

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462044

研究課題名(和文) 脂肪肝における虚血再灌流傷害分子機序の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Ischemia-Reperfusion Injury in Fatty Liver Is Mediated by Activated NADPH Oxidase 2 in Rats

研究代表者

二宮 瑞樹 (NINOMIYA, Mizuki)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：30546461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪肝ラット群と正常肝ラット群に対して70%温虚血再灌流を行い、肝障害、NOX発現の変化を検討をした。温虚血再灌流障害にて脂肪肝群は生存率が低下し、肝壊死面積、TNF α 、IL-6、8-OHdG等の炎症性サイトカインの増加が見られた。NOX発現は脂肪肝で増加していた。p47phox、TLR-4発現は脂肪肝ラットで有意に増加し、虚血再灌流後それぞれ24時間、4/24時間でピークとなった。HMGB1の発現は脂肪肝ラットにて減少していた。p47phox阻害剤apocynin投与群においては肝温虚血再灌流障害後の生存率が有意に改善し、しかもその効果は正常肝ラットよりも脂肪肝ラットにおいて顕著であった。

研究成果の概要(英文)：Fatty liver rats underwent surgically induced partial hepatic ischemia followed by reperfusion. The overall survival rate after I/R was lower in rats with fatty livers than with normal livers. Necrotic area and the concentrations of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), TNF α , and IL-6 were higher in fatty liver tissue than in normal liver tissue. The number of p47phox-positive cells was significantly higher in fatty liver tissue than in normal liver tissue after reperfusion and peaked 24 hours after reperfusion. The number of TLR-4 positive cells was significantly higher in fatty liver tissue than in normal liver tissue after reperfusion and peaked 4 and 24 hours after reperfusion coupled with a decreased number of high-mobility group box 1-positive hepatocytes. Apocynin significantly improved the survival rate, necrotic area, and concentrations of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, TNF α , and IL-6. The protective effect of apocynin on fatty livers was greater than on normal livers.

研究分野：肝臓外科

キーワード：脂肪肝 虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦における肝移植の現状

本邦では肝移植症例数は 2010 年末で累計 6000 例を超えるに至り、様々な病態からの末期肝不全に対する治療法として確立されてきている。生体肝移植では提供できるドナーが近親者に限られており、健常人の約 16-23% にあるといわれている脂肪肝をグラフトとして用いざるを得ないことも多い。脂肪肝グラフトでは、虚血再灌流傷害による類洞内皮細胞傷害が正常肝グラフトよりも強く、術後に primary graft non-function となる率が高くなるため脳死肝移植では 30%以上の steatosis が存在すればグラフトとして利用されない傾向にあった。

(2) 肝移植における虚血再灌流傷害に関する研究

虚血再灌流後の肝傷害の病態は、炎症反応に伴う過剰な Reactive Oxygen Species (ROS) 産生により脂質過酸化による細胞膜機能の障害、DNA 傷害や蛋白機能修飾がおこること等が原因と考えられている。この ROS 発生機序の 1 つとして細胞膜貫通型タンパクである Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) の存在が判明している。現在肝組織においては、肝細胞や類洞内皮細胞に存在する NOX1 や Kupffer 細胞に認められる NOX2 が知られており、肝線維化に関与していることが証明されている。また、NOX2 の活性化には構成蛋白である p47phox の細胞質から細胞膜への変位が必要であることがわかっている。しかしながら、脂肪肝における虚血再灌流後の重篤な肝障害の発生機序として NOX がいかに関与しているかを証明した報告は見られない。

2. 研究の目的

脂肪肝ラットにおいて、肝虚血再灌流傷害における NOX の役割、またその発生に関わるシグナル伝達のメカニズムを明らかにし、その制御により移植後の肝傷害抑制を目指し、脂肪肝グラフトを安全・有効に活用することを目的とする。

