

平成22年5月19日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890105
 研究課題名（和文） 脂肪肝からの肝移植は可能となるか—虚血再還流障害から移植まで動物モデルを使って—
 研究課題名（英文） Does the liver transplant from fatty liver become possible?
 – Ischemia reperfusion injury and liver transplantation model in rat.
 研究代表者
 岸和田 昌之 (Kishiwada Masashi)
 三重大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：40501961

研究成果の概要（和文）：

組換えヒト可溶性トロンボモジュリン(rhsTM)を投与することは、肝虚血再灌流によって引き起こされる肝細胞および類洞内皮細胞の障害、およびクッパー細胞の活性化を防ぐのに有用である。さらに、類洞内の微小血栓形成及びクッパー細胞から放出される局所の炎症性サイトカインによって引き起こされる肝の微小循環をも保護することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

rhsTM is useful for prevention of the HEPs and SECs damage and KCs activation induced by ischemia reperfusion injury. Our present study also suggests that disturbance of hepatic microcirculation is induced in part by intrasinusoidal microthrombus formation and by locally released inflammatory cytokines from KCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,080,000	324,000	1,404,000
2009年度	960,000	288,000	1,248,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：肝臓

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：(1) 虚血再灌流障害 (2) トロンボモジュリン (3) 肝細胞 (4) 類洞内皮細胞 (5) Kuppfer細胞 (6) 凝固・抗凝固因子 (7) 炎症性サイトカイン (8) 脂肪肝

1. 研究開始当初の背景

日本だけでなく世界中で移植手術を上

回る肝移植待機患者が発生しており、2008年5月の国際移植学会でも脳死肝移植の

慢性的不足は問題となり、各国がそれぞれ「自給自足」にて移植を行い、ドナー拡大に向け生体肝移植を推進していた。日本においては、9割以上が生体肝移植であるが、ドナー条件として夫婦もしくは4親等以内程度とされるためドナーとなる人数的制約を受け、ドナー肝の状態も脂肪肝が軽度のもとの質的制限を受けるため移植機会が減少していた。

正常肝および脂肪肝での肝虚血再還流障害によって生じる類洞内皮細胞傷害と微小循環障害の原因の1つに、肝類洞内に微小血栓が形成されて循環障害が生じることがあげられ、肝切除後の切除肝の再生及び移植肝の再生を著しく遅延させる。しかしながら、虚血再還流障害と炎症・凝固の機序に関しては未だに明らかではなく、その関連の解明や治療法の開発が急務である。

岸和田（報告者）はプロテインC制御系分野の研究において、凝固と炎症、肝切除、虚血再還流障害についての研究活動に従事してきた。研究内容としては、敗血症モデルラットにて、肝細胞と類洞内皮細胞を単離培養することにより、リポ多糖がMEK/ERKシグナル経路とNF κ Bの活性化を介して抗凝固因子であるプロテインS（PS）の発現を低下させることを報告し、個々の細胞レベルでの炎症と凝固の機序について解明してきた。また、正常肝だけでなく病変肝である硬変肝についても着目し、硬変肝モデルを作成し、正常肝と比較すると硬変肝においては類洞内皮細胞からPSが過剰に産出することにより、繊維化を受けている類洞内の微小循環を維持しているが、肝切除時には類洞内皮細胞でのPSの産生が破綻し微小血栓が生じて微小循環障害が発生することを報告し、病変肝における

個々の細胞レベルでの手術時の炎症と凝固の機序について解明してきた。さらに、最近では病態の解明とともに治療法の開発も探求しており、世界中の研究者により、抗血栓作用の他に、抗炎症作用、抗アポトーシス作用、傷害時の血管新生作用のあることが報告されているPC制御系の中心因子である活性化プロテインC（APC）を虚血再還流モデルラットおよび肝移植モデルに使用し、肝障害の軽減とともに生存率の上昇につながることに報告してきた。正常肝および脂肪肝における虚血再還流障害についても、培ってきた細胞単離技術や炎症と凝固に関する知見をもとにすすめていけば、ドナー適応の拡大と、加えて境界域のドナー脂肪肝の安全な肝移植が可能となり、多くの移植機会が増える道を拓くことが十分可能になると思われる。

2. 研究の目的

本研究では研究期間内に、正常肝および脂肪肝モデルラットを用いて、虚血再還流障害・肝移植における個々の細胞を単離培養することにより、細胞レベルにて固有の生物活性（抗血栓、抗炎症、アポトーシス制御、血管新生制御作用など）の探索とその分子機構を解析する。その後、抗血栓作用の他に、抗炎症作用を有するTMを投与して虚血再還流障害の軽減の実証、さらには移植モデルにて脂肪肝の生着向上を実証したい。

3. 研究の方法

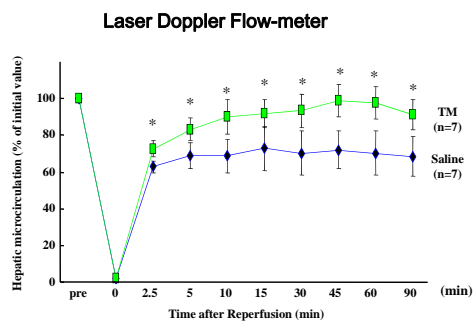
雄性ラット肝左葉と中葉をクランプして70%肝虚血を行い、虚血90分後にクランプを開放して虚血再還流モデルラットを作成した。虚血30分後にrhsTM(3 mg/kg BW)あるいは生理食塩水（生食）を陰茎静脈より注入した。肝実質細胞（Hep）、類洞内皮細胞（SEC）及びKupffer細胞（KC）は、コラゲナーゼ還流で得た細胞群からエルトリエーションロ

