



Title	硫化水素は生存シグナルの増強とNrf2の核内移行を介して肝温虚血再灌流障害を軽減する
Author(s)	島田, 慎吾
Description	配架番号 : 2124
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11600号
Issue Date	2014-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11600
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60362
Type	doctoral thesis
File Information	Shingo_Shimada.pdf



学 位 論 文

硫化水素は生存シグナルの増強と Nrf2 の核内移行を
介して肝温虚血再灌流障害を軽減する

(Hydrogen Sulfide Ameliorates Hepatic Warm Ischemia and
Reperfusion Injury via Augmentation of Survival Signals and
Nuclear Translocation of Nrf2)

2014 年 12 月

北 海 道 大 学

島 田 慎 吾

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1	頁
緒言	2	頁
略語表	5	頁
実験方法	6	頁
実験結果	10	頁
考察	22	頁
総括および結論	25	頁
謝辞	26	頁
引用文献	27	頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Shingo Shimada, Moto Fukai, Kenji Wakayama, Takahisa Ishikawa, Nozomi Kobayashi, Taichi Kimura, Kenichiro Yamashita, Toshiya Kamiyama, Tsuyoshi Shimamura, Akinobu Taketomi, and Satoru Todo

Hydrogen Sulfide Augments Survival Signals in Warm Ischemia and Reperfusion of the Mouse Liver

Surgery Today (In press) : <http://link.springer.com/>

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 島田 慎吾, 深井 原, 山下 健一郎, 鈴木 友己, 嶋村 剛, 神山 俊哉, 藤堂 省, 武富 紹信

マウス肝虚血再灌流モデルにおける硫化水素の肝保護効果

第 112 回日本外科学会定期学術集会, 2012 年 4 月 12 日-14 日・千葉市幕張

2. Shingo Shimada, Moto Fukai, Kenichiro Yamashita, Kenji Wakayama, Taichi Kimura, Masato Fujiyoshi, Tomomi Suzuki, Tsuyoshi Shimamura, Toshiya Kamiyama, Akinobu Taketomi, and Satoru Todo

Hydrogen Sulfide Confers Protection Against Hepatic Warm Ischemia and Reperfusion Injury in Mice

The XXIV International Congress of The Transplantation Society,
July 15th - 20th 2012, Berlin Germany

3. 島田 慎吾, 深井 原, 藤好 真人, 山下 健一郎, 鈴木 友己, 嶋村 剛, 神山 俊哉, 藤堂 省, 武富 紹信

マウス肝温虚血再灌流障害における硫化水素の効果

第 48 回日本移植学会総会, 2012 年 9 月 20 日-22 日・名古屋市

緒言

① 論文の背景

肝移植は現時点では末期肝不全に対する唯一の根治療法である。しかし、ドナー不足は世界共通の問題であり、脳死ドナーが少ない本邦では特に深刻である。移植を受けられずに死亡する患者が増加している現状を打開すべく、ドナー源拡大のための方策が研究されてきた。心停止ドナー（DCD； Donation after cardiac death）の利用はこのドナー源拡大のために近年試みられている方法であり、欧米では約 20%のドナー供給の増加が見込まれている¹。しかし、肝移植後の 3 年グラフト生存率は脳死（74.4%）、生体（82.9%）と比べ、心停止ドナーを利用した肝移植では 63.3%とその成績は不良である²。

DCD グラフトの成績が不良である原因として虚血再灌流障害が挙げられる³。グラフトは、温虚血により活性酸素種の産生、NF- κ B や AP-1 の核内移行、ミトコンドリア障害、ATP の減少、微小循環障害、プロテアーゼの活性化の初期段階が進行する。さらに、再灌流後には微小循環障害、酸化ストレス、サイトカインや脂質メディエータの産生が相互作用して急激に進行し、アポトーシス/ネクローシスが惹起される⁴⁻⁶。虚血再灌流障害はタンパク合成や細胞増殖（再生）も阻害し⁷、術後早期のグラフト機能障害を惹起すると共に、免疫原性の亢進を介して急性、慢性拒絶のカスケードを促進する^{8,9}。それ故、DCD グラフトの利用（ドナー源拡大）と術後成績向上を達成するためには、虚血再灌流障害の軽減が重要な方策の一つとなる。虚血再灌流障害の急性期には生存・抗アポトーシス・細胞増殖のシグナルの動態が重要であり、Akt が mTOR-p70s6k、Bcl2 family、Cyclin D1 や STAT3 の活性制御に主要な役割を担っている¹⁰⁻¹²。

硫化水素（Hydrogen sulfide; H₂S）は 500～1000ppm 以上の吸入により肺水腫、神経麻痺、昏睡などを来して死に至る有毒ガスとして知られているが¹³、近年では神経機能の保護作用や血管平滑筋の弛緩作用が報告され¹⁴⁻¹⁶、一酸化窒素、一酸化炭素とともに医療用ガスとして注目されている。

硫化水素の投与によりラットやマウスの心臓¹⁷、腎臓¹⁸、肺¹⁹、小腸²⁰、肝臓²¹⁻²⁴の虚血再灌流障害が軽減され、炎症性サイトカインの発現やアポトーシスを抑制できることが報告されている。心筋や脳の虚血再灌流において、硫化水素は PI3K/Akt/p70S6k カスケードの増強や NF-E2-related factor 2（Nrf2）の核内移行促進によって障害を軽減する^{25,26}。一方、肝温虚血再灌流に対する障害軽減効果は報告されているものの、心筋や脳と同様の作用機

序かは明らかではない。

Hydrogen sulfide-mediated signaling

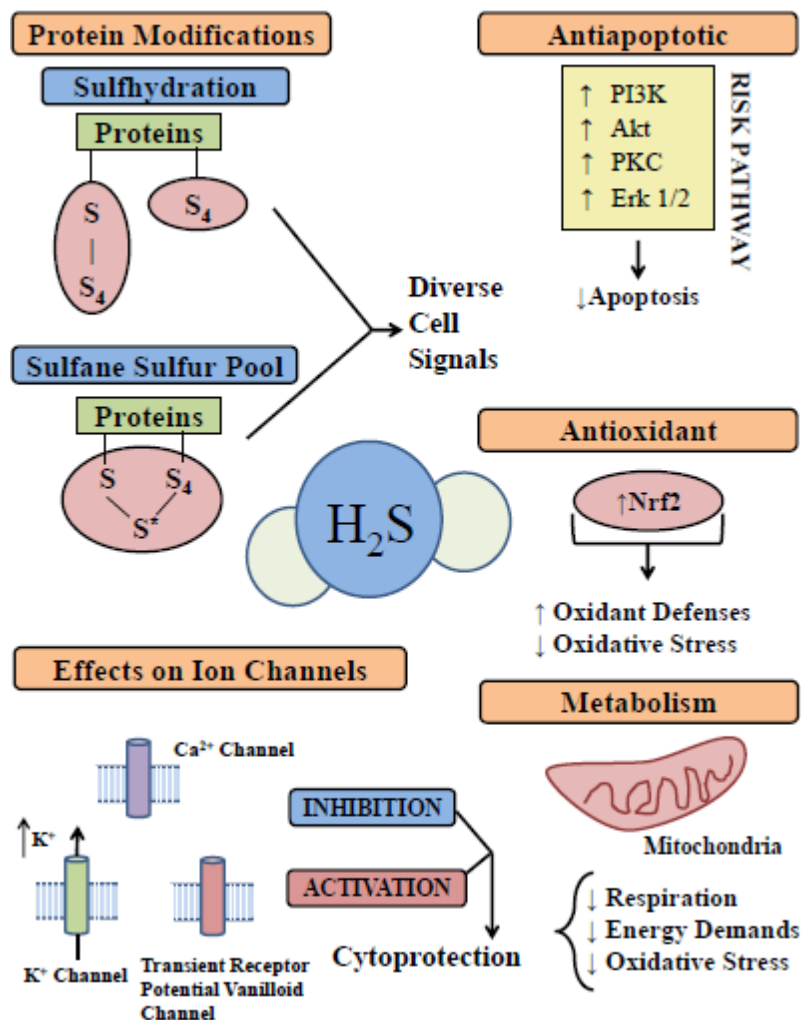


図 1. H₂S の保護作用（文献 26 の図を改変）

硫化水素の臓器保護作用の機序として、タンパク修飾、イオンチャネルの調節、PI3K-Akt 経路を介した抗アポトーシス効果、Nrf2 を介した抗酸化効果、ミトコンドリアを介した代謝の調節などが報告されている。

② テーマに関して何がわかっていて何がわかっていないのか

わかっていること： 硫化水素は各種臓器で抗酸化、抗炎症、抗アポトーシス作用、Akt のリン酸化を促進する作用があり、虚血再灌流障害を軽減す

る。脳では PI3K/Akt/p70S6k カスケードを増強させ、心臓では Nrf2 の核内移行を促進させる。

わかっていないこと： 肝虚血再灌流障害において、硫化水素が PI3K/Akt/p70S6k カスケードを増強させるか、Nrf2 の核内移行を促進するか、肝再生に影響を与えるか、は明らかではない。

