

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08623

研究課題名(和文) HGFの脂質輸送アップレギュレーションシステムの解明とIFALD克服への応用

研究課題名(英文) Elucidation of HGF lipid transport upregulation system and application to overcome IFALD

研究代表者

松久保 眞 (MATSUKUBO, Makoto)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：00528036

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)：【目的】絶食と完全中心静脈栄養(TPN)管理によりPNALDモデルラットを作成し、肝細胞増殖因子(HGF)の静脈内投与を行った。HGF投与群と非投与群を比較することでPNALDに対するHGFの予防効果を評価することを本研究の目的とした。【方法】ラットの右頸静脈より中心静脈カテーテルを留置し、7日間の絶食TPN管理を行った。ラットをTPN群、TPN+HGF(低容量)群とTPN+HGF(高容量)群の3群に分け比較検討を行なった。【まとめ】HGFにはPNALDを予防する可能性があり、HGFの肝細胞の抗アポトーシスや脂肪肝抑制などがその作用機序となっていると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長期静脈栄養に関連する肝障害を静脈栄養関連肝障害(PNALD)というが、肝機能の未熟な新生児や乳幼児では発症しやすい。不可逆性の肝硬変に進行することもあり、PNALDの予防や治療を行うことは重要である。今回、静脈栄養によって管理されたラットに、肝細胞増殖や血管再生などの多様な生理活性を持つ肝細胞増殖因子(HGF)を投与した動物実験を行った。その結果HGFにはPNALD発症を予防する効果があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：[Purpose] This time, we created a PNALD model rat using fasting and total parenteral nutrition (TPN) management and hepatocyte growth factor (HGF) was administered intravenously. The purpose of this study was to evaluate the preventive effect of HGF on PNALD by comparing HGF-treated and non-treated groups. [Method] A central venous catheter was placed in the right jugular vein of rats, and fasting TPN was administered for 7 days. Rats were divided into three groups: TPN group, TPN+HGF (low volume) group, and TPN+HGF (high volume) group, and comparative studies were conducted. [Summary] HGF has the potential to prevent PNALD, and the mechanism of action of HGF is thought to be anti-apoptosis of hepatocytes and inhibition of fatty liver.

研究分野：小児外科

キーワード：肝細胞増殖因子(HGF) 静脈栄養合併肝障害(PNALD) 完全静脈栄養(TPN) 脂肪肝 カスパーゼ9

### 1. 研究開始当初の背景

静脈栄養合併肝障害 (PNALD) や腸管不全関連肝障害 (IFALD) は、完全静脈栄養 (TPN) によるサポートを必要とする短腸症候群 (SBS) を含む腸管不全の重篤かつ致死の合併症である。PNALD や IFALD が進行し、不可逆的肝不全を来した場合には肝臓・小腸移植および多臓器移植を行う以外、現状では救命が困難である (文献 1)。そのためそれらの病態に対する有効な治療は喫緊の最重要課題であり、長期生存を得るためには肝不全を予防する、もしくは発症した場合には有効な治療を行うことが極めて重要である。

また肝細胞増殖因子 (HGF) は、肝細胞再生を強力に促進する増殖因子であり、その生理活性作用は単に肝細胞の再生のみならず、種々の上皮系細胞、血管内皮細胞等に対して、増殖促進、抗アポトーシス、細胞遊走能促進、抗線維化などの多彩な作用を誘導し (図 1)、多くの組織の重要な再生修復因子と考えられている (文献 2)。HGF 投与が、肝炎や肝線維化、脂肪肝などを緩和するという研究の報告は多数あり、本邦において重症虚血肢を含む末梢血管を対象とした遺伝子治療薬としての承認も得られているように、HGF 製剤は今後さまざまな疾患に臨床応用されいくと考えられている。

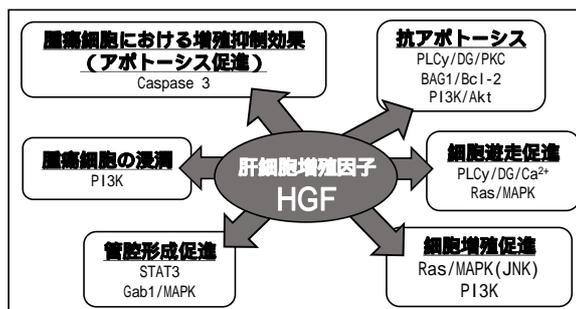


図 1: HGF の持つ多彩な生理作用

今回我々が克服すべき PNALD や IFALD は、前段階として非アルコール性脂肪肝 (NAFL) や非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) を発症することが知られている。HGF の生理作用の一つとして脂肪肝からの回復があり、その要因としてアポ蛋白活性化による肝内脂質の内因性リポ蛋白内への輸送の増加や肝臓内の脂質を含んだ内因性リポ蛋白の肝臓外への排出促進作用が報告されている (文献 3)。この作用を応用し、NAFL や NASH から PNALD や IFALD への進行を止めることが、予防と治療になると推測される (図 2)。その期待される効果を実験的に検証することが、急務かつ PNALD や IFALD 克服への可能性を切り拓く可能性が高いと考えた。

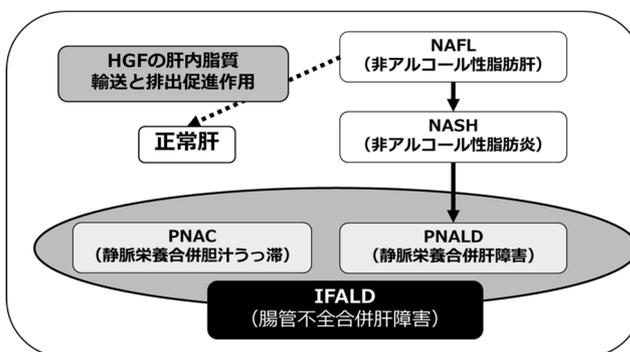


図 2: HGF の肝疾患に期待される効果

### 2. 研究の目的

絶食と TPN 管理により PNALD モデルラットと IFALD 誘導短腸症候群モデルラットを作成し、HGF の静脈内投与を行い TPN 群と TPN+HGF 投与群を比較することで PNALD と IFALD に対する HGF の予防・治療効果を評価し新規予防・治療法の 1 つとなり得るか検証することを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

PNALD モデルラットの作成：生後 7 週齢のラットの右頸静脈より中心静脈カテーテルを留置し、7 日間の絶食 TPN 管理を行った (図 3)。その後、犠死、検体採取を行った。

IFALD 誘導短腸症候群モデルラットの作成：生後 7 週齢のラットの右頸静脈より中心静脈カテーテル留置と全小腸の 90% を切除する手術を施行し、7 日間の絶食 TPN 管理を行った。その後、犠死、検体採取を行った。

それぞれのモデルラットを TPN 群、TPN+HGF (低容量) 投与群と TPN+HGF (高容量) 投与群の 3 群に分け評価項目 (体重変化、排泄量、摘出肝重量、血液生化学検査、肝組織像、肝組織中脂質定量、RT-PCR) に関して比較検討を行なった。



図 3: PNALD モデルラット作成

#### 4. 研究成果

##### (1) 研究の主な成果

7日間の絶食 TPN 管理を行ったラットの肝障害を病理学的に証明することで PNALD モデルラットの作成に成功した。そのモデルラットに HGF を投与することで、HGF 投与による PNALD 発症の予防効果を NAFLD activity score を用いて病理組織学的に確認できた(図 4)。肝組織内脂質量定量により、TPN+HGF 群が TPN 群と比較し有意に肝組織内脂質量(トリグリセリド)が減少している結果が得られた(図 5)。また TPN+HGF 群は、TPN 群と比較すると血清脂質量が上昇していた。肝障害予防効果の一因として HGF が内因性リポ蛋白を刺激し、肝内脂質を血液中に移行することで脂肪肝を抑制していると推測した。そのため肝内脂質の代謝経路やリポ蛋白に関与している複数の因子について RT-PCR を施行した。その結果 TPN+HGF 群が TPN 群と比較し、アポトーシス抑制因子である Caspase9 が有意に低値であること分かった(図 6)。HGF が肝内脂質輸送の促進に作用していることはまだ証明できていないが、HGF の肝細胞の抗アポトーシスや脂肪肝抑制などが PNALD 発症を予防するための作用機序となっていると思われる。この結果を国際学会(33rd International Symposium on Pediatric Surgical Research)で発表し、英文雑誌(Pediatric Surgery International, 37(3): 353-361, 2021)に掲載した。

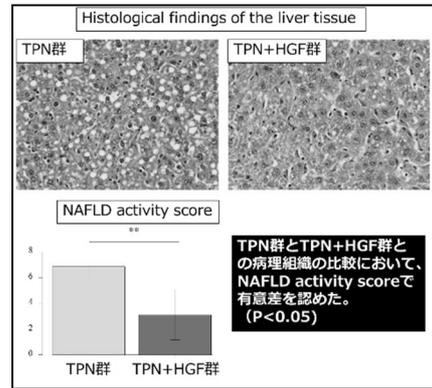


図 4:PNALD モデルラットによる実験結果

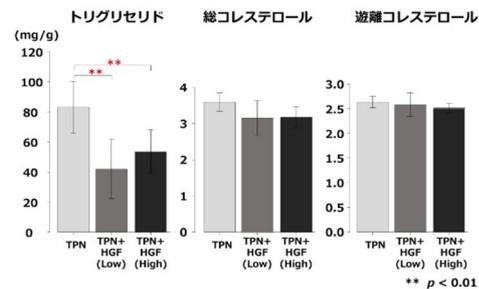


図 5:TPN 群と TPN+HGF 群の肝組織内脂質量の比較

またこの実験結果をもとに IFALD 誘導短腸症候群モデルラットを用いて、TPN+HGF 群と TPN 群の比較実験を行い、TPN+HGF 群で脂肪肝と肝組織の小葉性炎症が抑制されていることが明らかとなった。原因因子特定のために複数の因子に対して RT-PCR、Western blotting を施行した。その結果 TPN+HGF 群が TPN 群と比較し、アポトーシス抑制因子である Caspase9 が低値であったが、有意差は認めなかった。またオートファジーに関する Rubicon と p62 は TPN+HGF 群で有意に高値であった。これらの結果から導き出せる HGF の肝障害予防効果の関与はまだ推測の段階である。この結果は共同研究者が英文雑誌(Pediatric Surgery International, 40(1): 1743-1753, 2024)に掲載した。

##### (2) 今後の展望

上記実験と並行して、PNALD モデルラットおよび IFALD 誘導短腸症候群モデルラットに対する HGF 投与による腸管順応の研究もおこなわれ良好な結果を得ている。また当研究グループは従来から PNALD モデルラットや IFALD 誘導短腸症候群モデルラットを対象とした消化管ホルモンであるグレリンや 3 系脂肪酸、GPL-2 を用いた基礎実験に取り組んでおり、これらに HGF を加えた相乗効果の有無などを評価する研究も計画段階である。

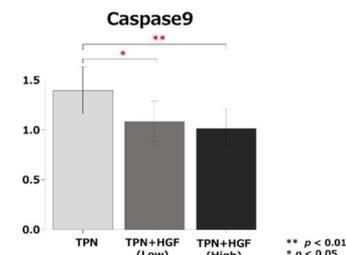


図 6:TPN 群と TPN+HGF 群の Caspase9 の比較

##### (引用文献)

和田 基, 工藤博典, 天江新太郎, 他: 【NST のための小児の栄養管理】 IFALD(腸管不全合併肝障害)の病因と治療. 静脈経超栄養, 27(5):1217-22, 2012.

井戸章雄, 坪内博仁: 肝再生医療の展望 肝細胞増殖因子(HGF)による再生医療の展望. 日本消化器病学会雑誌, 99(12): 1436-42, 2002

Tahara M, Matsumoto K, Nukiwa T, et al: Hepatocyte growth factor leads to recovery from alcohol-induced fatty liver in rat. J Clin Invest, 103(3):313-20, 1999.

## 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 4件）

1. 著者名 Sugita Koshiro, Yano Keisuke, Matsukubo Makoto, Iwamoto Yumiko, Ogata Masato, Takada Lynne, Kedoin Chihiro, Murakami Masakazu, Harumatsu Toshio, Onishi Shun, Kawano Takafumi, Muto Mitsuru, Kumagai Kotaro, Ido Akio, Kaji Tatsuru, Ieiri Satoshi	4. 巻 40
2. 論文標題 Potential mechanisms underlying the effect of hepatocyte growth factor on liver injury in short bowel syndrome model rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-023-05593-w	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 Yano Keisuke, Sugita Koshiro, Muto Mitsuru, Matsukubo Makoto, Onishi Shun, Kedoin Chihiro, Matsui Mayu, Murakami Masakazu, Harumatsu Toshio, Yamada Koji, Yamada Waka, Kumagai Kotaro, Ido Akio, Kaji Tatsuru, Ieiri Satoshi	4. 巻 57
2. 論文標題 The preventive effect of recombinant human hepatocyte growth factor for hepatic steatosis in a rat model of short bowel syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Surgery	6. 最初と最後の頁 1286 ~ 1292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpedsurg.2022.02.030	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 Matsukubo Makoto, Yano Keisuke, Kaji Tatsuru, Sugita Koshiro, Onishi Shun, Harumatsu Toshio, Nagano Ayaka, Matsui Mayu, Murakami Masakazu, Yamada Koji, Yamada Waka, Muto Mitsuru, Kumagai Kotaro, Ido Akio, Ieiri Satoshi	4. 巻 37
2. 論文標題 The administration of hepatocyte growth factor prevents total parenteral nutrition-induced hepatocellular injury in a rat model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 353 ~ 361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-020-04823-9	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 Sugita Koshiro, Kaji Tatsuru, Yano Keisuke, Matsukubo Makoto, Nagano Ayaka, Matsui Mayu, Murakami Masakazu, Harumatsu Toshio, Onishi Shun, Yamada Koji, Yamada Waka, Muto Mitsuru, Kumagai Kotaro, Ido Akio, Ieiri Satoshi	4. 巻 37
2. 論文標題 The protective effects of hepatocyte growth factor on the intestinal mucosal atrophy induced by total parenteral nutrition in a rat model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1743 ~ 1753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-021-05002-0	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 杉田 光士郎, 矢野 圭輔, 加治 建, 村上 雅一, 春松 敏夫, 大西 峻, 松久保 眞, 川野 孝文, 武藤 充, 井戸 章雄, 家入 里志
2. 発表標題 肝細胞増殖因子は短腸症候群のTherapeutic Agentとなるか? 疾患モデルラットの検討
3. 学会等名 第60回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松久 保眞, 鳥飼 源史, 矢野 圭輔, 徳久 琢也, 武藤 充, 杉田 光士郎
2. 発表標題 超低出生体重児における小腸瘻造設術後のIFALD発症のリスク因子の検討
3. 学会等名 第59回 日本周産期・新生児医学会 学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koshiro Sugita, Keisuke Yano, Tatsuru Kaji, Nanako Nishida, Ayaka Nagano, Masakazu Murakami, Toshio Harumatsu, Shun Onishi, Koji Yamada, Waka Yamada, Makoto Matsukubo, Takafumi Kawano, Mitsuru Muto, Kotaro Kumagai, Akio Ido, Satoshi Ieiri
2. 発表標題 The potential of recombinant human HGF - research on a TPN rat model and on a short bowel rat model
3. 学会等名 PAPS (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉田 光士郎, 矢野 圭輔, 武藤 充, 松久保 眞, 大西 峻, 祁答院 千寛, 松井 まゆ, 村上 雅一, 春松 敏夫, 山田 耕嗣, 山田 和歌, 加 治 建, 家入 里志
2. 発表標題 腸肝軸に焦点を当てた脂肪肝に対するHGFの予防効果 短腸モデルラットにおける研究
3. 学会等名 第59回 日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉田 光士郎, 松久保 眞, 矢野 圭輔, 加治 建, 村上 雅一, 春松 敏夫, 大西 峻, 山田 耕嗣, 山田 和歌, 武藤 充, 熊谷 公太郎, 井戸 章雄, 家入 里志
2. 発表標題 完全静脈栄養ラットモデルにおける肝細胞増殖因子の脂肪肝抑制効果および消化管粘膜萎縮
3. 学会等名 第59回 日本外科代謝栄養学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢野 圭輔, 杉田 光士郎, 加治 建, 松久保 眞, 大西 峻, 祁答院 千寛, 松井 まゆ, 村上 雅一, 春松 敏夫, 山田 耕嗣, 山田 和歌, 武 藤 充, 家入 里志
2. 発表標題 腸管不全関連肝障害モデルラットに対する肝細胞増殖因子の予防・治療的效果の検討
3. 学会等名 第122回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉田 光士郎, 加治 建, 矢野 圭輔, 松久保 眞, 祁答院 千寛, 松井 まゆ, 村上 雅一, 春松 敏夫, 大西 峻, 山田 耕嗣, 山田 和歌, 武 藤 充, 熊谷 公太郎, 井戸 章雄, 家入 里志
2. 発表標題 肝細胞増殖因子(HGF)を用いた腸粘膜上皮再生への試み 完全静脈栄養ラットモデルを用いた小腸粘膜上皮へ与える効果に関する検討
3. 学会等名 第122回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松久保 眞、山田耕嗣、山田和歌、大西 峻、松井まゆ、長野綾香、村上雅一、杉田光士郎、矢野圭輔、春松敏夫、武藤 充、加治 建、家入里志
2. 発表標題 完全静脈栄養ラットに対する、肝細胞増殖因子投与による肝細胞障害の予防
3. 学会等名 第58回日本小児外学会学術集会
4. 発表年 2021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	家入 里志  (IEIRI Satoshi)  (00363359)	鹿児島大学・歯学部医学系・教授   (17701)	
研究分担者	大西 峻  (ONISHI Shun)  (10614638)	鹿児島大学・歯学部鹿児島大学病院・講師   (17701)	
研究分担者	矢野 圭輔  (YANO Keisuke)  (30757919)	鹿児島大学・歯学部総合研究科・助教   (17701)	
研究分担者	加治 建  (KAJI Tatsuru)  (50315420)	久留米大学・医学部・教授   (37104)	
研究分担者	杉田 光士郎  (SUGITA Koshiro)  (50781514)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・特任助教   (17701)	

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	武藤 充  (MUTO Mitsuru)  (70404522)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・客員研究員    (17701)	
研究分担者	町頭 成郎  (MACHIGASHIRA Seiro)  (80404523)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員    (17701)	

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