

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16394

研究課題名（和文）脂肪肝グラフトの酸素化灌流修復における小胞体・ミトコンドリア相互作用の意義

研究課題名（英文）Basic study to elucidate the significance of endoplasmic reticulum-mitochondria interaction in oxygenated perfusion of fatty liver grafts

研究代表者

石川 隆壽（Ishikawa, Takahisa）

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：10844748

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：脳死ドナー不足の解決策の一つに脂肪肝グラフトの利用が挙げられる。それ故、標準的なドナー基準から逸脱する、30-60%程度のmacro-steatosisで、炎症、線維化がない脂肪肝の実験モデルが望まれる。本研究では2週間以内の高脂肪高コレステロール食給餌により、必要な脂肪肝を再現性よく作成できることを示した。脂質の量をLC-MS/MSと質量分析イメージング法で評価する方法も既に確立した。今後、冷保存再灌流障害に対する脂質の量と質の影響を解析する。移植前に肝内の脂質の質と量を制御するコンディショニングが虚血再灌流症候群の軽減に繋がる可能性があり、臓器灌流との親和性が高い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳死ドナー不足の解決策の一つに脂肪肝グラフトの利用が挙げられる。それ故、標準的なドナー基準から逸脱する、30-60%程度のmacro-steatosisの実験モデルが望まれる。本研究では2週間以内の高脂肪高コレステロール食給餌により、必要な脂肪肝を再現性よく作成できることを示した。脂質の量をLC-MS/MSと質量分析イメージング法で評価する方法も既に確立した。今後、冷保存再灌流障害に対する脂質の量と質の影響を解析する。移植前に肝内の脂質の質と量を制御するコンディショニングが虚血再灌流症候群の軽減に繋がる可能性があり、臓器灌流との親和性が高く、本領域の研究、臨床の発展に寄与するはずである。

研究成果の概要（英文）：The use of fatty liver grafts is one of the solutions to the shortage of brain-dead donors. Therefore, an experimental model of fatty liver with macro-steatosis of 30-60%, without inflammation or fibrosis, is desired. This study demonstrated that a high-fat, high-cholesterol (HFC) diet for up to two weeks reliably produces the required fatty liver. Methods for evaluating lipid quantity and quality using LC-MS/MS and imaging mass spectrometry have already been established. In the future, we will analyze the effects of lipid quantity and quality on cold storage reperfusion injury. Conditioning to control the quality and quantity of intrahepatic lipids before transplantation may reduce ischemia-reperfusion syndrome and is highly compatible with organ perfusion.

研究分野：臓器灌流

キーワード：脂肪肝 肝移植 機械灌流 単純冷保存 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

<臨床的背景>

脂肪肝グラフトの利用はドナー不足解消の方策となる。臨床的には、小滴性脂肪肝は risk 因子にならないが、高度(60%<)の大滴性脂肪肝は予後不良である。近年、4-7 灌流 (HMP, HOPE)、20-27 灌流 (SNMP)、37 灌流 (NMP) を 3~48 時間行うことで、大滴性(30-60%)脂肪肝の虚血再灌流傷害が軽減された。しかし、脱脂の程度は機械灌流 (MP) protocol によって異なり、脱脂促進剤の効果、至適灌流温度のコンセンサスは無く、脱脂量と傷害軽減の程度にも相関は無い (Linares 2019 Transplantation)。

<CS と MP における重水の効果>

我々は重水含有緩衝液(新液)を開発し、ラット心 (Wakayama 2012 Transplant Int)、肝の冷保存再灌流障害を軽減することを報告した (Shimada 2019 J Clin Med)。新液はミトコンドリア機能障害、臓器膨張、Ca²⁺ overload を抑制し、14-3-3 結合タンパクのリン酸化を増強した。H₂ 溶存新液による HMP では門脈抵抗増大、肝重量増加を抑制した。