本研究の目的は硫化水素による肝温虚血再灌流障害の軽減効果を担う細胞内シグナル伝達を明らかにすることである。具体的には、抗酸化、抗炎症、抗アポトーシス、肝再生などのカスケードに対する硫化水素の影響を明らかにすることである。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ALT	Alanine aminotransferase
CO	Carbon monoxide (一酸化炭素)
DCD	Donation after cardiac death (心停止後ドナー)
ET-1	Endothelin-1
GSH	Glutathione
4-HNE	4-hydroxy-2-nonenal
HO-1	Heme oxygenase-1
H ₂ S	Hydrogen sulfide (硫化水素)
IL-6	Interleukin-6
Keap-1	Kelch-like ECH-associated protein 1
MDA	Malondialdehyde
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NaHS	Sodium hydrogen sulfide (硫化水素ナトリウム)
Na ₂ S	Sodium sulfide (硫化ナトリウム)
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
Nrf2	NF-E2-related factor 2
PCR	Polymerase chain reaction
PK-1	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PTEN	Phosphatase and tensine homolog
PTP	Permeability transition pore
PVDF	Polyvinylidene difluoride
p70s6k	70-kDa Ribosomal protein S6 kinase
ROS	Reactive oxygen species (活性酸素種)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TLR-4	Toll-like receptor-4
TNF-α	Tumor necrosis factor α
TRX-1	Thioredoxin-1
TUNEL	Terminal dUTP nick end-labeling

実験方法

薬品と試薬

硫化水素の供与体である硫化水素ナトリウム (NaHS)²⁷ および入手先を記載していない試薬は和光純薬株式会社(Osaka, Japan)より購入した。それ以外の薬品・試薬については本文中に購入元を記載した。入手先の記載がない抗体は Cell Signaling Technology (Beverly, MA) より購入した。

動物

本研究は「北海道大学動物実験に関する規定」に従い、動物実験計画書を作成し、北海道大学動物実験委員会の承認の下で実施した。10-12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを三協ラボサービス株式会社 (Tokyo, Japan) より購入し、体重が 25-30g のものを使用した。マウスは購入後、2 週間定常環境 (23±2℃、湿度 50±10%、明期 12 時間/暗期 12 時間) で飼育し、水、餌 (MF; オリエンタル酵母工業株式会社, Tokyo, Japan) を自由に摂取させた。

肝部分温虚血再灌流モデル

マウスは一晩の絶食の後、イソフルランの吸入による全身麻酔を施行し、腹部正中切開で開腹した。中央、左外側葉の門脈を脳動脈瘤クリップで遮断し、70%肝部分温虚血とした²⁸。虚血中は閉腹し、麻酔から覚醒させた。再度全身麻酔後に開腹し、門脈遮断から 45、60、75、90 分後に、クリップを外して血流を再開させた。非虚血葉は切除しなかった。

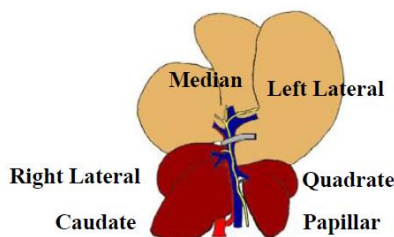


図 2. 肝部分温虚血再灌流モデル

中央、左外側葉の門脈を脳動脈瘤クリップで遮断し、70%肝部分温虚血とした。

実験プロトコール

予備実験として、①虚血時間を 45 分、60 分、75 分、90 分とし、マウスの 1 週生存率と血清 Alanine aminotransferase (ALT) 活性を評価した (各

n=6)。②75分温虚血モデルにおいて、NaHSの投与量を検討した。投与量を0.5 mg/kg、1.0 mg/kg、3.0 mg/kgとし、ALT活性を評価した（各n=6）。

予備実験の結果より、本実験ではNaHSの投与量は1.0 mg/kgとし、実験群は3群に分けた（各n=6）。

NaHS (+) 群: NaHSを生理食塩水に溶解し、再灌流10分前に陰茎背静脈から静脈注射した。NaHS溶液は用時調製とした。

NaHS (-) 群: 生理食塩水を陰茎背静脈から静脈注射した。

Sham 群: 門脈を遮断せずに同様の手術操作のみを行った。

マウスは再灌流3時間後（R3h）、6時間後（R6h）、24時間後（R24h）に犠牲死させた（各n=6）。

サンプルの採取

肝虚血葉を採取し、直ちに-80℃で保存した。一部は10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋試料とした。採取した血液から血漿を分離し、直ちに-80℃で保存した。

病理組織学的評価

R6hの肝組織のパラフィン包埋切片をヘマトキシリン・エオジン染色後に、光学顕微鏡で観察した。Suzukiらの方法に準じて類洞のうっ血〔0-4〕、肝細胞質の空胞化〔0-4〕、肝実質の壊死〔0-4〕をスコア化し、合計点数を比較した²⁹。組織障害の評価は一人の病理医が盲検下で行った。

血漿 ALT の評価

R6hの血漿中のALT活性を日立自動分析装置7020（株式会社日立ハイテクノロジーズ, Tokyo, Japan）で測定した。

血漿中の炎症性サイトカインおよびケモカインの評価

R3h、R6hの血漿中のTNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-17、IL-23およびCD40LをBioplex（Bio-Rad, Hercules, CA）を用い、ELISA法にて定量した。

ウェスタンブロット法による評価

-80℃で保存したR6hの肝組織を、10倍容のlysis bufferでホモジナイズし、遠心後（1000xg、10分）の沈殿を核画分、上清を細胞質画分とし、-80℃で保存した。lysis bufferの組成は以下の通りである：Tris HCl（25）（pH 7.5）、NaCl（150）、EDTA-2Na（5）、NaF（10）、sodium orthovanadate（10）、1%

Nonidet P-40、100x protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。タンパク濃度は BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL) を用いて測定した。

タンパク抽出液に Sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) sample buffer を添加し、95 °C で 5 分間煮沸し、タンパクを denature した。Any-kD pre-cast gel (Bio-Rad) を用いて、各 well あたり 40 ug のタンパクを測定に供した。常法の如く、SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) で展開し、Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜へ転写した。1 次抗体の希釈液にて室温で 60 分静置した。その後、2 次抗体 (horseradish peroxidase (HRP) -conjugated anti-rabbit IgG 抗体) と室温で 45 分静置した。各抗体の希釈倍率は以下の通りである：
phospho-Phosphoinositide-dependent kinase-1 (p-PDK-1) 、phospho-Akt (p-Akt Ser473)、phospho-Mammalian target of rapamycin (p-mTOR) 、
phospho-p70-kDa Ribosomal protein S6 kinase (p- p70s6k) 、Cleaved caspase-3、Heme oxygenase-1 (HO-1) (Abcam, Cambridge, UK)、Thioredoxin-1 (TRX-1) 、Nrf2 、 β -actin 、GAPDH 、Lamin B1 は全て 1:1000 ; 2 次抗体は 1:5000。

メンブレンに化学発光検出試薬 West Dura (Thermo Scientific) を添加し、化学発光検知器 Chem Doc XRS® (Bio-Rad) を用いてバンドの濃度を測定した。タンパク量は、 β -actin、GAPDH もしくは Lamin B1 量により補正し、得られた値をさらに Sham 群の平均値に対する%で表わし、比較した。ただし、Nrf2 については Sham 群の核内移行がほとんどみられなかったので、NaHS(-) 群と NaHS (+)群の定量とした。

アポトーシスの評価

R24h の肝凍結切片を 95% エタノールと 4% パラホルムアルデヒドで固定し、蛍光 TUNEL staining kit (Promega, Madison, WI) を用いて染色した。プレパラートは Prolong Gold anti-fade reagent with DAPI (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) でマウントし、蛍光顕微鏡 BZ-9000 (Keyence Japan, Osaka, Japan) を用いて観察した。TUNEL 陽性細胞数を DAPI 陽性細胞数で除して apoptotic index を算出した。各サンプルを 4 視野観察し、その平均値を比較した。

肝組織過酸化脂質の評価

R6h の肝組織の Malondialdehyde (MDA) + 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)

を LPO586 kit (Oxis International, Foster City, CA) を用いて測定した。肝組織を butylated hydroxytoluene (0.05%) 含有 Tris-HCl (20 mM) でホモジナイズした。ホモジネートを 4 °C、3000xg で 10 分間遠心した。引き続いて、上清を試薬とインキュベート後、上清の吸光度を測定した。データは nmol 4-HNE equivalent per mg of wet tissue weight で換算した。

肝組織の免疫染色による評価

① Nrf2 染色

R6h の肝組織の凍結切片を 95% エタノールおよび 1% ホルマリンで固定後、脱水、透徹処理した。引き続いて、3% 牛血清アルブミンでブロッッキングし、ウサギ抗 Nrf2 抗体 (Abcam) (1:250) で室温、1 時間インキュベートした。その後、Alexafluor488-conjugated goat anti-rabbit IgG 抗体 (Molecular Probes Inc.) (1:500) で室温、45 分インキュベートした。Prolong Gold anti-fade reagent with DAPI (Molecular Probes Inc.) で封入後、蛍光顕微鏡 BZ-9000 (Keyence Japan) を用いて観察した。無作為に 4 視野を観察し、Nrf2 陽性肝細胞数を DAPI 陽性肝細胞数で除して数値化した。

② PCNA 染色

R24h のパラフィン包埋切片をマウス抗 PCNA 抗体 (DAKO Japan, Tokyo) (1:300) でインキュベートし、streptavidin, DAB substrate (LSAB 2 system HRP; DAKO Japan) で可視化した。核はヘマトキシリンで染色し、蛍光顕微鏡 BZ-9000 (Keyence, Japan) を用いて観察した。無作為に 4 視野を観察し、PCNA 陽性肝細胞数を肝細胞数で除して数値化した。

統計学的解析

数値は平均±標準偏差で示した。t 検定もしくは片側 ANOVA で有意差を検定した。p 値は 0.05 未満を有意とした。統計解析には Stat View 5.0 for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC) を使用した。

