

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592623

研究課題名(和文) 3系脂肪酸製剤による肝臓星細胞活性抑制の検討

研究課題名(英文) The effect of omega-3 fatty acids on hepatic stellate cell activation

研究代表者

吉野 裕顕 (Yoshino, Hiroaki)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90182807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓星細胞はビタミンA貯蔵細胞であるが肝線維化の責任細胞としても知られている。小児短腸症候群症例で3系脂肪酸使用後に肝組織で活性化星細胞数の減少を認めた。ラット肝臓より単離培養した星細胞において培養液中に3系脂肪酸を加えると星細胞中の脂質滴形成は促進され平滑筋アクチンやⅠ型コラーゲンのmRNAの発現量は減少する傾向にあった。

研究成果の概要(英文)：Hepatic stellate cells (HSCs) store vitamin A and they are also known to be responsible for liver fibrosis. In child short bowel patients, oral administration of omega-3 fatty acids reduced the number of activated HSCs. Using HSCs isolated and cultured from rat liver, addition of omega-3 fatty acids accelerated formation of lipid droplets and decreased the expression levels of alpha-smooth muscle actin and type I collagen mRNAs.

研究分野：小児外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、小児外科学

キーワード：3系脂肪酸 肝臓星細胞

1. 研究開始当初の背景

小児短腸症候群では時に重篤な肝機能障害が引き起こされる。とくに肝線維化から肝硬変を発症すると致死的であり、肝線維化を回避することが治療戦略上非常に重要である。近年、小児短腸症候群をはじめとする腸管不全合併肝障害に対して、3系脂肪酸の有効性が報告されている。その作用機序として胆汁流出の促進、肝細胞脂肪化の抑制、免疫抗炎症作用などが関与すると言われているが、肝線維化抑制効果の有無については明らかでない。

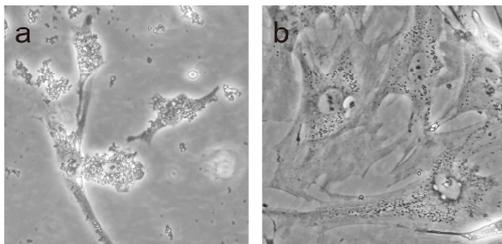
2. 研究の目的

肝線維化の責任細胞とされている肝臓星細胞や、その活性制御に密接に関係することが知られているビタミン A の代謝に着目し、3系脂肪酸による肝線維化抑制効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 3系脂肪酸が肝線維化を抑制する機序について、実際の臨床症例における肝組織像・臨床経過を観察・検討した。

(2) 3系脂肪酸の肝線維化抑制機序について検討するために、ラット肝臓より単離培養した星細胞に対して、培養液中に3系脂肪酸を加え、その影響を検討した。具体的にはSD系4週齢、雄性ラットを使用し肝灌流法によって肝臓中の細胞を採取し密度勾配遠心法によって星細胞を分離し初代培養を行った。

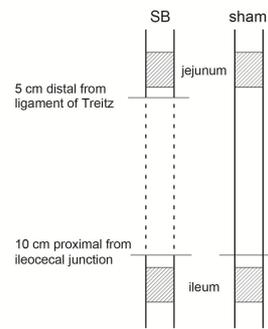


ラットから単離した肝臓星細胞 (a) 培養 2 日目、(b) 培養 7 日目

そして培養液中に静脈注射用の3系脂肪酸製剤、比較対照として6系脂肪酸製剤を添加し星細胞の細胞増殖能について細胞数、細胞生存割合を測定することで評価した。また、ビタミン A 脂質滴の形成について脂肪染色を施行し定量的、定性的に計測した。この初代培養星細胞を用いて、I型、III型、IV型コラーゲンの mRNA についてリアルタイム PCR によって定量し、3系脂肪酸が肝線維化に及ぼす影響について評価した。また、活性化星細胞マーカー(平滑筋アクチン、デスミン)を用いた免疫組織染色によって、肝障害におよぼす星細胞活性化の影響について評価した。

