Significance and Mechanism of TF-FXa-Thrombin Signaling Cascade in Hepatic Ischemia Reperfusion Injury

研究代表者

栗山 直久 (Kuriyama, Naohisa)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80525329

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)：マウス肝虚血再灌流障害(IRI)において直接Thrombin阻害剤(Dabigatran)は、トロンピンを介した細胞傷害シグナル伝達を阻害することにより、内皮細胞を肝IRIから保護した。またDabigatranによって内皮細胞上の内因性TMが増強されると、肝IRIにตอบสนองして内皮細胞から分泌される過剰なHMGB-1が不活性化された。最終的にHMGB-1の類洞外への浸潤の減少が肝細胞の保護につながった。

マウス肝IRIにおいて凝固Xa因子阻害剤(Edoxaban)は、類洞における微小血栓症を防御し、FXa-PAR-2が誘発する類洞内皮細胞における炎症を抑制することによって、肝IRIを改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Thrombinと凝固Xa因子を阻害し、凝固と炎症反応をともに抑制することで、肝IRIだけでなく、敗血症等への治療の応用が可能となる。また今回使用した阻害剤は、すぐに臨床応用可能であり、周術期使用で過度の凝固機能抑制からの出血が危惧されるが、すでに特異的拮抗剤も開発されていることから、有望な治療薬となり得る。この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に対する臓器移植のドナープール拡大や、高度進行肝細胞癌および胆管癌患者において、手術適応拡大や、周術期管理などの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るものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In mouse hepatic ischemia-reperfusion injury (IRI), a direct thrombin inhibitor (Dabigatran) protected endothelial cells from hepatic IRI by inhibiting thrombin-mediated cytotoxic signaling. Dabigatran also enhanced endogenous TM on endothelial cells, which inactivated excess HMGB-1 secreted by endothelial cells in response to hepatic IRI. Ultimately, reduced infiltration of HMGB-1 outside the sinusoids protected hepatocytes.

In mice hepatic IRI, coagulation factor Xa inhibitor (Edoxaban) improved hepatic IRI by protecting against microthrombosis in the sinusoids and by suppressing FXa-PAR-2-induced inflammation in sinusoidal endothelial cells.

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 内皮細胞障害 抗凝固作用

## 1. 研究開始当初の背景

末期肝疾患に対する肝移植や、胆管癌や肝癌に対する血管合併切除再建を伴う拡大肝切除などが、積極的に行われており、その予後は改善されている。しかし一方、その高い術後合併症率や手術関連死亡率が依然解決しなければいけない問題として存在している。

その要因として、手術直後から発生する虚血再灌流障害 (IRI) による血管内皮細胞障害が関与しており、我々はこの血管内皮細胞障害を克服すべく、抗凝固および抗炎症作用を有する活性化プロテイン C と、その受容体であるプロテアーゼ活性化型受容体-1 の signaling について研究を重ねてきた<sup>1,2,3</sup>。肝 IRI により血管内皮細胞障害が惹起されると、内皮上にフォンビルブランド因子 (vWF) や P-selectin などの接着因子が発現し、好中球などの炎症細胞浸潤や血小板が誘導され、多種多様な炎症性サイトカイン等の分泌が起こり、微小循環障害から肝実質障害に至る。一方、血管内皮細胞が障害されると、血管壁の外膜などに存在する膜タンパクである組織因子 (TF) が血流にむき出しになり、TF と血中の凝固第 VIIa 因子が結合して外因系凝固が活性化される。また障害された内皮細胞下に存在する膠原繊維や、死細胞由来の細胞成分である DNA, histone, HMGB1 などの DAMPs (damage-associated molecular patterns) に、血中の凝固 XIIIa 因子が接触することで、内因系凝固も活性化される。この二つの経路は最終的に凝固 Xa 因子を活性化し、Prothrombin (凝固 II 因子) を Thrombin (凝固 IIa 因子) に変換し、可溶性 Fibrinogen から不溶性 Fibrin 血栓が形成される。さらに Thrombin は凝固 XIII 因子を活性化し、Fibrin を安定化させ、強固な血栓形成となる。また同時に Thrombin によって血小板も活性化され凝固反応はさらに増幅し、一連の血栓形成が全身に及ぶと DIC となる。このように炎症反応と凝固反応は密接に関係し、ともに促進された状態は、敗血症などで経験される SIRS associated coagulopathy であり、炎症のみならず凝固反応も制御することが重要である。