<脂肪肝の進展と冷保存再灌流>

肝細胞の脂肪滴は小胞体で合成されて細胞質に放出され、小滴が融合して大滴になる。その過程で Triglyceride を主とする脂質と共に、Perilipin 等の機能分子が内包され、細胞内小器官として機能する。脂肪化の程度は脂質滴の大きさ、量により grading される。大滴性 (30-60%) 脂肪肝のうち予後良好症例は低リスクグラフトと長期予後は変わらず、再灌流後早期の傷害を乗り越えることが重要である (Crome 2020 Liver Transpl)。脂肪肝の冷保存再灌流では中心静脈域の肝細胞が壊死し、流出した脂肪が細胞外に停滞する (Lipopeliosis)。この脂質は 6 か月程度で clean up されるが、MP 時の挙動は不明である。

<本研究の着想に至った経緯>

ラット肝を UW 液で冷保存すると縮小し、等張液で再灌流すると腫大し、何れも再灌流後に急速に肝臓が腫大して門脈抵抗が増大する。低張な重水液 (Dsol) を用いると、冷保存時の臓器収縮、再灌流時の膨張が抑制され、門脈抵抗低減、傷害軽減に成功した (Shimada 2019 J Clin Med)。我々は 48h 冷保存肝(Shimada 2016 Artificial Organs)、心停止肝の冷保存後 (Ishikawa 2018 Surg Today) の再灌流時に水素ガス (H₂) 溶存液を門脈投与し、抗酸化や Nrf2 誘導よりも早期に門脈抵抗を低下させた。申請者らは市販 UW-MP 灌流液を用いてラット心停止肝を低温灌流し、再灌流後に肝表面 (末梢)に帯状の低灌流・壊死層を認めた。一方、H₂ 溶存低温灌流では帯状領域が消失し、低温灌流中の門脈抵抗が低下した。H₂による血管弛緩は低温でも同様に発揮された。

申請者らは別研究で SHRSP5-Dmcr rat の高脂肪・コレステロール (HFC)食給餌による NASH モデルを作成し、2-4 週給餌で脂肪肝、9 週で NASH になることを NAS score, Oil O Red, スダン染色で確認した。中等度脂肪肝 (33-66%) となる HFC 食給餌日数を検討し、MRI により、脂肪化の程度をより低侵襲に評価し、安定した脂肪肝モデルを作成できるめどが立った。

2. 研究の目的

脂肪肝の冷保存再灌流傷害を軽減する新しい肝体外灌流法を確立する

a) 再現性が高い脂肪肝モデルを作成する、b) 新規臓器保存液の有効性を脂肪肝の冷保存再灌流モデルで探索する、ことを本課題の具体的な目標とした。

3．研究の方法

(a) 再現性が高い脂肪肝モデルの作成

雄 SHRSP5-Dmcr rat に高脂肪・コレステロール (HFC)食を給餌し、給餌期間を 5 日、1, 2, 4, 12 週とし、肝臓を採取した。肝臓は HE 染色、ズダン染色、Oil O Red 染色、Elastica van Gieson 染色を行った。HE 染色像を NAFLD Activity Score (NAS) により grading した評価基準の詳細は表に示した。合計をスコアの合計値 (満点 8 点)とした。(NASH・NAFLD 診療ガイド(2015), Hepatology 41 : 1313-21(2005) Int. J. Exp. Path. (2016), 97, 75–85)

スコア	脂肪沈着	風船様変性	小葉内炎症
0	<5%	なし	なし
1	5%～33%	少数	<2 カ所
2	33%～66%	多数	2～4 カ所
3	>66%	NA	>4 カ所

また、一部のラットでは犠牲死させる前に MRI を撮像し、Proton density fat fraction を算出した。さらに、NAS スコアと PDFF の値の相関を統計学的に解析した。

(b) ラット脂肪肝の虚血再灌流障害軽減法の探索：

4-6 週令の雄 SHRSP5-Dmcr ラットを購入し (日本 SLC, 浜松)、HFC 食 (船橋ファーム, 千葉) を 2 週間給餌し、脂肪肝を作成した。全身麻酔下に肝臓を摘出し、氷冷した Belzer UW® cold storage transplant solution (UW 液; Bridge to Life; UK)、あるいは、新液中に 24 時間浸漬した。実際の肝臓と保存液の温度は 2-4℃程度に維持される。なお、新液は先行研究で有効性を報告した重水含有臓器保存液 (Dsol) のバッファー成分を改変した自作液である (組成は非開示)。冷保存後の肝臓は単離ラット肝灌流装置 (Isolated perfused rat liver; IPRL) で 90 分間再灌流した。灌流条件は既報のとおり (Shimada 2016 *Artificial Organs*)である ; Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (KHB 液)、閉鎖循環回路、37℃, 450<pO₂<550 mmHg, タウロコール酸ナトリウム (0.3 mM)、灌流流量 300mL。灌流中は常時門脈圧 (PVP) をモニターし、30 分後までに PVP を 12 cmH₂O に下げないように流速を調節した。PVP を流速で除することにより門脈抵抗 (PVR) を算出した。灌流終了時までの積算産生量 (uL)、酸素消費率、灌流液中 LDH 活性を評価した。

4．研究成果

(a) 再現性が高い脂肪肝モデルの作成: SHRSP5-Dmcr rat に HFC 食を給餌すると、給餌期間に応じて肝臓の外観が変化した。1w から肝の色調が変化し、2w では著明に白色調を呈し、4w では著明な肝腫大と白色調の増強を呈し、12w では発赤と硬化が観察された (図 1)。16w には全ての個体が死亡した (n=6)。死亡個体に癌を疑う腫瘤を認めなかった。



図 1 : SHRSP5-Dmcr ラットの肝臓外観
HFC 食の給餌日数により肝の外観が劇的に変化した。

HFC 5d, 1w, 2w 給餌群の NAS スコアはそれぞれ、 2.2 ± 0.45 , 3.3 ± 0.82 , 5 ± 0.89 (Mean $\pm$ SD; n=6) であり、給餌日数によって脂肪肝の程度を再現性良く制御できた (図 2)。

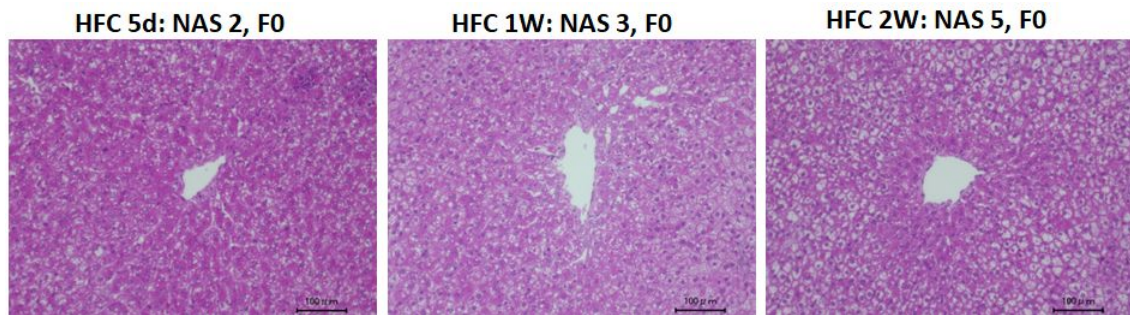


図 2 : SHRSP5-Dmcr ラットの肝組織像
HFC 食の給餌日数により HE 像が変化した。

Steatosis grade、NAS total score は共に給餌日数と相関した。移植の拡大適応として検討したい steatosis grade 2 点 (33-66%の脂肪沈着) は 7 日以下の HFC 給餌により作成できた (図 3)。

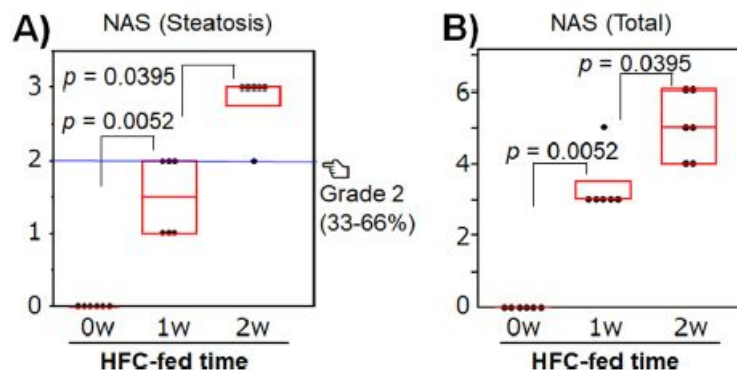


図 3 : HFC 食給餌日数と脂肪肝
A) NAS steatosis スコアと HFC 給餌日数
B) NAS total スコアと HFC 給餌日数。
両者とも給餌日数によって有意に変化した。

HFC 給餌期間が 0, 1, 2w の 3 群を比較すると、給餌期間毎に MRI PDFF 値は分かれ、各群の値は有意に異なっていた (図 4A)。さらに、PDFF 値は NAS の脂肪化の点数と相関した (図 4B)。これらの結果は、SHRSP5-Dmcr ラットに HFC 食を給餌する日数を制御することによって、脂肪肝の程度を制御できることを示しており、MRI で PDFF 値を評価することで、企図した脂肪肝の動物を再現性良く作成できることを示していた。本研究の成果により、33-66%の脂肪化を呈する脂肪肝を用いた冷保存、灌流モデルを再現性良く作成できる技術が確立された。

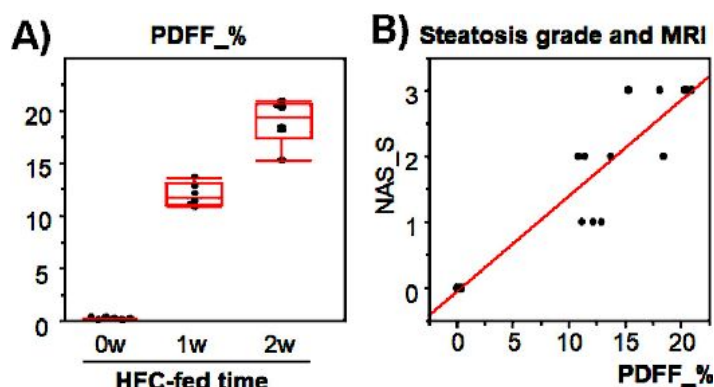
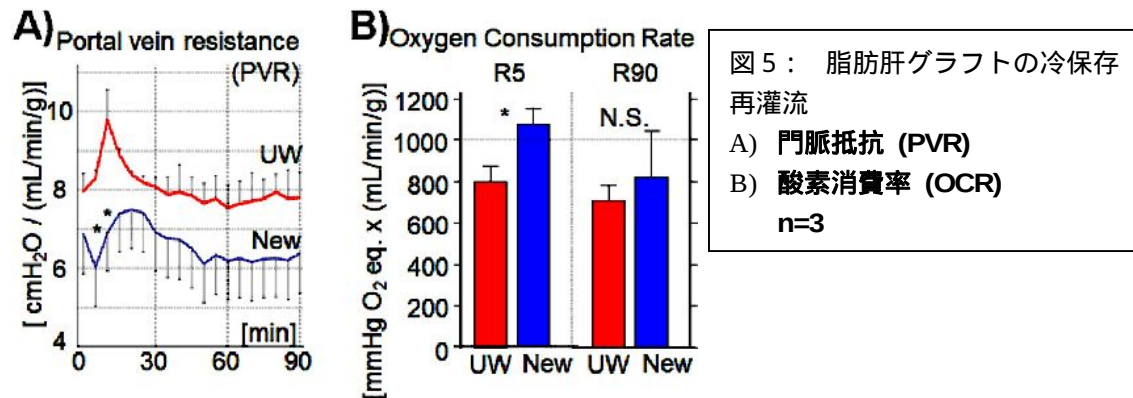
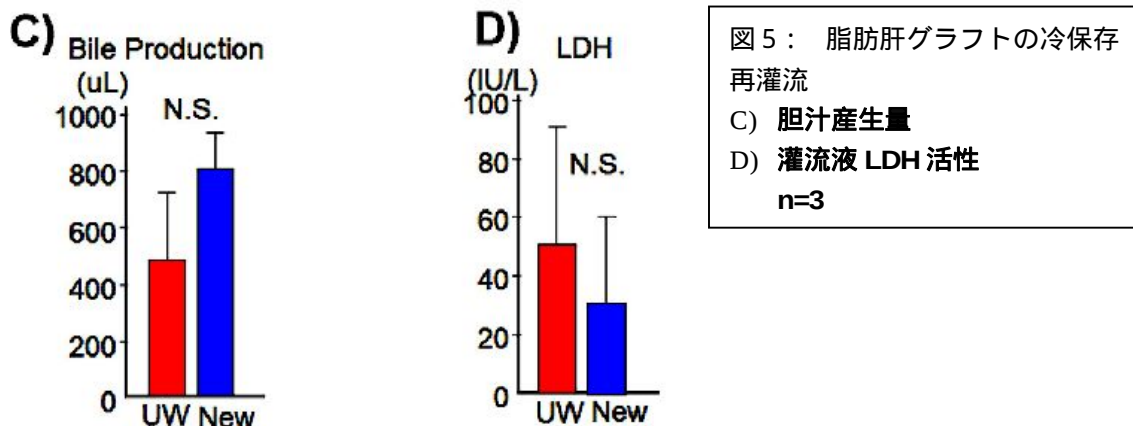


