

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791426

研究課題名(和文) 肝虚血再灌流傷害・再生制御における小胞体ストレス応答の解明と制御に関する研究

研究課題名(英文) study about a novel elucidation of endoplasmic reticulum stress response on ischemia /reperfusion injury and liver regeneration after massive hepatectomy and living donor liver transplantation

研究代表者

森 大樹 (MORI, Hiroki)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：70448330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：大量肝切除後肝不全は重要な問題であり、その克服は重要な課題である。今回、肝再生モデルである70%肝切除モデルと肝不全モデルである90%肝切除モデルを用いて、肝再生に対する小胞体ストレス応答の関与を検討した。肝不全モデルでは、術後1日から21日まで経時的に小胞体ストレス応答関連遺伝子のmRNAが術前と比較して最大6倍まで強発現していた。さらに、小胞体ストレス応答は、肝切除術後7日目以降の後期に強発現していた。肝再生モデルでは、術後1日から21日まで経時的に小胞体ストレス応答関連遺伝子のmRNAが術前と比較して約1.5～3倍まで強発現していたが、肝不全モデルほど強発現はしていなかった。

研究成果の概要(英文)：It is important issue to overcome liver failure after extended hepatectomy (Hx) or living donor liver transplantation which is still serious problem. This time, we investigated the involvement of the endoplasmic reticulum stress response on liver regeneration, using 70% Hx model, postoperative liver regeneration model, and 90% Hx model, postoperative liver failure model. In 90% Hx model, mRNA of intrahepatic endoplasmic reticulum stress response related genes were time-dependently up-regulated up to maximum 6 times at 1, 3, 7, 14, 21 days after Hx. In addition, they were strongly expressed since the late phase after postoperative 7 days. In 70% Hx model, they were time-dependently up-regulated up to about 1.5 to 3 times but not strongly expressed in equivalent to liver failure model.

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：大量肝切除 肝再生 小胞体ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

肝疾患(肝細胞癌、肝硬変)に対する肝切除術や肝移植などの手術治療において肝虚血再灌流傷害は術後肝傷害発症に最も重要な因子である。肝切除術施行時出血制御のための各種阻血後の再灌流傷害や、生体肝移植施行時におけるグラフト肝の虚血再灌流傷害の克服は肝臓外科において避けることができない。肝虚血再灌流障害の成因として虚血期における kupper 細胞からの炎症性サイトカイン(TNF- α など)による類洞内皮細胞の priming と血流再開による活性化があげられる。また大量肝切除後にも過小な肝容積に対して過剰な門脈血流による類洞の傷害と、肝再生機序の混乱が術後肝不全の一因としてあげられる(Transplant Proc 2001, Ann Surg 2003)。つまり肝再生は肝細胞と他の間葉系細胞の再生により構成され(Science 1997) 初期の肝細胞増殖に引き続く類洞内皮細胞の増殖により肝血流が保たれるが、大量肝切除術後には過度の肝細胞増殖と比較して類洞内皮細胞増殖が相対的に減少する結果、肝微小循環障害が惹起され術後肝不全が引き起こされる。

小胞体ストレス応答は生体内での恒常性を維持する作用を持ち(図1) 近年、肝に対して細胞の保護作用および apoptosis 作用を持つことが示され、肝障害時の小胞体ストレスの関与が報告されている(Science 2009, Mol Med 2009)。また心筋および脳の虚血再灌流傷害に対する小胞体ストレス応答の関与が報告されている(J Biol Chem 2009) 依然として大量肝切除術後および生体肝移植術後における虚血再灌流傷害・肝再生制御に対する小胞体ストレスの関与は明らかになっていない。

これらのことから、大量肝切除時や生体肝移植時の虚血再灌流傷害に対する小胞体ストレス応答の関与する可能性が示唆される。

2. 研究の目的

大量肝切除術後肝再生における新たな調節因子となりうる小胞体ストレス応答の作用機序について解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 70%大量肝切除術後肝再生モデルにおける小胞体ストレス応答の関与: 正常ラットに 70%大量肝切除を行い術後肝再生における小胞体ストレス応答の役割とともに再生の経時的变化の程度による違いについて、real time RT-PCR による肝内小胞体ストレス応答関連遺伝子(ATF6, XBP1, CHOP, GRP78, HSP70) の mRNA 発現量の経時的变化を検討する。

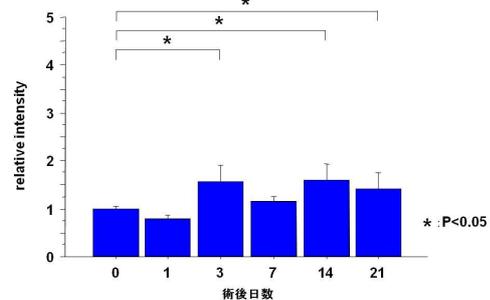
(2) 90%大量肝切除術後肝不全モデルにおける小胞体ストレス応答の関与: 正常ラットに 90%大量肝切除を行い術後肝再生における小胞体ストレス応答の役割とともに再生の経時的变化の程度による違いについて、real

time RT-PCR による肝内小胞体ストレス応答関連遺伝子(ATF6, XBP1, CHOP, GRP78, HSP70) の mRNA 発現量の経時的变化を検討する。

4. 研究成果

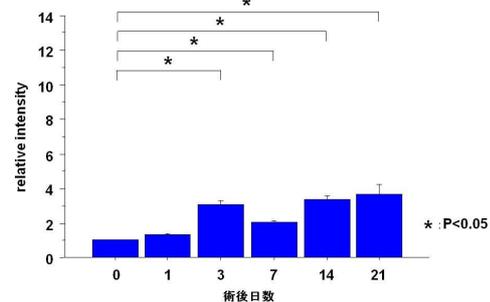
(1) 70%大量肝切除術後肝再生モデルにおいて、ATF6 mRNA 発現は、術前と比較して術後3日、14日、21日目で有意に上昇は認められたが、最大約1.6倍までの上昇であった。

70%肝切除後小胞体ストレス応答マーカー - ATF6 mRNA発現 -



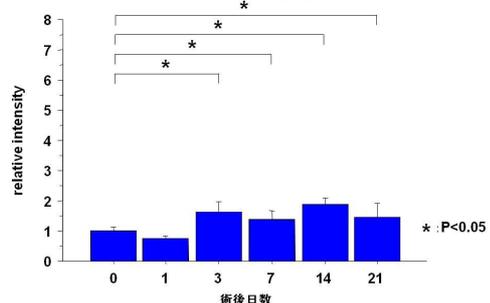
Xbp1 mRNA 発現は、術前と比較して術後3日、7日、14日、21日目で経時的に有意な上昇を認め、最大約3.6倍まで上昇を認めた。

70%肝切除後小胞体ストレス応答マーカー - Xbp1 mRNA発現 -

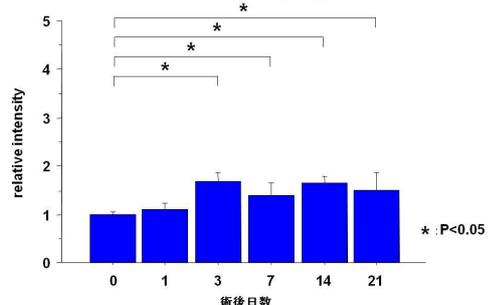


CHOP mRNA 発現は、術前と比較して術後3日、7日、14日、21日目で経時的に有意な上昇を認められたが、最大約1.9倍までの上昇であった。

70%肝切除後小胞体ストレス応答マーカー - CHOP mRNA発現 -

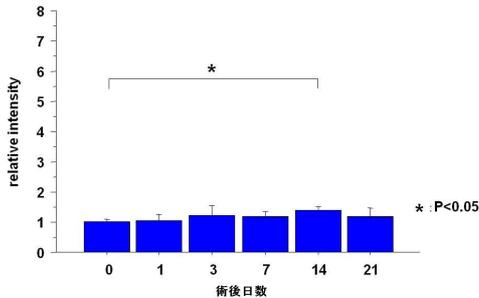


70%肝切除後小胞体ストレス応答マーカー - HSP70 mRNA発現 -



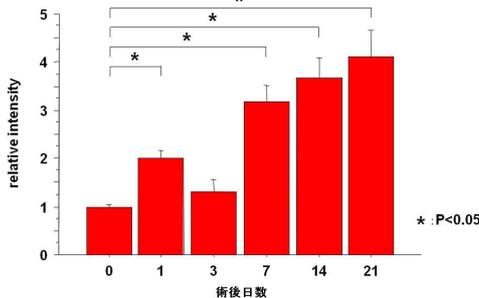
HSP70 mRNA 発現は、術前と比較して術後3日、7日、14日、21日目で有意に上昇は認められたが、最大約1.7倍までの上昇であった。
 GRP78 mRNA 発現は、術後1日目から約2.6倍まで上昇を始め、14日目で約6倍とピークに達し、21日目では約4.7倍と減少を認めた。

