

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861182

研究課題名(和文) 肝虚血性再灌流障害(IRI)は脂肪肝成因によって異なるか？

研究課題名(英文) Does the degree of hepatic ischemia reperfusion injury differ depending on the cause of fatty liver?

研究代表者

藤井 武宏(Fujii, Takehiro)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・リサーチアソシエイト

研究者番号：00640690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では肝臓手術合併症の大きな原因となる虚血再灌流傷害(IRI)について、脂肪とフルクトースの2種の異なった食餌投与によって作成したマウス脂肪肝におけるIRIの差異と治療法の検討を行った。後者の肝におけるIRIの脆弱性が示唆されたが、両群の脂肪肝程度に差があるなどの問題で客観的評価には至らなかった。治療薬としてトロンボモジュリン製剤を脂肪食脂肪肝群に投与した結果、障害肝への白血球浸潤を抑制したIRI治療効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the difference of hepatic ischemia reperfusion injury(IRI) between the fatty liver of mice caused by fat and by fructose. The results suggested more serious vulnerability to IRI in the fatty liver caused by fructose than by fat. Our present study also showed that thrombomodulin agent reduced the IRI in the fatty liver caused by fat inhibiting leukocyte invasion in injured liver.

研究分野：肝虚血再灌流障害

キーワード：肝虚血再灌流傷害 脂肪肝 肝移植 術後合併症 トロンボモジュリン 治療薬 白血球浸潤 肝細胞壊死

1. 研究開始当初の背景

広範肝切除術や肝移植術などの肝臓外科手術において、肝流入血行遮断は必要不可欠な手術手技であるが、それによって引き起こされる肝虚血性再灌流障害(IRI)は術後の肝機能異常や移植グラフト機能不全いわゆる primary nonfunction(PNF)の原因となる。昨今のメタボリックシンドロームに伴う脂肪肝患者の増加に伴い、脂肪肝患者の肝切除術数は増加の一途であり、またドナー数の不足から脂肪肝ドナーの応拡大いわゆる marginal donor が問題となっている。

脂肪肝は肝 IRI を助長する因子として広く知られており、また脂肪肝グラフトは PNF に陥りやすい。この重大な欠点を持ちながら、肝移植術にてドナー肝数確保という重要な役割を担った脂肪肝の虚血再灌流障害に対する治療法開発は急務である。

これまでに当教室では、正常肝 IRI に対して、プロテイン S (PS) 及びトロンボモジュリン (TM) の治療効果とその機序を実証し報告してきたが、脂肪肝 IRI へのこれらの薬物の効果は未だ検討されていない。

一方、肝臓外科医は術後合併症対策として、術前に脂肪肝重症度を慎重に評価してきたにも関わらず、食餌性脂肪肝の成因については留意することはなかった。アルコール性脂肪肝を除けば、食事性脂肪肝の成因には肥満患者に見られる脂質や糖質の過剰摂取があげられる。これらの脂肪肝は非アルコール性脂肪肝 (Nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) として広く知られるようになっており、さらに炎症が加わった Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) は IRI のさらなるリスクファクターとして認識されている。しかしながら、通常ドナー肝として使用される NAFLD の食餌性成因による IRI への影響については、研究報告もなく、臨床現場においても意識されることはなかった。

食餌性脂肪肝動物モデルとして、従来からの高脂肪食の他、果物や清涼飲料水などに多く含まれるフルクトース(果糖)をラットやマウスに過剰摂取させた高フルクトース食脂肪肝モデルが最近多く報告されている。

脂肪やフルクトースなど異なった食種により作られた脂肪肝の病態的差異は未だ不明な点が多いが、最近「脂肪肝部分切除後の肝再生能を比較した実験で、高脂肪食群に比して高フルクトース食群の肝再生能が有意に不良であった」、「他群に比して高フルクトース群に門脈域中心の脂肪沈着が多くみられた」など、食餌種による病態の違いを

指摘した報告がある。

藤井(報告者)は予てより、脾広範脾切除後の脂肪肝発生について、臨床ならびに動物実験研究に従事してきており、脂肪肝発生のメカニズムについて深い興味を抱いてきた。同研究において、その術後脂肪肝メカニズムには性別、外分泌機能など複数の要素が関連し一様ではないことが、当研究申請時に明らかになりつつあった。これらの背景を受け通常 NAFLD の発生メカニズムや病態もまた成因によって同一ではなく、それに伴い肝臓手術時の IRI の機序と程度も異なるとの仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

(1)食餌性成因別脂肪肝 IRI 評価

脂肪肝成因として脂肪とフルクトースに注目し、これまで同一の病態と考えられてきた脂肪肝をその成因別に細分化し、留意されることのなかった食餌性の脂肪肝成因と肝 IRI との関連を明確にする。

(2)脂肪肝 IRI 治療開発

脂肪肝 IRI に対しての組換えヒト可溶性トロンボモジュリン(rhsTM)の治療効果を実証する。

3. 研究の方法

マウス(C57/BL6)に対して高脂肪食並びに高フルクトース食を過剰摂取させることにより、脂肪肝を作成する。この際、障害程度のみならず障害機序の各項目を客観的に評価するため、脂肪肝程度において各モデル群に差が生まれないように、投与期間を複数設定し、肝 TG 定量、Oil red 染色にて脂肪肝程度を評価し、比較検討した上で IRI の評価を行った。同週齢とした正常肝ならびに脂肪肝モデル群に対し、マウスの肝左葉と中葉のクランプにて、70%肝虚血を施行し、虚血1時間後にクランプを開放し虚血再還流モデルマウスを作成した。虚血30分前に rhsTM(3 mg/kg BW)あるいは生理食塩水(生食)を尾静脈より注入した。再還流後6時間後と24時間後に肝臓及び血液サンプルを採取した。

