

令和 3 年 5 月 15 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16998

研究課題名（和文） 3系脂肪酸による肝線維化抑制機構

研究課題名（英文） Mechanism of suppression of liver fibrosis by omega-3 fatty acids

研究代表者

渡部 亮 (Watanabe, Ryo)

秋田大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80638255

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：小児外科分野において治療の確立が望まれるIFALDおよび肝硬変であるが、3系脂肪酸製剤が有用であることが報告されつつある。その機序はいまだ不明である。一方、肝線維化には肝星細胞が関与することが広く知られている。本研究では3系脂肪酸製剤が肝星細胞に対し、活性化を抑制すること、その結果コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの産生を抑制することを示した。3系脂肪酸製剤が肝星細胞を介する機序でIFALDを抑制している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管不全関連肝障害（IFALD）は一部の小児外科疾患が原因で引き起こされる腸管不全の致命的な合併症であり、その機序の解明及び治療法が急務であるが、いまだ多くが解明されていない。一方で動物実験や臨床試験において、3系脂肪酸製剤がIFALDの改善または発症を遅らせることが報告されている。本研究は3系脂肪酸製剤がなぜ肝障害を抑制するのか、その一端を説明できる可能性を含んだ結果を得ることができ、本邦ではいまだ保険適応外である3系脂肪酸製剤の認可、さらにはより有効な治療薬の開発に一步前進するものである。

研究成果の概要（英文）：IFALD and liver cirrhosis are one of the diseases for which treatment should be established in the field of pediatric surgery, and it has been reported that 3 fat preparations are useful for IFALD. The mechanism is still unknown. On the other hand, it is widely known that hepatic stellate cells are involved in liver fibrosis. In this study, it was shown that 3 fat preparation suppresses activation of hepatic stellate cells, and as a result, suppresses the production of extracellular matrix such as collagen. It was suggested that 3 fat preparations may suppress IFALD by a mechanism mediated by hepatic stellate cells.

研究分野：小児外科学

キーワード：IFALD 肝硬変 3系脂肪酸製剤 肝星細胞

## 1. 研究開始当初の背景

腸管不全 (Intestinal failure: IF)とは小児においては成長に十分な栄養と水分を吸収するための最低限の小腸容積または機能の重大な低下、と定義される。一般に小腸の70~80%が切除されると短腸症候群とされ、厳密な栄養管理、特に静脈栄養が必須となる。

小児外科において短腸症候群の原因疾患としては腹壁破裂、中腸軸捻転、先天性腸閉鎖、壊死性腸炎、Hirschsprung 病類縁疾患などがある。IFにおける長期静脈栄養は肝障害を併発し、IFALD (intestinal failure-associated liver disease)と呼ばれている。IFALDは新生児、乳児には致命的となり得る。

しかし、IFALDへの進行を抑制する方法、IFALDが完成された場合の有効な治療法は未だに解明されておらず、今現在、本邦ならびに世界中の小児外科医・新生児科医の解決すべき課題の一つである。

## 2. 研究の目的

近年、IFALDに対する魚油由来 3系脂肪酸製剤である Omegaven の有用性が報告されている。その機序は抗炎症作用、胆汁流出改善、肝脂肪化の減少と言われているが、未だ不明である。

一方、肝線維化、肝硬変の進行にはコラーゲンなどの ECM (extracellular matrix) 産生の担い手である肝星細胞の関与が知られている。肝星細胞は Disse 腔と呼ばれる、肝実質細胞と Sinusoidal endothelial cells の間隙に存在し、生体のビタミン A の多くをレチニルエステルとして細胞内脂肪滴に貯蔵している。肝星細胞は肝障害などの病的条件下ではビタミン A 貯蔵能を失い、筋線維芽細胞へと形質転換し、増殖し、Collagen type などの ECM を産生する。これを活性化と呼ぶ。この活性化には肝実質細胞や Kupffer 細胞、内皮細胞、血小板などからの TGF-1 や PDGF が関与する。

上述の様に未だ機序が不明であり、IFALD に対し明確な有効性が示されていない 3系脂肪酸製剤の有用性を、肝星細胞を中心とした研究で明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### ・ LX-2 培養

ヒト肝星細胞株 LX-2 (EMD Millipore Corp, USA)を用いた。10%FBS (Thermo Fisher Scientific, USA)とペニシリン/ストレプトマイシンを含有させた DMEM を 37 度、5%の CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。すべての培養液に 5 nM となるよう TGF- 1(Wako,Japan)を添加し、DMEM のみ (コントロール)、intralipid (Fresenius Kabi, German)添加、omegaven (Fresenius Kabi, German)添加、の 3 群を作成した。

### ・ 蛍光染色およびレーザー走査型顕微鏡

LX-2 をガラスカバースリップに、intralipid(0.1mg/ml)、omegaven(0.1mg/ml)、DMEM のみの 3 条件で 48 時間培養した。なおすべての群に 5nM の TGF- 1 を添加している。細胞を固定し、細胞核を DAPI、脂肪滴を Adipocyte Fluorescent Staining kit (Cosmo Bio, Japan)で染色した。また、細胞骨格を F-Actin Visualization Biochem kit (Cytoskeleton, Inc, USA)を用いて染色した。観察は LSM780 Laser Scanning Microscope (Carl Zeiss, German)を用いた。

### ・ 細胞増殖能評価

前述と同様の 3 群を作成し、72 時間ごとに 0.25%トリプシンで細胞を回収し個数をとるパンプルを用いて計測し、再度培養した。12 日目まで行った。

### ・ RNA 抽出と qRT-PCR

LX-2 を Trizol 試薬 (Thermo Fisher Scientific, USA)で溶解し、プロトコールに従ってください RNA を単離した。各サンプルについて、Transcriptor First Stand cDNA 合成キット (Roche, Switzerland) を使用して 300ng の RNA を cDNA に転写した。cDNA の定量化は、LightCycler DNA Master SYBR Green (Roche, Switzerland) を使用して、製造元の指示に従って行った。PCR は n=3 で施行し、標準偏差を計算した。転写産物は GAPDH で補正した。

・データ解析

データは、一元配置分散分析またはスチューデントの t 検定を使用して分析した。統計的有意性は、Prism6 ( GraphPad、USA ) を使用し決定した。データは、 $p < 0.05$  で統計的に有意であると見なした。

4 . 研究成果

Omegaven 群は、コントロール群、Intralipid 群に比べ細胞内脂肪球を多く認めた。また、F-Actin 染色において Omegaven 群は他の群に比べ細胞形態が小さく楕円形の傾向にあり、樹状用の突起を伸展する傾向にある他の群の形態とは異なっていた ( 図 1 )。

