

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18140

研究課題名(和文) マージナルドナー拡大のための脂肪肝グラフトの網羅的情報解析

研究課題名(英文) Comprehensive genetic analysis of fatty liver grafts for marginal donor expansion

研究代表者

石井 武 (Ishii, Takeshi)

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・医員

研究者番号：10837058

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)：ラットの肝動脈を阻血し、それに伴う肝細胞における遺伝子発現の変化を検討した。これまでに肝血流について門脈と肝動脈を合わせて同時に阻血する研究は多数存在するが、肝動脈のみの阻血に着目した研究はない。今回RNA microarrayによる網羅的遺伝子解析を行った。その結果、動脈クランプにより発現する遺伝子群の中でGTP代謝経路の遺伝子については変動が大きく、虚血再灌流障害に関与している可能性が高いことが示唆された。GTP代謝経路は一酸化窒素合成酵素NOSの生成、ひいては虚血再灌流障害の成因となりうるとされており、我々の実験系は妥当でありさらなる解析が望まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝動脈の阻血に対する肝臓組織の応答、つまりは遺伝子発現の変化について詳細かつ客観的な網羅的解析を行うことで虚血再灌流に対する肝臓組織の生理学的応答の詳細なメカニズムの解明につながる。このことは最終的には肝移植治療の卑近の問題であるドナー不足とマージナルドナーの拡大の問題の解決につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We studied the changes in gene expression in hepatocytes following inhibition of the hepatic artery in rats. Although there have been many studies on the simultaneous inhibition of portal vein and hepatic artery blood flow, there have been no studies focusing on the inhibition of hepatic artery blood flow alone. In this study, we performed a comprehensive gene analysis using RNA microarray. The results showed that among the genes expressed by arterial clamping, those in the GTP metabolic pathway varied widely, suggesting that they are likely to be involved in ischemia-reperfusion injury. Since the GTP metabolic pathway is thought to contribute to the generation of nitric oxide synthase NOS and thus to ischemia-reperfusion injury, our experimental system is valid and further analysis is warranted.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：虚血再灌流 肝動脈 脂肪肝

### 1. 研究開始当初の背景

肝移植においてドナー不足とマージナルドナーの拡大は根本的な問題であり、特に脂肪肝グラフトに伴う虚血再灌流障害は周術期に生じる肝不全あるいはグラフトロスの発生に深く起因しているが詳細なメカニズムは不明である。実験動物を用いた虚血再灌流障害モデルは肝切除に際しての血行遮断とその再開、移植ドナー肝や低血圧による臓器灌流不全後の再灌流などの状況を想定したものであり、その分子生物学的メカニズムの解明は手術の安全性向上や重篤な肝疾患の治療法開発等に関わり、可能性があり、臨床的にも重要な意味を持っている。ただし、これまで類洞機能について分子生物学的・病態生理学的に詳細な解析をした実験系がないのが現状であった。当教室では肝動脈血流に着目しつつ肝細胞機能を顕微鏡下に visualize する手法 (IVMS) を開発しており (図 1)、上記メカニズムの解明にむけて独自の研究を続けていた。また、当教室ではバイオインフォマティクスを用いた網羅的遺伝子解析技術も確立しており、これまでに肝動脈に着目して正常肝と脂肪肝との比較で起こる同変化を網羅的遺伝子解析で検証した報告はこれまでにないことから、この観点からの上記虚血再灌流のメカニズムの解明の可能性について検討していた。

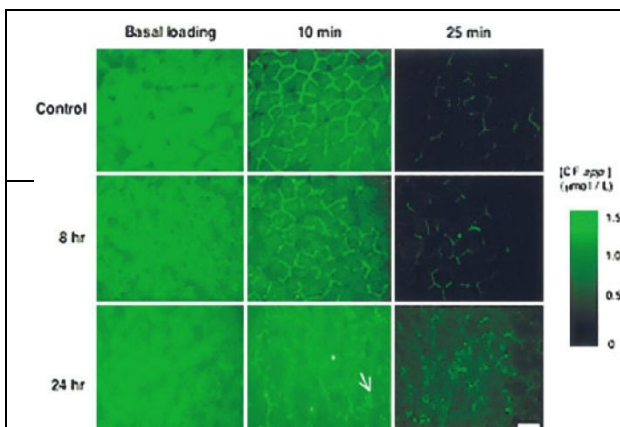


図 1. IVMS による肝細胞経時的イメージング

### 2. 研究の目的

肝移植においてドナー不足とマージナルドナーの拡大を最終的な目的とし、そのためにまず虚血再灌流に対する肝類洞組織の生理学的応答の詳細なメカニズムの解明を卑近の目的とした。そのためにまず肝動脈阻血による肝細胞の生理学な応答、すなわち遺伝子発現の変化について分析することを目的とした。特に脂肪肝モデルについて、阻血に伴う生理学な応答が正常肝モデルとどう異なるかを解明することを目標とした。

### 3. 研究の方法

Wistar rat (8 - 9 週齢) をエーテルにて麻酔導入し、イソフルランによる維持麻酔下 (2 - 4%) で開腹し、肝動脈を 30 分または 2 時間クランプした後にクランプを解除し 10 時間後にラットを sacrifice し、摘出した肝の RNA 抽出を行った。これを 30 分クランプ、2 時間クランプの個体をそれぞれ 3 匹ずつ行い、さらにクランプは行わず開腹と閉腹操作のみを行う sham 個体 1 匹も肝の RNA 抽出を行った。抽出後は超微量分光光度計やアガロースゲル電気泳動による RNA の品質チェックを行った。これら計 7 個体の肝 RNA サンプルについては化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所 (CERI) の microarray 検査に提出した。この結果を Normalize し sham 個体と肝動脈 30 分クランプ個体、sham 個体と肝動脈 2 時間クランプ個体、肝動脈 30 分クランプ個体と肝動脈 2 時間クランプ個体をそれぞれについて変動遺伝子の比較検討を行い、すべての比較で共通して変動のある遺伝子の検索を行った。変動遺伝子の解析については GSEA と DAVID を用いて行った。

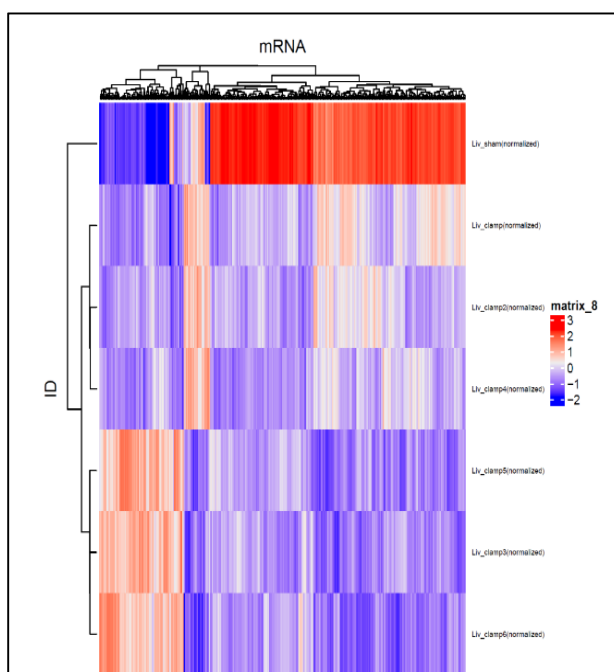


図 2. Microarray 結果に基づく Heat map

### 4. 研究成果

網羅的遺伝子解析を行うにあたり、アーチファクトを極力少なくした結果を得るためにラット肝動脈クランプ手技を定型的・安定的に行う必要があり、手技獲得に時間を要したものの、肝十

二指腸間膜をモスキート鉗子を用いて愛護的に剝離することが重要であることを確認し、さらに長時間の麻酔管理が必要となるため低濃度でのイソフルラン維持麻酔も重要であり、これらが確立されたことで安定的にクランプ操作を行うことが可能となった。30分クランプ個体と2時間クランプ個体をそれぞれ計3匹ずつでマイクロアレイ解析を行った(図2)。GSEA解析では発現変動遺伝子群の有意な pathway 変化は抽出できなかった。一方、DAVID解析を行うと GTPase activator activity(GO:0005096)の pathway の変化が検出された(p=0.06)。GTP代謝経路は一酸化窒素合成酵素 NOS の生成、ひいては虚血再灌流障害の成因とされており(Wu MY et al.2018 Cell Physiol Biochem. doi: 10.1159/000489241)、今回我々の解析結果は肝動脈クランプにより発現する遺伝子群の中で GTP代謝経路の遺伝子については変動が大きく、虚血再灌流障害に関与している可能性が高いことが示唆された。

ラット肝を摘出時に RNA 抽出検体のみならず、ホルマリン固定標本や凍結標本も保存しており今後上記 GTP代謝経路に関連する遺伝子、蛋白について免疫組織化学染色やウエスタンブロット法にて評価することで、肝動脈クランプによる影響を蛋白レベルでも明らかにすることで肝臓の生理学的機能のより詳細な理解へとつながることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Keiichi Akahoshi, Takeshi Ishii & Atsushi Kudo	4. 巻 1
2. 論文標題 MCA Analysis for Hepatology: Establishment of the In Situ Visualization System for Liver Sinusoid Analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Multidisciplinary Computational Anatomy	6. 最初と最後の頁 225-227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-16-4325-5_29	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0件

〔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
研究協力者	工藤 篤 (Kudo Atsushi)	東京医科歯科大学病院・肝胆膵外科・病院教授  (12602)	
研究協力者	赤星 径一 (Akahoshi Keiichi)	東京医科歯科大学病院・肝胆膵外科・講師  (12602)	
研究協力者	田邊 稔 (Tanabe Minoru)	東京医科歯科大学病院・肝胆膵外科・教授  (12602)	

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
---------	---------