

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18096

研究課題名（和文）減量手術による肥満関連肝障害の予防とメカニズムの解明

研究課題名（英文）Prevention study of obesity-associated liver disease by bariatric surgery

研究代表者

嵯峨 邦裕（SAGA, Kunihiro）

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：50770145

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではHSCの網羅的遺伝子発現解析を行い、さらにどの胆汁酸がHSCの活性化に強く影響するのかについて検討した。DNAマイクロアレイによるpathway解析を行ったところ、TNF signaling pathwayに属する多くの遺伝子群のupregulationを認めた。免疫蛍光染色では2次非抱合型胆汁酸群で内皮下突起が放射状に延長し、myofibroblast様の形態学的変化が確認された。またIL-6に代表されるSASP関連遺伝子の有意なupregulationを認めた。9種類の胆汁酸による各種刺激実験においては2次非抱合型胆汁酸群において上清中IL-6濃度の有意な上昇を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2次非抱合型胆汁酸がHSCの活性化に及ぼすメカニズムには細胞膜への直接作用やTNF signaling pathwayの上流に位置するレセプターに対する作用が考えられる。治療ターゲットとしてTLR阻害薬が種々の病態において注目されているが、未だ臨床上実用化されていない。

HSCの活性化は2次非抱合型胆汁酸により、最も強く誘導されることが示唆される。2次非抱合型胆汁酸によるHSCの強い活性化誘導は、肥満に起因する肝発癌のメカニズム解明、新たな治療ターゲットの開発につながると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We conducted a comprehensive DNA microarray study of the human HSC line LX-2 treated with Bile Acids (BAs). Additionally, LX-2 cells were exposed to nine BAs and studied using immunofluorescence staining, ELISA, and flow cytometry to examine the mechanisms of HSC activation. We focused on TNF pathway and revealed upregulation of genes related to NF- $\kappa$ B signaling and senescence-associated secretory phenotype factors.  $\alpha$ -SMA was highly expressed in cells treated with secondary unconjugated BAs, and a morphological change associated with radial extension of subendothelial protrusion was observed. Interleukin-6 level in culture supernatant was significantly higher in cells treated with secondary unconjugated BAs. Flow cytometry showed that the proportion of cells highly expressing  $\alpha$ -SMA was significantly increased in HSCs cultured with secondary unconjugated BAs. We demonstrated that secondary unconjugated BAs induced the activation of human HSCs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肥満関連肝障害 肝星細胞 2次胆汁酸 肝細胞癌 腸内細菌叢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、肥満肝癌発生マウスモデルを用いた研究において、肥満が引き金となって肝癌が発生する生物学的メカニズムの一部が解明された。そのメカニズムのひとつとして腸内細菌叢および胆汁酸の組成変化に伴う肝星細胞 (HSC)の活性化が、その周囲に存在する細胞の Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP)と呼ばれる老化現象を来すためではないかと推測されている。

2. 研究の目的

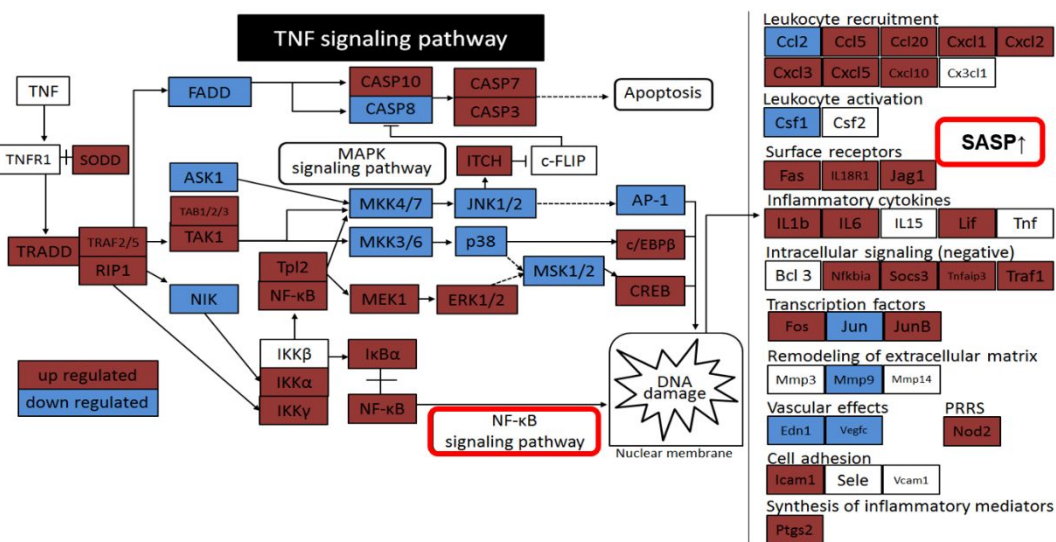
本研究では HSC の網羅的遺伝子発現解析を行い、さらにどの胆汁酸が HSC の活性化に強く影響するのかについて検討した。

3. 研究の方法

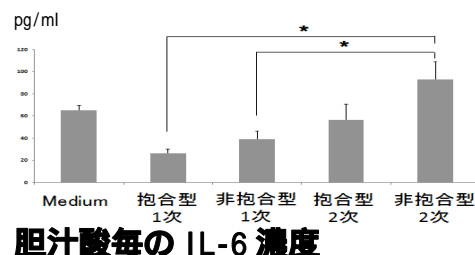
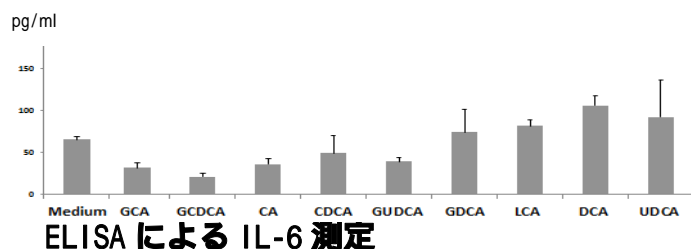
ヒト HSC line LX-2 に対し 2 次非抱合型胆汁酸であるデオキシコール酸による処理を行ったのち、DNA マイクロアレイによる網羅的解析を行い、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes を用いて Pathway 解析を行った。次に 9 種類の胆汁酸 ( 1 次抱合型胆汁酸: グリココール酸、グリコケノデオキシコール酸、 1 次非抱合型胆汁酸: コール酸、ケノデオキシコール酸、 2 次抱合型胆汁酸: グリコウルソデオキシコール酸、グリコデオキシコール酸、 2 次非抱合型胆汁酸: デオキシコール酸、リトコール酸、ウルソデオキシコール酸)を HSC にそれぞれ添加後 48 時間の培養上清の Interleukin-6 (IL-6)濃度測定を行った。同様の実験系において -smooth muscle actin ( -SMA) および Glial fibrillary acidic protein による HSC の免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。またフローサイトメトリーを用いて -SMA の発現割合すなわち活性化 HSC の割合を比較した。

4. 研究成果

DNA マイクロアレイによる pathway 解析を行ったところ、Tumor Necrosis Factor (TNF) signaling pathway に属する多くの遺伝子群の upregulation を認めた(下図)。この傾向は特に nuclear factor-kappa B signaling pathway において顕著であった。免疫蛍光染色では 2 次非抱合型胆汁酸群で内皮下突起が放射状に延長し、myofibroblast 様の形態学的変化が確認された。