## 2. 研究の目的

肝胆道系腫瘍に対する拡大肝切除時の温阻血後や、肝移植グラフト保存時の冷阻血後などによる肝虚血再灌流障害 (ischemia reperfusion injury: IRI) は未だに解決されていない課題である。その大きな原因の一つとして、血管内皮細胞障害による組織因子 (tissue factor: TF) 発現から始まり、凝固第 Xa 因子 (FXa) を介して、Thrombin 活性に至る TF-FXa-Thrombin signaling cascade が存在する。この反応では凝固反応が促進され、血栓形成を誘導されるだけでなく、炎症反応も惹起されることから、いかにこの cascade を制御するかが重要となる。よって、この cascade で key となる TF, FXa, Thrombin を制御することで、肝 IRI を抑制することが可能かどうか検証するとともに、その作用機序についても解明する。

## 3. 研究の方法

### 研究 : マウス肝虚血再灌流障害における直接 Thrombin 阻害剤の細胞保護効果について

使用モデル (in vivo): マウス (C57BL6) 70%部分肝 60 分間虚血再灌流モデル

使用モデル (in vitro): 肝内皮細胞及び肝細胞 60 分間低酸素再酸素化モデル

使用薬剤: 直接 Thrombin 阻害剤 (Dabigatran etexilate)

## 4. 研究の結果

Fig. 1

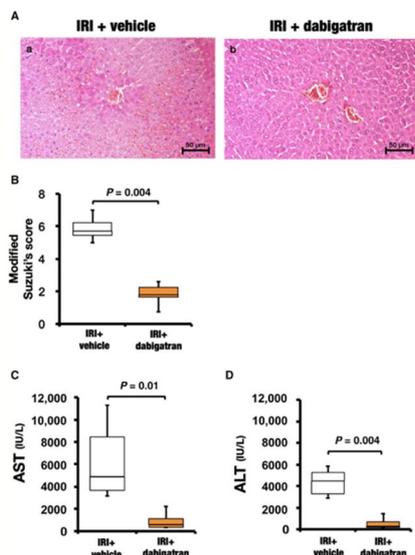
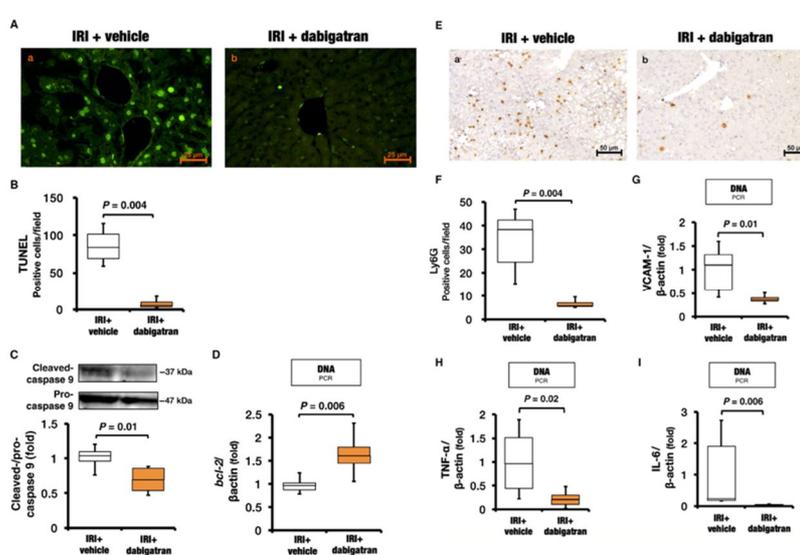