(3)短小腸下でのビタミン A 代謝機序を検討すべく75%小腸切除を行った短小腸ラット

モデルを作成した。術後1週間でサンプルを回収した。



75%小腸切除ラットモデルの模式図

ビタミン A の取り込み・貯蔵に影響すると考えられる因子につき mRNA の変化をコントロール群(腸管切離・再吻合を行う)と比較した。具体的な遺伝子として細胞質レチノール結合タンパク質(CRBP)I、CRBP II、ビタミン A のエステル化酵素であるレシチン:レチノールアシル基転移酵素(LRAT)、血漿レチノール結合タンパク質(RBP)、リンパ系を介するビタミン A 輸送を担うカイロミクロンの構成因子であるアポリポタンパク質 A IV (APOA4)、胆汁酸合成の律速酵素であるシトクロム P450 酵素 CYP7A1、脂質合成転写因子であるステロール調節エレメント結合タンパク質(SREBP)1等の遺伝子につき検討を行った。また組織学的変化について検討した。

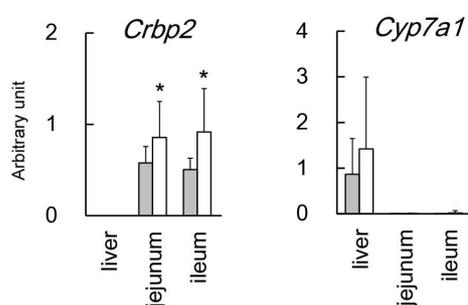
4. 研究成果

(1)小児短腸症候群症例で3系脂肪酸使用後に胆汁流出・肝線維化は改善し、組織学的にも活性化型星細胞の減少を認めた(森井 ほか、小児における腸管不全合併肝障害に対する3系脂肪酸製剤投与の検討. 外科と代謝・栄養, 46, 159-167, 2012.)。

(2)3系脂肪酸添加によって、星細胞の活性化の指標である平滑筋アクチンや、肝線維化の指標であるI型コラーゲンの mRNA の発現量は減少する傾向にあった。また3系脂肪酸を投与した星細胞では、著明に脂質滴が形成されることが確認された(森井 ほか、腸管不全合併肝障害に対して3系脂肪酸製剤を長期投与した1例. 第28回日本小児外科学会秋季シンポジウム/第42回日本小児外科代謝研究会/Pediatric Surgery Joint Meeting 2012, 2012.11.2, 静岡)。今後、この脂質滴形成が線維化に対して抑制的に機能していることを検証することによって、肝線維化に対する新たな治療法を確立できる可能性がある。

(3)短腸群の腸管において対照群と比べてCRBP II 遺伝子が有意に上昇していることを確認した(蛇口 ほか、短小腸下でのビタミン A 吸収・貯蔵メカニズムの解明. 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2014.3.27,

栃木) CRBP II はビタミン A の腸管からの吸収において中心的な役割をすることが知られている。従って CRBP II 遺伝子発現の上昇は、腸管切除による吸収面積の減少を補う反応の表れと考えられた。また腸管切除による吸収面積の低下により胆汁酸の腸管からの再吸収(胆汁酸の腸肝循環)が低下することを肝臓での CYP7A1 遺伝子の発現量が増加することを予想したが、意外にも肝臓での CYP7A1 遺伝子の発現量に変化が見られなかった。CYP7A1 遺伝子はビタミン A の経口摂取により発現が抑えられることが報告されていることから、短小腸下においてもビタミン A 吸収の亢進により CYP7A1 遺伝子発現に抑制がかかり、腸肝循環の減少を補おうとする CYP7A1 の発現上昇を打ち消している可能性が考えられた(蛇口 ほか, 短小腸下におけるビタミン A 吸収・貯蔵機構の解明～短小腸ラットモデルを用いた検討～, 第 51 回日本小児外科学会学術集会, 2014.5.9, 大阪)。



