

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月9日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659237

研究課題名（和文）臓器ストレス測定法の開発と外科領域への応用

研究課題名（英文）Development of the tools for organ stress and its surgical application

研究代表者

藤堂 省 (TODO SATORU)

北海道大学・大学院医学研究科・特任教授

研究者番号：60136463

研究成果の概要（和文）：

脂肪化した肝は、肝切除等の外科治療に対して術後肝機能不全・再生不全、術後感染症、敗血症に関与する。今回、メタボリック症候群により脂肪化した肝臓に対し、外科的治療が術後肝機能、障害、再生にどの程度の影響を及ぼすかを、様々な光プローブにて生体イメージング法により解析した。マウスにて経時的・非侵襲的に評価し、生体イメージング法による肝ストレス測定の有用性を示し、脂肪肝における外科治療後の障害、再生不全の機序を解明した。

研究成果の概要（英文）：

Steatotic liver, very sensitive to various surgical procedures, is associated with post-operative liver failure, impaired regeneration, post-operative infection and sepsis. In the present study, we analyzed whether the surgical stress affects the post-operative liver function, injury and regeneration of steatotic liver by newly developed optic probes for bio-imaging. We evaluated mouse liver continuously and non-invasively and analyzed the underlying mechanism of post-operative liver injury and impaired regeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	0	2,100,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	240,000	3,140,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：生体イメージング、脂肪肝、肝ストレス、メタボリック症候群、肝障害、肝再生

1. 研究開始当初の背景

わが国では、40～74歳の男性の4人に1人が、メタボリックシンドロームに罹患していると推測され、メタボリックシンドロームが国民健康に重大な問題を引き起こし、国民医療費に莫大な負担をかけていることは

周知の事実である。平成20年より特定健診が始まり、国をあげてのメタボリックシンドローム克服が期待される中で、メタボリックシンドロームの病因解明が進められている。メタボリック症候群の病態の理解が進むにつれ患者数は急増し、これまでは見過ごされていた術後合併

症への影響が注目されてきている。とくに、メタボリック症候群には、肝へのストレスが主要な病因のひとつであるのに加えて、肝の脂肪化、インシュリン抵抗性を伴うために、肝易傷害性、再生能低下への影響が懸念されている。そのため、そのメタボリック症候群における各臓器レベルでの病態解明と（とくに外科的）治療面での検討が緊急課題となってきた（Surgery for Obesity and Related Diseases, 1:245; 2005, Current Opinion in Lipidology, 16:421;2005）。肝臓は、脂肪組織・中枢神経をはじめとした様々な臓器と相関して生理的恒常性を維持しているが、それにより肝臓は様々なストレスに関して大いに寛容であり、許容能を有している可能性がある。しかしながら、外科治療などによりその機能限界を超えた場合にはその全肝臓としての機能不全に陥り、個体の生命を脅かすことになる。「許容される肝へのストレスを正確に解析し、その限界を非侵襲的に知ること（あるいは術前後に知ること）は、これからの外科治療の QOL を向上させ上で非常に重要な課題である」と考えられる。

2. 研究の目的

肝におけるストレスは、特殊な環境下でのストレスのみならず、日常生活においても慢性的にストレスがかかっている。これまでの動物実験等の結果から種々の肉体的・精神的ストレスが、具体的な肝の障害（脂質過酸化などの酸化ストレス、細胞障害）を引き起こしていることが示されているが、その詳細な機序は不明である。外科領域での治療の面では、こういったストレス下にある肝（脂肪肝、糖尿病状態下あるいはインシュリン抵抗性にある肝実質細胞・非実質細胞）は、外科的ストレスに対して敏感となっており、術後肝機能不全・再生不全、術後感染症、敗血症に直接関与すると考えられ、今後迅速な対応と対処法の確立が必要と考えられる。すなわち、「メタボリック症候群に陥った肝臓にたいし、どのような種類のストレスが、肝機能にどの程度影響を及ぼすか、さらにはそれが外科治療にどの程度の影響を及ぼすことになるのか否かを、個々の個体レベルで非侵襲的に知ることが今後の外科治療において重要なテーマである。本研究は、このテーマを最終目標とするユニークなものである。