実験結果

予備実験

① 肝部分温虚血再灌流モデルの生存率

肝部分温虚血再灌流モデルにおいて（各 $n=6$ ）、虚血時間 45 分群、60 分群の 1 週生存率は 100%、75 分群では 67%、90 分群では 33%であった。

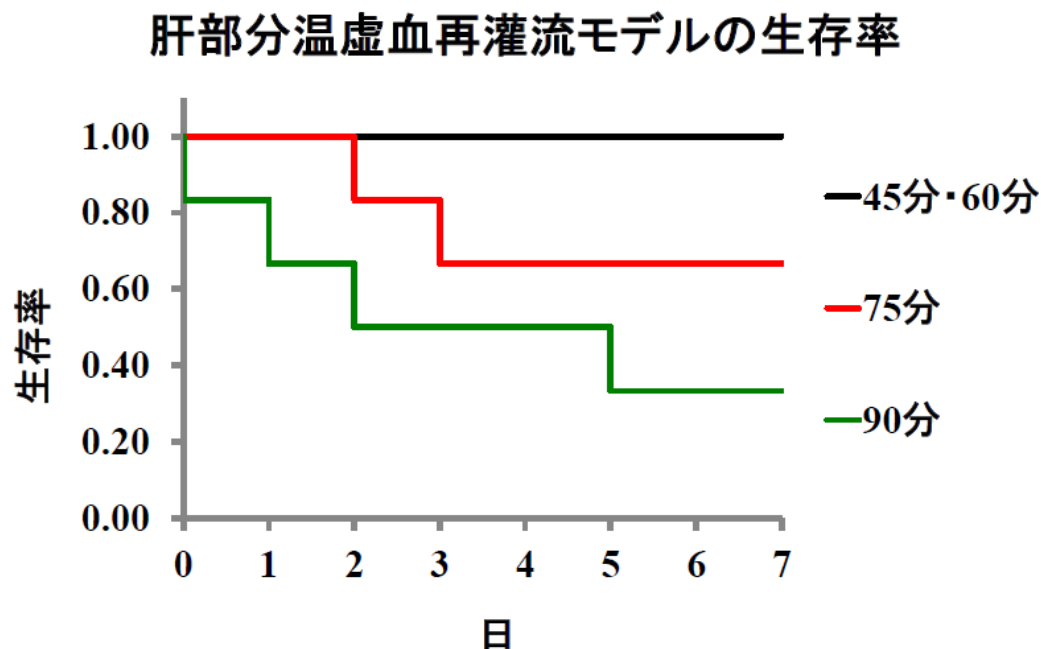


図 3.1 週生存率

虚血時間 45 分群および 60 分群の 1 週生存率は 100%、75 分群では 67%、90 分群では 33%である。

② ALT

1) 虚血時間毎の血漿 ALT 活性 (R6h)

R6h の ALT 活性は虚血時間 45 分群では、 11408 ± 2203 U/L、60 分群では 13475 ± 2140 U/L、75 分群では 18338 ± 3719 U/L、90 分群では 24437 ± 3195 U/L であった。

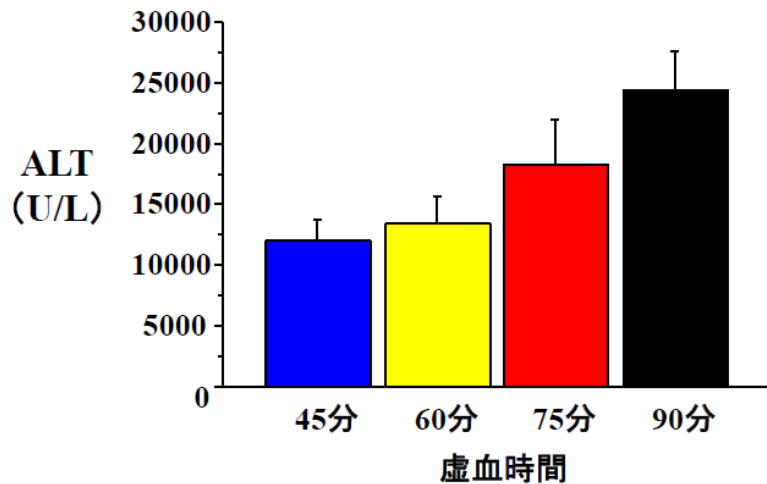


図 4. 虚血時間毎の血清 ALT (R6h)

再灌流 6 時間後の ALT 活性は虚血時間 45 分群では、11408±2203 U/L、60 分群では 13475±2140 U/L、75 分群では 18338±3719 U/L、90 分群では 24437±3195 U/L である。

ALT 値や生存率は諸家の論文でもばらつきがあるが、本実験の結果は諸家の報告³¹⁻³³と矛盾しない範囲にあり、実験モデルとして妥当性が示された。これらの結果から、薬効の評価には 75 分虚血モデルが適切と考えられ、以後の検討を行った。

2) NaHS 投与量毎の血漿 ALT (75 分虚血モデル R6h)

虚血時間 75 分の肝部分温虚血再灌流モデルにおいて、R6h の ALT は、無治療群 (NaHS 0 mg/kg) で 18338±3719 U/L、0.5 mg/kg では 11461±4078 U/L、NaHS 1.0 mg/kg では 5586±3301 であった。3.0 mg/kg では 6649±3778 U/L であったが、6 例中 3 例で投与直後に呼吸が停止し、硫化水素の毒性と考えられた。これらの結果から NaHS の至適投与量を 1.0 mg/kg とし、以後の検討を行った。

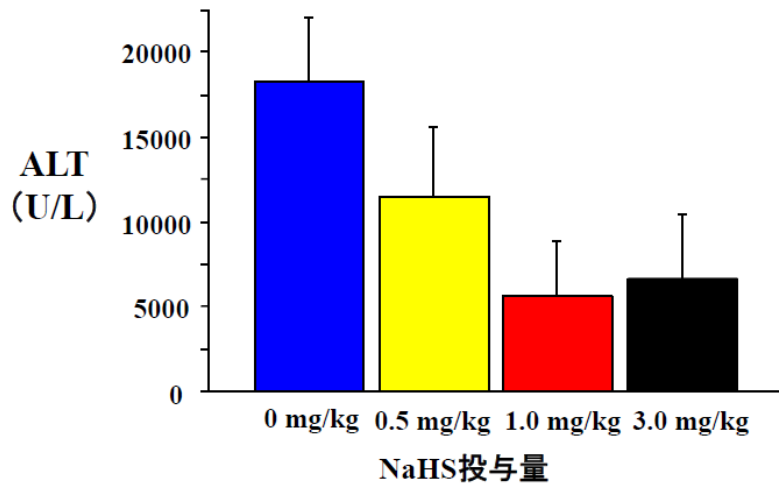


図 5. NaHS 投与量毎の血漿 ALT

再灌流 6 時間後の ALT は、無治療群 (NaHS 0 mg/kg) で 18338 ± 3719 U/L、NaHS 0.5 mg/kg では 11461 ± 4078 U/L、NaHS 1.0 mg/kg では 5586 ± 3301 、NaHS 3.0 mg/kg では 6649 ± 3778 U/L である。

本実験

① 肝障害

R6h の肝組織を比較した。Sham 群ではほぼ正常であった (図 6A) が、NaHS (-) 群では炎症細胞浸潤、うっ血、肝細胞の空胞化が著明であった (図 6B)。NaHS (+) 群では、これらの変化が軽減された (図 6C)。肝障害スコアは Sham 群 (2.2 ± 1.2) と比べ、NaHS (-) 群では有意に上昇したが (11.7 ± 0.5)、NaHS (-) 群に比べ NaHS (+) 群では有意に低下した (6 ± 1.9) ($p < 0.05$) (図 6D)。

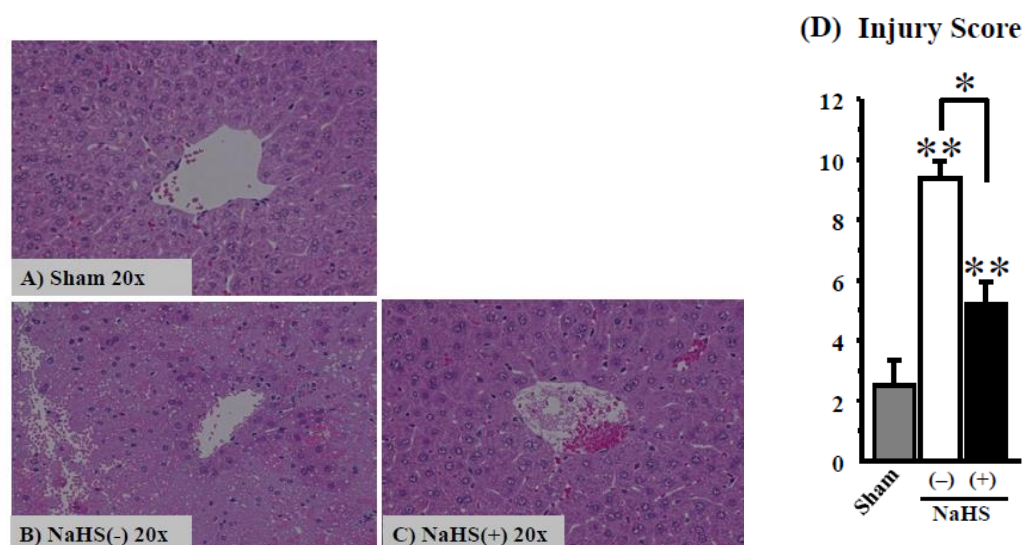


図 6. 病理組織学的所見

(A) Sham 群: ほぼ正常である。(B) NaHS (-) 群: 炎症細胞浸潤、うっ血、肝細胞の空胞化が著明である。(C) NaHS (+) 群: 炎症細胞浸潤、うっ血、肝細胞の空胞化は軽減されている。(D) 肝障害スコアは Sham 群 (2.2 ± 1.2) と比べ、NaHS (-) 群では有意に上昇しているが (11.7 ± 0.5)、NaHS (-) 群に比べ NaHS (+) 群では有意に低下している (6 ± 1.9) ($p < 0.05$: * NaHS(-) 群 vs NaHS(+) 群, ** vs Sham 群)。

