

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11525

研究課題名(和文)最先端リポミクス解析を用いた 3系脂肪乳剤の抗炎症効果に関する研究

研究課題名(英文)An investigation on anti-inflammatory effect of omega-3 fatty acid lipid emulsion by lipidomic analysis

研究代表者

渡邊 稔彦(WATANABE, Toshihiko)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：50306734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：6週齢のC57BL6マウスに液体の高炭水化物食を与え、脂肪変性の程度を評価すると、肝臓は肉眼的に脂肪投与群で経日的に黄色調の色調を帯び、肝臓重量も経日的に増加した。病理学的にもHE染色で、14日目よりびまん性の脂肪変性を認め、21日では脂肪変性はより重篤となっていた。このマウス肝臓脂肪変性モデルに大豆油由来(S:Intralipid)、魚油由来(F:omegaven)、総合的(C:SMOFlipid)脂肪乳剤を投与して脂肪変性の程度を評価した。肝機能障害(ALT)は3群とも有意差をもって改善した。病理はHE染色にて、F群では脂肪変性は完全消失、S・C群では脂肪滴が縮小し重症度は改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスの脂肪変性モデルを作成し、現在市販されている3種類の脂肪乳剤である大豆油由来(S:Intralipid)、魚油由来(F:omegaven)、総合的(C:SMOFlipid)脂肪乳剤を投与して、脂肪変性の改善を評価した。魚油由来の総合脂肪乳剤で、大豆油由来の脂肪乳剤に比べ、顕著な脂肪変性の改善が認められた、炎症性サイトカインの抑制も同時に認められた。この結果を網羅的なリポミクス解析で探索してみると、18-HEPE系のレゾルビン代謝経路の代謝物に活発な代謝が行われていた。以上から、この経路が脂肪変性を改善したメカニズムであると考えられ、抗炎症作用の発揮に重要な機能を有していると思われる。

研究成果の概要(英文)：High carbohydrate diet was given to C57BL6 mice to establish murine hepatic steatosis model. Liver appearance was changes to slightly yellowish over time. Fish oil strikingly improved hepatic steatosis rather than soybean oil or composite oil. Lipidomic analysis revealed massive metabolic product of 18-HEPE channel was evident in Fish oil group which was thought to be the mechanism of anti-inflammatory effect of Fish oil in this murine model.

研究分野：小児外科

キーワード：3系脂肪乳剤 3系脂肪酸 リポミクス解析 短腸症 小腸機能不全関連肝障害 IFALD 抗炎症効果 メカニズム

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児における小腸機能不全関連肝機能障害 (IFALD)

小児において小腸機能不全の 60% の患者に肝疾患は起こるとされ、これは解剖学的に短腸症であるか、または蠕動運動の機能不全の患者の長期の静脈栄養依存に起因する。IFALD は、文献的に 25-40% の頻度で慢性的な肝不全に陥る致死的な合併症である¹⁾。残存腸管機能を十分に活用・回復させるため、栄養療法・薬物療法・外科的治療・臓器移植までを包括して、各専門診療科が情報を共有して集学的治療を行う Intestinal Rehabilitation Program の考えが提唱され治療成績を向上してきた²⁾。しかし、本邦の全国調査では、354 例の小腸機能不全の患者が登録され、6 か月以上の静脈栄養を必要とした 184 例 (52%) のうち、IFALD による死亡例は 44 例 (25%) と報告され³⁾、依然 IFALD の効果的な治療法の開発は大きな課題である。

(2) 3 系脂肪酸の抗炎症効果と IFALD に対する有効性

1971 年に実施されたグリーンランドにおける疫学調査において、イヌイット族の急性心筋梗塞の発症が少ないことが認められてからその食生活に注目が集まり、動脈硬化や心筋梗塞、認知症、骨粗鬆症において 3 系脂肪酸の疾病予防効果について数多くの研究が行われてきた。近年では悪性腫瘍の治療や周産期分野での早産予防など、多岐にわたる病態で 3 系脂肪酸による抗炎症効果の有効性が報告されている。小児では重篤な大豆アレルギーを持つ必須脂肪酸欠乏の患児の治療に魚油由来である 3 系脂肪乳剤 (omegaven®) を使用した際、必須脂肪酸欠乏の改善とともに黄疸や肝機能異常の改善が観察されたことを契機に、ボストン小児病院やトロント小児病院において、外科的疾患による短腸症候群で IFALD を呈した症例において omegaven® の有効性と安全性が示された。我々が行った本邦の omegaven® の使用状況の調査⁴⁾ では、登録された 74 例のうち 68.6% の患児で有効性を認め、IFALD の標準的な治療法として期待されている。近年では、大豆油 (30%)、MCT (30%)、オリーブオイル (25%)、魚油 (15%) からなる総合脂肪乳剤である SMOF lipid® は、3 系脂肪酸が加わることで、従来大豆油の暴露を減少することにより、小児の IFALD の予防に有効であることが RCT により証明された⁵⁾。しかしながら、これらの 3 系脂肪乳剤、omegaven® と SMOF lipid® の両者について、IFALD の治療や予防に対する優劣、役割の分担についてはいまだ確立されていないことに加え、これら脂肪乳剤の有効性のメカニズムについては解明されていない。さらに、これらの脂肪乳剤は未だ本邦では薬事未承認の医薬品であり IFALD を呈する患児への投与は困難な現状が続いている。

(3) 最先端リピドミクス解析システムによる脂肪酸代謝と炎症制御メカニズムの解明

炎症反応は病原体や障害組織の効率的な除去のために必須の生体防御機構である。一方で、一旦誘発された炎症反応は適切に収束する必要があり、この制御機構が破綻すると慢性炎症から癒痕を形成し、組織の機能障害を伴う病態へと発展してしまうとされる。体内の脂肪酸バランスの変化が炎症を基盤病態とする様々な疾患に対して強い影響を及ぼすことから、炎症を制御するサイトカインやケモカインに加えて、近年では脂質メディエーターの役割に注目が集まっている。3 系脂肪酸である EPA や DHA は従来アラキドン酸経路に対して拮抗することで抗炎症作用を発揮すると考えられてきたが、最近の研究により EPA や DHA もアラキドン酸と同様に脂質酸化酵素により、レゾルピンやプロテクチンなどの抗炎症性代謝物に変換されることが明らかにされ、これら化合物にも低用量で強力な抗炎症作用、組織保護作用が認められている。研究連携者である有田らは、生体に微量かつ一過性しか存在しない脂肪酸代謝物を好感度に測定する LC-MS/MS を用いた脂肪酸代謝の一斉定量分析システム (最先端リピドミクス解析システム) を確立した⁶⁾。このメタボローム解析システムを用いることにより、これまで証明されなかった IFALD における 3 系脂肪乳剤の治療過程における特定の脂肪酸代謝経路の存在、生成する活性代謝物のバランスについて、包括的かつ定量的に捉えることができる。

2. 研究の目的

新生児・未熟児の小腸機能不全を呈する外科的疾患において、長期の静脈栄養に起因する肝機能障害の罹患率は高いまだ致死的な合併症である。omegaven® と SMOF lipid® などの 3 系脂肪乳剤の登場により、治療成績は大きく向上したが、これらの IFALD の治療や予防に対する優劣や役割の分担は確立されていない。最先端リピドミクス解析によりこれら脂肪乳剤の脂肪酸代謝経路で生成される脂肪酸活性代謝物のバランスを包括的かつ定量的に捉え、抗炎症効果の分子機構のメカニズムを解明し、IFALD の魚油由来脂肪乳剤による標準的治療を検証することを目的とした。これまで我々は外科的疾患による小児の IFALD に対して omegaven® を使用して奏効率は約 80% と高く有害事象も認めなかった。IFALD では植物ステロールが蓄積し直接ビリルビンと有意な相関があり、omegaven® により肝線維化も改善し得ることを報告してきた。海外の新たな SMOF lipid® の良好な成績から、将来的な 3 系脂肪乳剤の薬事承認を考慮すると、omegaven® と SMOF lipid® の両者について、IFALD の治療や予防に対する優劣や役割の分担を検証し標準的治療を確立するための基礎研究が必要との発想に至った。動物実験で omegaven® と SMOF lipid® の有効性の優劣の証明することができ、またこれら脂肪乳剤の治療過程のメタボローム解析を行うことにより、その抗炎症効果の分子機構のメカニズムが解明されることが期待できる。

3. 研究の方法

マウスの肝臓脂肪変性モデルを用いて、脂肪乳剤の経静脈的投与を行う基礎的な実験を行う。

(1) 脂肪乳剤の治療効果

血液生化学的検査、病理組織、肝臓内脂肪分画、を検討して脂肪乳剤による肝脂肪変性の治療効果の程度を検証する。

(2) 最先端リピドミクス解析による活性代謝物の解析

脂肪乳剤の治療前後でのメタボローム解析を行い脂肪酸代謝経路で生成される活性代謝物を網羅的、定量的に解析する。

(1) 脂肪乳剤による肝脂肪変性の治療効果の検討

マウスの肝臓脂肪変性モデル

6週齢の C57BL6 マウスに、液体の高炭水化物食を 21 日間与える。液体の高炭水化物食は小児の静脈栄養を行う標準的な静脈栄養剤を用い、20%デキストロース、2%の必須・非必須アミノ酸、0.2%の微量元素、総合ビタミン、電解質、で組成される。標準的なげっ歯類の餌を与えた群を negative control として準備する。

脂肪乳剤の経静脈的投与による治療

生理食塩水、および大豆油由来(Intralipid®)、魚油由来(omegaven®)、総合的(SMOF lipid®)脂肪乳剤を、2.4g/kg/day の dose で尾静脈より 1 日おきに静脈注射を 7 回 (14 日間) 行った後に、犠死させ、以下の分析を行う。

検討項目

1. 肉眼的肝臓外観と重量

脂肪乳剤治療前後に犠死させたマウスの肝臓を摘出して、外観を観察しデジタルカメラにて記録し、重量を測定する。

2. 血液生化学的検査

肝細胞障害の指標として、血清 AST/ALT を測定する。

3. 血清および肝臓中の脂肪酸分画

血清、およびホモナイズした肝臓から脂質を抽出して、ガス液体クロマトグラフィー法を用いて、脂肪酸分画の評価を行う。

4. Myeloperoxidase(MPO)活性

肝臓凍結標本を用いて、肝臓への好中球浸潤の指標として MPO 活性を測定する。

5. 炎症性サイトカイン産生

RT-PCR 法により、炎症性サイトカイン (IL-1、TNF- α)、Th1 サイトカイン (IFN- γ 、IL-2)、および Th2 サイトカイン (IL-4、IL-6、IL-13) の定量を行う。

6. 病理組織学的検討

H E 染色、および oil red O 染色を行い、肝臓脂肪変性の程度を評価する。

(2) メタボローム解析による活性代謝物の解析

7. 脂肪酸代謝物のリピドミクス解析

肝臓をホモナイズして、脂肪酸代謝物は固層カラムを用いて抽出され、HPLC で分離された後に、三連四重極型 MS による multiple reaction monitoring(MRM)によって、分子構造特異的な検出による高感度な定量分析を行う。脂肪乳剤治療前、治療後 3 日、治療後 7 日の 3 ポイントでリピドミクス解析を行い、脂肪酸代謝物の生成の経時的変化を検討する。

8. 3系脂肪酸特異的代謝経路の活性代謝物の同定

EPA から 18-HEPE への 3系脂肪酸に固有のものであるが、この 18-HEPE 系から生成する代謝物である 17,18-dihydroxy eicosapentaenoic acid (17,18-diHEPE : RvE3) は低用量で強力な抗炎症効果を発揮する活性代謝物とされる 8)。また EPA の 17,18-EpETE から生成する新規代謝経路から同定された 12-OH-17,18-EpETE にも強力な抗炎症活性が見出されている 9)。これらの強力な抗炎症効果のある活性代謝物の推移に注目し、Intralipid®、omegaven®、SMOF lipid® の 3 群のリピドミクス解析結果 (MRM クロマトグラム) を検討する。

4. 研究成果

(1) マウス肝臓脂肪変性モデル・・・6 週齢の C57BL6 マウスに液体の高炭水化物食を与え、7 日、14 日、21 日で犠死させ、脂肪変性の程度を評価。肝臓は肉眼的に脂肪投与群で経日的にわずかな黄色調の色調を帯びた。肝臓重量は、経日的に 7 14 日は 1.23 倍、14 21 日では 1.52 倍に増加した。血液生化学的な肝障害 (ALT) は、脂肪投与群の 14 日目では 7 日、対照群に比べ変化はなかったが、21 日目には有意差を認めた。病理学的には HE 染色で、14 日目よりびまん性の脂肪変性を認め、21 日では脂肪変性はより重篤となっていた。環境因子による実験結果の差異がないことを確認した。

(2) 脂肪乳剤の経静脈的投与による治療

液体の高炭水化物食を 21 日与え、大豆油由来 (S: Intralipid)、魚油由来 (F: omegaven)、総合的 (C: SMOFlipid) 脂肪乳剤を 2.4g/kg/day の dose で尾静脈より 1 日おきに静脈注射を 7 回 (14 日間) 行った後に犠死させ、脂肪変性の程度を評価した。肝臓の肉眼的外観は S/F/C 群 3 群ともに黄色調の色調が改善した。肝臓重量は 3 群ともに治療前より減少した。肝機能障害 (ALT) は 3 群とも正常値まで有意差をもって改善した。病理は HE 染色にて、F 群では脂肪変性は完全消失、S・C 群では脂肪滴の縮小が見られ重症度は改善した。

(3) メタボローム解析による活性代謝物の解析・・・脂肪乳剤治療前、治療後 3 日、治療後 7 日の 3 ポイントでリポミクス解析を行い、脂肪酸代謝物の生成の経時的变化を検討。18-hydroxyeicosapentaenoic acid (18-HEPE) を前駆体とした代謝物は F 群と S 群、C 群と S 群の間で有意に上昇していたが、F 群と S 群には有意差はなかった。3 系脂肪酸の代謝産物を網羅的に定量化しているが、18-HEPE 系のレゾルビン代謝経路の代謝産物は、17, 18-EpETE 系の代謝産物に比べ生成量が多く、どの代謝経路に多く代謝が行われているかの流れについて網羅的メタボローム解析の全貌の分析を行っている。

(4) 炎症性サイトカイン評価・・・F 群や C 群では S 群に比べ、炎症性サイトカイン投与 (TNF-) は有意に上昇していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 渡辺稔彦、藤野明浩、金森豊	4. 巻 119(6)
2. 論文標題 IFALDに対する魚油由来脂肪乳剤の最新の知見	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 652-657
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 渡邊稔彦 竹添豊志子 大野通暢 田原和典 藤野明浩 菱木知郎 淵本康史 藤本桂子 伊藤裕司 新井勝大 金森豊	4. 巻 51(2)
2. 論文標題 IFALDに対する魚油由来脂肪乳剤の治療成績	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 外科と代謝・栄養	6. 最初と最後の頁 79-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺稔彦、朝長高太郎、大野通暢、田原和典、藤野明浩、伊藤裕司、新井勝大、金森豊
2. 発表標題 IFALDに対する 3系脂肪乳剤の有効性と脂肪酸分画解析による予後予測に関する研究
3. 学会等名 第34回日本静脈経腸栄養学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----