4. 研究成果

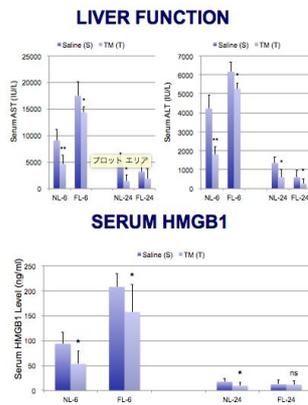
(1)脂肪肝モデル評価

既に教室で Macrosteatosis モデルとして確立していた高脂肪食9週間投与モデル(BW $37.4 \pm 2.3$ g、Hepatic TG  $124.4 \pm 20.7 \mu\text{g}/\text{mg}$ )を基準とし、高フルクトース投与期間を調整した。しかしながら当初の予測をはずれ、3~9週間の投与期間高フルクトース食投与群で

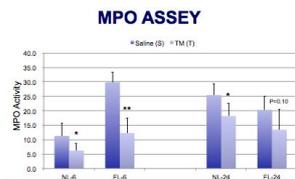
は Oil red 染色ならびに肝 TG 定量において Microsteatosis と判断されるマウスが多数含まれた。しかし同群の IRI 後トランスアミナーゼはこれまでの脂肪肝程度から予測されるものより高値であり、より深刻な IRI への脆弱性が示唆された。フルクトース投与による Macrosteatosis モデルの作成を目指し、当初計画になかった同フルクトース食・30%フルクトース飲料同時摂取モデルを作成したところ、これまでにない重度の脂肪沈着が認められたが、既存の高脂肪食モデルと比較した IRI 評価には不適切と判断された。

(2)脂肪肝 IRI に対する rhsTM 治療効果目標としたフルクトース脂肪肝モデル作成の遅れのため、正常肝モデル NL と高脂肪食脂肪肝モデル FL における rhsTM の IRI 治療効果の判定を先行して行った。

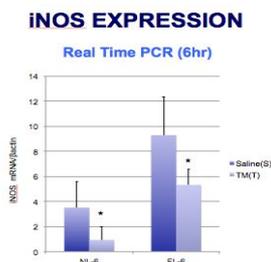
血漿 AST・ALT と HMGB1 濃度は生食投与群に比較して有意に低下を示した。



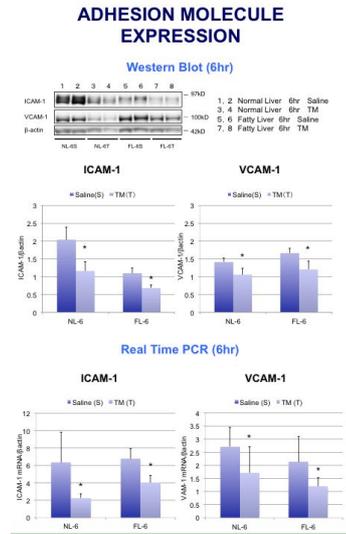
肝組織 MPO 活性は生食投与群に比較して有意に低下を認めた。



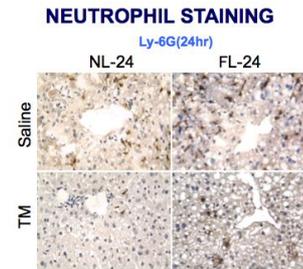
肝組織 iNOS 発現は生食投与群に比較して有意に低下を認めた。



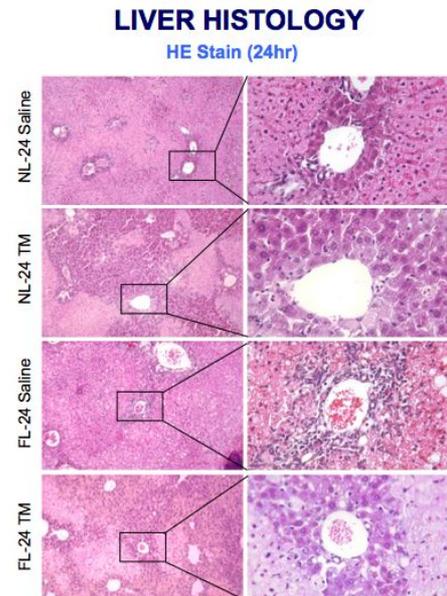
肝組織接着分子 ICAM-1 及び VCAM-1 発現は生食投与群に比較して有意に低下を示した。



肝組織好中球、マクロファージ浸潤は生食投与群に比較して有意に低下を示した。



肝組織壊死領域は生食投与群に比較して有意に減少した。



以上の結果より、rTM は正常肝のみならず脂肪肝においても、接着分子発現ならびに白血球浸潤を抑制し IRI を軽減させることが実証された。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計2件)

Takehiro Fujii, Kuriyama Naohisa, Akihiro Tanemura, Yasuhiro Murata, Yoshinori Adumi, Masashi Kishiwada Shugo Mizuno, Masanobu Usui, Hiroshi Sakurai, Masami Tabata and Shuji Isaji  
Recombinant human soluble thrombomodulin attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in mice with normal and fatty liver (World Transplant Congress 2014, 2014.7.26-31, San Francisco, CA, USA)

藤井 武宏, 栗山 直久, 種村 彰洋, 安積 良紀, 大澤 一郎, 岸和田 昌之, 水野 修吾, 臼井 正信, 櫻井 洋至, 田端 正己, 伊佐地 秀司

膵切除後脂肪肝発生に関する臨床的並びに実験的研究. 第25回日本肝胆膵外科学会・総会 2013.6.12-14 ホテル東日本宇都宮・栃木県総合文化センター(栃木県・宇都宮市)

〔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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 武宏 (FUJII, Takehiro)

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシ

エイト

研究者番号: 00640690

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: