

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09088

研究課題名(和文) 脂肪肝グラフトの脂肪滴を有効利用する画期的な保護性タンパク質機能の賦活法の探索

研究課題名(英文) Exploration of the new method to stimulate protective protein function during machine perfusion of steatotic graft

研究代表者

若山 顕治 (Wakayama, Kenji)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：50646544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝移植時に脂肪肝は冷保存再灌流傷害を受けやすい。移植前に再灌流後の傷害を予測するマーカーを見出し、障害機構を解明できれば、脂肪肝移植の安全性が向上する。本研究ではラットの安定した脂肪肝モデルを作成し、正常肝、脂肪肝に虚血ストレスを負荷し、その肝臓を質量分析イメージング(IMS)法で評価した。リソフォスファチジルコリン(18:0)は脂肪化の程度に依らず、虚血中に虚血時間依存的に門脈域で増加し、再灌流障害の程度を事前に予測できることを明らかにした。他にも虚血時間を鋭敏に検出できる物質を見出し、臓器灌流におけるグラフト機能評価に有用な方法論になることが期待される結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IMS法により虚血中に虚血時間依存的に門脈域で限局的に起こる事象を捉えることに成功した。通常ホモジナイズして抽出する方法ではマスクされてしまう限局した変化を定量評価できることに意義がある。他にも再胆管構造中に限局して起こる変化もとらえており、単一の傷害予測マーカーを測定する方法というよりも、1つの方法で肝グラフトの状態を多角的に機能評価できる方法論と言える。今後、臓器灌流におけるグラフト機能評価に有用な方法論になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have established a reliable steatotic rat model and evaluated the time course of the potential prognostic markers of ischemia reperfusion injury (IRI) using MALDI imaging mass spectrometry (IMS) method. We found some promising candidates of injury markers, which could predict the severity of IRI due to the ischemic time regardless of the grade of the fatty change. Lysophosphatidylinositol (LPI) 18:0 showed excellent correlation with the post-reperfusion injury, such as blood ALT level and injury score. Furthermore, distribution of LPI (18:0) revealed the ischemia time dependent accumulation during ischemia, specific to the Zone1 area. Some other indices also showed a potential to predict IRI. Accordingly, IMS appeared to show its ability to detect regional subtle change due to the ischemic insult.

研究分野：臓器移植、臓器保存、臓器灌流、酸化ストレス

キーワード：肝移植 脂肪肝 機械灌流 脂肪滴 ミトコンドリア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦では肝移植待機患者の42%が移植を受けられずに死亡し、ドナー不足は依然深刻である(日本臓器移植ネットワーク2018)。脂肪肝の有病率が上昇し、今後脂肪肝ドナーの増加が見込まれるが、M3脂肪肝(60%<sup><</sup>)では移植片早期機能不全、Graft Lossの頻度が高く、解決策が必要である(Durand 2008)。正常肝の脳死肝移植における虚血再灌流傷害は、冷保存中に起こるエネルギー枯渇、ミトコンドリア機能不全、イオンバランスの破綻、臓器膨張、と引き続く、酸化ストレス、炎症、ネクローシス、アポトーシスの初期反応が、再灌流時の再酸素化と復温、臓器膨張により級数的に増強される病態である。脂肪肝ではそれらが増強され、抗酸化能、肝再生・生存シグナルの減弱も加わり高度の虚血再灌流傷害が惹起される。それ故、正常肝の虚血再灌流傷害軽減法に加え、脂肪肝特有の傷害要因解明と治療法探索が必要である。

脂肪肝は組織学的に肝細胞内の脂肪滴の大きさにより定義される。小胞体で生成した脂肪滴は細胞質で融合して大滴に成長する。脂肪滴内の反応や、Macroautophagy (Lipophagy)、Chaperone-mediated autophagy (CMA) 等により、TAGから遊離した脂肪酸(FFA)の一部はβ酸化によりエネルギーを産生する。しかし、細胞質に放出されたFFAの動態は殆ど解っていない。脂肪肝グラフトでは過剰な脂肪酸が脂質過酸化の連鎖反応を起こしやすく、電子伝達系酵素群を傷害する。Triacylglycerol、リン脂質、コレステロールから遊離する脂肪酸は炎症や細胞死シグナルを制御する脂質メディエータとなるが、肝臓内のリン脂質、脂肪酸の質と量が脂肪肝の虚血再灌流傷害の進展に果たす役割は完全には解明されておらず、リポドミクス解析による「脂肪毒性」の詳細な解析が有効な手段と考えられる。

酸素化体外灌流中の脂肪肝では、糖が供給されなければアミノ酸と脂質、脂肪酸が主なエネルギー源となる。臓器灌流の研究では、“生理的温度の方が良いに決まっている”とする風潮がある。しかし、エネルギー産生、脂肪代謝は温度降下の影響を受けにくく、灌流温度は37°Cである必然性はない。そもそも摘出されて他臓器や血液との相互作用が断たれた状態は十分に非生理的であり、温度だけを生理的にすることの正当性は保証されていない。Fatty acid binding proteinの発現増強、脂肪酸の取り込みを増加、ミトコンドリア膜の脂質組成改変と脂肪酸代謝促進等の多重的な適応が、魚や蛙で種を超えてミトコンドリアで起こることは興味深い(Fukai 2016 Organ Biol)。低温下で生命活動を維持する動物では脂肪滴は細胞質、ミトコンドリア、小胞体、核を繋ぐハブであり運搬体であり、エネルギー源である。冬眠中には体温(27-32°C)、飢餓状態(低糖)、脂肪滴の蓄積、酸素の供給等が保持される環境下でβ酸化賦活が生命活動の維持に重要なことを示している。臓器灌流、臓器保存において、脂肪酸β酸化からエネルギー産生のフローを進める至適条件を探索し、正常肝、脂肪肝の冷保存、灌流モデルにおいてミトコンドリア機能を制御、評価する方法論を確立することが急務である。

### 2. 研究の目的

本研究は脂肪肝の体外酸素化機械灌流の至適な灌流条件を確立し、脂肪肝の移植前に体外でコンディショニングすると共に、移植前とグラフト機能を評価し、予後予測マーカーを確立することを目指すものである。目的達成のために、自作の灌流液を冷保存、機械灌流に使用し、既存液を凌駕する臓器修復効果の優位性(少なくとも非劣性)を達成する。脂肪肝虚血再灌流傷害、移植における肝組織、脂肪滴、脂肪滴中の脂質、脂肪酸、タンパク質、膜リン脂質組成とエネルギー産生、ミトコンドリア機能、オートファジーとのクロストークを分子生物学的に解き明かすことを目指す。

### 3. 研究の方法

全ての動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」改正（2006年6月1日施行）、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」（文部科学省告示第71号）、その他関係法令を遵守し、北海道大学動物実験委員会に承認された動物実験計画に基づいて実施した。

#### (1) 脂肪肝ラットの作成

絶食-高炭水化物食 (High carbohydrate diet; HCD) 誘発脂肪肝モデル

雄 Wistar ラット (9 週令) を使用した。入舎後 7 日間は標準飼料 MF (オリエンタル酵母株) を給餌し、2 日間の絶食後、2-5 日間 HCD 試料を給餌し、脂肪肝の程度を調節した。

高脂肪高コレステロール High-Fat-cholesterol (HFC) 食誘発脂肪肝モデル

雄 SHRSP5 / Dmcr ラット (4-8 週令) (日本 SLC) を使用した。入舎後 3 日間は標準飼料 MF を給餌し、以後、HFC 飼料を摂食させ、給餌期間により脂肪肝の程度を調節した。

#### (2) 脂肪肝モデルの評価

試料の採取: 各ラット個体は脂肪肝作成処置後に犠牲死させて血液と肝臓を採取した。

HE 標本を NAFLD Activity Score (NAS) 評価基準に従って下記の項目を病理医が盲検し、スコアの合計値 (満点 8 点) を評価した (Hepatology 41 : 1313-1321(2005))。

脂肪沈着 0 : < 5 % , 1 : 5-33 % , 2 : 33-66 % , 3 : > 66 %

小葉内炎症 0 : なし , 1 : < 2 カ所 , 2 : 2-4 カ所 3 : > 4 カ所

風船様変性 0 : なし , 1 : 少数 , 2 : 多数の合計 8 点で評価した

#### (3) 単離肝灌流 (IPRL) モデル: 常法に従って作成した。

#### (4) in vivo 肝70%温虚血再灌流モデル: 常法に従って作成した。

正常肝を15, 30, 90分、脂肪肝を30分温虚血し、虚血終了時、再灌流後1, 6, 24時間で犠牲死させて、肝臓と血液を採取した。

#### (5) 解析項目: 逸脱肝酵素活性、過酸化脂質定量: 常法に従って実施した。

#### (6) 質量分析イメージング法 (MALDI Imaging Mass Spectrometry; MALDI-IMS)

凍結切片をスライドグラスに貼付し、マトリックス (9-aminoacridine) を噴霧後にレーザー照射し、遊離したイオン化分子を質量分析装置で検出した。陰イオンモードで  $m/z$  200-2000 のデータを取得し、興味分子の分布をマッピングした。また、レーザーによって興味物質を分解し、その断片化パターンにより物質を同定した (LC-MS/MS)。

#### (7) 肝機械灌流法: (3) の IPRL に準じて、肝臓と灌流液を温度制御して実施した

### 4. 研究成果

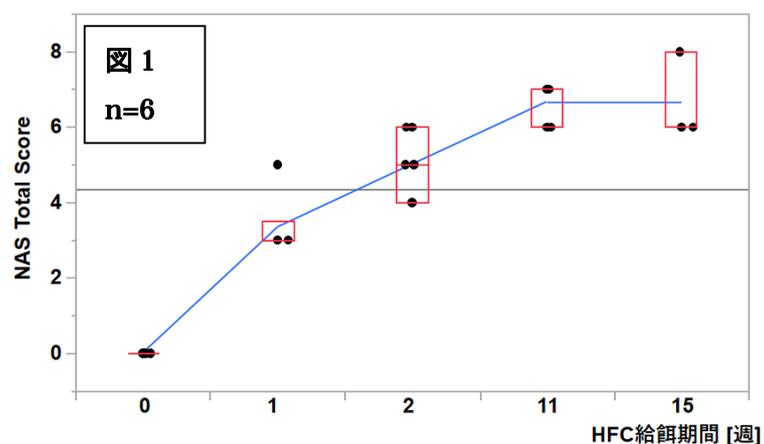
成果概要:

#### (1) 脂肪肝ラットの作成

まず、NAS gradingの推移を評価した (図1)。

SHRSP5/DmcrラットはHFC食給餌期間が5日でNAS score 2.2点、1週で3.3点、2週で5.0点の脂肪肝を呈し、線維化を認めなかった。1週未満では小滴性と大

滴性が混在する脂肪肝であった。2週では大滴性の定義である「脂肪滴が核を偏在させる大き



さ」の脂肪滴が大部分の肝細胞で観察された。11週では脂肪滴は軽度増加し、高度のバルーニングと繊維化を呈し、NASH肝硬変と診断された。15週目は11週と病理学的には同様の所見であったが、16週目には全例が肝硬変による肝不全で死亡した。これらの結果から、脂肪肝虚血再灌流傷害の評価には、HFC食の1-2週給餌が適していると考えられた。しかし、1週では小滴・大滴性の頻度には個体差があり、また、脂肪化はZone 1で高度で大滴性の頻度が高い傾向があり、Zone 3で軽度であった。一方で、絶食・HCD誘発脂肪肝も同様に5日で作成され、大滴性脂肪肝を呈し、NAS scoreは2.3点、線維化を認めなかった。11週以降は給餌期間と脂肪含量は相関せず、いわゆる、Burn out NASHから肝硬変に至り、16週目には全動物が死亡した。これらの結果から、本研究での検討を絶食・HCD 誘発モデルで行うこととした。

## (2) 脂肪肝虚血再灌流傷害の増悪要因の探索

### 肝虚血再灌流傷害モデルの一般的評価項目

正常肝を15, 30, 90分、脂肪肝を30分温虚血し再灌流すると全例が7日間生存した。正常肝では温虚血時間依存的に虚血終了時の肝過酸化脂質が増加し、再灌流後の血中ALT活性のピーク値が上昇し、脂肪肝(30分虚血)では各値が正常肝90分虚血群を凌駕する値を示した。

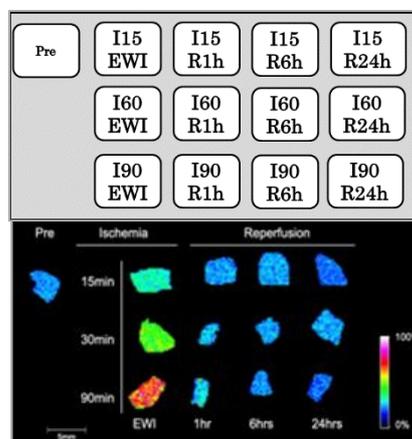
### 質量分析イメージング法による評価

凍結切片1枚のスライド上に温虚血時間毎に3段、時間毎に4列配置し、6枚のスライドで全症例を測定した。コントロール試料として同一個体由来の無虚血の肝臓(pre)を全てのスライドに貼付した。各物質の量はコントロール試料での量に対する比として算出し、全スライドのデータを集積した(図2)。

検出されたシグナルの推移は、虚血中に虚血時間依存的にシグナルが増加し再灌流後に前値に復する物質、逆に虚血時に減少し再灌流後に前値に復する物質に大別された。前者はm/z 498.28のタウリン抱合ジヒドロキシコラン酸(TDHCA)、m/z 599.32のリゾフォスファチジルイノシトール(18:0) [LPI(18:0)]に代表され、温虚血による変化を検出した。LPI

(18:0)はその原料となるフォスファチジルイノシトール(18:0, 20:4) [PI(18:0, 20:4)]の減少と並行し、LPI(18:0)/PI(18:0, 20:4)比はLPI(18:0)の変化を強調した。重要なことに、LPI(18:0)/PI(18:0, 20:4)比は再灌流後の血中ALT活性のピーク値、傷害スコアと強く相関した。虚血時間を30分に固定して脂肪肝の有無で比較すると、TDHCA、LPI(18:0)、LPI(18:0)/PI(18:0, 20:4)比の値は脂肪肝で著明に増加した。これらの結果は、TDHCA、LPI、LPI/PI比によって、温虚血による変化を脂肪化の程度に依らず鋭敏に検出し、再灌流傷害のピークを予測できることを示唆している。

これらを高解像度イメージングでさらに精査すると、TDHCAは再胆管構造中で強いシグナルを発しており、温虚血による胆汁輸送機構の障害を反映すると推測された。一方、LPIあるいはLPI/PI比はZone1の肝細胞で強いシグナルを発しており、虚血時間の遷延に伴ってシグナルの限局は見られなくなった。脂肪肝の30分虚血では正常肝の90分虚血よりも高度の変化が見られ、Zone1に限局した変化ではなかった。これらの結果は、肝内で脂質の虚血性変化がZone1から起こり、虚血時間依存的に全肝に波及していくことを示唆する。それ故、治療対象



**図2: IMS画像**  
**LPI(18:0)/PI(18:0, 20:4)比**  
 正常肝の15, 30, 90分温虚血再灌流  
 I: 虚血時間(16, 60, 90分)  
 R: 再灌流後時間(1, 6, 24時間)  
 EWI: End of Ischemia(虚血終了時)

となり得る可逆的な虚血傷害の病態は肝内で不均一に分布し、少なくともLPIに関してはhomogenateで定量する方法ではZone1に限局する変化を検出できない可能性があり、本法の有効性が支持される結果であった。

温虚血によるTDHCAやLPI (18:0) の蓄積が、再灌流後の傷害を増強している可能性が示唆された。

### (3) その他の結果

ラット肝を任意の温度で酸素化機械灌流するモデルを確立し、正常肝、心停止肝、脂肪肝の低温酸素化灌流を実施し、その障害と機能評価のために、単離肝灌流装置による再灌流を実施した。また、グラフト機能評価のための測定系として、灌流中のフラビンモノヌクレオチド(FMN)をはじめとする、同じ蛍光を発するビタミン2群を分離・定量する方法 (HPLC-蛍光検出法)、メタボローム解析試料からの徐タンパクとpH調整を迅速、簡便に行う試料抽出、調製法、それらの試料を用いて、ATP, ADP, AMP ~ 尿酸、までの代謝物やNAD<sup>+</sup>-NADH<sub>2</sub>, FAD<sup>+</sup>-FADH<sub>2</sub>, NADP<sup>+</sup>-NADPH等のエネルギー代謝関連物質を簡便・安価に測定する方法 (イオンペアODS-HPLC法)を確立した。また、プロテオーム解析試料の夾雑物を除去し、簡便に試料調製を行うBAC-PAGE in-gel digestion法を検討した。これらの検討により、ポジティブデータが得られた際に直ちに定量評価ができる体制を確立することに成功した。

一方で、当初の予定を変更し、主に細胞実験研究室で完結できる検討を行った。LPI が肝温阻血中に増加して再灌流傷害を増悪させる機序を肝細胞株、星細胞株を用いて低酸素曝露、あるいは、低酸素曝露中にエンドセリンを添加し、LPI 添加による細胞障害を評価した。LPI の添加により何れの細胞においても細胞内Ca<sup>2+</sup> 濃度が上昇した。この細胞内Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇はLPI受容体 (GPR55) の阻害剤、IP<sub>3</sub>受容体阻害剤によって消失し、LPI がGPR55-IP<sub>3</sub>受容体を介したシグナル伝達を賦活することが明らかになった。しかし、LPI は星細胞の傷害を増強したが、肝細胞に対しては寧ろ保護的に作用している可能性が示唆された。また、ゲル上に培養した初代培養ラット星細胞に低酸素あるいは低酸素+エンドセリンを負荷し、LPI添加の有無により星細胞の収縮が変化するかを評価したが、LPI はエンドセリンによる星細胞の収縮には関与していなかった。これらの結果は、温虚血におけるLPI の役割が細胞種によって異なることを示しており、今後、評価対象の肝臓における虚血程度、脂肪化の程度、脂質・脂肪酸組成によってLPIがどのように作用するかを精査する必要があると考えられた。