R6h の血漿 ALT 活性を比較すると、Sham 群では低値であったが (388 ± 92 U/L)、NaHS (-) 群では有意に上昇した (18338 ± 3719 U/L)。NaHS (+) 群では NaHS(-) 群に対して ALT の上昇は有意に軽減した (5586 ± 3301 U/L) ($p < 0.05$) (図 7)。

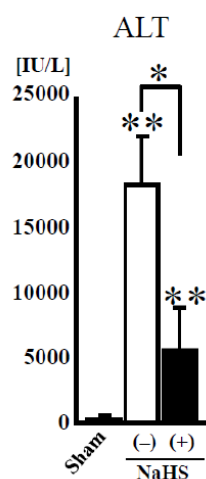


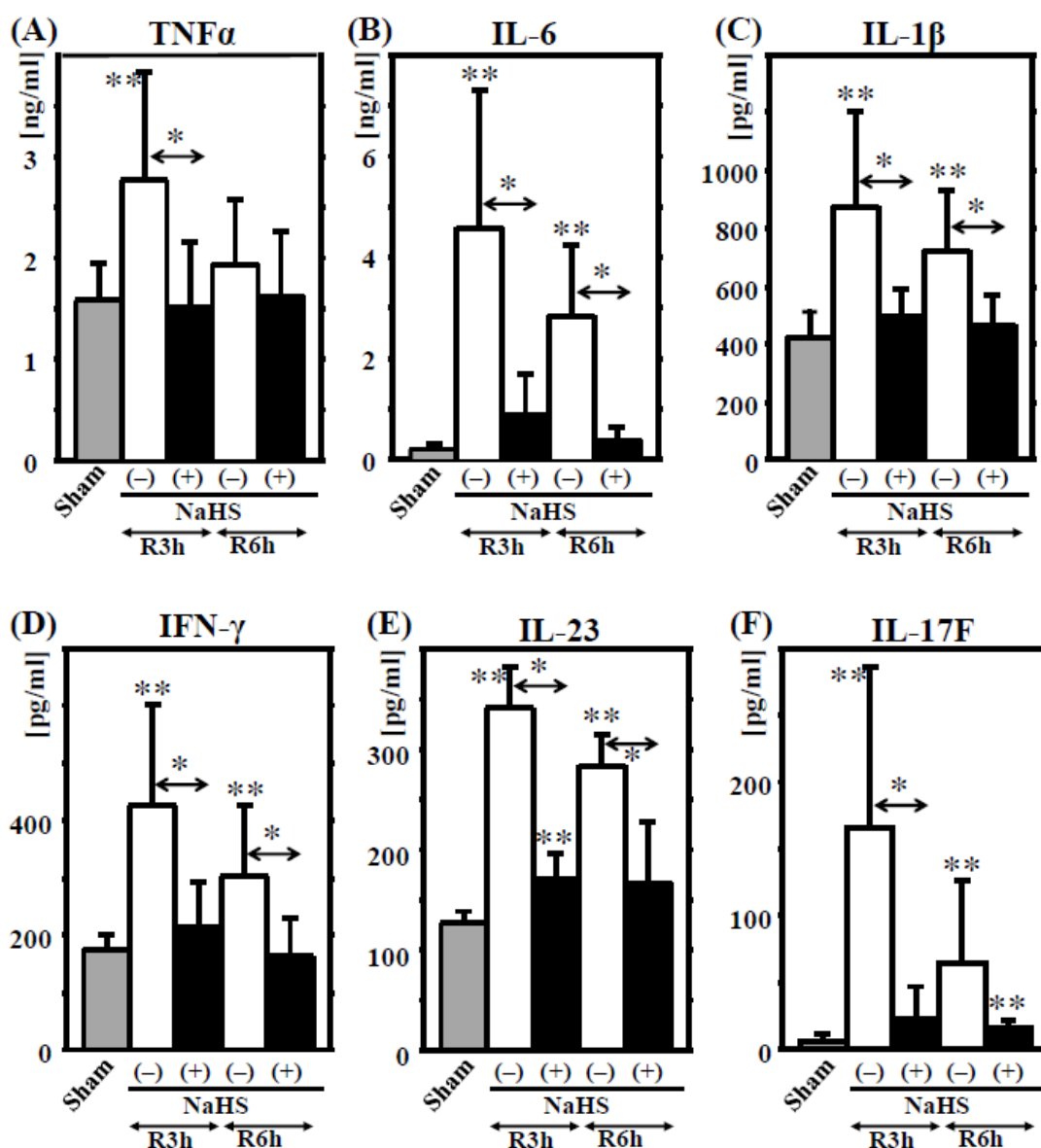
図 7. 肝逸脱酵素

血漿 ALT 活性: Sham 群では低値である (388 ± 92 U/L) が、NaHS (-) 群では有意に上昇している (18338 ± 3719 U/L)。NaHS (+) 群では NaHS(-) 群に対して ALT の上昇は有意に軽減している (5586 ± 3301 U/L) ($p < 0.05$: * NaHS(-) 群 vs NaHS(+) 群, ** vs Sham 群)。

② サイトカイン・ケモカイン

R3h: Sham 群と比べ NaHS(-) 群では血漿中 TNF- α (図 8A)、IL-6 (図 8B)、IL-1 β (図 8C)、IFN- γ (図 8D)、IL-23 (図 8E)、IL-17F (図 8F)、CD40L (図 8G) は有意に上昇した。NaHS(+) 群では、これらの上昇は有意に抑制された ($p<0.05$)。

R6h: Sham 群と比べ NaHS(-) 群では血漿中 IL-6 (図 8B)、IL-1 β (図 8C)、IFN- γ (図 8D)、IL-23 (図 8E)、IL-17F (図 8F)、CD40L (図 8G) は有意に上昇した。NaHS(+) 群では IL-6 (図 8B)、IL-1 β (図 8C)、IFN- γ (図 8D)、IL-23 (図 8E) の上昇は有意に抑制された ($p<0.05$)。



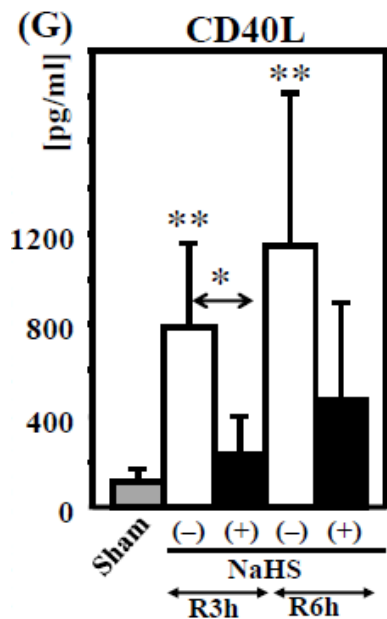


図 8. 血漿中サイトカイン、ケモカイン

(A) TNF- α : 再灌流 3 時間後で NaHS(-) 群は Sham 群と比べ有意に上昇している。NaHS(+) 群では上昇が有意に抑制されている。再灌流 6 時間後では、NaHS(-) 群と NaHS(+) 群はほぼ同様であり Sham 群と同じ程度である。(B) IL-6、(C) IL-1 β 、(D) IFN- γ 、(E) IL-23: 再灌流 3 時間後、6 時間後ともに、NaHS(-) 群は Sham 群と比べ有意に上昇している。NaHS(+) 群では、再灌流 3 時間後、6 時間後ともに上昇が有意に抑制されている。(F) IL-17F、(G) CD40L: 再灌流 3 時間後、6 時間後ともに、NaHS(-) 群は Sham

群と比べ有意に上昇しているが再灌流 3 時間後で NaHS(+) 群では上昇が有意に抑制されている ($p < 0.05$: * NaHS(-) 群 vs NaHS(+) 群, ** vs Sham 群)。

③ 生存シグナル

R6h の生存シグナル: phosphorylated PDK-1 (p-PDK1-Ser²⁴¹)、Akt (p-Akt-Ser⁴⁷³)、mTOR (p-mTOR-Ser²⁴⁴⁸)、p70S6k (p-p70S6K-Ser³⁷¹) をウエスタンブロット法で評価した。

p-PDK1: Sham 群と比較すると、NaHS(-) 群では著明に低下したが、NaHS(+) 群では、低下が有意に抑制された ($p < 0.05$) (図 9A)。

p-Akt: Sham 群と比較すると、NaHS(-) 群では低下傾向であったが、NaHS(+) 群では、Sham 群よりもむしろ増強された ($p < 0.05$) (図 9B)。

p-mTOR、p-p70S6k: Sham 群、NaHS(-) 群はほぼ同等であったが、NaHS(+) 群では有意に増強された ($p < 0.05$) (図 9C、D)。

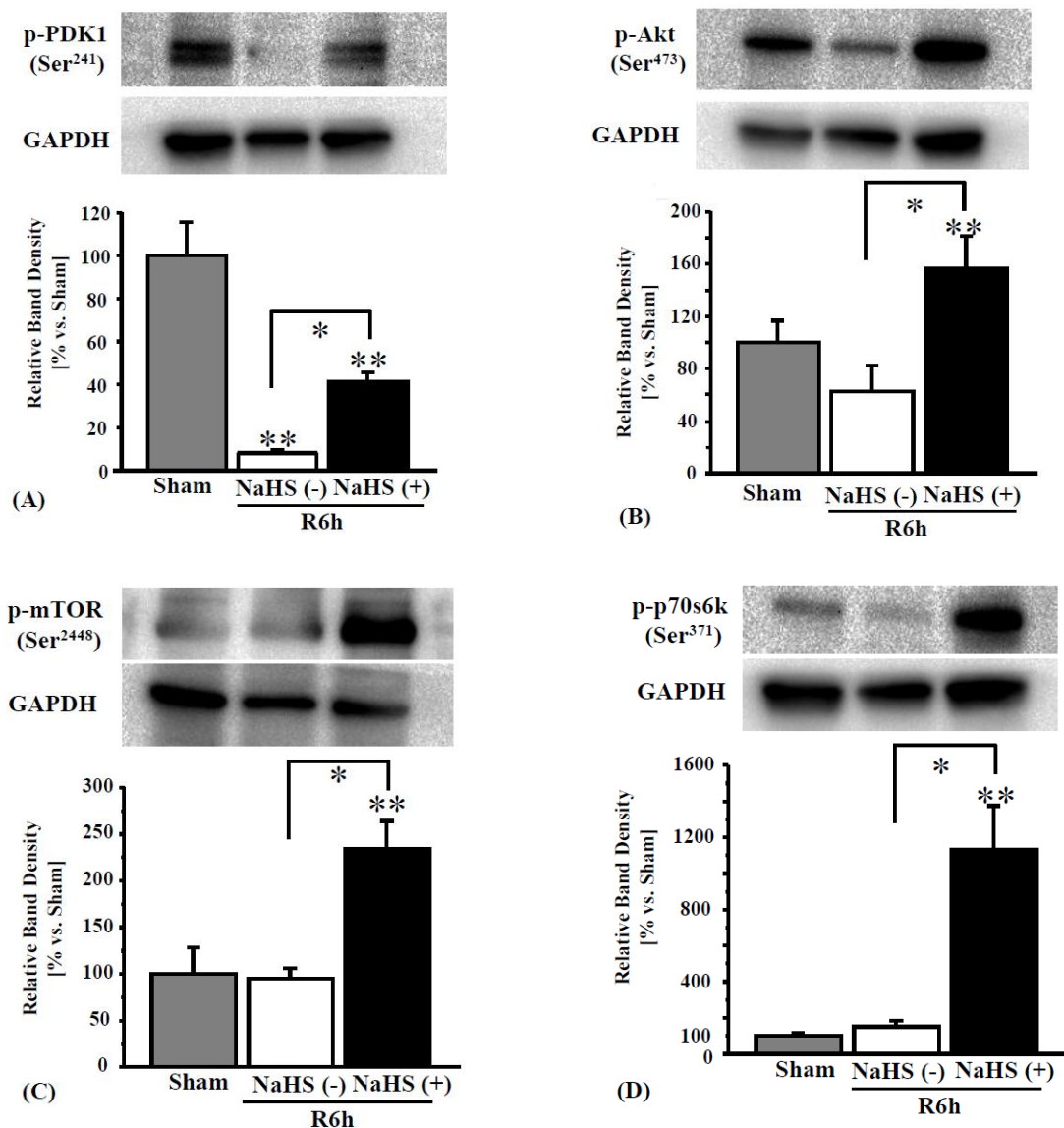


図 9.生存シグナル

(A) p-PDK1 : Sham 群と比較すると、NaHS(-) 群では著明に低下しているが NaHS(+)群では、低下が有意に抑制されている。(B) p-Akt : Sham 群と比較すると、NaHS(-) 群では低下傾向であるが、NaHS(+) 群では、Sham 群よりもむしろ増強されている。(C) p-mTOR、(D) p-p70S6k: Sham 群、NaHS(-) 群はほぼ同等である、NaHS(+) 群では有意に増強されている ($p < 0.05$: * NaHS(-) 群 vs NaHS(+) 群, ** vs Sham 群)。

④ アポトーシス

Sham 群では TUNEL 陽性細胞はほとんど認めなかった (図 10A、D) 。 NaHS(-) 群では多数の TUNEL 陽性細胞を認めたが (図 10B、D) 、NaHS(-) 群に比して NaHS(+) 群では、TUNEL 陽性細胞の割合は有意に低下した ($p<0.05$) (図 10C、D) 。

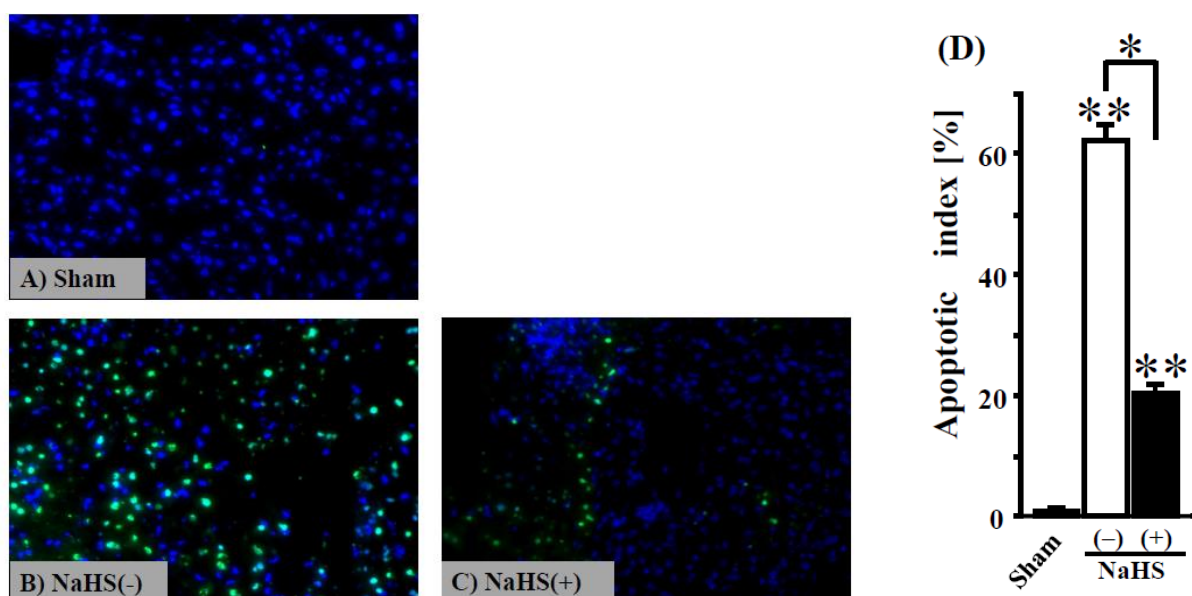


図 10. TUNEL 染色

(A) Sham 群: TUNEL 陽性細胞はほとんど認めない。(B) NaHS(-) 群: 多数の TUNEL 陽性細胞を認める、(C) NaHS(+) 群: TUNEL 陽性細胞の割合は低下している。(D) Apoptotic index: NaHS(-) 群と比較して、NaHS(+) 群で有意に低下している ($p<0.05$: * NaHS(-) 群 vs NaHS(+) 群, ** vs Sham 群) 。

Cleaved caspase-3 は、Sham 群と比較し NaHS(-) 群では著明に増加したが、NaHS(+) 群では、Cleaved caspase-3 の増加は有意に抑制された ($p<0.05$) (図 11) 。

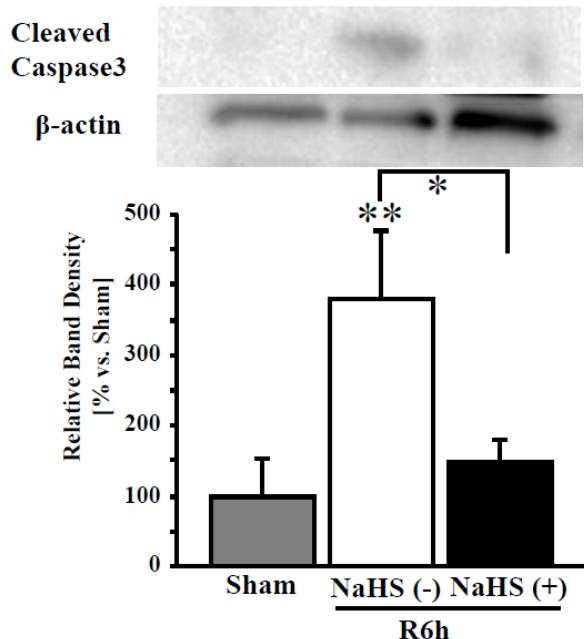


図 11. Cleaved caspase-3

Sham 群と比較し NaHS(-) 群では著明に増加しているが、NaHS(+) 群では、Cleaved caspase-3 の増加は有意に抑制されている ($p<0.05$: * NaHS(-) 群 vs NaHS(+) 群, ** vs Sham 群)。