リアルタイム PCR

今回短小腸動物モデルにおいて観察された CRBP II 遺伝子の発現量増加が、小腸上皮によるビタミン A の吸収効率の上昇、肝臓星細胞におけるビタミン A 貯蔵効率の上昇、星細胞活性化の抑制というプロセスを経て、肝線維化の抑制に関与している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

(1)Mezaki Y., Morii M., Hebiguchi T., Yoshikawa K., Yamaguchi N., Miura M., Imai K., Yoshino H., Senoo H.: Differential increases in the expression of intermediate filament proteins and concomitant morphological changes of transdifferentiating rat hepatic stellate cells observed *in vitro*. *Acta Histochem. Cytoc.*, 46(5), 137-143, 2013. doi: 10.1267/ahc.13007. 査読有

(2)森井真也子, 目崎喜弘, 蛇口 琢, 渡部亮, 妹尾春樹, 吉野裕顕: エタノールロック療法におけるカテーテル内エタノール濃度の検討. 日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌, 27(2), 133-137, 2013.

(<http://mol.medicalonline.jp/library/archive/search?jo=d17pedga&vo=27&nu=2&st=133>) 査読有

(3)Mezaki Y., Morii M., Hebiguchi T., Yoshikawa K., Yamaguchi N., Yoshino H., Senoo H.: The role of retinoic acid receptors in activated hepatic stellate cells. *Med. Hypotheses*, 81(2), 222-224, 2013. doi: 10.1016/j.mehy.2013.04.045. 査読有

(4)森井真也子, 吉野裕顕, 蛇口 琢, 渡部亮, 目崎喜弘, 南條 博, 妹尾春樹, 和田 基, 仁尾正記, 蛇口達造: 小児における腸管不全合併肝障害に対する 3 系脂肪製剤投与の検討. 外科と代謝・栄養, 46(6), 159-167, 2012. (<http://mol.medicalonline.jp/library/archive/search?jo=dj5surgi&vo=46&nu=6&st=159>) 査読有

(5)Mezaki Y., Morii M., Yoshikawa K., Yamaguchi N., Miura M., Imai K., Yoshino H., Senoo H.: Characterization of a cellular retinol-binding protein from lamprey, *Lethenteron japonicum*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 161(3), 233-239, 2012. doi: 10.1016/j.cbpb.2011.11.011. 査読有

(6)Mezaki Y., Morii M., Yoshikawa K., Yamaguchi N., Satoyoshi K., Miura M., Imai K., Hebiguchi T., Habuchi T., Senoo H.: Elevated expression of transforming growth factor 3 in carbon tetrachloride-treated rat liver and involvement of retinoid signaling. *Int. J. Mol. Med.*, 29(1), 18-24, 2012. doi: 10.3892/ijmm.2011.809. 査読有

(7)森井真也子, 吉野裕顕, 蛇口 琢, 南條博, 野口篤子, 高橋勉, 目崎喜弘, 妹尾春樹, 蛇口達造: 腸管不全合併肝障害に対して -3 系脂肪製剤を投与した 2 症例の検討. 小児外科 43, 380-387, 2011. (http://www.tokyo-igakusha.co.jp/f/b/index/zc01/5/oa_table/b_z_top.html) 査読無

〔学会発表〕(計 11 件)

(1)蛇口 琢, 森井真也子, 渡部 亮, 目崎喜弘, 妹尾春樹, 吉野裕顕: "短小腸下におけるビタミン A 吸収・貯蔵機構の解明～短小腸ラットモデルを用いた検討～" 第 51 回日本小児外科学会学術集会. (2014.5.9) 大阪, 大阪

(2)蛇口 琢, 目崎喜弘, 森井真也子, 渡部亮, 吉川 究, 今井克幸, 三浦光隆, 吉野裕顕, 妹尾春樹: "短小腸下でのビタミン A 吸

収・貯蔵メカニズムの解明" 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会. (2014.3.27) 下野, 栃木

