

主論文の要旨

**Inhibition of Toll-like receptor 4 ameliorates  
experimental postischemic injury in the cholestatic  
liver through inhibition of high-mobility group box  
protein b1 (HMGB1) signaling**

Toll-like receptor 4 阻害剤はラット胆汁鬱滞モデルにおいて  
high-mobility group box protein b1 (HMGB1)活性を抑制して  
虚血再灌流後肝障害を軽減する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：榑野 正人 教授)

横井 剛

## 【緒言】

肝虚血再灌流 (I/R)は術後肝障害・肝不全の一要因であり、I/R 後肝障害を軽減させることは安全に肝切除を行う上で極めて重要である。肝門部胆管癌患者は一般的に胆管閉塞状態となっており、肝外胆管切除を伴う大量肝切除を必要とする。胆汁鬱滞性肝に対し術前胆道ドレナージなしで大量肝切除を安全に施行し得るという報告もあるが、明らかなコンセンサスは得られていない。

胆汁鬱滞性肝における I/R 後肝障害は Toll-like receptor 4 (TLR4)が重要な役割を果たしている。TLR4 は pathogen associated molecular pattern-molecules (PAMPs) と damage associated molecular pattern-molecules (DAMPs)によって活性化される。PAMPs はエンドトキシンによって伝達され、DAMPs は障害組織から放出された HMGB1 により伝達される。我々は TLR4 と HMGB1 が胆汁鬱滞性肝における I/R 後肝障害において重要な役割を果たしているという仮説を立てこれを検証した。また、TLR4 阻害剤 TAK242 を I/R 前に投与することによって胆汁鬱滞性肝における I/R 後肝障害が軽減され得るかについても検討した。

## 【対象及び方法】

Wister 系ラット (250~300g、雄) を単開腹群 (sham) ・胆管結紮群 (BDL) ・単開腹後虚血再灌流群 (sham I/R) ・胆管結紮後虚血再灌流群 (BDL I/R) に分け、それぞれの群に 6~12 匹を割当てた。初回手術では BDL 群と BDL I/R 群に対しては胆管を結紮し、sham 群と sham I/R 群に対しては胆管の授動のみを行った。7 日後に再開腹し、sham I/R 群と BDL I/R 群に対しては肝十二指腸靱帯のクランプを 30 分間行い、sham 群と BDL 群に対しては肝十二指腸靱帯の授動のみを行った。sham I/R 群と BDL I/R 群の各 6 匹に対し I/R 手技 15 分前に TAK242 (1mg/kg) を経静脈投与した。再手術 4 時間後に犠牲死させ、血液と肝組織を採取し分析した。

血液検査では血清中のエンドトキシン値と肝逸脱酵素値を測定した。肝組織はパラフィンブロック薄切標本 (試料) を HE 染色し、切片毎に無作為に選んだ 5 視野から肝壊死面積を測定した。さらに他の試料を TLR4 で免疫染色した。血清 HMGB1 発現量は ELISA 法を用いて測定した。肝内 TLR4 発現量と肝内炎症関連遺伝子 (IL-1 $\beta$ 、IL-6、iNOS、CCL2)発現量を RT-PCR 法を用いて測定した。

多群間比較は一元配置分散分析を用いて解析した。2 群間比較は正規分布であれば Student t 検定を用いて解析し、非正規分布の場合は Mann-Whitney U 検定を用いた。2 因子間の相関は Pearson 相関係数を用いて計算した。すべての結果は平均±標準誤差で示した。

## 【結果】

### 1. 肝内 TLR4 発現

肝内 TLR 発現は sham 群に比べて BDL 群で有意に高値であった (Fig 1A)。I/R が加わると、さらに高値となった。免疫染色では BDL I/R 群が他群と比較して類洞沿い