Fig. 2



**Fig 1. 再灌流 6 時間後肝障害評価**

(A, B) IRI Vehicle (コントロール群) に比べて, Selective thrombin inhibitor (Dabigatran) 投与群で有意に組織的肝障害が改善されていた。

(C, D) Dabigatran 投与群で有意に AST 及び ALT 値が改善された。

**Fig 2. アポトーシスと炎症細胞浸潤とサイトカイン評価**

(A, B) IRI Vehicle に比べて, Dabigatran 投与群で有意に TUNEL 陽性細胞数が減少していた。

(C, D) IRI Vehicle に比べて, Dabigatran 投与群で有意に Cleaved-caspase 9 の発現が抑制されていたが, 抗アポトーシス作用がある Bcl 2 の発現は有意に上昇していた。

(E, F) IRI Vehicle に比べて, Dabigatran 投与群で有意に Ly6G 陽性炎症細胞数が減少していた。

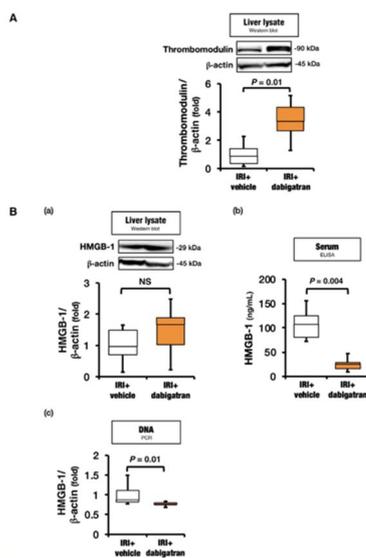
(G, H, I) IRI Vehicle に比べて, Dabigatran 投与群で有意に VCAM-1, TNF, IL-6 の発現が, それぞれ有意に抑制されていた。

**Fig 3. Thrombomodulin (TM) と HMGB-1 発現 (in vivo)**

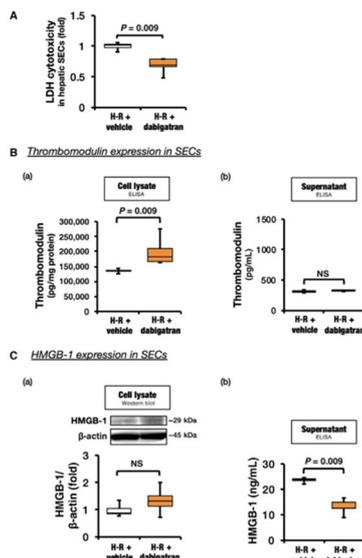
(A) IRI Vehicle に比べて, Dabigatran 投与群で有意に TM の発現が増加していた。

