

論文内容要旨

Downregulation of thrombomodulin contributes to
ischemia - reperfusion injury in mice with steatotic
liver

(トロンボモジュリンの発現低下は脂肪肝マウスに
おける虚血再灌流障害増悪の一因となる)

Hepatology Research, 52(9):762-772, 2022.

主指導教員：大段 秀樹教授

(医系科学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：安達 伸生教授

(医系科学研究科 整形外科学)

副指導教員：小林 剛准教授

(医系科学研究科 消化器・移植外科学)

山口 恵美

(医歯薬学保健学研究科 医歯薬学専攻)

【はじめに】脂肪肝は、肝移植を含む肝切除後の術後合併症のリスクを増加させるが、脂肪肝で虚血再灌流障害 ischemia-reperfusion injury (IRI) が増悪する事が一因として知られている。以前我々は、動物モデルにおいて脂肪肝では肝星細胞が活性化し類洞が狭小化するため、微小循環障害により正常肝に比べ IRI が増悪することを報告した。

組み換え人可溶性トロンボモジュリン recombinant thrombomodulin (rTM) 製剤が脂肪肝における IRI を軽減することが報告されている。TM は、血管内皮細胞の細胞表面に発現する膜貫通糖タンパク質である。TM の細胞外ドメインには、N 末端レクチン様ドメイン (D1)、6 つの上皮成長因子 (EGF) 様構造を持つドメイン (D2)、およびセリンとスレオニンに富むドメイン (D3) が含まれる。D1 ドメインは damage-associated molecular patterns (DAMP) の一員である high-mobility group box 1 (HMGB-1) に結合し、抗炎症作用を有し、D2 ドメインは、トロンビン結合の補助因子であり、protein C の活性化を媒介し、抗凝固活性を示す。組換えヒト可溶性 TM (rTM) は、TM の活性細胞外ドメインからなり、日本では播種性血管内凝固症候群 (DIC) 治療に使用されている。しかしながら、rTM の脂肪肝における IRI 軽減作用の詳細なメカニズムは不明である。

今回我々は、脂肪肝が微小循環障害によって低酸素状態になることにより、脂肪肝では、TM 発現が低下し、その機能発現低下が IRI 増悪の一因ではないかと仮定した。そこで、脂肪肝マウスにおける TM 発現を評価することに加えて、TM の機能活性が約 50% に減少した TM ヘテロノックアウトマウス(TM-KO) (ゲノム編集により作製) を使用し、TM 発現低下が肝 IRI を増悪させるか否かを検討した。さらに、rTM 及びその D1 ドメインが肝障害を軽減しうるか検討した。

【方法】コリン欠乏食 (4 週間) によるマウス脂肪肝モデル steatotic liver (SL) を用いて 70% 部分肝虚血 60 分モデルを作製して、肝障害を検討した。また、rTM 治療群では、手術 60 分前に、rTM (6mg/kg) を尾静脈注射した。

【結果と考察】脂肪肝マウスにおいて、肝類洞壁に発現する TM を免疫染色で確認したところ、通常マウス normal liver (NL) と比較し、SL では TM 発現が低下していた。また、SL では肝のピモニダゾールの蓄積、hipoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1 α) の発現の亢進を認め、定常より低酸素状態であることが確認できた。また、TM の mRNA は SL で有意に増幅されていたが、活性化 protein C 産生能力は、SL で NL の約 20% に低下していた。このことから、脂肪肝においては、類洞内皮細胞から TM が剥がれ落ち、TM の機能発現が低下しているものと推察された。また、血清 HMGB1 値も SL で NL に比べ有意に上昇していた。

次に、肝虚血再灌流モデルでは術後 3、6、および 24 時間後の血清 ALT 値は、いずれも NL よりも SL で有意に高かった。肝壊死面積では、NL は術後 6 時間で肝壊死面積の拡大を認めたが、術後 24 時間では増加しなかった。一方、SL では術後 6 時間と比較し術後 24 時間で肝壊死面積が拡大し、NL の術後 24 時間の肝壊死面積と比較し有意に拡大していた。次に、CD11b (マクロファージ)、Ly-6 (好中球) の陽性領域は、NL は術後 6 時間で増加し 24 時間で減少した。一方、SL では術後 24 時間で大幅に増加した。これらの結果は、SL では NL と比較し、IRI を

受けやすく、肝傷害及び炎症が遷延する可能性があることが示唆された。さらに、肝虚血再灌流モデルに対する rTM 治療の効果を検討した。NL では、rTM 投与群で術後 3,6,24 時間の術後血清 ALT 値に有意な改善を認め、術後 6,24 時間後の肝壊死面積及び炎症細胞浸潤面積は、有意に低下した。SL では、rTM 投与により術後 6 時間で血清 ALT 値の有意な改善を認め、術後 24 時間の肝壊死面積、炎症細胞浸潤面積に有意な低下を認めた。また、血清 HMGB1 は、NL では、術後 1 時間の rTM 投与群に有意に低下を示し、SL では、rTM 投与により術後 3、6 時間で有意に改善していた。この結果より、rTM 投与により NL、SL とともに IRI による肝障害とそれに伴う炎症細胞浸潤を軽減できる可能性が示唆された。

次に、TM-KO を作製し同様に検討した、活性化 protein C 産生能力は TM-KO で約 50%を示した。TM-KO での IR では、術後 3 時間で TM-KO の血清 ALT は NL に比べ有意に上昇し、rTM 投与により有意に血清 ALT 値の低下、また、血清 HMGB1 値も改善を認めた。この結果から、TM の発現機能低下が IRI の増悪に関連することが示唆された。

さらに、rTM のうち D1 ドメインのみの薬剤 (rTMD1) を投与したところ、SL では、術後 6 時間で rTMD1 投与により優位に血清 ALT 値、血清 HMGB1 値が改善した。

【結語】 SL では、TM 発現低下が肝虚血再灌流障害の増悪に寄与し、TM は、その D1 ドメイン (抗炎症効果) を介して肝虚血再灌流障害を減弱することが示唆された。