

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08655

研究課題名(和文) 肝虚血再灌流障害とその制御における概日リズムの関与

研究課題名(英文) The involvement of circadian rhythm in liver ischemia-reperfusion injury

研究代表者

寺嶋 宏明(Terajima, Hiroaki)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 腫瘍研究部・研究主幹

研究者番号：40314215

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)：我々は夜間術前12時間絶食が肝虚血再灌流障害(IRI)に対し強い抑制効果を持つことを報告した。一方で生物には“概日リズム”が存在し、日中と夜間で各種の代謝産物の量が変動する。今回、絶食と虚血のタイミングがIRIに与える影響を検証した。絶食とIR刺激の介入を夜間と日中の2群に分け、絶食の有無を含めた4群のマウスで肝酵素・組織所見・PCRによる比較検討した。12時間絶食は日中・夜間において自由摂餌群と比較し肝IRIを有意に抑制したが、夜間絶食でより高い効果を認めた。夜間12時間絶食の効果を再現する目的でメタボローム解析を行い、候補物質として5-アミノレブリン酸(ALA)を同定し効果を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスの肝温虚血再灌流障害モデルを用いた実験系で、12時間絶食の介入が強力な肝虚血再灌流障害の抑制効果を発揮することを解明した。しかしながら、ヒトへの応用を考えると、肝硬変を背景にもつ患者が多い肝臓外科手術において、絶食を臨床適応することは難しい。今回、概日リズムが肝虚血再灌流障害に及ぼす影響を検証したが、一定の見解は得られなかった。しかし、抑制効果が著明であった夜間12時間絶食後の肝臓の代謝産物を検討することで、絶食状態に近い効果を発揮する物質を見出した。負担の少ない介入で、術後肝機能障害を予防することができれば、根治性の高い手術を、より回復しやすい状態で行うことが可能になる。

研究成果の概要(英文)：We confirmed that preoperative 12-hour fasting at night strongly attenuated liver ischemia-reperfusion injury (IRI). On the other hand, “circadian rhythm” exists in living organisms and the amounts of metabolites fluctuates between daytime and nighttime. In the present study, we tested whether the timing of fasting or ischemia affected liver IRI. Liver enzymes, histological findings, and PCR analysis were compared in four groups of mice; daytime IR without or with fasting at night, nighttime IR without or with fasting in the daytime. Twelve-hour fasting suppressed liver IRI, compared to the free-feeding group both during the day and at night, but the inhibitory effects of fasting on liver IRI were more significant in fasting at night. With the aim of reproducing the effects of 12-hour nocturnal fasting, a metabolomic analysis of liver tissues was performed. As a candidate substance, 5-Aminolevulinic Acid (ALA) was identified and the effect has been examined.

研究分野：肝臓外科

キーワード：肝虚血再灌流障害 概日リズム 絶食 体内時計 肝臓外科 肝移植 メタボローム解析 5-アミノレブリン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マウスの肝温虚血再灌流障害モデルにおいて、術前 12 時間の絶食は肝虚血再灌流障害 (Ischemia reperfusion injury: IRI) を著明に抑制することを報告した (図 1: Miyauchi T, Uchida Y, Kadono K, et al. Up-regulation of FOXO1 and reduced inflammation by β -hydroxybutyric acid are essential diet restriction benefits against liver injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116(27):13533-13542.)。

虚血再灌流 (IR) 刺激は肝障害を引き起こすが、刺激前の絶食処置は肝障害を有意に抑制する。

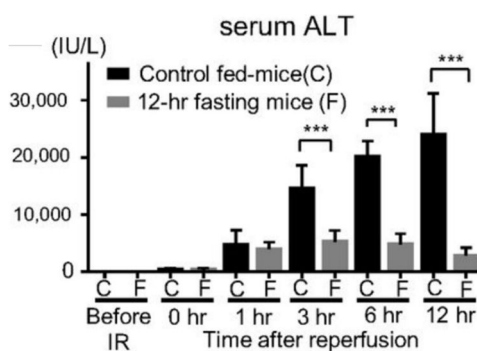


図 1: 絶食有無による肝虚血再灌流障害

実臨床においては、ヒトの肝臓外科手術および肝移植時には肝 IRI は不可避であり、術後肝機能障害の要因となる。しかしながら、背景肝には肝硬変を伴うことが多く、周術期の絶食管理は好ましくない。

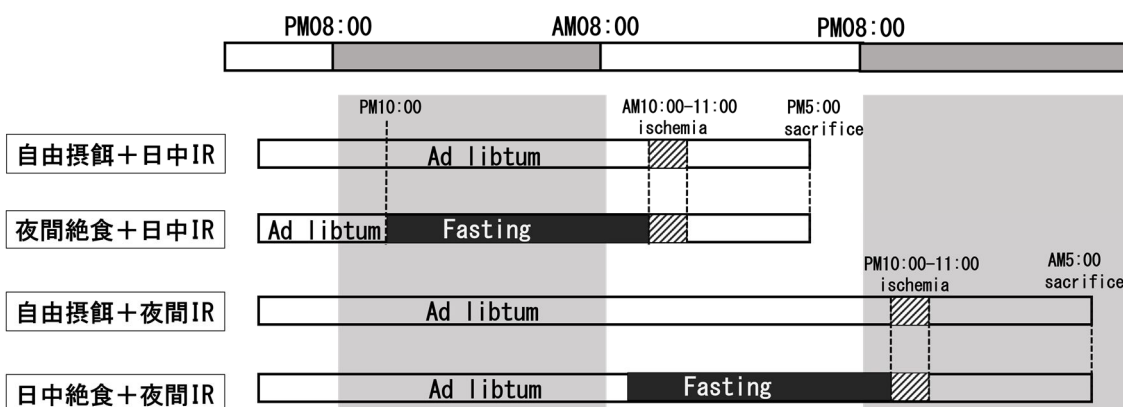
2. 研究の目的

術前 12 時間絶食は前日晚からの術当日朝にかけての夜間絶食処置としてきたが、介入タイミングが日中と夜間とで変化するか、変化した場合にはどのような機序によるものかを検証する。さらに、より効率的なヒト肝臓手術時の周術期管理を見出すことを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスを用いて、(A) 自由摂餌 + 日中 IR 群 (B) 夜間 12 時間絶食 + 日中 IR 群 (C) 自由摂餌 + 夜間 IR 群、(D) 日中 12 時間絶食 + 夜間 IR 群の 4 群 (n = 6) に分けて実験を行った。肝温虚血再灌流モデルとして、IR 刺激 (70% 部分肝虚血 1 時間) を加えて、再灌流 6 時間後に血液および肝組織サンプル回収した (図 2)。

図 2: 研究プロトコール



(2) 概日リズムの分子機構の解明が進み、特に Bmal-1・CLOCK・Period (Per1, Per2)・CRY は、概日リズムの発振において中心的役割を持ち、その下流の遺伝子の発現をリズムカルに制御している。

上記サンプルを用いて、概日リズム遺伝子に関する PCR 解析を行い、絶食および IR 刺激による肝臓組織での概日リズムの変化を検証した。

(3) 各種代謝産物の変動を検出するため、肝 IRI の抑制効果をより強く認めた夜間絶食に焦点を置き、夜間 12 時間絶食の有無、IR 刺激の有無による 4 群に分けて、モデルを作成して、肝臓組織におけるメタボローム解析を行った。

4. 研究成果

(1) 短時間絶食 12 時間後に IR 刺激 (70%部分肝虚血 1 時間) を加えて再灌流 6 時間後における血中肝酵素 (AST, ALT) は、絶食のタイミングが日中でも夜間でも絶食介入により有意に抑制した (図 3)。しかし、自由摂餌群同士、絶食群同士の比較では肝酵素の差異は有意ではなく、絶食タイミングの違いによる肝酵素の変動は確認できなかった。

図 3 血中 AST および ALT 値 (各群 n=6, * p<0.05)

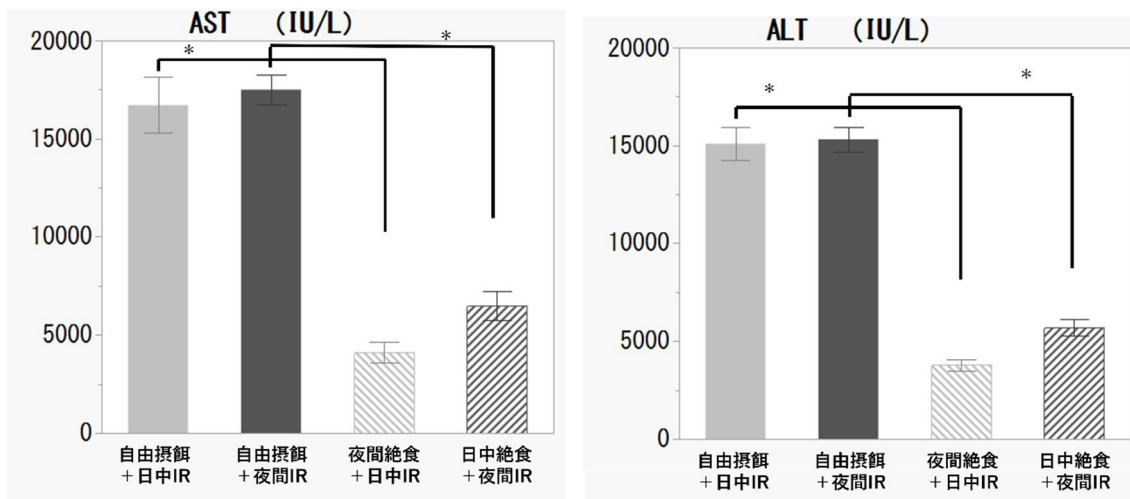
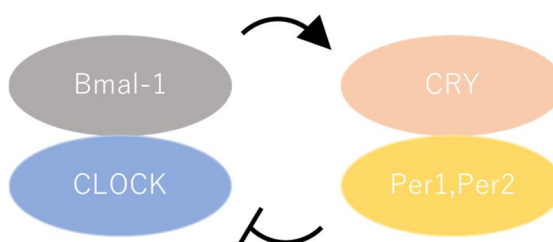


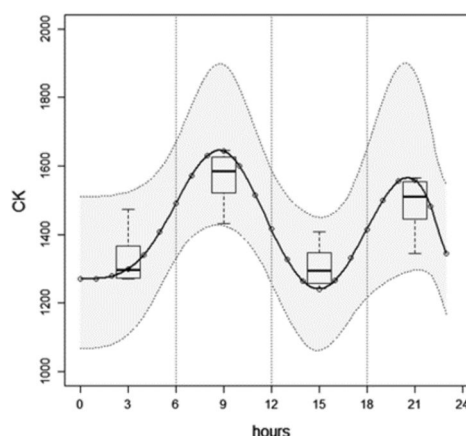
図 4 マウス概日リズム

(2) マウスの概日リズム遺伝子の発現は、中枢の視交叉上核の支配を受け、深夜から早朝にかけて Bmal-1 および CLOCK の産生を増加させ、更にその Bmal-1, CLOCK が結合して、CRY, Per をポジティブフィードバックにより増加させる。増加した CRY, Per は Bmal-1, CLOCK の産生をネガティブフィードバックにより減少させる。これらを 24 時間周期で繰り返すことで組織における概日リズムは形成される (図 4)。



概日リズムはレニン アンジオテンシン系に影響し、血管抵抗や血栓リスクを変動させ、早朝から午前中に心血管イベントが起きやすいとされている。心筋梗塞においては、虚血イベントのタイミングと梗塞範囲の影響に関して、心筋梗塞の発症時間別の報告がある。午前 6-12 時に発症した場合には CK 上昇および梗塞範囲は最大となり、午後 0-6 時に発症した場合には CK 上昇及び梗塞範囲は最少となる (図 5: Suárez-Barrientos A, López-Romero P, Vivas D, et al. Circadian variations of infarct size in acute myocardial infarction. Heart. 2011;97(12):970-976.)

図 5: 心筋梗塞発症時間と血中 CK 最高値

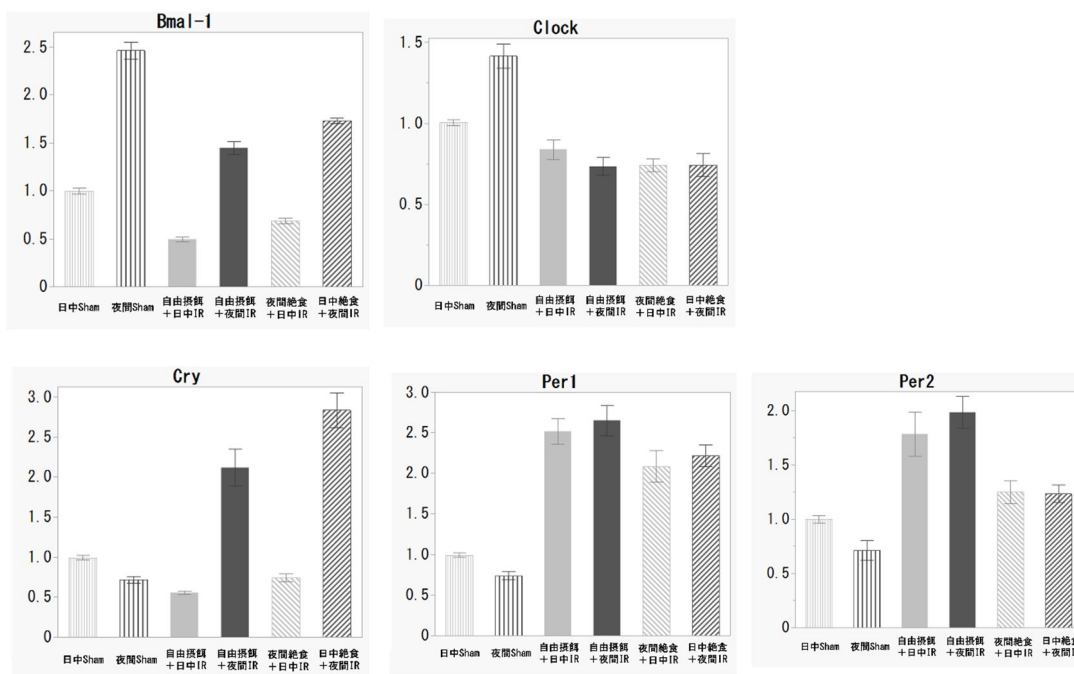


概日リズムと手術成績に関する研究では、心臓弁膜症に対する手術成績は、午後手術群において、午前手術群と比較して有意に心筋障害を反映するトロポニン T 上昇が少なく、術後合併症も少ないことが報告されている (Montaigne D, Marechal X, Modine T, et al. Daytime variation of perioperative myocardial injury in cardiac surgery and its prevention by Rev-Erb antagonism: a single-centre propensity-matched cohort study and a randomised study. Lancet. 2018;391(10115):59-69.)。それ故に、絶食介入は概日リズム遺伝子発現を変動させる可能性が考えられた。

実際の肝組織サンプルで概日リズム遺伝子の PCR を行った結果を示す。Bmal-1、CRY は上昇したが、Per1,2 には明らかな差異はなく、通常の制御状態とは異なる推移を示した(図 6)。すなわち、本来パラレルで上下変動する Bmal と Clock、Period1/2 と Cry はそれぞれ絶食で違う挙動となった。事前の 12 時間絶食の介入は、単純に体内の概日リズムの時間をずらして遺伝子発現量を変えるのではなく、概日リズム遺伝子の挙動自体を変化させる可能性が示唆された。今回の概日リズム遺伝子の PCR 解析からは、絶食が与える概日リズムへの変化を一元的に解釈するのは困難であった。

今回は 12 時間間隔の 2 点のみの測定であり、その影響がリズムを保持したものかどうかは、追加ポイントでの測定が必要となる。絶食により概日リズム遺伝子の発現量は影響を受けるが、その影響は遺伝子ごとに違う可能性が考えられる。

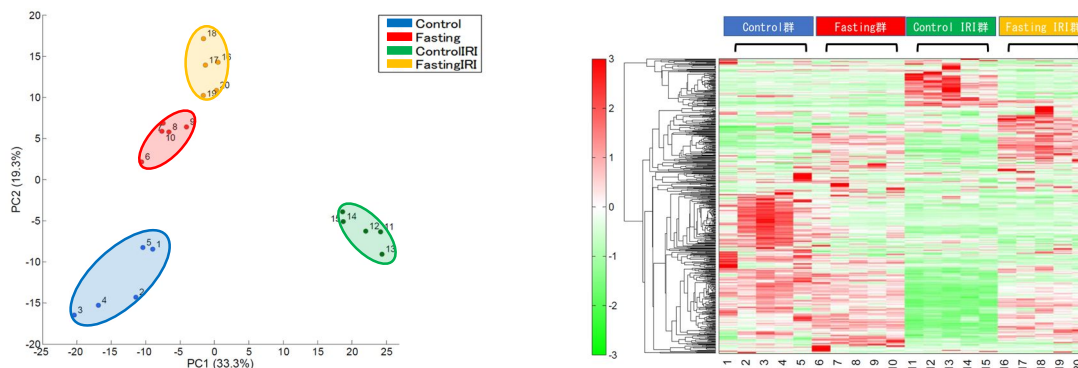
図 6：概日リズム遺伝子の PCR 解析 (各群 n=4, 有意差なし)



以上の結果より、今回の検討では、絶食を行う時間帯の相違による肝 IRI へ及ぼす変化は著明ではなく、概日リズムによる肝 IRI への影響については一定の見解は得られなかった。また、インスリン抵抗性に対する体内時計の関与が、Cosinor analysis を用いることで解析されており (Xie Z, Sun Y, Ye Y, et al. Randomized controlled trial for time-restricted eating in healthy volunteers without obesity. Nat Commun. 2022;13(1):1003.) 概日リズムの変化については、Cosinor analysis などによる評価方法を用いることで明らかになる可能性がある。

(3) 肝組織での状態変動を検証するため、抑制効果が著明であった夜間 12 時間絶食および IR 刺激有無における肝組織のメタローム解析を行い検討した(図 7)。肝臓の代謝産物は大きく変化しており、見出された物質として 5-アミノレブリン酸(ALA)の同定に至り、5-ALA の効果を検証している。

図 7 代謝産物の主成分分析 (左) ヒートマップ (右)