(B, C, D) Dabigatran 投与群で有意に HMGB-1 の発現が, 有意に抑制されていた。

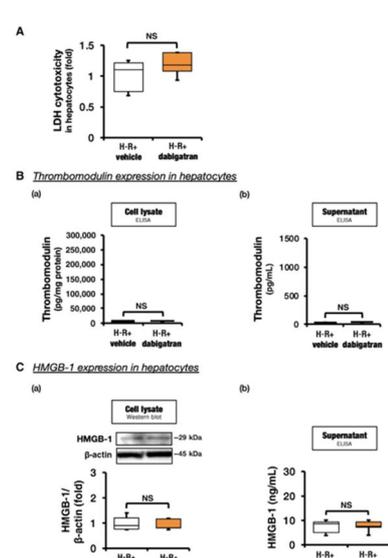
**Fig 3**



**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig 4. 60 分低酸素下に培養された内皮細胞 (SECs) での TM と HMGB-1 発現 (in vitro)**

(A) H-R Vehicle に比べて, Dabigatran 投与群で有意に TM の発現が増加していた。

(B, C, D) Dabigatran 投与群で有意に HMGB-1 の発現が, 有意に抑制されていた。

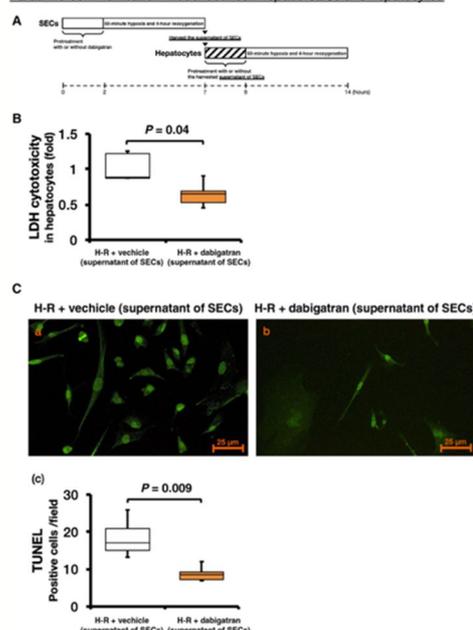
**Fig 5. 60 分低酸素下に培養された肝細胞(Hepatocyte)での TM と HMGB-1 発現 (in vitro)**

(A) H-R Vehicle に比べて, Dabigatran 投与群では同等の細胞障害度であった。

(B) H-R Vehicle に比べて, Dabigatran 投与群では TM の発現は同等であった。

(C) H-R Vehicle に比べて, Dabigatran 投与群では HMGB-1 の発現は同等であった。

**Paracrine communication model between hepatic SECs and hepatocytes**

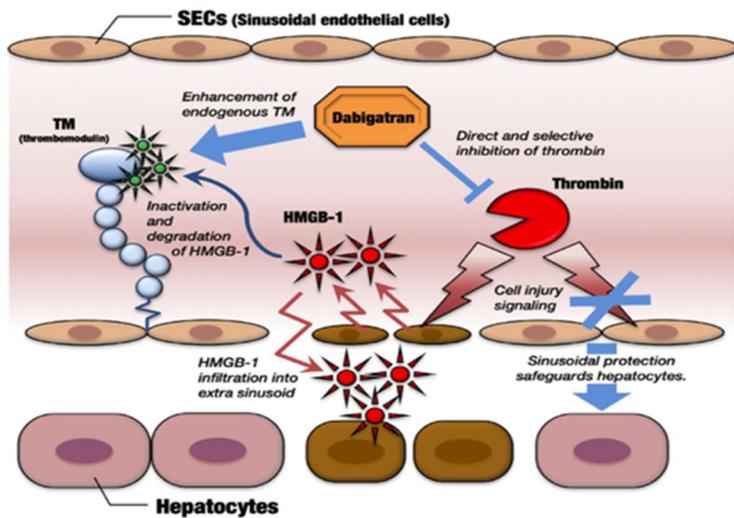


**Fig 6. 内皮細胞と肝細胞間のパラクラインコミュニケーションモデルにおける肝細胞に対する Dabigatran の効果**

(A) 内皮細胞と肝細胞間のパラクライン伝達モデルの図式. 内皮細胞を Dabigatran で前処理した後, H-R 条件下で無血清培地で培養し, 内皮細胞の上清を回収した. 肝細胞は, 内皮細胞の上清で前処理した後, H-R 条件下で血清欠乏培地で培養した.

(B) 肝細胞培養上清中の LDH 細胞毒性レベルは, H-R+Dabigatran で前処理した内皮細胞上清の群では, H-R + Vehicle で前処理した内皮細胞上清の群よりも有意に低かった。

(C) 肝細胞のアポトーシスは, H-R+Dabigatran で前処理した内皮細胞上清の群では, H-R + Vehicle で前処理した内皮細胞上清の群よりも有意に低かった。



**Fig 7. 肝 IRI に対する Dabigatran 治療による細胞保護効果のメカニズム**  
 Dabigatran 投与は、トロンピンを介した細胞傷害シグナル伝達を直接的かつ選択的に阻害することにより、内皮細胞を肝 IRI から保護した。また Dabigatran 処理によって内皮細胞上の内因性 TM が増強されると、肝 IRI に応答して内皮細胞から分泌される過剰な HMGB-1 が不活性化され、分解された。最終的に、HMGB-1 の類洞外への浸潤の減少が肝細胞の保護につながった。