3. 研究の方法

我々は、これまで肝の障害および再生の分子メカニズムを長年検討してきており、また肝細胞内における分子レベルでの糖・脂肪代謝

制御機構を研究してきた（J Hepatol 48; 422-432, 2008, Nat Med 10(2): 168 -174, 2004, J Clin Invest 112:989-998, 2003）。また、同時に生体における分子機能イメージング法の開発を行ってきた（PNAS 106 :15599-15603, 2009）。これらの研究結果をもとに、主として脂肪肝・糖尿病状態にある肝における外科侵襲に対する反応性・易傷害性の評価と手術限界・適応を研究する。

（1）種々のストレスマーカーにたいする分子機能プローブ・抗体搭載型プローブの作成

① ルシフェラーゼを基盤とした光プローブの作成：ストレスに関連する分子、糖代謝、脂肪代謝に関連する分子、細胞の生存・増殖に関連する分子に対する活性化(分子機能)プローブを作成する。

酸化ストレスを示す発光プローブの作成:ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを修飾するにより発光プローブ、を作製する。

小胞体ストレスにたいするプローブ:CHOP あるいは PERK に対する発光による機能プローブを作製する。

肝インスリン作用の可視化プローブ（インスリン受容体/ PI3-K シグナル経路と IL-6/ STAT3 シグナル経路の可視化）: 肝インスリン作用は、肝臓への直接作用であるインスリン受容体/ PI3-K シグナル経路活性化と、中枢神経インスリン作用による IL-6/ STAT3 経路の活性化により、糖脂質代謝調節作用を発揮する。そこで、インスリン受容体/ PI3-K シグナル経路活性化に必要な不可欠である IRS 蛋白と PI-3K との結合を可視化するとともに、STAT3 の核移行を可視化し、肝臓へのインスリン作用をリアルタイムに測定する。肝ストレス可視化モデルとの併用により、肥満・メタボリックシンドロームモデルにおけるインスリン抵抗性発症に重要な役割を果たす肝ストレスを同定し、また、それぞれのインスリン作用が、様々な肝ストレスにどのように応答するかを検討する。

蛍光物質 (GFP) を基盤とした酸化ストレスに対するプローブの作製: GFP の chromophore の近傍の cysteine に対する mutant を作成することにより、レドックス感受性のプローブを作製する。

細胞表面あるいは細胞内抗原に対する光プローブの作製: 上記分子に対して抗体を利用した光プローブを作製する。この方法が利用できれば、遺伝子導入することなく生体イメージングすることが可能となり、さらに臨床への応用の可能性が高まる。生体深部にて使用可能なプローブと組み合わせ、新しい生体イメージング法の開発を行なう（PNAS 106 :15599-15603, 2009）。

（2）細胞実験：細胞ストレス実験による上記プローブの機能の特異性およびシグナル強度の検証およびベクターの検討。

上記のプローブ作成後、肝細胞株をもちいて、transient transfection し、細胞内に導入して、

プローブの有効性を確認する。生体レベルでは、刺激によりベースラインのシグナル強度の5-10倍のシグナルを発する必要がある、細胞レベルでの検討により、必要に応じてプローブのデザインを再構築し、最適のプローブを作製する。

細胞実験におけるストレスとしては、以下の実験を検討する。①酸化ストレス、②低酸素、③高血糖ストレス、④senescence (細胞の老化ストレス)。

上記検証実験にて、十分な特異性とシグナル強度をもつプローブに対しては、小動物(肝臓)に導入するために、これらベクターをアデノウイルスベクターにその遺伝子を組み込む。プローブ搭載抗体のデリバリーに関しては、リポソームに封入することにより行う。我々は、種々のリポソーム合成の技術を有しているが、まず肝・網内系により有効に抗体をデリバリーすることを目指す(細胞膜表面抗原に対して)。その後、細胞内蛋白質へのデリバリーの実験に移る。これらの基本的ノウハウは、すでに原島らにより確立されている。

(3) 小動物実験による肝ストレス評価法の確立生体プローブ導入条件の検討。

これまでの段階で作成され、ベクターに組み込まれたプローブを、個々にマウス肝に導入し、それぞれのプローブの組織での発現をウェスタンブロット法、免疫染色法により確認する。