図 4 : MRI 所見 (PDFF) と HFC 給餌日数、NAS
A) HFC 食給餌日数と MRI (PDFF)
B) MRI-PDFF と NAS steatosis スコア
何れも相関した。

- A) 再灌流直後には冷保存中に虚脱したグラフト内の末梢類洞を一度開くために 2 分間高流量 (3 mL/min/g) で灌流し、直ちに 20 cmH₂O 以下となるように流量を下げた。その後 30 分までに 12 cmH₂O になるように流量を下げた。門脈圧は再灌流直後から 5 分までの間、UW 群では PVR は上昇し、新液群では低下した。約 15 分で温度が安定し、PVP, PVR も安定傾向を示し、30 分以降は PVP, PVR ともに安定した。30-90 分の灌流中新液群で UW 群よりも高値であったが有意差は認めなかった (n=3)。
- B) 酸素消費率 (OCR) は再灌流直後 (R5) では新液群で有意に高値であったが、再灌流終了時 (R90) には同等の値となった



- C) 90 分の再灌流中に産生された胆汁量は新液群で高値の傾向を認めた。
- D) 灌流液中 LDH 活性は新液群で低値の傾向を認めた。



考察

SHRSP5-Dmcr ラットに高脂肪高コレステロール (HFC) 食を給餌する脂肪肝誘発モデルは食餌性に再現性良く脂肪肝を作成できた。また、HE 染色での NAS score、Oil O red 染色での評価、MRI_PDF 値での評価、何れにおいても安定した脂肪肝モデルであることが示された。これまでに多くの脂肪肝モデルが報告され、多くの論文が発表されてきた。どのモデルが研究したい病態に適しているかはそれぞれの研究者、研究領域のコンセンサスが必要になるであろう。本研究は、肝移植における脂肪肝グラフトの冷保存再灌流障害を研究対象としている。現在臨床で標準的なドナー基準からは逸脱する、リスクがある脂肪肝を安全に利用するための研究に利用したいニーズがある。それ故、脂肪化の状態が macro-steatosis で 30-60% 程度の脂肪化があり、炎症、線維化がないものが望まれる。本研究の結果から、2 週間の HFC 食給餌が再現性をもって最適なモデルであることが分かった。現在、脂質を抽出し LC-MS/MS で脂質の量と質を評価している。今後、冷保存再灌流障害に対して、脂質の量と質のどちらが右翼影響するのかを解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Fukai Moto, Sakamoto Sodai, Bochimoto Hiroki, Zin Nur Khatijah Mohd, Shibata Kengo, Ishikawa Takahisa, Shimada Shingo, Kawamura Norio, Fujiyoshi Masato, Fujiyoshi Sunao, Nakamura Kosei, Shimamura Tsuyoshi, Taketomi Akinobu	4. 巻 55
2. 論文標題 Hypothermic Machine Perfusion with Hydrogen Gas Reduces Focal Injury in Rat Livers but Fails to Restore Organ Function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 1016 ~ 1020
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2023.02.036	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 -

1. 著者名 Fukai Moto, Sugimori Hiroyuki, Sakamoto Sodai, Shibata Kengo, Kameda Hiroyuki, Ishikawa Takahisa, Kawamura Norio, Fujiyoshi Masato, Fujiyoshi Sunao, Kudo Kohsuke, Shimamura Tsuyoshi, Taketomi Akinobu	4. 巻 55
2. 論文標題 Rapid and Reliable Steatosis Rat Model Shrsp5-Dmcr for Cold Storage Experiment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 1032 ~ 1035
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2023.02.063	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 -

1. 著者名 Fukai Moto, Sakamoto Sodai, Shibata Kengo, Fujiyoshi Masato, Fujiyoshi Sunao, Bochimoto Hiroki, Ishikawa Takahisa, Shimada Shingo, Nakamura Kosei, Kawamura Norio, Shimamura Tsuyoshi, Taketomi Akinobu	4. 巻 55
2. 論文標題 Combination of Cold Storage in a Heavy Water-Containing Solution and Post-Reperfusion Hydrogen Gas Treatment Reduces Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Livers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 1027 ~ 1031
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2023.03.061	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 -

1. 著者名 Sakamoto Sodai, Bochimoto Hiroki, Shibata Kengo, Zin Nur Khatijah Mohd, Fukai Moto, Nakamura Kosei, Ishikawa Takahisa, Fujiyoshi Masato, Shimamura Tsuyoshi, Taketomi Akinobu	4. 巻 12
2. 論文標題 Exploration of Optimal pH in Hypothermic Machine Perfusion for Rat Liver Grafts Retrieved after Circulatory Death	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 3845 ~ 3845
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm12113845	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 -

1. 著者名 Fukai Moto, Sakamoto Sodai, Shibata Kengo, Ishikawa Takahisa, Kawamura Norio, Fujiyoshi Masato, Fujiyoshi Sunao, Nakamura Kosei, Bochimoto Hiroki, Shimada Shingo, Shimamura Tsuyoshi, Taketomi Akinobu	4. 巻 56
2. 論文標題 Important Constituents of Heavy Water-containing Solution for Cold Storage and Subsequent Reperfusion on an Isolated Perfused Rat Liver	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 223 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2023.10.005	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9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Moto Fukai, Kengo Shibata, Sodai Sakamoto, Masato Fujiyoshi, Sunao Fujiyoshi, Kosei Nakamura, Takahisa Ishikawa, Norio Kawamura, Nur Khatijah Mohd Zin, Hiroki Bochimoto, Tsuyoshi Shimamura, Akinobu Taketomi.
2. 発表標題 Important components of D2O containing solution for liver cold storage using an isolated perfused rat liver (IPRL).
3. 学会等名 Transplantation Science Symposium (TSS) Asian Regional Meeting 2022, Kyoto, 25-26 Sep. 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Moto Fukai, Kengo Shibata, Sodai Sakamoto, Masato Fujiyoshi, Sunao Fujiyoshi, Kosei Nakamura, Takahisa Ishikawa, Norio Kawamura, Nur Khatijah Mohd Zin, Hiroki Bochimoto, Tsuyoshi Shimamura, Akinobu Taketomi.
2. 発表標題 Cold storage in D2O containing solution and post-reperfusion H2 gas treatment reduced rat liver damage: An IPRL study
3. 学会等名 Transplantation Science Symposium (TSS) Asian Regional Meeting 2022, Kyoto, 25-26 Sep. 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Moto Fukai, Kengo Shibata, Sodai Sakamoto, Masato Fujiyoshi, Sunao Fujiyoshi, Kosei Nakamura, Takahisa Ishikawa, Norio Kawamura, Nur Khatijah Mohd Zin, Hiroki Bochimoto, Tsuyoshi Shimamura, Akinobu Taketomi.
2. 発表標題 Hypothermic machine perfusion with H2 gas reduced focal injury in DCD rat liver but failed to restore organ function.
3. 学会等名 Transplantation Science Symposium (TSS) Asian Regional Meeting 2022, Kyoto, 25-26 Sep. 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名
Moto Fukai, Kengo Shibata, Sodai Sakamoto, Masato Fujiyoshi, Sunao Fujiyoshi, Kosei Nakamura, Takahisa Ishikawa, Norio Kawamura, Nur Khatijah Mohd Zin, Hiroki Bochimoto, Tsuyoshi Shimamura, Akinobu Taketomi.
2. 発表標題
Rapid and reliable steatosis rat model (SHRSP5-Dmcr) for cold storage experiments: A preliminary study.
3. 学会等名
Transplantation Science Symposium (TSS) Asian Regional Meeting 2022, Kyoto, 25-26 Sep. 2022 (国際学会)
4. 発表年
2022年