3. 研究の方法

(1). 脂肪肝ラットにおける酸化ストレスの定量と、NOX の役割に関する検討

① 脂肪肝ラットの作成、評価

(方法) SD ラットにメチオニンコリン欠乏食を 8-12 週投与し、脂肪肝ラットを作成。

(検討項目) 生化学検査、脂肪肝の評価(ズダン染色)、肝線維化、肝星細胞の活性化

② 脂肪肝における酸化ストレスの定量と NOX の発現

(方法) 脂肪肝ラットの全肝を摘出し、酸化ストレス、NOX 発現を評価する。

(検討項目) ROS 定量 (過酸化脂質定量、ROS

用蛍光プローブ)、NOX 発現:p47phox 免疫染色

③ in vitro での検討

(方法) 正常肝、脂肪肝モデルより Kupffer 細胞を単離

(検討項目) 低酸素環境下での ROS 産生の定量。Toll-like receptor (TLR) 4 siRNA による ROS 産生、NOX 活性化への影響の評価。

(2). 脂肪肝ラットにおける肝虚血再灌流後の肝傷害に対する NOX 阻害剤の有用性の検討

① 脂肪肝温虚血再灌流モデルによる検討

(方法) 脂肪肝ラット群と正常肝ラット群に対して 70% 温虚血後再灌流を行い、肝傷害、NOX 発現の変化を評価する。

(検討項目)

生化学検査、肝組織所見 (Hematoxylin Eosin 染色)、NOX 発現 p47phox 免疫染色

② NOX 阻害下における脂肪肝温虚血再灌流傷害の検討

(方法) 脂肪肝ラット、正常肝ラット NOX 阻害剤 apocynin を投与し、Vehicle 投与群と比較する。

(検討項目)

生化学検査、肝組織所見 (Hematoxylin Eosin 染色)、NOX 発現 p47phox 免疫染色

4. 研究成果

(1) 脂肪肝ラット群と正常肝ラット群に対して 70% 温虚血再灌流を行い、肝障害、NOX 発現の変化を検討をした。温虚血再灌流障害にて脂肪肝群は生存率が低下し、肝壊死面積、TNF α 、IL-6、8-OHdG 等の炎症性サイトカインの増加が見られた (図 1)。

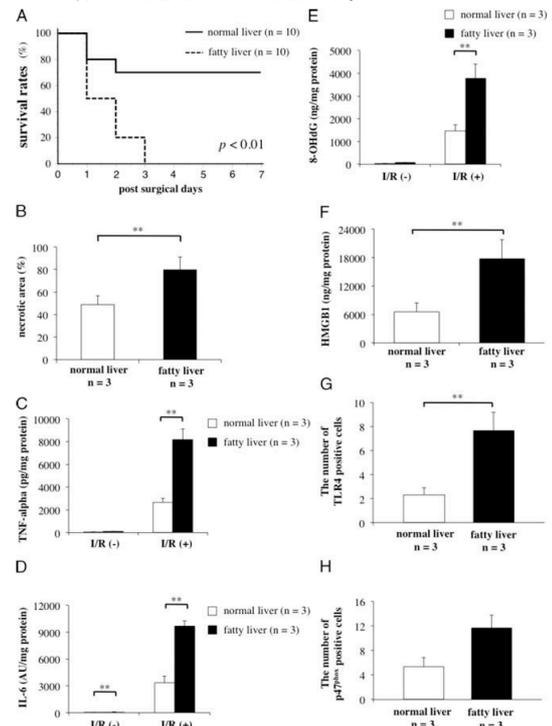


図 1. 虚血再灌流後の脂肪肝と正常肝の比較

(2) 70%肝温虚血再灌流後の ROS 発生を比較した。ROS 発生の指標としての 8-OHdG 蛋白の発現は脂肪肝群において虚血再灌流後 2-24 時間に有意に上昇していた (図 2)。

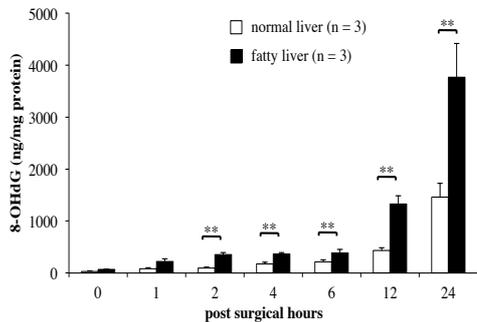


図 2. 虚血再灌流後 8-OHdG の発現

(3) 70%肝温虚血再灌流後の NOX2 の活性化を検討した。二重免疫染色により、脂肪肝虚血再灌流後 p47phox 発現はマクロファージマーカーである F4/80 と重複しており、マクロファージにおいて p47phox が活性化されていることがわかった (図 3)。

