

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11603

研究課題名（和文）中心静脈栄養における代謝異常・肝機能障害とエピジェネティック因子の関連

研究課題名（英文）TPN related metabolic disorders and hepatic dysfunction depend on epigenetic factors

研究代表者

田附 裕子（Tazuke, Yuko）

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10397698

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）：腸管不全モデルにおける中心静脈栄養に合併する肝機能障害の易発現性のメカニズムをエピジェネティクスにおけるDNAメチル化に注目し検討した。腸管不全モデルとして、マウスおよびラットモデルを用い、短腸症モデル、中心静脈栄養モデルを作成した。またTPN後の腸管不全動物モデルにおける2次ストレスによるPPARsおよびFGF21の発現の変化とDNAメチル化の解析を試みた。結果として、同一モデルにおいても個体差があり、腸管不全モデル間での比較や、方向性を確定することは困難であった。しかし、TPNモデルからRNAを抽出し、遺伝子のプロファイリングを行うことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管不全患者にとって中心静脈栄養（TPN）は重要な栄養供給源である。しかし腸管不全患者における肝機能障害（IFALD）は重篤な合併症の一つである。しかしIFALDの原因は多岐に及びしばしば不可逆性であり、その治療は極めて困難であるが、根本的な治療方法の開発には至っていない。

近年、胎児期～新生児期に外的に受けたDNAメチル化などの遺伝子発現制御機構により種々の病態の易発現性に相違があることに注目が置かれている。疾患特異的・後天的に代謝関連遺伝子に生じたエピジェネティックな変化とIFALDの発現性との関連性が得られれば、IFALDの予防的管理が可能となり得る。

研究成果の概要（英文）：We investigated the mechanism of the facilitation of hepatic dysfunction associated with central venous nutrition in models of intestinal insufficiency, focusing on DNA methylation in epigenetics. Mouse and rat models of intestinal failure were used, including a short bowel syndrome model and a central venous nutrition model. We also attempted to analyze the changes in expression of PPARs and FGF21 and DNA methylation induced by secondary stress in animal models of intestinal failure after TPN. As a result, there were individual differences even in the same model, and it was difficult to compare the results among the intestinal failure models and to determine the directionality. However, we were able to extract RNA from the TPN model and perform gene profiling.

研究分野：外科栄養

キーワード：腸管不全 肝機能障害 中心静脈栄養 エピジェネティクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全患者では、生涯にわたる長期 TPN を必要とする。このような長期 TPN は種々の合併症を引き起こすが、中でも腸管不全患者における肝機能障害 (IFALD) は重篤な合併症の一つである。IFALD の原因は多岐に及びしばしば不可逆性であり、その治療は極めて困難である。近年、腸管不全患者における胆汁うっ滞に対する 3 系脂肪製剤や短腸に対する GLP2 アナログなど新規治療薬の有効性が報告されているが、IFALD に対する治療効果は限局的である。腸管不全患者における IFALD のリスク因子として、種々の栄養素の過不足に加えて、未熟性、感染症、超短腸などの患者側の要因があげられる。中でも未熟性に伴う出生後の代謝異常 (低栄養や肥満など) は胎児期 ~ 新生児期に外的に受けた DNA メチル化などの遺伝子発現制御機構によることが報告され (Yuan X, Hashimoto K, et al. Nature communications, 2018)、従来より提唱されていた Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 仮説がエピジェネティックの関与として立証されるようになってきた。新生児や未熟児における IFALD 易発症性もエピジェネティックの関与による可能性が高いが、エピジェネティック因子と IFALD の易発現性との関係性を臨床的に、あるいは動物実験で検討した研究はない。そこで、エピジェネティック因子としての DNA メチル化に注目し、各種病態における TPN 関連の代謝異常や肝機能障害の出現メカニズムを解明するとともに、個体差のある TPN 関連の代謝異常や肝機能障害に対する個別化された新規予防法・対策の可能性を検討する。因子と IFALD の易発現性との関係性を臨床的に、あるいは動物実験で検討した研究はない。

### 2. 研究の目的

腸管不全患者にとって中心静脈栄養 (TPN) は重要な栄養供給源である。特に小児の腸管不全患者では、生涯にわたる長期 TPN を必要とする。このような長期 TPN は種々の合併症を引き起こすが、中でも腸管不全患者における肝機能障害 (IFALD) は重篤な合併症の一つである。しかし IFALD の原因は多岐に及びしばしば不可逆性であり、その治療は極めて困難である。近年、胎児期 ~ 新生児期に外的に受けた DNA メチル化などの遺伝子発現制御機構により種々の病態の易発現性に相違があることに注目が置かれているが、IFALD の易発現性との関係性を検討した研究はない。そこで、エピジェネティック因子としての DNA メチル化に注目し、各種病態における TPN 関連の代謝異常や肝機能障害の出現メカニズムを解明するとともに、個体差のある TPN 関連の代謝異常や肝機能障害に対する個別化された新規予防法・対策の可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

I. 腸管不全動物モデルにおける TPN による代謝調整遺伝子 (PPARs) およびその関連遺伝子 (FGF21) の発現の変化とエピジェネティクス変化 (DNA メチル化) の解析を行う。動物モデルは、腸管不全モデルとして、体重 80g 前後のマウスを用い、短腸症モデル・虚血再灌流モデル・炎症性腸疾患モデルを作成する。また代謝異常モデルとして胆汁鬱滞 (胆管結紮) モデル・耐糖能異常モデルにおいて、TPN を 1 週間実施し、代謝遺伝子の発現の変化および DNA メチル化を測定する。脂肪肝が安定して得られなければ、TPN 期間を延長し一定のモデルを完成させる。

II. TPN 後の腸管不全動物モデルにおける 2 次ストレス (LPS) による PPARs および FGF21 の発現の変化と DNA メチル化の解析をおこなう。I の各モデルに TPN 試行中の 2 次ストレス (LPS 投与) を与え、LPS 投与によるメチル化を測定する。

III. TPN 腸管不全動物モデルに生じたエピジェネティック変化の網羅的検索を行う。ゲノム DNA の抽出後、メチル化 DNA を濃縮する。その一部を鋳型としてその一部を鋳型とし、3 種類の遺伝子の転写開始点上流付近を対象として、リアルタイム PCR を行い、メチル化率を比較する。また、外部の DNA メチル化アレイ受託解析サービスあるいは RNA シークエンスサービスを利用し、網羅的な DNA メチル化遺伝子あるいは RNA のプロファイリングを行う。

IV. 腸管不全動物モデルの疾患の相違における代謝関連遺伝子の発現および DNA メチル化の比較を行い、エピジェネティックな因子と肝線維化/肝機能障害の悪化との相関を模索する。

### 4. 研究成果

研究には動物モデルを使用した。腸管不全モデルとして、体重 80g 前後のマウスを用い、短腸症モデル、中心静脈栄養モデルを作成した。当初マウスで開始したが術後経過が安定しないため一部モデルをラットへ変更し研究を継続した。なお短腸症においてはマウスで短腸症モデルが作成できるが、組織学的な脂肪肝の作成には至らず、モデル作成に難渋した。そのため、TPN 後の腸管不全動物モデルにおける 2 次ストレスによる PPARs および FGF21 の発現の変化と DNA メチル化の解析をおこなったが、モデルの安定性が得られなかった。つまり、TPN 後の腸管不全動物モデルにおいては、同じ群でも個体差があり、腸管障害モデル間での比較や方向性の判断は困

難であった。

しかし、TPNモデルの肝臓組織からRNAを抽出し、RNA遺伝子のプロファイリングを実施し、組織学的に有意差のえられなかったエピジェネティックに関連する遺伝子および肝線維化関連遺伝子の相関の検討は可能であった。今後、このRNAシーケンスから得られた遺伝子に注目し、目的とするエピジェネティックなリスクを回避するための研究およびに個別別の新規治療の選択へつなげていく予定である。

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
研究分担者	出口 幸一  (Deguchi Koichi)  (00747082)	大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)   (14401)	
研究分担者	米山 知寿  (Yoneyama Hisatoshi)  (00839368)	大阪大学・医学部附属病院・医員   (14401)	
研究分担者	菅山 千巖  (Toyama Chiyoshi)  (10839369)	大阪大学・医学部附属病院・医員   (14401)	
研究分担者	奥山 宏臣  (Okuyama Hiroomi)  (30252670)	大阪大学・医学系研究科・教授   (14401)	
研究分担者	野村 元成  (Nomura Motonari)  (40546909)	大阪大学・医学系研究科・助教   (14401)	
研究分担者	塚田 遼  (Tsukada Ryo)  (70838747)	大阪大学・医学部附属病院・医員   (14401)	

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	東堂 まりえ  (Todo Marie)  (50882239)	大阪大学・医学部附属病院・医員     (14401)	

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