の TLR4 発現がより強く認められた。

## 2. 血液検査

血清 AST、ALT 値は sham I/R 群と BDL I/R 群で、I/R を施行しなかった群と比較して有意に上昇した。Sham I/R 群では TAK242 を投与しても Sham 群と比べ AST、ALT 値に有意差を認めなかったが、BDL I/R 群では TAK242 の投与により BDL 群と比べこれらの値は有意に低下した (Fig 2A、2B)。肝内 TLR4 発現量は AST 値と相関を示した ( $r=0.575$ ,  $P<0.001$ )。血清エンドトキシン値は TAK242 の投与に関わらずすべての群で測定不能であった。

## 3. 肝壊死面積

Sham 群と sham I/R 群において肝壊死は観察されなかった。BDL 群では主に門脈周囲に肝壊死が観察された (Fig 2C)。BDL I/R 群では BDL 群と比較して肝壊死面積が有意に大きく、この変化は TAK242 の投与により抑制された (Fig 2C、2D)。肝内 TLR4 発現量は肝壊死面積と相関を示した ( $r=0.555$ ,  $P<0.001$ )。

## 4. 肝内炎症関連遺伝子発現

BDL 群における IL-1 $\beta$ 、IL-6、iNOS、CCL2 の遺伝子発現量は sham 群と比較して有意に高値であった。これらの値は BDL I/R 群でさらに上昇し、TAK242 投与により抑制された (Fig 3A-D)。

## 5. 血清 HMGB1 発現

BDL I/R 群の HMGB1 値は sham 群や BDL 群と比較して有意に上昇し、TAK242 投与により抑制された (Fig 4)。肝壊死面積( $r=0.235$ ,  $P=0.019$ )と同様に、HMGB1 値は AST 値と相関を示した ( $r=0.422$ ,  $P<0.001$ )。

## 【考察】

I/R 後に肝内 TLR4 発現が増加することは広く知られている。我々は以前に、胆汁鬱滞性肝では TLR4 発現が増加することを報告した。このことから、胆汁鬱滞性肝に I/R の侵襲が加わると TLR4 発現がさらに増加し、肝障害が増悪するという仮説を立てた。予想通り、胆汁鬱滞性肝に I/R を加えることにより血清肝酵素の上昇と共に TLR4 が高度に上昇することが明らかとなった。

Sham I/R 群において肝壊死が観察されなかったのに対し、BDL I/R 群で過剰な肝壊死が観察されたことは、胆汁鬱滞性肝が正常肝と比較し I/R の侵襲に対して感受性が高まっていることを示している。AST 値と肝内 TLR4 発現量は強い相関を示し、HMGB1 値とも相関を示していた。これは胆汁鬱滞性肝における I/R 後肝障害のメカニズムとして、TLR4 シグナル伝達と血中 HMGB1 放出が重要であることを示唆している。

術前胆道ドレナージが困難な状況下で肝切除を施行せざるを得ない場合、術後肝障害を軽減させることは重要である。本研究では TLR4 阻害剤である TAK242 を投与することによって血清肝酵素、肝壊死面積、肝内炎症関連遺伝子発現が有意に抑制された。この結果は、胆汁鬱滞性肝において TLR4 シグナル伝達を阻害することで I/R 後

肝障害が軽減されるということを強く支持するものである。

本研究では血清中エンドトキシンが検出されなかった一方で、BDL I/R 群では HMGB1 が高値であった。この結果は BDL I/R 群における重度の肝障害は PAMPs ではなく DAMPs を介して惹起されることを示唆している。興味深いことに、BDL I/R 群において TAK242 を投与することにより HMGB1 が有意に低下していた。以上より TAK242 により TLR4 が阻害されることで、重度の炎症反応が抑制され、胆汁鬱滞性肝における I/R 後肝障害の悪循環を断っているという仮説が成り立つと考察する (Fig 5)。

#### **【結語】**

胆汁鬱滞性肝に対し I/R が加わると重度の肝障害と肝内 TLR4 発現の上昇を引き起こす。TAK242 を投与することにより TLR4 発現およびその活性が阻害され、閉塞性黄疸肝に対する I/R 後肝障害が抑制される。TLR4 阻害剤は、閉塞性黄疸下での大量肝切除を必要とする患者に対する治療選択肢となり得る。