70%肝切除後小胞体ストレス応答マーカー
 - GRP78 mRNA発現 -



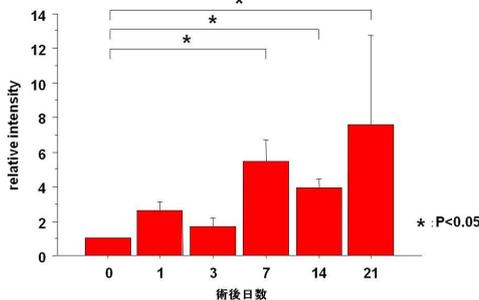
(2) 90%大量肝切除術後肝不全モデルにおいて、ATF6 mRNA 発現は、術前と比較して術後1日目から約2倍まで上昇を始め、一旦3日目に1.3倍まで減少したが、その後7日、14日、21日目と経時的に最大約4倍まで再上昇を認めた。

90%肝切除後小胞体ストレス応答マーカー
 - ATF6 mRNA発現 -



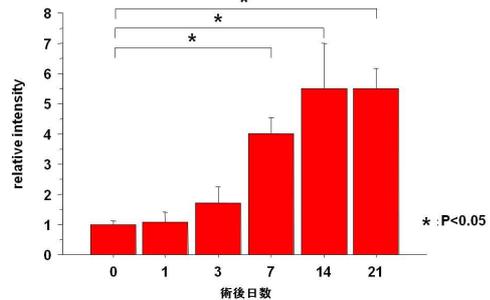
Xbp1 mRNA 発現は、術後1日目から約2.5倍まで上昇し、一旦3日目に1.7倍まで減少したが、その後7日、14日、21日目と多少の増減を繰り返しながら経時的に最大約7.5倍まで上昇を認めた。

90%肝切除後小胞体ストレス応答マーカー
 - Xbp1 mRNA発現 -



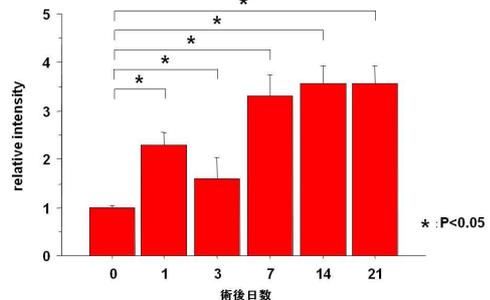
CHOP mRNA 発現は、術後3日目から上昇を始め、その後経時的に上昇を続け、14日目でプラトーに達し、最大約5.5倍までの上昇を認めた。

90%肝切除後小胞体ストレス応答マーカー
 - CHOP mRNA発現 -



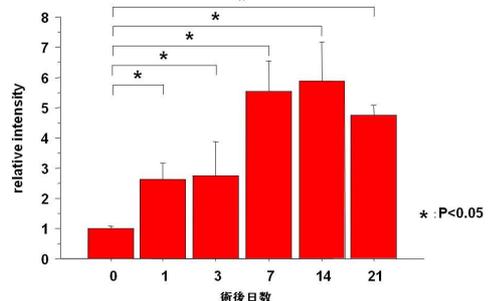
HSP70 mRNA 発現は、術後1日目から約2.3倍まで上昇を始め、一旦3日目に1.6倍まで減少したが、その後再上昇を認め、7日目でプラトーに達し、最大約3.6倍まで上昇を認めた。

90%肝切除後小胞体ストレス応答マーカー
 - HSP70 mRNA発現 -



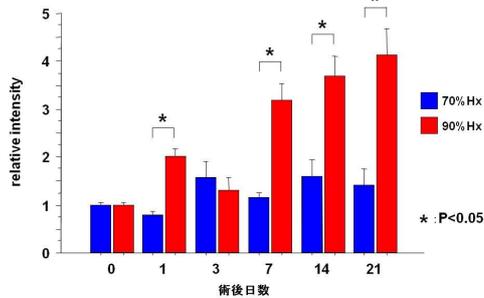
GRP78 mRNA 発現は、術後1日目から約2.6倍まで上昇を始め、14日目で約6倍とピークに達し、21日目では約4.7倍と減少を認めた。