### 3. 研究の方法

**研究**：マウス肝虚血再灌流障害における凝固 FXa 阻害剤の細胞保護効果について

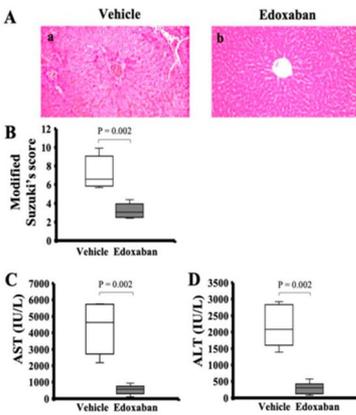
使用モデル：マウス (C57BL6) 70%部分肝 60 分間虚血再灌流モデル

使用モデル (in vitro)：肝内皮細胞及び肝細胞 60 分間低酸素再酸素化モデル

使用薬剤：凝固 Xa 因子阻害剤 (Edoxaban)

### 4. 研究の結果

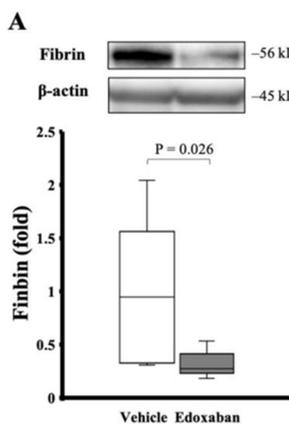
**Fig. 1**



**Fig 1. 再灌流 6 時間後の肝障害評価**

(A, B) IRI Vehicle に比べて、Selective FXa inhibitor, (edoxaban) 投与群で有意に組織的肝障害が改善されていた。(C, D) edoxaban 投与群で有意に AST 及び ALT 値が改善された

**Fig. 2**

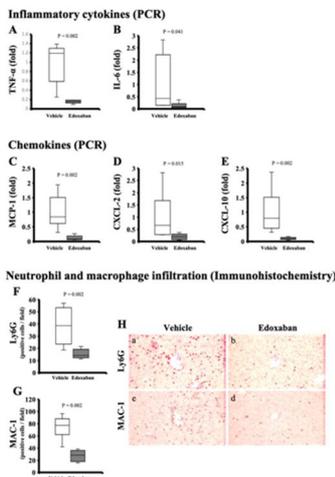


**Fig 2. フィブリン沈着評価**

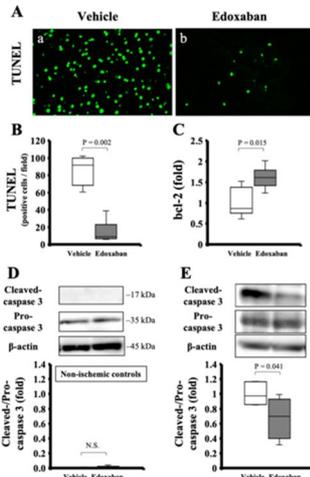
(A) IRI Vehicle に比べて、edoxaban 投与群で有意にフィブリン沈着が少なかった。

(B) 免疫染色では、コントロール群に比べて、edoxaban 投与群で有意に CD31 陽性の内皮細胞が染色されていたが、fibrin 沈着は有意に減少していた。

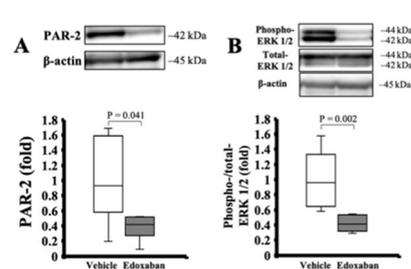
**Fig. 3**



**Fig. 4**



**Fig. 5**



### 3. 研究の方法

**研究**：マウス肝虚血再灌流障害における凝固 FXa 阻害剤の細胞保護効果について

使用モデル：マウス (C57BL6) 70%部分肝 60 分間虚血再灌流モデル

使用モデル (in vitro)：肝内皮細胞及び肝細胞 60 分間低酸素再酸素化モデル

使用薬剤：凝固 Xa 因子阻害剤 (Edoxaban)