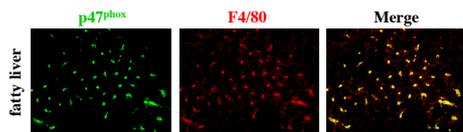


図 3. 脂肪肝虚血再灌流後の p47phox 局在

p47phox 陽性細胞数は虚血再灌流後経時的に増加し、脂肪肝群では正常肝群と比べ有意にその増加が顕著であった。またその局在は虚血再灌流後に細胞質から細胞膜へ移行していることがわかった (図 4)。

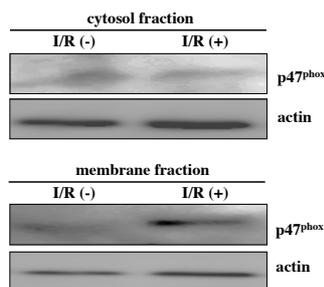
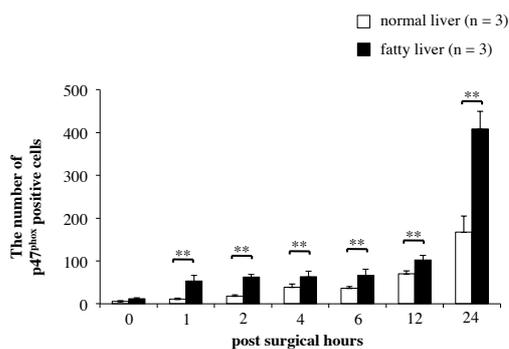


図 4. 虚血再灌流後の p47phox 発現の変化

(4) 虚血再灌流障害における TLR4, HMGB1 の関与を検討した。70%肝温虚血再灌流後、Toll-like receptor (TLR) 4 発現は脂肪肝ラットで有意に増加し、虚血再灌流後それぞれ 4 時間と 24 時間でピークがみられた。また二重免疫染色による検討にて TLR4 発現は脂肪肝において F4/80 と重複しており、マクロファージに発現していることがわかった (図 5)。

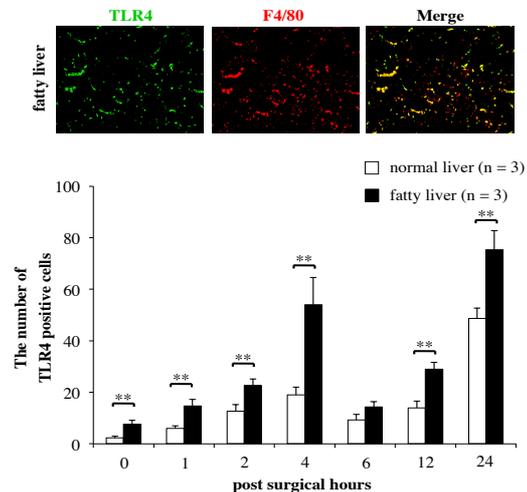


図 5. 虚血再灌流後 TLR4 発現の変化

次に 70%肝温虚血再灌流後の High-mobility group box (HMGB) 1 の発現を検討した。HMGB1 は虚血再灌流後 6 時間で著明に減少しており、免疫染色でもともと肝細胞の核に発現していたものが減少していることがわかった。