COVID19蔓延による研究施設への立ち入り制限、行動規制故に、動物実験施設や共同利用機器の使用が困難な時期が続き、残念ながら当初予定していた機械灌流によって修復された肝臓試料を十分に得られなかった。しかし、幾つかの希望が持てる灌流法が見出され、LPI の役割については、in vitroで興味深い知見を得ることができた。COVID19 による研究機関への立ち入り制限等が一定以上に緩和されれば、引き続き検討を進めたいと考えているが、当面は本研究の成果を共同研究者に引き継ぎ、本研究をさらに進捗させる予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wakizaka Kazuki, Kamiyama Toshiya, Wakayama Kenji, Orimo Tatsuya, Shimada Shingo, Nagatsu Akihisa, Kamachi Hirofumi, Yokoo Hideki, Fukai Moto, Kobayashi Nozomi, Mitsuhashi Tomoko, Taketomi Akinobu	4. 巻 20
2. 論文標題 Role of Wnt5a in suppressing invasiveness of hepatocellular carcinoma via epithelial-mesenchymal transition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.12131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shibata Kengo, Hayasaka Takahiro, Hashimoto Satsuki, Umemoto Kohei, Ishikawa Takahisa, Sakamoto Sodai, Kato Koichi, Shimada Shingo, Kawamura Norio, Wakayama Kenji, Kobayashi Nozomi, Hama Yuka, Fukai Moto, Shimamura Tsuyoshi, Taketomi Akinobu	4. 巻 52
2. 論文標題 Imaging Mass Spectrometry Reveals the Changes in the Taurine Conjugates of Dihydroxycholeanoic Acid During Hepatic Warm Ischemia and Reperfusion in a Rat Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 1880~1883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2020.01.169	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 Orimo Tatsuya, Kamiyama Toshiya, Wakayama Kenji, Shimada Shingo, Nagatsu Akihisa, Asahi Yoh, Sakamoto Yuzuru, Kamachi Hirofumi, Taketomi Akinobu	4. 巻 27
2. 論文標題 Hepatectomy Combined with Diaphragmatic Resection for Hepatocellular Carcinoma with Diaphragmatic Involvement: A Propensity Score-Matched Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 4153~4163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-08754-6	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 Shimada Shingo, Fukai Moto, Shibata Kengo, Sakamoto Sodai, Wakayama Kenji, Ishikawa Takahisa, Kawamura Norio, Fujiyoshi Masato, Shimamura Tsuyoshi, Taketomi Akinobu	4. 巻 8
2. 論文標題 Heavy Water (D2O) Containing Preservation Solution Reduces Hepatic Cold Preservation and Reperfusion Injury in an Isolated Perfused Rat Liver (IPRL) Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1818~1829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8111818	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深井原、柴田賢吾、坂本聡大、島田慎吾、加藤紘一、藤好真人、若山顕治、石川隆壽、川村典生、嶋村剛、武富紹信
2. 発表標題 小腸冷保存中の酸素供給が抗酸化治療の有効性に与える影響の検討
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会（web開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 深井原、柴田賢吾、島田慎吾、石川隆壽、若山顕治、藤好直、小林希、加藤紘一、早坂孝宏、三野和宏、川村典生、嶋村剛、武富紹信
2. 発表標題 生存シグナル増強を目指した機械灌流による肝グラフトの薬剤性コンディショニング法の探索
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会、大阪国際会議場
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深井原、柴田賢吾、坂本聡大、島田慎吾、小林希、石川隆壽、若山顕治、藤好真人、川村典生、嶋村剛、武富紹信
2. 発表標題 虚血再灌流傷害に対する水素ガスの作用点の探索
3. 学会等名 第46回 日本臓器保存生物医学会学術集会、ふくしま医療機器開発支援センター
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
研究分担者	嶋村 剛  (Shimamura Tusyoshi)  (00333617)	北海道大学・大学病院・准教授    (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分担者	島田 慎吾  (Shimada Shingo)  (40755576)	北海道大学・医学研究院・客員研究員   (10101)	2021年3月17日に分担研究者から削除（留学のため）
研究 分担者	深井 原  (Fukai Moto)  (60374344)	北海道大学・医学研究院・特任講師   (10101)	
研究 分担者	木村 太一  (Kimura Taichi)  (90435959)	北海道大学・医学研究院・客員研究員   (10101)	2021年3月17日に分担研究者から削除（COVID19に関連する本務多忙と活動制限のため）

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