(4) メタボリック症候群(耐糖能異常、脂肪肝、肥満)にあるマウスに対し、外科的ストレスを加え、ストレスへの応答不全と全身への影響を生化学的検討および生体イメージング法により検討する。db/db(ob/ob)マウスをベースとして、脂肪肝、糖尿病肝、インシュリン抵抗性を示した小動物モデルを作成する。これらの動物モデルの肝において、種々の外科的ストレス(肝切除、肝虚血ストレス、感染症に対する抵抗力)に対するマーカー分子の反応性の変化を、作成したプローブにより、生体レベルで経時的にモニタリングするとともに、生化学的・分子生物学的な確認を行う。これらにより、ストレスにたいする肝の持つ許容能および限界を評価・検討する。

① 光プローブの遺伝子導入(アデノウイルスベクターあるいは肝特異的トランスジェニックマウス)による評価。

肝に対して特異的に導入されたマウス・ラットに対して、肝切除、虚血・再灌流傷害といった急性ストレスを加えて、各分子機能のダイナミックな変化を測定する。また、細胞増殖、生存、アポトーシス、肝細胞の糖・脂肪代謝の変化について、生化学的・分子生物学的に解析し、上記プローブの機能を裏付ける。

② 光プローブ搭載抗体による実験について

も、上記と同様にプローブ機能を検討する。

(5) 生体イメージングによる新たな診断法、治療法の開発を研究する。

光を利用したイメージングにより、同一個体において、非侵襲的かつ継続的な生体イメージングを行い、慢性的なストレス状態(肥満、脂肪肝、加齢、糖尿病など)に置かれた肝臓の術前ストレスを測定し、それが外科手術の経過に影響を与えるかどうかを検討する。すなわち、術前のストレス測定が、術後臓器機能(再生・障害)を予測できるかどうかを、同一個体により追跡することで検討する。最終的に、これらの臨床的な有用性、利便性、実用性を検討する。

4. 研究成果

(1) ストレスおよびストレス応答をイメージングするため、以下のような様々なプローブの作製を行なった。

ストレスに対する光プローブ: 酸化ストレスに対するGFPベースの蛍光プローブをアデノウイルスベクターに組み込み、細胞・マウス実験に使用できるようにした。

小胞体ストレス測定に対して、CHOPの遺伝子発現レポーター、PERK分子の活性化(相互作用)に対するプローブをいずれも発光系(ルシフェラーゼ)をもちいて作製することに成功した。細胞生存に対する光プローブ: 細胞の「生きの良さ(viability)」を示すマーカーとしてAkt分子に対する光プローブの作製を試み、プロトタイプのプローブの作製に成功した。

細胞死(アポトーシス、ネクロプトーシス)に対する光プローブ: 前者に対するプローブとして、カスパーゼ3活性化プローブの作製に成功した。また、後者に対するプローブとして、RIPK1/RIPK3の相互作用を感知する光プローブの開発を手掛けた。

(2) 細胞実験

細胞ストレス実験により、これまでに作成したプローブの機能の特異性およびシグナル強度の検証およびベクターを検討・評価した。

上記のプローブ作成後、肝細胞株をもちいて、transient transfectionし、細胞内に導入して、プローブの有効性を確認した。生体レベルでは、刺激によりベースラインのシグナル強度の5-10倍のシグナルを発する必要がある、細胞レベルでの検討により、必要に応じてプローブのデザインを再構築し、生体イメージングを目的とした最適のプローブの開発を行なった。酸化ストレス、低酸素・再酸素化、高血糖ストレス、senescence(細胞の老化ストレス)などを刺激として用い、細胞におけるストレスとストレス応答を検討し、作製した光プローブがマウス生体にて評価法として使用できることを確認した。

(3) マウスモデルを用いた検討

メタボリック症候群(耐糖能異常、脂肪肝、肥満)にあるマウスに対し、外科的ストレスを加

え、ストレスへの応答不全と全身への影響を生化学的検討および生体イメージング法により検討した。db/db(ob/ob)マウスをベースとして、脂肪肝、糖尿病肝、インシュリン抵抗性を示した小動物モデルを作成した。これらの動物モデルの肝において、種々の外科的ストレス（肝切除、肝虚血ストレス）に対するマーカー分子の反応性の変化を、作製した光プローブにより、生体レベルで経時的にモニタリングするとともに、生化学的・分子生物学的な確認を行なった。

光プローブの遺伝子導入（アデノウィルスベクター）により評価した。肝に対して特異的に導入されたマウスに対して、肝切除、虚血・再灌流傷害といった急性ストレスを加えて、各分子機能のダイナミックな変化を測定した。また、細胞増殖、生存、アポトーシス、肝細胞死について、生化学的・分子生物学的に解析し、上記プローブの機能を裏付けた。研究成果として特筆すべきことは、以下のような実験により得られた事実であった。

脂肪肝における肝切除モデルでは、肝切除による肝再生直後より強い酸化ストレスの発生が認められ、それに引き続いてアポトーシスによる細胞死・肝傷害が引き起こされており、光プローブの使用により、肝ストレス応答の時間的・空間的解析を定量的に行なうことが可能であった。p62/SQSTM1分子の低下が中心となって脂肪肝のストレス応答の低下、易傷害性に関係していることが明らかとなった。

また、マウス肝虚血・再灌流モデルにおいては、虚血時間と再灌流後酸化ストレスの程度をダイナミックに評価することが可能であった。これにより、初めて虚血時間と酸化ストレスの程度とピークのタイミング、障害との関係が明らかとなった。また、虚血時間とアポトーシス、ネクローシスのバランスの変化、酸化ストレスの関与の変化も新しい知見として得られた。

生体イメージングによる新たな診断法、治療法の開発の可能性を検討した。

光を利用したイメージングにより、同一個体において、非侵襲的かつ継続的な生体イメージングを行い、ストレス状態（肥満、脂肪肝、加齢、糖尿病など）に置かれた肝臓の術前ストレスを評価し、それが外科手術の経過に影響を与えるかどうかを検討した。また、p62/SQSTM1といった分子が、術後臓器機能（再生・障害）を予測できるかどうかをも検討した。今回得られた多くの知見は、将来臨床的に有用なツールとなり得ると考えられた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 5 件）

1. Saito N, Yoshioka N, Abe R, Qiao H, Fujita Y, Hoshina D, Suto A, Kase S, Kitaichi N, Ozaki M, Shimizu H. J Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis mouse model generated by using PBMCs and the skin of patients. *Allergy Clin Immunol*, 査読有、2013, Feb;131(2) : 434-41.
2. Shibasaki S, Yamashita K, Goto R, Wakayama K, Tsunetoshi Y, Zaitzu M, Igarashi R, Haga S, Ozaki M, Umezawa K, Todo S. Immunosuppressive effects of DTCM-G, a novel inhibitor of the mTOR downstream signaling pathway. *Transplantation*, 査読有、95(4), 2013 Feb 27, 542-50.
3. Kohei Oashi, Hiroshi Furukawa, Hiroshi Nishihara, Michitaka Ozaki, Akihiko Oyama, Emi Funayama, Toshihiko Hayashi, Yuji Kuge and Yuhei Yamamoto. Pathophysiological Characteristics of Melanoma In-Transit Metastasis in a Lymphedema Mouse Model. *Journal of Investigative Dermatology*, 査読有、133(2)、2013 Feb, 537-544.
4. Chun Wu, Ke-Yong Wang, Xin Guo, Masanori Sato, Michitaka Ozaki, Shyohei Shimajiri, Yoshihiro Ohmiya, Yasuyuki Sasaguri. Rapid Methods of Detecting the Target Molecule in immunohistology using a Bioluminescence Probe. *Luminescence: The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, 査読有、2013、28(1) : 38-43, 2012.
5. Michitaka Ozaki, Sanae Haga, Takeaki Ozawa. In vivo monitoring of liver damage by caspase-3 probe. *Theranostics*, 査読有 2(2)、2012、207-214.