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 1件）

1. 著者名 Kawasoe Junya, Uchida Yoichiro, Kawamoto Hiroshi, Miyauchi Tomoyuki, Watanabe Takeshi, Saga Kenichi, Tanaka Kosuke, Ueda Shugo, Terajima Hiroaki, Taura Kojiro, Hatano Etsuro	4. 巻 13
2. 論文標題 Propionic Acid, Induced in Gut by an Inulin Diet, Suppresses Inflammation and Ameliorates Liver Ischemia and Reperfusion Injury in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.862503	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11件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 内田洋一朗、川本浩史
2. 発表標題 短鎖脂肪酸の新たな可能性 - 基礎研究が示す肝障害の保護効果 from bench to bedside -
3. 学会等名 第38回日本臨床栄養代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内田洋一朗
2. 発表標題 肝臓外科手術における「短鎖脂肪酸」の新たな有用性 - 絶食基礎研究からの学び -
3. 学会等名 第29回侵襲とサイトカイン研究会/日本外科代謝栄養学会第60回学術集会およびアジア外科代謝栄養学会（ASSMN2023）合同開催（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川本浩史、内田洋一朗、渡邊 武、宮内智之、川添准矢、田中康介、嵯峨謙一、門野賢太郎、寺嶋宏明、波多野悦朗
2. 発表標題 Academic Surgeon が取り組む臨床栄養学 From bench to bedside の視点から
3. 学会等名 日本外科代謝栄養学会第60回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内田洋一朗
2. 発表標題 肝臓外科周術期管理におけるこれからのERAS - 絶食基礎研究から学ぶ「短鎖脂肪酸」の可能性
3. 学会等名 第33回九州内視鏡・ロボット外科手術研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内田洋一朗、川本浩史、川添准矢、田中康介、嵯峨謙一、宮内智之、平尾浩史、影山詔一、中村公治郎、田浦康二朗、寺嶋宏明、波多野悦朗
2. 発表標題 肝虚血再灌流障害における腸内環境調整の重要性
3. 学会等名 Japan Digestive Disease Week 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Kidoguchi, Yoichiro Uchida, Hiroshi Kawamoto, Junya Kawasoe, Tomoyuki Miyauchi, Kosuke Tanaka, Kenichi Saga, Kentaro Kadono, Hirofumi Hirao, Shoichi Kageyama, Kojiro Nakamura, Takeshi Watanabe, Hiroaki Terajima, Etsuro Hatano
2. 発表標題 The Novel Findings in Liver Ischemia-Reperfusion Injury - Fasting and Short-Chain Fatty Acids-
3. 学会等名 The 33rd Annual Meeting of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 内田洋一朗、影山詔一、中村公治郎、嵯峨謙一、田中康介、川本浩史、川添准矢、宮内智之、小島秀信、門野賢太郎、平尾浩史、伊藤貴洋、渡邊 武、寺嶋宏明、波多野悦朗
2. 発表標題 外科医がクリニカルマインドを持って基礎研究に取り組む重要性
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 内田洋一朗、波多野悦朗
2. 発表標題 適正な静脈栄養管理における新潮流 - 新しい概念「中間的静脈栄養(IPN)」の提唱 -
3. 学会等名 第37回日本臨床栄養代謝学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoichiro Uchida, Shinya Okumura, Tomoaki Yoh, Takuya Kato, Ken Fukumitsu, Takashi Ito, Takamichi Ishii, Satoru Seo, Koichiro Hata, Etsuro Hatano
2. 発表標題 The activity to obtain Board Certified Expert Surgeon (Hepatobiliary-Pancreatic field)
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kosuke Tanaka, Yoichiro Uchida, Junya Kawasoe, Hiroshi Kawamoto, Kenichi Saga, Takeshi Watanabe, Tomoyuki Miyauchi, Shugo Ueda, Kojiro Taura, Hiroaki Terajima, Etsuro Hatano
2. 発表標題 The impact of propionic acid induced by prebiotics on mice liver ischemia and reperfusion injury
3. 学会等名 Transplantation Science Symposium Asian Regional Meeting 2022(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内田洋一朗、川添准矢、嵯峨謙一、寺嶋宏明、田浦康二郎
2. 発表標題 Academic Surgeon 育成に向けた positive feedback させるシステム構築の有用性
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
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	宮内 智之 (Miyachi Tomoyuki) (10852303)	公益財団法人田附興風会・医学研究所 腫瘍研究部・研究員 (74314)	
研究分担者	内田 洋一郎 (Uchida Yoichiro) (30597745)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	
研究分担者	渡邊 武 (Watanabe Takeshi) (40028684)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・研究員 (14301)	

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