90%肝切除後小胞体ストレス応答マーカー
 - GRP78 mRNA発現 -



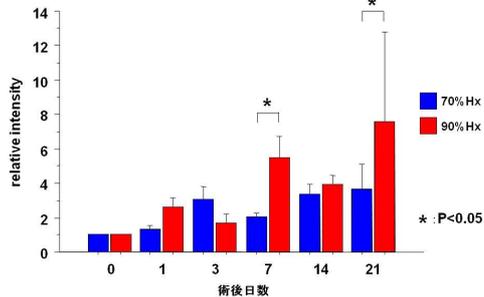
さらに、ATF6 mRNA 発現は 70%肝切除モデルと比較して、術後 1 日、7 日、14 日、21 日において、90%肝切除群で有意な上昇を認めた。

70% 90%肝切除後小胞体ストレス応答マーカー
- ATF6 mRNA 発現 -



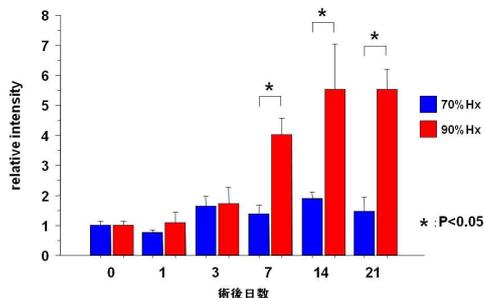
Xbp1 mRNA 発現は 70%肝切除モデルと比較して、術後 7 日、21 日において、90%肝切除群で有意な上昇を認めた。

70% 90%肝切除後小胞体ストレス応答マーカー
- Xbp1 mRNA 発現 -



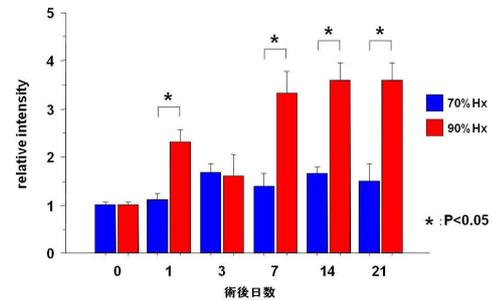
CHOP mRNA 発現は 70%肝切除モデルと比較して、術後 7 日、14 日、21 日において、90%肝切除群で有意な上昇を認めた。

70% 90%肝切除後小胞体ストレス応答マーカー
- CHOP mRNA 発現 -



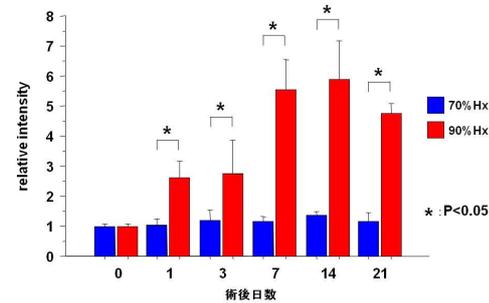
HSP70 mRNA 発現は 70%肝切除モデルと比較して、術後 1 日、7 日、14 日、21 日において、90%肝切除群で有意な上昇を認めた。

70% 90%肝切除後小胞体ストレス応答マーカー
- HSP70 mRNA 発現 -



GRP78 mRNA 発現は 70%肝切除モデルと比較して、術後 1 日、3 日、7 日、14 日、21 日において、90%肝切除群で有意な上昇を認めた。

70% 90%肝切除後小胞体ストレス応答マーカー
- GRP78 mRNA 発現 -



今回の結果から、70%肝切除モデルは肝再生モデルであり、致死的なモデルではないので、小胞体ストレス応答が働く必要がほとんどないが、90%肝切除モデルは、致死的な肝不全モデルなので、小胞体ストレス応答が強く動いたと考えられた。さらに、小胞体ストレス応答が、肝切除術後の後期に上がっていたのは、肝切除術後の早期には、細胞自体は細胞増殖 (cell proliferation) に専念している状態で、細胞の機能は保持されず、小胞体ストレス応答自体も停止していると考えられた。そして、細胞増殖が完了すると、小胞体ストレス応答が働き始め、ALB などの肝機能を改善する方向 (正常な肝臓の働く方向) に向かわせるのではないかと考えられた。今後の研究計画としては、肝特異遺伝子の術後の経時的な発現変化を検討し、上述の仮説を検証し、さらに、肝臓でのみ小胞体ストレス応答を抑制・促進するマウスを用いて 70%肝切除モデル (術後肝再生モデル) と 90%肝切除モデル (術後肝不全モデル) で検討し、小胞体ストレス応答の肝再生への関与をより selective に解明する予定である。