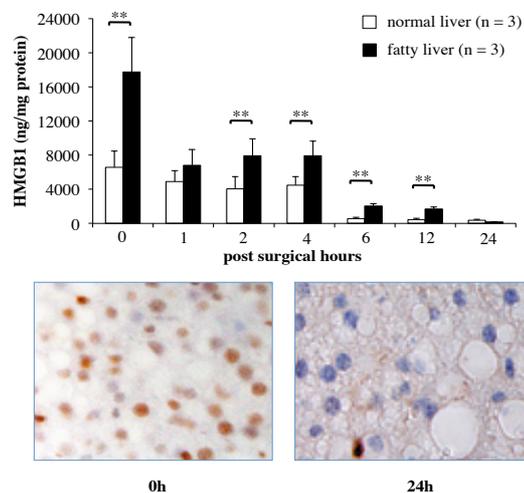


図 6. 虚血再灌流後 HMGB1 の発現の変化

(5) in vitro にてマクロファージの低酸素条件下における変化を観察した。単離されたマクロファージにおいて低酸素条件にて TLR4 発現が有意に増加し、しかもその増加は正常肝細胞より脂肪肝細胞において顕著であった。また、単離マクロファージに HMGB1 抗原を添加して培養したところ、ROS 産生は脂肪肝由来マクロファージの方が顕著であった (図 7)。

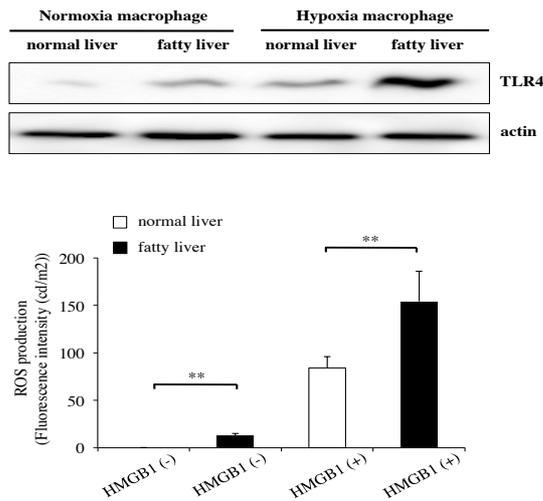


図7. in vitro マクロファージへの低酸素の影響

(6) NOX2 阻害による脂肪肝虚血再灌流障害軽減効果について検討した。p47phox 阻害剤 apocynin 投与群において脂肪肝虚血再灌流後の生存率が有意に改善し、肝組織における壊死範囲も有意に減少した (図8)。

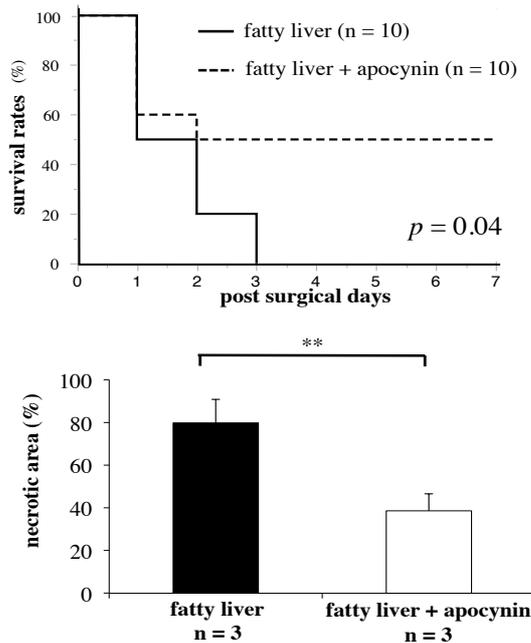


図8. p47phox 阻害剤の脂肪肝虚血再灌流への効果

また apocynin 投与によって脂肪肝における p47phox 発現、8-OHdG は虚血再灌流後 24 時間後で有意に減少していた。TLR4 発現も脂肪肝において虚血再灌流 24 時間後に減少していたが、4 時間後では変化はみられなかった。脂肪肝細胞核における HMGB1 の発現低下も、apocynin 投与によって有意に軽減されていた (図9)。