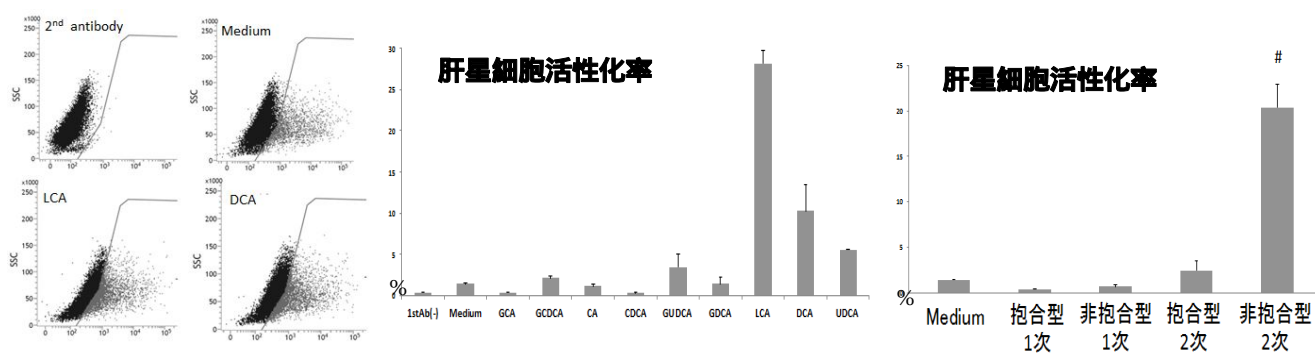


また IL-6 に代表される SASP 関連遺伝子の有意な upregulation を認めた(下図左)。9 種類の胆汁酸による各種刺激実験においては 2 次非抱合型胆汁酸群において上清中 IL-6 濃度の有意な上昇を認めた(下図右)。



フローサイトメトリーにて -SMA の蛍光強度と細胞密度を測定し(下図左)、活性化された星

細胞の割合を各胆汁酸（下図中央）および分画毎に比較した（下図右）。2次非抱合型胆汁酸群において有意な  $\alpha$ -SMA の発現増強を認めた。



以上の結果から HSC の活性化は 2 次非抱合型胆汁酸により、最も強く誘導されることが示唆される。2 次非抱合型胆汁酸による HSC の強い活性化誘導は、肥満に起因する肝発癌のメカニズム解明、新たな治療ターゲットの開発につながると考えられ、これらの知見をもとに論文を予定している。

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 2件）

1. 著者名 Endo Y, Ohta M, Nakanuma H, Tada K, Saga K, Masuda T, Hirashita T, Iwashita Y, Ozeki Y, Masaki T, Inomata M	4. 巻 3
2. 論文標題 Improvement in non-alcoholic fatty liver disease after laparoscopic sleeve gastrectomy in Japanese obese patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Gastroenterol Surg	6. 最初と最後の頁 285-290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12234.	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 Hirashita T, Iwashita Y, Nakanuma H, Tada K, Saga K, Masuda T, Endo Y, Ohta M, Matsumoto T, Inomata M	4. 巻 1
2. 論文標題 Pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy preserving right gastroepiploic vessels following proximal gastrectomy: report of two cases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surg Case Rep	6. 最初と最後の頁 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40792-019-0599-4	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 嵯峨邦裕
2. 発表標題 2次非抱合型胆汁酸が誘導する肝星細胞の活性化の検討
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 嵯峨邦裕
2. 発表標題 胃軸捻転症に対する内視鏡的整復術および腹腔鏡下胃固定術の有用性
3. 学会等名 第110回日本消化器内視鏡学会九州支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 嵯峨邦裕
2. 発表標題 肝pseudolymphomaの1切除例
3. 学会等名 第33回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 嵯峨邦裕
2. 発表標題 2次非抱合型胆汁酸は肝星細胞の活性化を強く誘導する
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 白石 憲男、二宮 繁生、嵯峨 邦裕ほか	4. 発行年 2020年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 200
3. 書名 Q&Aでわかる腹腔鏡手術	

1. 著者名 白石 憲男、二宮 繁生、嵯峨 邦裕	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 312
3. 書名 Key論文を紐解き，理解する 消化管癌に対する外科治療選択のPlatform	

〔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
---------	---------