(3)森井真也子, 目崎喜弘, 吉川 究, 山口典子, 三浦光隆, 今井克幸, 蛇口 琢, 渡部亮, 妹尾春樹, 吉野裕顕: "ヤツメウナギにおける胆汁排泄機構" 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会. (2013.3.30) 高松, 香川

(4)Hebiguchi T., Morii M., Watanabe R., Mezaki Y., Senoo H., Yoshino H., Imai K., Miura M., Yoshikawa K., Yamaguchi N.: "腸管不全合併肝障害ラットモデルの作製" 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会. (2013.3.28) 高松, 香川

(5)森井真也子, 蛇口 琢, 渡辺 亮, 目崎喜弘, 妹尾春樹, 和田 基, 仁尾正記, 吉野裕顕: "腸管不全合併肝障害に対して 3 系脂肪製剤を長期投与した 1 例" 第 28 回日本小児外科学会秋季シンポジウム/第 42 回日本小児外科代謝研究会/Pediatric Surgery Joint Meeting 2012. (2012.11.2) 静岡, 静岡

(6)森井真也子, 平野尚子, 蛇口 琢, 渡部亮, 目崎喜弘, 妹尾春樹, 三浦昌朋, 吉野裕顕: "在宅中心静脈カテーテル管理におけるエタノールロック療法の検討" 第 39 回日本小児栄養消化器肝臓学会. (2012.7.15) 大阪, 大阪

(7)森井真也子, 蛇口 琢, 渡部 亮, 吉野裕顕, 目崎喜弘, 山口典子, 吉川 究, 今井克幸, 三浦光隆, 妹尾春樹: "胆道閉鎖症患者に対する 3 系脂肪製剤投与の経験" 第 49 回日本小児外科学会学術集会. (2012.5.16). 横浜, 神奈川

(8)Morii M., Mezaki Y., Yamaguchi N., Yoshikawa K., Imai K., Miura M., Yoshino H., Hebiguchi T., Asanuma Y., Hebiguchi T., Senoo H.: "The metabolism of cholesterol after bile duct degeneration in lamprey" 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会. (2012.3.27). 甲府, 山梨

(9)Morii M., Yoshino H., Hebiguchi T., Mezaki Y., Yamaguchi N., Yoshikawa K., Miura M., Imai K., Senoo H., Hebiguchi T.: "Reversibility of periductal fibrosis during biliary atresia in the lamprey" 16th International Symposium on Cells of Hepatic Sinusoid. (2011.9.23). Florence, Italy

(10)森井真也子, 吉野裕顕, 蛇口 琢, 目崎喜弘, 山口典子, 吉川 究, 三浦光隆, 今井克幸, 妹尾春樹, 蛇口達造: " 3 系脂肪

製剤を使用した, 短腸症候群 2 例の経験" 第 48 回日本小児外科学会学術集会. (2011.7.22). 東京

(11)森井真也子, 吉野裕顕, 和田 基, 蛇口琢, 目崎喜弘, 山口典子, 吉川 究, 三浦光隆, 今井克幸, 妹尾春樹, 仁尾正記, 蛇口達造: "腸管不全合併肝障害に 3 系脂肪製剤が著効した短腸症候群の 2 例" 日本外科代謝栄養学会第 48 回学術集会. (2011.7.8). 名古屋, 愛知

〔図書〕(計 1 件)

(1)Morii M., Mezaki Y., Yoshikawa K., Miura M., Imai K., Hebiguchi T., Watanabe R., Asanuma Y., Yoshino H., Senoo H.: "Cholestasis-How do lampreys avoid cholestasis after bile duct degeneration-" ed. Tripodi V. INTECH, pp. 81-98 (2011)

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉野 裕顕 (YOSHINO HIROAKI)
秋田大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 90182807

(2)研究分担者

森井 真也子 (MORII MAYAKO)
秋田大学・医学部・助教
研究者番号: 10375280

蛇口 琢 (HEBIGUCHI TAKU)

秋田大学・医学部・医員
研究者番号: 20375281