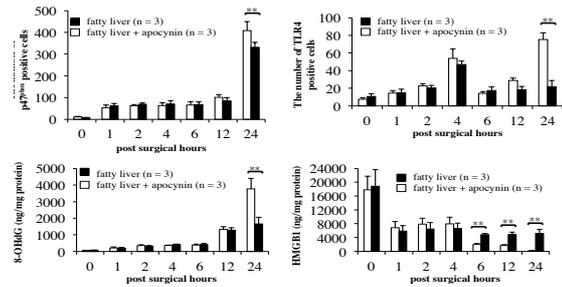


図9. p47phox 阻害による TLR4, HMGB1 の変化

以上より、脂肪肝における虚血再灌流障害の分子メカニズムは以下のように推察される。虚血再灌流後に脂肪肝・肝細胞核内の HMGB1 が放出され、肝内 Kupffer 細胞膜上の TLR4 に結合し、肝外マクロファージを招集する。このマクロファージで活性化された NOX2 により ROS 産生が増加し、肝細胞障害を惹起し HMGB1 放出を更に促進する。この HMGB1 が招集されたマクロファージ上の TLR4 と結合し、更なる炎症性サイトカインの産生を増加させ、炎症を増悪させる (図10)。

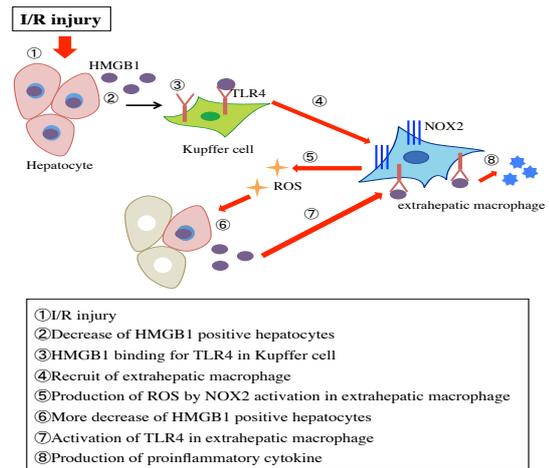


図10. 脂肪肝における虚血再灌流障害のメカニズム

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 2 件)

1. Kimura K, Shirabe K, Yoshizumi T, Takeishi K, Itoh S, Harimoto N, Ikegami T, Uchiyama H, Okano S, Maehara Y. Ischemia-Reperfusion Injury in Fatty Liver Is Mediated by Activated NADPH Oxidase 2 in Rats. Transplantation. 査読有, 2016 Apr;100(4):791-800. doi: 10.1097/TP.0000000000001130.

2. Ninomiya M, Shirabe K, Kayashima H, Ikegami T, Nishie A, Harimoto N, Yamashita Y, Yoshizumi T, Uchiyama H, Maehara Y. Functional assessment of the liver with gadolinium-ethoxybenzyl-diethylenetriamine penta-acetate-enhanced MRI in living donor liver transplantation. Br J Surg. 査読有, 2015 Jul;102(8):944-51. doi: 10.1002/bjs.9820.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 木村 光一, 調 憲, 岡部 弘尚, 伊藤 心二, 播本 憲史, 池上 徹, 内山 秀昭, 吉住 朋晴, 前原 喜彦
脂肪肝温阻血再灌流傷害における NADPH oxidase シグナルの関与とその制御
第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016 年 4 月 14 日、「大阪国際会議場 (大阪市)」

2. 木村 光一, 調 憲, 吉田 佳弘, 今井 大祐, 王 歆林, 別城 悠樹, 松本 佳大, 武石 一樹, 伊藤 心二, 播本 憲史, 山下 洋市, 池上 徹, 岡野 慎士, 吉住 朋晴, 川中 博文, 前原 喜彦
脂肪肝における温阻血再灌流傷害の増悪の分子機序解明と新しい治療の展開
第 115 回日本外科学会定期学術集会、2015 年 4 月 16 日、「名古屋国際会議場 (名古屋市)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二宮 瑞樹 (NINOMIYA, Mizuki)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：30546461

(2) 研究分担者

副島 雄二 (SOEJIMA, Yuji)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：30325526

(3) 研究分担者

調 憲 (SHIRABE, Ken)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70264025

(4) 研究分担者

内山 秀昭 (UCHIYAMA, Hideaki)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：70380425

(5) 研究分担者

吉住 朋晴 (YOSHIZUMI, Tomoharu)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：80363373

(6) 研究分担者

池上 徹 (IKEGAMI, Toru)

九州大学・大学病院・助教
研究者番号：80432938