⑤ 酸化ストレス

R6h の肝組織中の過酸化脂質 [Malondialdehyde (MDA) と 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) の和] を測定した。Sham 群 と比べ、NaHS(-) 群では MDA + 4-HNE は著明に増加したが、NaHS(+) 群では増加は有意に抑制された ($p<0.05$) (図 12) 。

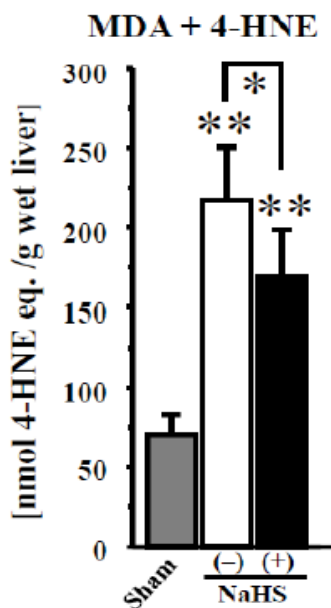


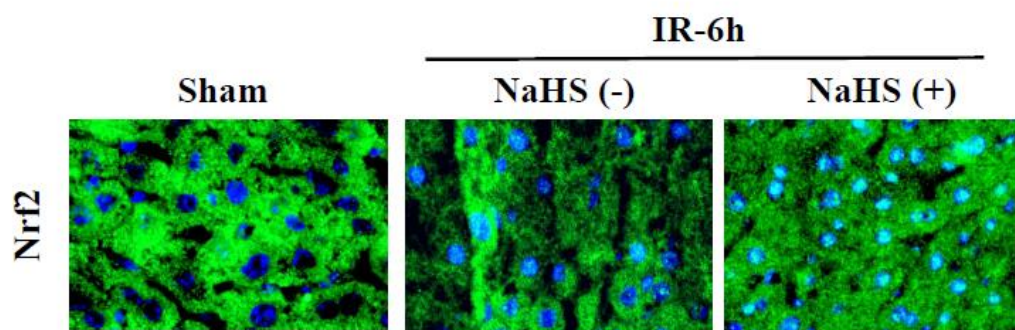
図 12. MDA + 4-HNE

Malondialdehyde (MDA) + 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE): Sham 群 と比べ、NaHS(-) 群では MDA + 4-HNE は著明に増加しているが、NaHS(+) 群では増加は有意に抑制されている ($p<0.05$: * NaHS(-) 群 vs NaHS(+) 群, ** vs Sham 群)。

R6h の Nrf2 の核内移行と、Nrf2 によって転写が促進される Heme oxygenase-1 (HO-1)、Thioredoxin-1 (TRX-1) を評価した。

免疫染色では Nrf2 の核内移行は、Sham 群ではほとんど見られなかったが、NaHS(-) 群では軽度に認められ、NaHS(+) 群では著明に増強した (図 13A)。核タンパクのウエスタンブロットでも同様に、Sham 群では核内に Nrf2 はほとんど存在しなかったが、NaHS(-) 群では核内の Nrf2 は増加し、NaHS(+) 群ではさらに有意に増加した ($p<0.05$) (図 13B)。

(A)



(B)

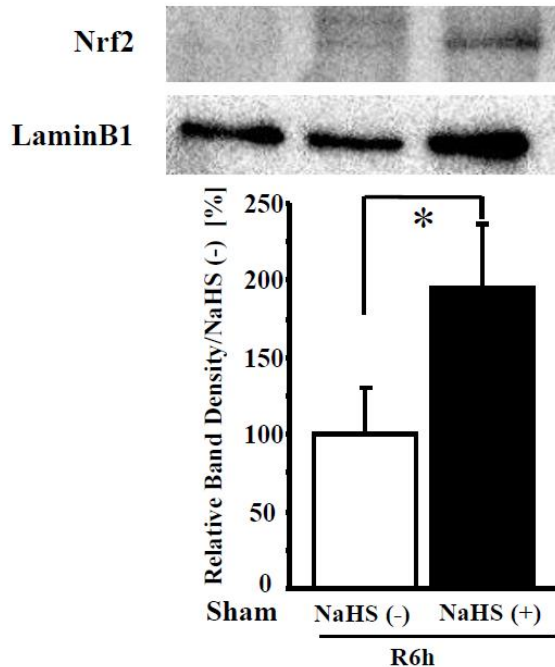


図 13. Nrf2 の核内移行

(A) Nrf2 の核内移行は、Sham 群ではほとんど見られていないが、NaHS(-) 群では軽度に認められ、NaHS(+) 群では著明に増強している。(B) Sham 群では核内に Nrf2 はほとんど存在していないが、NaHS(-) 群では核内の Nrf2 は増加し、NaHS(+) 群ではさらに有意に増加している

($p<0.05$: * NaHS(-) 群 vs

NaHS(+) 群)。Sham 群は定量できなかったため、NaHS(-) 群と NaHS(+) 群を定量して比較した。

HO-1、TRX-1 とともに NaHS(+) 群では NaHS(-) 群よりも有意に発現が増強した ($p<0.05$) (図 14A、B)。

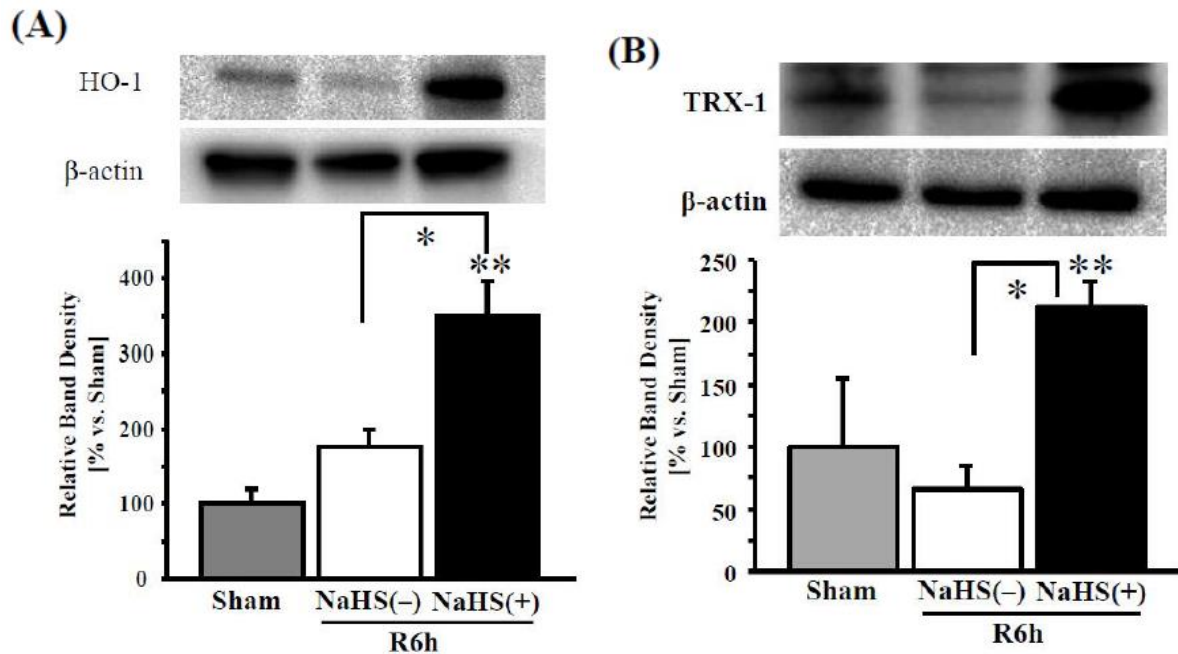
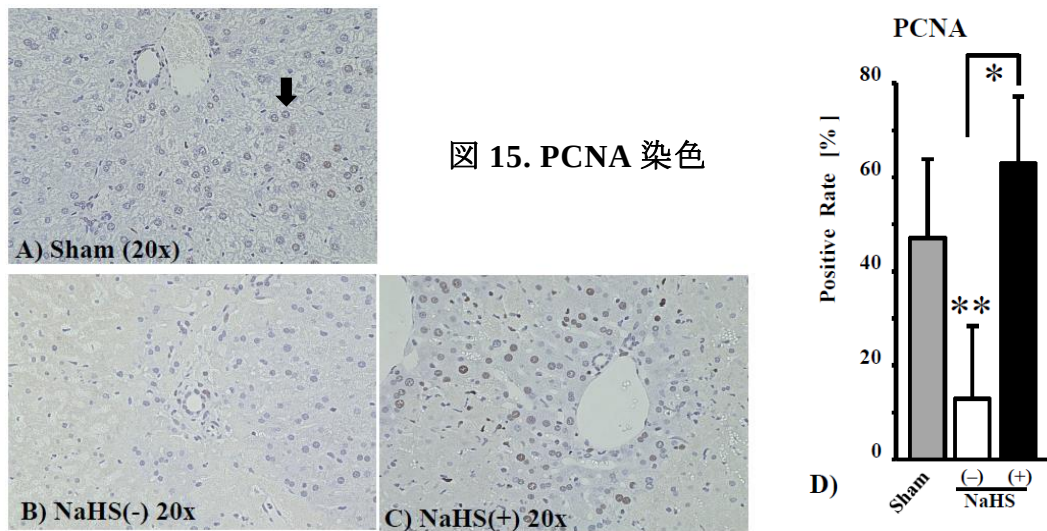


図 14. HO-1 と TRX-1 の発現

(A) HO-1、(B) TRX-1: NaHS(+) 群では NaHS(-) 群よりも有意に発現が増強している ($p<0.05$: * NaHS(-) 群 vs NaHS(+) 群, ** vs Sham 群)。