1. 発表者名
Kengo Shibata, Takahiro Hayasaka, Satsuki Hashimoto, Kohei Umemoto, Takahisa Ishikawa, Sodai Sakamoto, Koichi Kato, Shingo Shimada, Norio Kawamura, Kenji Wakayama, Nozomi Kobayashi, Yuka Hama, Moto Fukai, Tsuyoshi Shimamura, and Akinobu Taketomi
2. 発表標題
Lysophosphatidylinositol (16:0) as a possible cause of ischemia reperfusion injury
3. 学会等名
Transplantation Science Symposium (TSS) Asian Regional Meeting 2022, Kyoto, 25-26 Sep. 2022 (国際学会)
4. 発表年
2022年

1. 発表者名
深井原、中藪拓哉、大谷晋太郎、柴田賢吾、千葉仁志、恵淑萍、坂本聡大、若山顕治、川村典生、後藤了一、渡辺正明、嶋村剛、武富紹信
2. 発表標題
新規抗酸化物質 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMB) は心筋細胞の冷保存傷害を軽減する
3. 学会等名
第122回日本外科学会 2022.4.14 (SF-109-8 サージカルフォーラム) Hybrid開催 Web 発表
4. 発表年
2022年

1. 発表者名
坂本聡大、柴田賢吾、石川隆壽、島田慎吾、川村典生、若山顕治、藤好真人、渡辺正明、後藤了一、巖築慶一、加藤紘一、嶋村剛、深井原、武富紹信
2. 発表標題
心停止肝に対する低温機械灌流の至適pHの検討
3. 学会等名
第122回日本外科学会 2022.4.14 (SF-29-6 サージカルフォーラム) Hybrid開催 Web 発表
4. 発表年
2022年

1. 発表者名 深井原、柴田賢吾、坂本聡大、島田慎吾、加藤紘一、藤好真人、若山顕治、石川隆壽、川村典生、嶋村剛、武富紹信
2. 発表標題 新規抗酸化物質 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMA) は小腸上皮 細胞の冷保存傷害を軽減する
3. 学会等名 第121回日本外科学会 2021.4.10 (SF-091-8) hybrid開催
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本聡大、深井原、柴田賢吾、島田慎吾、加藤紘一、藤好真人、若山顕治、石川隆壽、川村典生、嶋村剛、武富紹信
2. 発表標題 心停止ドナー肝に対する機械灌流における水素ガスの有効性の検討
3. 学会等名 第121回日本外科学会 2021.4.8 (PS-026) hybrid開催
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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