### 4. 研究の結果

### Fig 3. サイトカインと炎症細胞浸潤

(A, B, C, D, E) IRI Vehicle に比べて, edoxaban 投与群で有意に TNF $\alpha$ , IL-6, MVP-1, CXCL-2, CXCL-10 の発現が, それぞれ有意に抑制されていた。

(F, G, H) edoxaban 投与群で有意に Ly6G と MAC-1 陽性炎症細胞数が減少していた。

### Fig 4. アポトーシス評価 (TUNEL 染色, Bcl2, caspase-3)

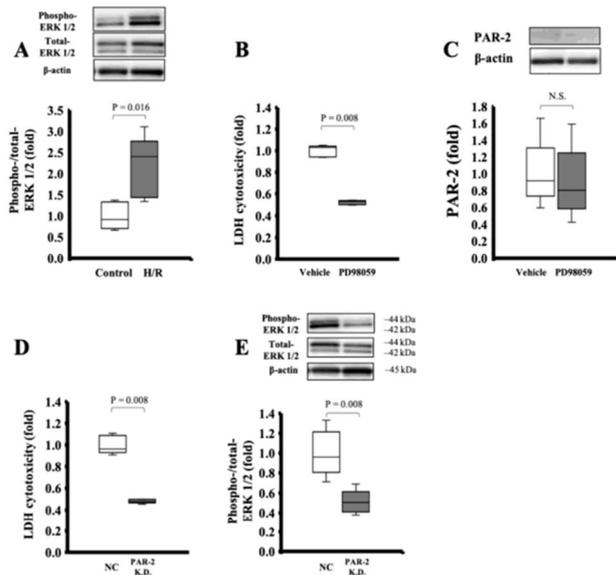
(A, B) IRI Vehicle に比べて, edoxaban 投与群で有意に TUNEL 陽性細胞数が減少していた

(C, D, E) IRI Vehicle に比べて, edoxaban 投与群で有意に抗アポトーシス作用がある Bcl 2 の発現が抑制されていたが, Cleaved-caspase 3 の発現は有意に上昇していた

### Fig 5. PAR-2 と ERK1/2 発現 (in vivo)

(A) IRI Vehicle に比べて, edoxaban 投与群で有意に PAR-1 発現が減少していた。

(B) Edoxaban 投与群で有意に phosphorylation of ERK 1/2 の発現が減少していた。



### Fig 6. 60 分低酸素下に培養された内皮細胞 (SECs) での細胞障害と PAR2, ERK1/2 発現 (in vitro)

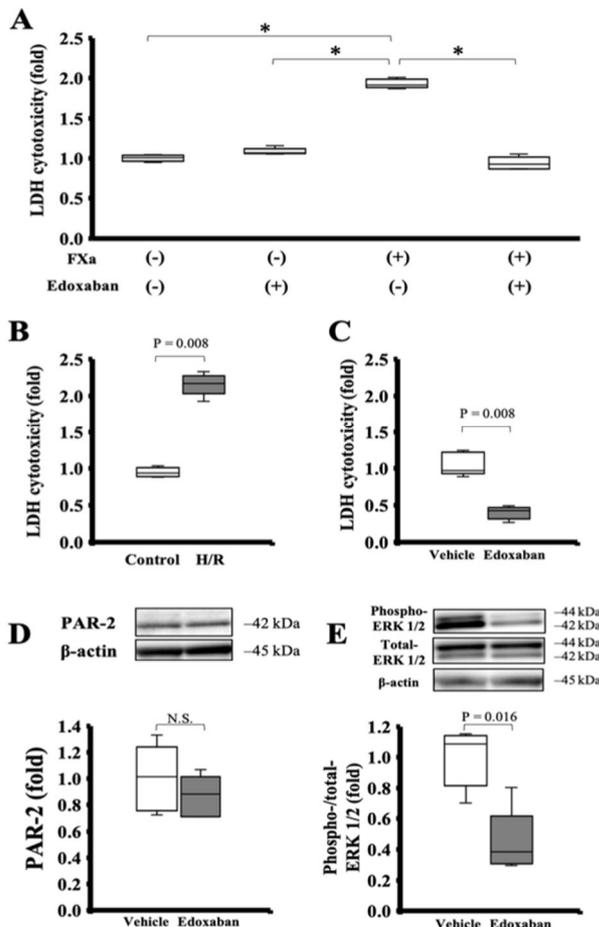
(A) FXa は肝内皮細胞の細胞毒性レベルを上昇させたが, edoxaban 投与は FXa 誘発細胞毒性を有意に改善した。