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 14 件)

1. Mori H, Ishibashi H, Shimada M, Utsunomiya T, Asanoma M, Yamada S, Saito Y, Iwahashi S, Ikemoto T, Imura S, Morine Y. Risk of carcinogenesis in the biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction through the epigenetic regulation. *Hepatogastroenterology*. in press.2014 査読有
2. Saito Y, Mori H, Takasu C, Komatsu M, Hanaoka J, Yamada S, Asanoma M, Ikemoto T, Imura S, Morine Y, Utsunomiya T, Shimada M. Beneficial effects of green tea catechin on massive hepatectomy model in rats. *J Gastroenterol*. 2014; 49: 692-701. 査読有 doi: 10.1007/s00535-013-0799-9.
3. Ikemoto T, Shimada M, Iwahashi S, Saito Y, Kanamoto M, Mori H, Morine Y, Imura S, Utsunomiya T. Changes of immunological parameters with administration of Japanese Kampo medicine (Juzen-Taihoto / TJ-48) in patients with advanced pancreatic cancer. *Int J Clin Oncol*. 2014; 19: 81-86. 査読有 doi: 10.1007/s10147-013-0529-6.
4. Yamada S, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S, Saito Y. CXC receptor 4 and stromal cell-derived factor 1 in primary tumors and liver metastases of colorectal cancer. *J Surg Res*. 2014; 187: 107-112. 査読有 doi: 10.1016/j.jss.2013.10.030.
5. Hanaoka J, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H, Sugimoto K, Saito Y, Yamada S, Asanoma M. Beneficial effects of enteral nutrition containing with hydrolyzed whey peptide on warm ischemia/reperfusion injury in the rat liver. *Hepatol Res*. 2014; 44: 114-121. 査読有 doi: 10.1111/hepr.12097.
6. Ishibashi H, Oshio T, Sogami T, Nii A, Mori H, Yada K, Shimada M. Iliopsoas Abscess in an Infant. *J Med Invest*. 2014; 61: 213-216. 査読有
7. Ishibashi H, Mori H, Yada K, Shimada M, Sogami T, Nii A. Dye-assisted lymphatic sparing laparoscopic Palomo varicolectomy in children. *J Med Invest*. 2014; 61: 151-155. 査読有
8. Kumagai-Braesch M, Jacobson S, Mori H, Jia X, Takahashi T, Wernerson A, Flodström-Tullberg M, Tibell A. The TheraCyte™ device protects against islet allograft rejection in immunized hosts. *Cell Transplant*. 2013; 22: 1137-1146. 査読有 doi: 10.3727/096368912X657486.
9. Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Morine Y, Imura S, Mori H, Sugimoto K, Iwahashi S, Asanoma M. The protective effect of adipose-derived stem cells against liver injury by trophic molecules. *J Surg Res*. 2013; 180: 162-168. 査読有 doi: 10.1016/j.jss.2012.10.009.
10. Hanaoka J, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H. Significance of sonic hedgehog signaling after massive hepatectomy in a rat. *Surg Today*. 2013; 43: 300-307. 査読有 doi: 10.1007/s00595-012-0248-z.
11. Ikemoto T, Shimada M, Komatsu M, Yamada S, Saito Y, Mori H, Morine Y, Imura S, Bando Y, Utsunomiya T. Indoleamine 2,3-dioxygenase affects the aggressiveness of intraductal papillary mucinous neoplasms through Foxp3+CD4+CD25+ T cells in peripheral blood. *Pancreas*. 2013; 42: 130-134. 査読有 doi: 10.1097/MPA.0b013e3182575e4a.
12. Mori H, Shimada M, Ikegami T, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Hanaoka J, Iwahashi S, Saito Y, Asanoma M, Yamada S, Miyake H. The impact of pegylated-interferon -2b on partial and massive hepatectomy model in rats. *Hepatogastroenterology*. 2012;59:2300-2304. 査読有 doi: 10.5754/hge10401.
13. Kanamoto M, Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Mori H, Hanaoka J. Impact of a new refrigerator on the preservation of hepatic grafts. *Hepatol Res*. 2012; 42: 798-805. 査読有 doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.00987.x.
14. Morine Y, Shimada M, Iwahashi S, Utsunomiya T, Imura S, Ikemoto T, Mori H, Hanaoka J, Miyake H. Role of histone deacetylase expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surgery*. 2012; 151: 412-419. 査読有 doi: 10.1016/j.surg.2011.07.038.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Mori H, Ishibashi H, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Yada K, Shimada M. Risk of carcinogenesis in the biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction through both epigenetic and genetic regulation. International Surgical Week (ISW 2013) 2013 年 8 月 25 日-29 日フィンランド (Helsinki Exhibition and Convention Centre)