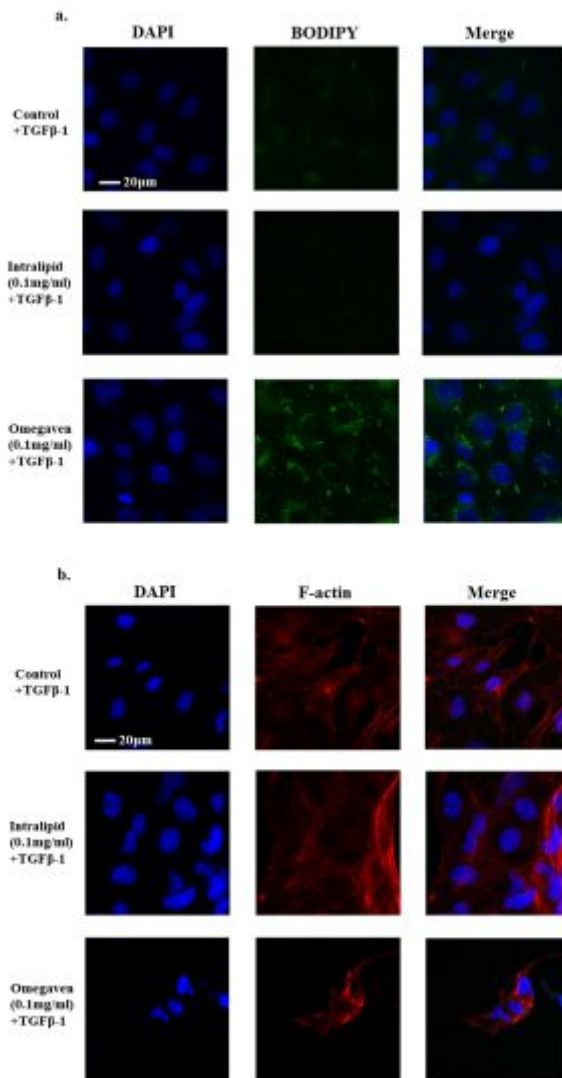


図 1

細胞増殖能は 3 群間に有意差を認めた。つまり Omegaven 群は他の群に比べ、有意に細胞増殖能が低い。肝星細胞は活性化されると増殖が促進される細胞である ( 図 2 )。

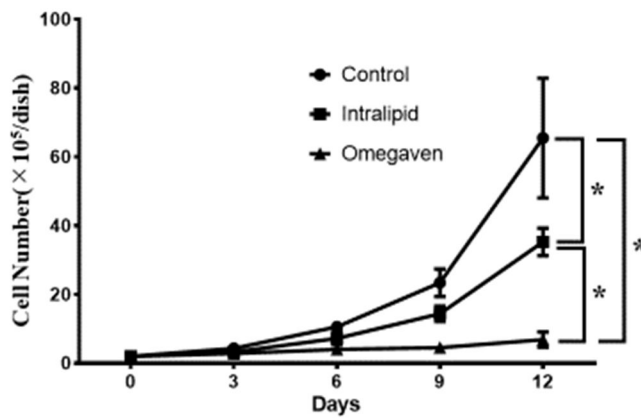


図 2

RT-PCR では、Omegaven 群はコントロール群に比べ Collagen1a1 と SMA の発現が有意に低かった。Collagen1a1 は hepatic stellate cell が活性化すると産生する ECM である。また SMA は細胞骨格であると同時に筋線維芽細胞のマーカーである。

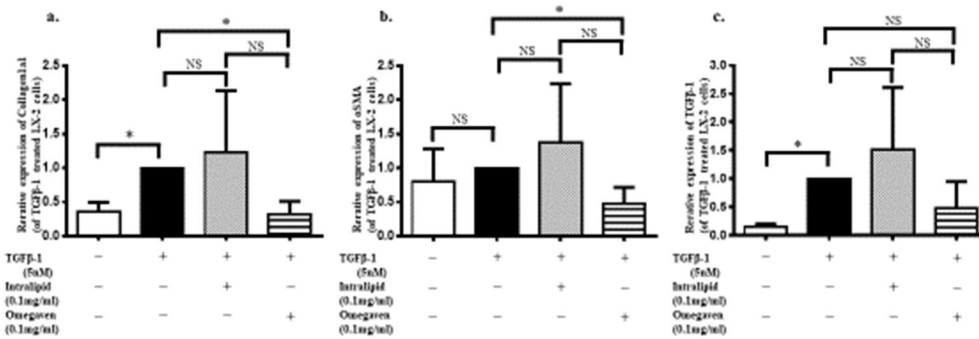


図 3

以上より、Omegaven が肝星細胞の活性化を抑え、ECM 産生を抑制することで IFALD に対して有効である、という新たな機序の可能性が示唆された。本研究をまとめ、近日中に欧文誌へ成果を投稿する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡部亮、森井真也子、蛇口琢、山形健基、吉野裕顕、中西広樹、佐々木雄彦
2. 発表標題 3系脂肪酸によるヒト肝星細胞株の細胞外マトリックス産生への影響
3. 学会等名 第56回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡部亮、森井真也子、蛇口琢、山形健基、林海斗、吉野裕顕、中西広樹、佐々木雄彦
2. 発表標題 ヒト肝星細胞株の細胞外マトリックス産生に対する 3系脂肪酸製剤の影響の検討
3. 学会等名 日本外科代謝栄養学会第56回学術大会
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------