(B) コントロール群に比べて, 60 分低酸素下に培養された内皮細胞 (H/R) 群で有意に細胞毒性レベルが上昇していたが, edoxaban 投与によって有意に細胞毒性レベルが抑制された。

H-R: hypoxia/reoxygenation

(D) edoxaban 投与によって PAR-2 発現は変化しなかったが, ERK1/2 のリン酸化は有意に抑制されていた。

### Fig 7. 60 分低酸素下に培養された内皮細胞 (SECs) での PAR-2 knockdown による細胞毒性と ERK1/2 発現



(A, B, C) コントロール群に比べて, 60 分低酸素下に培養された内皮細胞 (H/R) 群で有意に ERK1/2 リン酸化が有意に上昇していたが, specific MAPK inhibitor (PD98059) を投与することで, PAR-2 の発現を抑制することなく, 細胞毒性レベルを改善した。レベルが上昇していたが, edoxaban 投与によって有意に細胞毒性レベルが抑制された。

D, E) ERK1/2 リン酸化は PAR-2 knockdown で有意に抑制されていた。

### 結語

Edoxaban は, 肝 IRI において類洞における微小血栓症を防御し, FXa-PAR-2 が誘発する類洞内皮細胞における炎症を抑制することによって, マウスの肝虚血再灌流障害を改善した。

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 1件）

1. 著者名 Noguchi D, Kuriyama N, Hibi T, Maeda K, Shinkai T, Gyoten K, Hayasaki A, Fujii T, Iizawa Y, Tanemura A, Murata Y, Kishiwada M, Sakurai H, Mizuno S.	4. 巻 3
2. 論文標題 The Impact of Dabigatran Treatment on Sinusoidal Protection Against Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Liver transplantation	6. 最初と最後の頁 363-384
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lt.25929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koki Maeda, Naohisa Kuriyama, Tatsuya Sakamoto, Benson M Kaluba, Takuya Yuge, Daisuke Noguchi, Takahiro Ito, Kazuyuki Gyoten, Aoi Hayasaki, Takehiro Fujii, Yusuke Iizawa, Yasuhiro Murata, Akihiro Tanemura, Masashi Kishiwada and Shugo
2. 発表標題 A Direct Oral Factor Xa Inhibitor Edoxaban Ameriorates Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury
3. 学会等名 American Transplant Congress 2023 (米国). (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前田光貴、栗山直久、伊藤貴洋、堯天一亨、早崎碧泉、藤井武宏、飯澤祐介、村田泰洋、種村彰洋、岸和田昌之、櫻井洋至、水野修吾
2. 発表標題 Fxa inhibitor (Edoxaban tosilate)によるマウス肝虚血再灌流障害の軽減と細胞保護効果.
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会（熊本市）
4. 発表年 2022年

〔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	前田 光貴 (Maeda Koki) (00868812)	三重大学・医学部附属病院・助教  (14101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	新貝 達  (Shinkai Toru)  (40860672)	三重大学・医学部附属病院・助教    (14101)	

	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	日比妙美  (Hibi Taemi)	三重大学・肝胆膵・移植外科・実験助手	

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