⑥ 細胞増殖

R24h の肝細胞増殖を PCNA 染色で評価した。Sham 群では肝細胞の PCNA 陽性率は $47\pm14\%$ であった。PCNA 陽性率は NaHS(-) 群では減少したが ($13\pm15\%$)、NaHS(+) 群では NaHS(-) 群に比して有意に増加した ($63\pm14\%$) ($p<0.05$)。



(A) Sham 群: PCNA 陽性肝細胞(黒矢印)を認める。(B)NaHS(-) 群: PCNA 陽性肝細胞は減少している。(C) NaHS(+) 群: PCNA 陽性肝細胞が NaHS(-) 群よりも増加している。(D) PCNA 陽性率: Sham 群では $47 \pm 14\%$ 、NaHS(-) 群では $13 \pm 15\%$ と減少し、NaHS(+) 群では $63 \pm 14\%$ と NaHS(-) 群に対して有意に増加している ($p < 0.05$: * NaHS(-) 群 vs NaHS(+) 群, ** vs Sham 群)。

考察

本研究ではマウス肝温虚血再灌流障害に対する NaHS の肝保護効果が、PDK-1、Akt、mTOR、p70s6k 等の生存シグナル分子のリン酸化増強作用によるものであることを明らかにし、既報の組織障害、アポトーシス、酸化ストレス、炎症の軽減効果に部分的に関与することを示した。これらの保護効果には Nrf2 の核内移行の促進と、引き続く HO-1、TRX-1 の発現増強による抗炎症、抗酸化作用が関与することも示した。また、NaHS 投与により、障害肝の再生が促進されることが示唆された。

硫化水素 (H_2S) は肝臓、腎臓、血管、脳、神経ではシステインから産生されて生理活性を有し³⁰、肝臓²¹⁻²⁴や他臓器¹⁷⁻²⁰で虚血再灌流障害を軽減することが報告されている。本研究の結果はこれらの報告と良く合致していた。肝温虚血再灌流障害における炎症反応は主として虚血中のクッパー細胞と肝細胞によって惹起され^{5,6}、産生された TNF- α や IL-6、IL-1 β がこれらの細胞に autocrine, paracrine に作用し、浸潤した白血球の活性化と相まって、さらなる活性酸素種 (ROS) やプロテアーゼの放出を促進し、細胞死に至る^{6,7}。それ故、早期に多種のサイトカインの産生を抑制することが、その後の障害を軽減するためには重要である。

心停止ドナー (Donation after cardiac death : DCD) 肝の移植後には、血清 TNF- α 、IL-17 の上昇と CD154 陽性 T 細胞の増加が見られ³¹、IL-23 や Th17 細胞 (NK・NKT・ $\gamma\delta$ T 細胞) が抗原非特異的免疫、獲得免疫の制御に主要な役割を担う³²。また、肝温虚血再灌流障害において IL-23 はクッパー細胞や CD4+/Th17 細胞を刺激し、産生された IL-6 は Th17 細胞を活性化して IL-17 を放出させ、好中球の集積を促進する³³。CD40-CD40L (CD154) は肝細胞における酸化ストレス由来のアポトーシスを誘導する³⁴。

本研究では、血漿中の TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-17、IL-23 や可溶性 CD40L (CD154) が再灌流 3 時間以内に増加し、NaHS 投与によってこれらが全て抑制された。これらの結果は上記の報告と矛盾せず、IL23-IL17 の抑制が肝温虚血再灌流障害を軽減することが再確認された³⁵。CD40L は肝虚血再灌流障害を増悪させることが知られており³⁴、その主要な供給源は活性化された血小板である³⁶。本研究では再灌流後 3 時間で種々のサイトカイン、ケモカインの放出がみられ、血小板の活性化により CD40L が高値に保たれ⁵、硫化水素はその初期段階を阻害したと考えられる。

酸化ストレスは肝虚血再灌流障害においても一つの重要な要素である⁵⁻⁷。類洞内皮細胞の酸化傷害は Endothelin-1 (ET-1) 産生を促進し、微小循

環境障害を引き起こす³⁷。硫化水素の抗酸化作用は、1) 活性酸素種に対する直接的な消去活性³⁸、2) ミトコンドリア呼吸鎖の可逆的な阻害³⁹、3) シスチン-システイン輸送の増強を介したグルタチオン (GSH) 産生の増加⁴⁰、4) Nrf2 を介した抗酸化・抗炎症タンパクの発現³⁰、によって説明される。本研究でも NaHS は過酸化脂質や炎症を軽減した。

Nrf2 は通常は Keap-1 と複合体を形成して、不活性状態で細胞質に存在する。酸化ストレスや生存シグナルのような刺激が加わると、Keap-1 から解離して核内に移行し、HO-1 や TRX-1 の転写を促進させる^{41,42}。HO-1 はヘムをビリベルジンと一酸化炭素 (CO) に転換することで酸化ストレスを軽減し⁴³、産生された CO は抗炎症作用と血管拡張作用を発揮する⁴⁴。TRX-1 は GSH の存在下にチオールや過酸化水素を還元する⁴⁵。本研究では、NaHS が Nrf2 の核内移行を促進し、HO-1 や TRX-1 の発現を増強させることにより、酸化ストレスや炎症を軽減することが示された。

硫化水素は生存シグナル増強作用やミトコンドリアを介したアポトーシス阻害作用を有する⁴¹。硫化水素による生存シグナル増強と抗アポトーシス作用によって海馬の神経²⁵や心筋¹⁰の虚血再灌流障害が軽減される。一方、インスリンによる PI3K-Akt-mTOR-p70s6k の活性化が心筋のサバイビン発現を介して抗アポトーシス効果を示す⁴⁶。また、p70s6k のリン酸化は抗アポトーシス、抗炎症作用により心臓や小腸の虚血再灌流障害を軽減することが知られている^{47,48}。本研究では、NaHS を投与した肝臓において PDK-1-Akt-mTOR- p70s6k 経路のリン酸化が維持され、生存シグナルが増強されることを示した。再灌流後 6 時間における PDK-1-Akt シグナルの増強は、*de novo* の遺伝子発現ではなく、PDK-1 と Akt のリン酸化の増強に起因するはずである^{22,49}。本研究では、NaHS 投与による p70s6k やその上流のキナーゼ (mTOR、Akt、PDK-1) のリン酸化維持が、肝温虚血再灌流障害の軽減に寄与することを明らかにした。NaHS による再灌流早期の保護に関する作用機序を解明するためには、今後さらなる遺伝子発現や non-coding RNA 等の多角的な解析が必要であろう。

肝温虚血再灌流障害における重要な抗アポトーシスシグナルとして、STAT3 が挙げられる¹⁷。HO-1 は核内の NF- κ B 阻害によって炎症・アポトーシスを軽減する。その HO-1 を介した TLR-4 や PTEN の down-regulation および Akt のリン酸化には STAT3 が不可欠とされる³⁵。本研究では NaHS 投与により再灌流後 3 時間～6 時間の IL-6 と TNF- α は軽度上昇した状態を維持し、再灌流 24 時間後の PCNA 陽性率は有意に高かった。IL-6 を介した STAT3 の活性化のみでは高度の障害肝の再生には不十分とされる⁵⁰。しかし、

本研究では STAT3 を介した肝再生機構⁵¹が NaHS により促進される可能性が示唆された。再灌流 3 時間の時点で既に NaHS による障害軽減効果、炎症性サイトカイン・ケモカインの産生阻害作用が観察されていることから、障害の軽減によって肝再生が良好に作動したと推測された。しかし、24 時間以後の生存や肝機能に対する NaHS 投与の意義については、今後のさらなる検証が必要である。

硫化水素投与のタイミングは重要である。Zhang らは虚血前の NaHS 投与によってミトコンドリアの PTP 開孔が阻害され、Akt-GSK3 β が活性化されることを報告した⁵²。一方、再灌流前の NaHS もしくは Na₂S 投与によって虚血再灌流障害が軽減された報告^{18,20,22}もあり、硫化水素投与の至適なタイミングは明らかではない。外因性の硫化水素ガスは酸化やチオール結合によって血液や組織から速やかに消失し⁵³、肝での半減期は有酸素下では 2.0 分、無酸素下では 5.4 分とされる⁵⁴。本研究では障害が増悪する再灌流時に十分な濃度になるように再灌流前に NaHS を投与し、良好な結果を得た。

肝温虚血再灌流障害の軽減効果を担う細胞内シグナル伝達を明らかにするために、マウス肝温阻血再灌流における NaHS 投与の効果を解析した。NaHS 投与は肝温虚血再灌流障害を軽減した。NaHS 投与は抗酸化、抗炎症、抗アポトーシス作用を示し、肝再生を促進させた。NaHS 投与によるこれらの保護効果は、PI3K/Akt/p70S6k カスケードの増強と Nrf2 の核内移行促進に起因すると考えられた。

総括および結論

① 研究全体から得られた新知見

肝虚血再灌流障害モデルにおいて硫化水素による治療は

- 1) PI3K/Akt/p70S6k カスケードを増強した。
- 2) Nrf2 の核内移行を促進した。
- 3) 肝再生を促進した。

② 新知見の意義

硫化水素は PI3K/Akt/p70S6k カスケードを増強し、Nrf2 の核内移行を促進することで抗酸化、抗炎症、抗アポトーシス効果を示し肝虚血再灌流障害を軽減するのみならず、肝再生にも有益な効果を与えることが示唆された。

③ 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

1) PI3K/Akt/p70S6k カスケードの経時推移

マウス肝虚血再灌流障害モデルにおける PI3K/Akt/p70S6k カスケードの経時推移は検討していない。再灌流後、経時的に検体を採取し PCR を含めたアッセイを行い、PI3K/Akt/p70S6k カスケードの経時推移を検討する。

2) 肝再生に与える影響

今回、肝再生に与える影響として PCNA 染色で評価したが、STAT3 や CyclinD1 は評価していない。今後 STAT3 や CyclinD1 への影響についても検討すべきである。

③ 今後の課題

- 1) 大動物モデルにおける有効性、安全域の証明が期待される。
- 2) 肝癌に対する肝切除では、出血の制御のために肝温虚血再灌流 (Pringle 法)が行われることがある。この際に肝保護のために硫化水素を投与することが想定される。しかし、生存シグナルの増強効果が腫瘍細胞に対してどのように作用するのかは明らかではない。悪性腫瘍へ与える影響を確認する必要がある。

謝辞

稿を終えるにあたり、研究の御指導を頂きました北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I 武富紹信 教授、藤堂省 前教授、移植外科学講座 深井原 助教に謝意を表します。また、卓越した技術により実験を終始支援して頂きました堀米正敏、小林希、三好早香の諸氏、ならびに貴重な御助言を賜りました同分野の皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Foley, D.P. et al. Donation after cardiac death: the University of Wisconsin experience with liver transplantation. *Ann. Surg.* 242, 724-731 (2005).
2. The 2009 OPTN / SRTR Annual Report: Transplant Data 1999-2008.
3. Monbaliu, D. et al. Multifactorial biological modulation of warm ischemia reperfusion injury in liver transplantation from non-heart-beating donors eliminates primary nonfunction and reduces bile salt toxicity. *Ann. Surg.* 250, 808-817 (2009).
4. Monbaliu, D., Pirenne, J., Talbot, D. Liver transplantation using Donation after Cardiac Death donors. *J. Hepatol.* 56, 474-485 (2012).
5. Vollmar, B., Menger, M.D. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol. Rev.* 89, 1269-1339 (2009).
6. Zwacka, R.M. et al. Redox gene therapy for ischemia/reperfusion injury of the liver reduces AP1 and NF-kappaB activation. *Nat. Med.* 4, 698-704 (1998).
7. Abu-Amara, M. et al. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review. *Liver. Transpl.* 16, 1016-1032 (2010).
8. Requião-Moura, L.R. et al. Effects of ischemia and reperfusion injury on long-term graft function. *Transplant. Proc.* 43, 70-73 (2011).
9. Wood, K.J., Goto, R. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation.* 93, 1-10 (2012).
10. Hu, Y. et al. Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways. *Pflugers. Arch.* 455, 607-616 (2008).
11. Tsang, A., Hausenloy, D.J., Mocanu, M.M., Yellon, D.M. Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ. Res.* 95, 230-232 (2004).
12. Noshita, N., Lewen, A., Sugawara, T., Chan, P.H. Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 21, 1442-1450 (2001).
13. Li, L., Moore, P.K. Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air? *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 84-90 (2008).
14. Kimura, H. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA

- receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267, 129-133 (2000).
15. Kawabata, A. et al. Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger. *Pain.* 132, 74-81 (2007).
 16. Hosoki, R., Matsuki, N., Kimura, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 527-531 (1997).
 17. Calvert, J.W. et al. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circ. Res.* 105, 365-374 (2009).
 18. Hunter, J.P. et al. Effects of hydrogen sulphide in an experimental model of renal ischaemia-reperfusion injury. *Br. J. Surg.* 99, 1665-1671 (2012).
 19. Fu, Z. et al. Hydrogen sulfide protects rat lung from ischemia-reperfusion injury. *Life. Sci.* 82, 1196-1202 (2008).
 20. Henderson, P.W. et al. Hydrogen sulfide attenuates intestinal ischemia-reperfusion injury when delivered in the post-ischemic period. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25, 1642-1647 (2010).
 21. Wang, D. et al. The role of AKT1 and autophagy in the protective effect of hydrogen sulphide against hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Autophagy.* 8, 954-962 (2012).
 22. Jha, S. et al. Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 295, H801-H806 (2008).
 23. Kang, K. et al. Role of hydrogen sulfide in hepatic ischemia-reperfusion-induced injury in rats. *Liver. Transpl.* 15, 1306-1314 (2009).
 24. Bos, E.M. et al. Beneficial effects of gaseous hydrogen sulfide in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transpl. Int.* 25, 897-908 (2012).
 25. Shao, J.L. et al. H₂S protects hippocampal neurons from anoxia-reoxygenation through cAMP-mediated PI3K/Akt/p70S6K cell-survival signaling pathways. *J. Mol. Neurosci.* 43, 453-460 (2011).
 26. King, A.L., Lefer, D.J. Cytoprotective actions of hydrogen sulfide in ischaemia-reperfusion injury. *Exp. Physiol.* 96, 840-846 (2011).
 27. Lowicka, E., Beltowski, J. Hydrogen sulfide (H₂S) - the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological reports.* 59, 4-24 (2007).
 28. Yadav, S.S., Gao, W., Harland, R.C., Clavien, P.A. A new and simple technique of total hepatic ischemia in the mouse. *Transplantation.* 65, 1433-1436 (1998).

29. Suzuki, S. et al. The beneficial effect of a prostaglandin I₂ analog on ischemic rat liver. *Transplantation*. 52, 979-983 (1991).
30. Szabo, C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 6, 917-935 (2007).
31. Schlegel, A., Graf, R., Clavien, P.A., Dutkowski, P. Hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) protects from biliary injury in a rodent model of DCD liver transplantation. *J. Hepatol.* 59, 984-991 (2013).
32. Chen, Y., Wood, K.J. Interleukin-23 and TH17 cells in transplantation immunity: does 23+17 equal rejection? *Transplantation*. 84, 1071-1074 (2007).
33. Husted, T.L. Potential role for IL-23 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Inflamm. Res.* 55, 177-178 (2006).
34. Bhogal, R.H. Activation of CD40 with platelet derived CD154 promotes reactive oxygen species dependent death of human hepatocytes during hypoxia and reoxygenation. *PLoS One*. 7, e30867 (2012).
35. Ke, B. et al. HO-1-STAT3 axis in mouse liver ischemia/reperfusion injury: regulation of TLR4 innate responses through PI3K/PTEN signaling. *J. Hepatol.* 56, 359-366 (2012).
36. Shen, X. et al. CD4 T cells promote tissue inflammation via CD40 signaling without de novo activation in a murine model of liver ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*. 50, 1537-1546 (2009).
37. Yokota, R. et al. A novel hydroxyl radical scavenger, nicaraven, protects the liver from warm ischemia and reperfusion injury. *Surgery*. 127, 661-669 (2000).
38. Johansen, D., Ytrehus, K., Baxter, G.F. Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury--Evidence for a role of K ATP channels. *Basic. Res. Cardiol.* 101, 53-60 (2006).
39. Elrod, J.W. et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 104, 15560-15565 (2007).
40. Kimura, Y., Goto, Y., Kimura, H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxid Redox Signal*. 12, 1-13 (2010).
41. Paine, A., Eiz-Vesper, B., Blasczyk, R., Immenschuh, S. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1895-1903 (2010).
42. Kim, Y.C. Thioredoxin-dependent redox regulation of the antioxidant

- responsive element (ARE) in electrophile response. *Oncogene*. 22, 1860-1865. (2003).
43. Akamatsu, Y. et al. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide protects hearts from transplant associated ischemia reperfusion injury. *Faseb. J.* 18, 771-772 (2004).
 44. Wei, Y. et al. Carbon monoxide-releasing molecule-2 (CORM-2) attenuates acute hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *BMC Gastroenterol.* 10, 42 (2010).
 45. Watanabe, R., Nakamura, H., Masutani, H., Yodoi, J. Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2. *Pharmacol. Ther.* 127: 261-270 (2010).
 46. Si, R. et al. Survivin: a novel player in insulin cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50, 16-24 (2011).
 47. Kis, A., Yellon, D.M., Baxter, G.F. Second window of protection following myocardial preconditioning: an essential role for PI3 kinase and p70S6 kinase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 1063-1071 (2003).
 48. Ban, K., Kozar, R.A. Protective role of p70S6K in intestinal ischemia/reperfusion injury in mice. *PLoS One*. 7, e41584 (2012).
 49. Koh, P.O. Melatonin prevents hepatic injury-induced decrease in Akt downstream targets phosphorylations. *J. Pineal. Res.* 51, 214-219 (2011).
 50. Debonera, F. et al. Severe preservation injury induces Il-6/STAT3 activation with lack of cell cycle progression after partial liver graft transplantation. *Am. J. Transplant.* 4, 1964-1971 (2004).
 51. Taub, R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5, 836-847 (2004).
 52. Zhang, Q. et al. Hydrogen sulfide preconditioning protects rat liver against ischemia/reperfusion injury by activating Akt-GSK-3 β signaling and inhibiting mitochondrial permeability transition. *PLoS One*. 8, e74422 (2013).
 53. Klingerman, C.M., Trushin, N., Prokopczyk, B., Haouzi, P. H₂S concentrations in the arterial blood .during H₂S administration in relation to its toxicity and effects on breathing. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 305, R630-r638 (2013).
 54. Vitvitsky, V., Kabil, O., Banerjee, R. High turnover rates for hydrogen sulfide allow for rapid regulation of its tissue concentrations. *Antioxid Redox Signal.*

17, 22-31 (2012).