2. 森大樹, 島田光生, 石橋広樹, 宇都宮徹, 居村暁, 森根裕二, 池本哲也, 荒川悠佑, 金本真美, 岩橋衆一. 膵・胆管合流異常症に対する長期経過中に胆道癌を合併した3症例の検討 第 68 回日本消化器外科学会総会 2013 年 7 月 17 日-19 日 宮崎県(シーガイアコンベンションセンター)

3. 森大樹, 島田光生, 宇都宮徹, 居村暁, 森根裕二, 池本哲也, 荒川悠佑, 金本真美, 岩橋衆一, 山田眞一郎, 浅野間理仁, 石川大地, 三宅秀則. 分子標的 Bevacizumab の小胞体ストレス応答を介した肝切除後肝機能障害改善・肝再生促進効果 第 49 回日本肝臓学会総会 2013 年 6 月 6 日-7 日 東京都(京王プラザホテル)

4. 森大樹, 石橋広樹, 佐藤宏彦, 矢田圭吾, 島田光生. ラットの膵・胆管合流異常症モデルの意義と課題 第 50 回日本小児外科学会学術集会 2013 年 5 月 30 日-6 月 1 日 東京都(京王プラザホテル)

5. 森大樹, 島田光生, 宇都宮徹, 石橋広樹, 佐藤宏彦, 居村暁, 森根裕二, 池本哲也, 荒川悠佑, 金本真美, 岩橋衆一, 矢田圭吾, 浅野間理仁, 山田眞一郎, 石川大地, 三宅秀則. 胆道癌発がんモデルの膵・胆管合流異常症での発がん特性の解析 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013 年 4 月 11 日-13 日 福岡県(マリンメッセ福岡)

6. 森大樹, 島田光生, 宇都宮徹, 居村暁, 森根裕二, 池本哲也, 荒川悠佑, 金本真美, 岩橋衆一, 浅野間理仁, 山田眞一郎, 石川大地, 三宅秀則. Bevacizumab の小胞体ストレス応答を介した大量肝切除後肝機能障害改善・肝再生促進効果 第 19 回外科侵襲とサイトカイン研究会 2012 年 12 月 8 日 兵庫県(ホテルオークラ神戸)

7. 宮谷智彦, 島田光生, 宇都宮徹, 居村暁, 森根裕二, 池本哲也, 森大樹, 花岡潤, 杉本光司, 齋藤裕, 浅野間理仁, 山田眞一郎, 三宅秀則. 分子標的薬 Bevacizumab の小胞体ストレス応答を介した肝切除後肝機能障害改善効果 日本消化器関連学会週間【第 10

回日本消化器外科学会】 2012 年 10 月 10-13 日 兵庫県(神戸国際会議場)

8. 徳永卓哉, 島田光生, 宇都宮徹, 居村暁, 森根裕二, 池本哲也, 森大樹, 花岡潤, 杉本光司, 齋藤裕, 浅野間理仁, 山田眞一郎, 三宅秀則. Bevacizumab は小胞体ストレス応答を介して肝切除後肝機能障害を改善する 第 112 回日本外科学会定期学術集会 2012 年 4 月 12-14 日 千葉県(幕張メッセ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 大樹 (MORI Hiroki)
徳島大学・病院・助教
研究者番号: 70448330

(2) 研究協力者

石橋 広樹 (ISHIBASHI Hiroki)
徳島大学・病院・講師
研究者番号: 20314867

宇都宮 徹 (UTSUNOMIYA Tohru)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授
研究者番号: 30304801

居村 暁 (IMURA Satoru)
徳島大学・病院・助教
研究者番号: 90380021

森根 裕二 (MORINE Yuji)
徳島大学・病院・助教
研究者番号: 60398021