〔学会発表〕（計 1 2 件）

1. 芳賀早苗、小澤岳昌、森田直樹、梅澤一夫、藤堂省、尾崎倫孝：「p62/STSQM1 plays a central role in liver injury in steatotic liver during regeneration.」第 85 回日本生化学会大会、2012. 12. 6、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
2. S. Haga, H. Inoue, A. Kano, X. -Y. Fu, K. Terui, M. Ozaki : STAT3 plays a pivotal role in cell adhesion in mouse hepatocytes by regulating E-cadherin expression. 25th European Congress of Pathology, 2012. 9. 8-12, Prague Congress Centre, Czecho
3. Sanae Haga, Takeaki Ozawa, Michitaka

- Ozaki : Bioluminescent imaging of hepatic caspase-3 activity in mice. 第14回国際組織細胞化学会議, 2012. 8. 26-29, 国立京都国際会館
4. 芳賀早苗、小澤岳昌、森田直樹、阿部理一郎、藤堂省、尾崎倫孝:「虚血/再灌流傷害における高血糖および脂肪化病態肝の反応性の相違」第19回肝細胞研究会、2012. 6. 29-30、札幌医科大学臨床教育研究棟講堂
 5. N. Morita, S. Haga, T. Ozawa, S. J. Remington, M. Ozaki : "Bio-imaging of surgical stress: Dynamic analysis of liver oxidative stress and damage" 17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (ISBC2012) 2012. 5. 28-6. 2 Delta Guelph Hotel & Conference Centre, Guelph, Ontario, Canada
 6. Michitaka Ozaki, Sanae Haga, Hiroshi Inoue, Wataru Ogawa: Molecular analysis of liver regeneration in mouse: roles of cell proliferation and growth MBSJ2011 第34回日本分子生物学会年会、2011. 12. 13-16、パシフィコ横浜
 7. Sanae Haga, Takeaki Ozawa, Takako Aoyama, Naoki Morita, S. James Remington, Riichiro Abe, Michitaka Ozaki: Analysis of different cellular responses of cells in hyperglycemic condition or steatotic hepatocytes - a simulated study of stress response in metabolic syndrome - MBSJ2011 第34回日本分子生物学会年会、2011. 12. 13-16、パシフィコ横浜
 8. Michitaka Ozaki, Sanae Haga, Kaikobad Irani, Naoki Morita, Yoshimi Kaneshima, Takeaki Ozawa : Age-associated p66Shc induced redox-dependent liver damage and impaired regeneration after hepatectomy in aged mice. 62th Annual meeting of AASLD, San Francisco, USA, 2011. 11. 4-8, Moscone West Convention Center
 9. 芳賀早苗, 森田直樹, 青山貴子, 小澤岳昌, Remington S. James, 阿部理一郎, 藤堂省、尾崎倫孝:「脂肪肝における Fas 過剰発現および細胞内酸化的ストレスによる肝再生不全の検討」第84回日本生化学会大会、2011. 9. 21-24、国立京都国際会館
 10. M. Ozaki, S. Haga, T. Ozawa, N. Morita, Y. Kaneshima, J. Remington: Bio-imaging of Surgical Stresses-Dynamic Analyses of Liver Oxidative Stress and Damage. 5TH European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering, 2011. 9. 14-18, Budapest Congress & World Trade Center, Budapest, Hungary
 11. Sanae Haga, Toshiaki Takezawa, Takeaki Ozawa, James Remington, Naoki Morita and Michitaka Ozaki: 'Collagen Vitrigel Sheet' as a Novel Drug Delivery Bio-material. 5TH European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering, 2011. 9. 14-18, Budapest Congress & World Trade Center, Budapest, Hungary
 12. 芳賀早苗、森田直樹、小澤岳昌、レミントンジェームズ、藤堂省、尾崎倫孝:「脂肪肝における肝再生不全機序の解析」第18回肝細胞研究会、2011. 6. 24-25、東京ガーデンパレス
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
藤堂 省 (TODO SATORU)
北海道大学・大学院医学研究科・特任教授
研究者番号：60136463
 - (2) 研究分担者
尾崎 倫孝 (OZAKI MICHITAKA)
北海道大学・大学院保健科学研究院・教授
研究者番号：80256510