ータを用いて単離した。血漿及び培養上清の
 プロテイン S (PS)、IL-6 及び TNF α はそれ
 ぞれに特異的な ELISA 法を用いて測定した。
 レーザードップラーを用いて肝表面の血流
 を測定した。

4. 研究成果

①血漿 AST、ALT、ヒアルロン酸は、saline
 投与群に比較して、rhsTM 投与群で有意に低
 下していた。類洞内フィブリン沈着の改善及
 び血清 FDP 濃度の低下も、saline 投与群に比
 較して rhsTM 投与群で顕著に認められた。

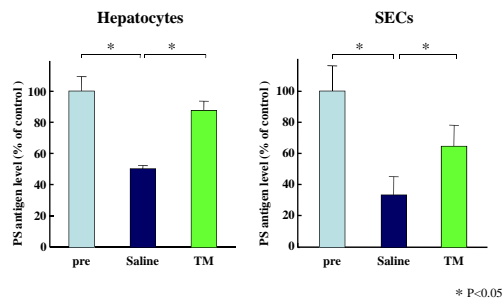
②肝の表面の微小循環も改善していた。



* P<0.05 as compared to IR-Saline

③虚血再還流 2 時間後の血漿 PS 濃度は、
 虚血前に比較して両群とも 75%程度に低
 下し、Hep 及び SEC での PS 産生量も、虚血
 前に比較して有意に低下していたが、
 saline 投与群に比較して rhsTM 投与群では
 有意に高値を示した。

PS Production in Hepatocytes and SECs isolated from rhsTM-treated Rats 2h after Reperfusion

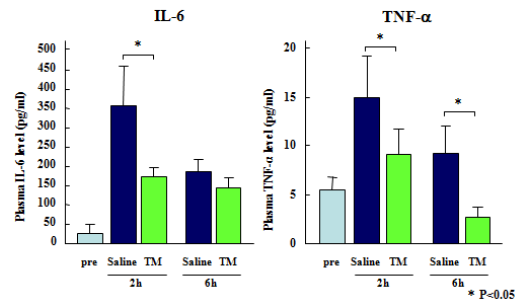


* P<0.05

④虚血再還流 2 時間後の血漿 IL-6 と TNF α 、
 及び KC での IL-6、TNF α の産生も、虚血前
 に比較して両群で有意に増加したが、それら

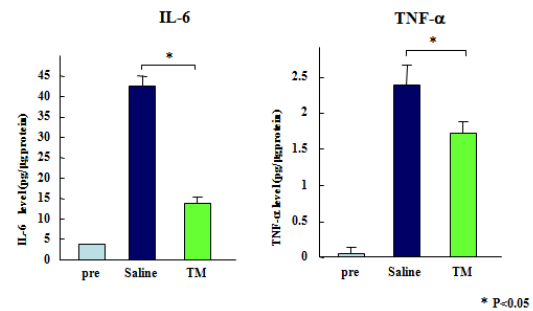
の値は、生食投与群に比較して、rhsTM 投与
 群で有意に低値を示した。

Plasma IL-6 and TNF- α Levels in rhsTM-treated Rats after Reperfusion



* P<0.05

IL-6 and TNF- α Production by KCs isolated from rhsTM-treated Rats 2h after Reperfusion



* P<0.05

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)

①Kuriyama N, Isaji S, Hamada T, Kishiwada M, Ohsawa I, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Hayashi T, Suzuki K. The cytoprotective effects of addition of activated protein C into preservation solution on small-for-size grafts in rats. Liver Transpl. 2010 Jan;16(1):1-11. (査読あり)

②Kishiwada M, Hayashi T, Yuasa H, Fujii K, Nishioka J, Akita N, Tanaka H, Ido M, Okamoto T, Gabazza EC, Isaji S, Suzuki K. Regulatory mechanisms of C4b-binding protein (C4BP) alpha and beta expression in rat hepatocytes by lipopolysaccharide and interleukin-6. J Thromb Haemost. 2008 Nov;6(11):1858-67. Epub 2008 Aug 22.

(査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

①Kishiwada M, Kuriyama N, Hamada T, Mizuno S, Usui M, Sakurai S, Tabata M, Hayashi T, Suzuki K, Isaji S

The Effect of Thrombomodulin on liver cells in Hepatic Ischemia Reperfusion Injury (学会名: American transplant Congress 2009、2009. 5. 30-6. 3、Boston, MA, USA)

②岸和田昌之、林辰弥、安積良紀、栗山直久、濱田賢司、水野修吾、臼井正信、桜井洋至、田端正巳、伊佐地秀司、鈴木宏治

肝虚血再還流障害モデルラットに対する組換えヒト可溶性トロンボモジュリンの保護効果 (第109回日本外科学会、2009. 4. 2-4、福岡)

③Kishiwada M, Isaji S, Kuriyama N, Ohsawa I, Hamada T, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Hayashi T, Esteban C. Gabazza, Suzuki K, Thrombomodulin Protects Against Hepatic Ischemia Reperfusion Injury in the Rat (American transplant Congress 2008、2008. 5. 30-6. 4、Tront、Canada)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸和田 昌之 ()
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 40501961

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: