HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ラットの心臓死ドナー肝における水素ガスによる虚血再灌流障害軽減効果に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	石川, 隆壽
Description	配架番号：2429
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13373号
Issue Date	2018-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/72393
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takahisa_Ishikawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　石川　隆壽

学 位 論 文 題 名

ラットの心臓死ドナー肝における水素ガスによる虚血再灌流障害軽減効果に関する研究

(Studies on the effect of amelioration of ischemia reperfusion injury by hydrogen gas in rat livers from donors after cardiac death)

【背景と目的】肝移植は末期肝疾患の根治療法だが、慢性的なドナー不足は世界的に重要な課題である。ドナー源拡大のために心停止後ドナーからの臓器提供が（Donation after Cardiac Death; DCD）などの従来の適応基準を逸脱したグラフトの利用が注目されている。これらのグラフトは虚血再灌流障害（IRI）に対して脆弱であり、移植後にグラフト機能不全を起こしやすい。この理由として DCD グラフトを用いた肝移植では、心停止による温虚血（低酸素)、その後の冷虚血（低温、低酸素)、再灌流（再加温、再酸素化）の 3 段階で障害が進行する。エネルギー欠乏と低温により、能動輸送の停止（ATPase 依存性ポンプ）と、引き続く Na^+、Ca^{2+}の蓄積、Ca^{2+}依存性の障害性タンパク質の活性化が惹起され、タンパク分解、活性酸素種生成、細胞骨格タンパク質脱重合等が起こる。低温ではこれらの変化は類洞内皮細胞、クッパー細胞で起こり、炎症や微小循環障害のトリガーとなる。温虚血では肝細胞も傷害され、再灌流時にクッパー細胞やリンパ球、好中球、血小板の活性化と相まって、活性酸素種、炎症性サイトカイ・ケモカインの放出、類洞収縮、凝血や血球塊の形成を介して、酸化ストレス、微小循環障害、細胞死シグナルが増強される。再灌流時の治療で水素ガス（Hydrogen gas; H_2）は医用ガスとして近年注目され、ラットやマウスの肺、心臓、腎臓、小腸、肝臓などで IRI を軽減し、様々な実験系で抗酸化、抗炎症、抗アポトーシスが報告された。当研究室では、長期冷保存後のラット肝臓の再灌流時に H_2 を投与し、IRI の軽減に成功した。しかし、より高度の障害が惹起される DCD 肝の冷保存後再灌流における、再灌流時 H_2 投与の有効性は検討されていない。

本研究の目的は 1)DCD 肝の冷保存後再灌流において再灌流時 H_2 投与の有効性を評価し、2）H_2 の肝保護作用機序を明らかにすることである。

【材料と方法】

動物実験は「北海道大学動物実験に関する規定」に従い、当該実験倫理委員会の承認のもと実施した。ラットを深麻酔により心停止させ、30 分後に門脈にカニュレーションし、1000IU のヘパリンを含む室温の生理食塩水で肝臓を脱血した。その後、4℃の University of Wisconsin（UW）液でフラッシュ後に肝臓を摘出し、同液に浸漬し冷保存した。4 時間後にグラフトを単離肝灌流装置（Isolated Perfused Rat Liver; IPRL）で 90 分間、再灌流した。

実験群は 3 群を作成した（各 n=6)。対照群（CT)：心停止をさせずに肝臓を摘出し、冷保存

せずに直ちに再灌流した。無治療群（NT）：30 分の温虚血(心停止)後、4 時間冷保存し、再灌流した。水素投与群（H_2）：NT 群と同様の条件で肝臓を摘出、冷保存し、再灌流時に H_2 を投与した。
IPRL の条件は、グルコースとタウロコール酸ナトリウムを添加した Krebs Henseleit bicarbonate buffer（KHB）を用い、再循環システム、12cmH2O で定圧灌流した (総量 300mL)。KHB は、IPRL において広く使用されている、細胞外液を模した晶質緩衝液である。KHB はハミルトン肺で酸素化した (450< pO2<550 mmHg)。H_2 群ではガラスボトルに封入した水素飽和させた KHB を総流量の 4%を側管から投与した。
灌流中に門脈抵抗（portal vein resistance; PVR）、胆汁産生量 (uL/g liver /90min)、酸素消費率（Oxygen consumption rate; OCR）を評価した。再灌流後の灌流液中 AST、ALT、LDH 活性を測定した。再灌流後の肝組織の組織障害[ヘマトキシリンエオジン（HE）染色]、アポトーシス[terminal deoxynucleotidyl transferase; TUNEL 染色]、ATP 量、GSH/GSSG 比、過酸化脂質量を測定した。また、再灌流後の肝組織の細胞質の MKK4、JNK、caspase3、c-Fos、c-Jun、ASK1、p38 MAPK、ERK1/2、p90RSK、PI3k、PDK1、Akt、mTOR をウエスタンブロット法で評価した。
【結果】
1）肝障害：肝障害 (HE 染色)、アポトーシス (TUNEL 染色)、再灌流後 90 分の灌流液 ALT、LDH 活性が、H_2 群では NT 群と比較し有意に低下した。
2）微小循環：PVR は H_2 群では NT 群と比較し有意に低下した。
3）ミトコンドリア機能：灌流後 90 分の ATP 産生量、OCR は H_2 群では NT 群と比較し有意に増加した。
4）肝の統合的機能：胆汁産生量は H_2 群では NT 群と比較し有意に増加した。
5)レドックスと過酸化脂質： GSH/GSSG は H_2 群では NT 群と比較し還元側へシフトした。過酸化脂質量は群間に有意差を認めなかった。
6）炎症・細胞死、生存シグナル：H_2 群では NT 群と比較し、MKK4、JNK のリン酸化、Caspase3 の分解 (活性化)が抑制された。その他の炎症に関連するシグナル（c-Fos、c-Jun、ASK1、p38 MAPK、ERK1/2、p90RSK）、生存に関連するシグナル（PI3k、PDK1、Akt、mTOR）のリン酸化は NT 群と H_2 群の間に有意差を認めなかった。
【考察】
本研究ではラット DCD 肝の冷保存後の再灌流に対する再灌流時の H_2 投与が IRI を軽減することを示した。H_2 投与により微小循環の改善、ミトコンドリア機能の維持、適切なレドックス状態の維持が認められた。その結果、細胞死が抑制され、グラフト障害が軽減され、統合的な肝機能が改善された。H_2 は MKK4-JNK 経路による障害を抑制することが初めて示された。本研究はグラフト因子のみの評価だが、今後、移植モデルで H_2 の効果を検証し、レシピエント因子に対する効果も検討する必要がある。
【結論】
H_2 の再灌流時投与は、ラット DCD 肝の冷保存後再灌流における IRI を軽減した。MKK4-JNK 経路の抑制がその作用に関与することが明らかになった。