

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462316

研究課題名(和文) 胃-腸-骨連関による骨の慢性炎症の解明

研究課題名(英文) Investigation of chronic inflammation in bone by gastro-intestinal-bone axis

研究代表者

井口 幹崇 (Mikitaka, Iguchi)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40336889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：胃切除を行ったラットにおいて骨の代謝異常が起こることを報告したが、多臓器への影響は明らかではない。本研究では、胃切除による肝臓への影響を、遺伝子発現変化と、血清および組織学的に解析を行った。胃切除により、肝臓で573遺伝子の発現変化を認め、ステロイドシグナルと脂質代謝に関連する可能性をパスウェイ解析により見出した。また、血清ALTが胃切除により上昇し、胃切除ラット肝臓で小滴性脂肪を有する肝細胞を認めた。更に、胃切除により致死イベントが有意に起きることを明らかにした。胃全摘後の肝機能障害についての症例が報告されており、本研究はこの報告のメカニズムを説明できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We reported the abnormality of bone metabolism in gastrectomized rats. However, the effects of gastrectomy in multiple organs had not been clear. We examined the effect of gastrectomy on rat livers with analysis of gene expression, biochemistry, and histological changes.

Microarray analysis identified 573 differential expressed genes in gastrectomized rat liver, and pathway analysis indicated statistically relationship between these genes and steroid signaling and lipid metabolism. In gastrectomized rats, serum ALT was increased, and small droplets were observed in hepatocyte. Furthermore, lethal events were significantly happened in gastrectomy rats. The case reports about liver dysfunction after gastrectomy have been reported, this study may explain the mechanisms of these cases.

研究分野：消化器疾患

キーワード：胃切除 骨代謝異常 炎症

1. 研究開始当初の背景

我々は、胃切除を行ったラットの骨で、骨吸収と骨形成が、各々亢進する骨代謝異常を見出し、cDNA マイクロアレイ解析とパスウェイ解析により、骨における遺伝子発現変化に炎症との関連を見出し、この骨代謝異常は、胃切除により起こる炎症が原因ではないかと結論付け、発表した。その後、結腸においても、粘膜中に著明なリンパ球の浸潤を認めため、胃切除により炎症が多臓器で起こっている可能性を見出した。

我々は、約 15 年前に、胃粘膜でエストロゲン合成酵素のアロマターゼを初めて発見し、雄ラットにおいて門脈中のエストロゲン濃度が静脈中の濃度に比べて著しく高いことを明らかにしており、胃の内分泌器官としての役割が強く、胃切除により内分泌機能を喪失することで、この炎症と骨代謝異常が起きている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、内分泌器官である胃の全摘出により、肝臓への影響を明らかにするため、骨代謝異常を起こす胃切除後 5 週間のラットの肝臓について遺伝子発現および肝機能マーカーである血清 AST および ALT 濃度、血清タンパク質、および肝組織像より多角的に解析を行い、肝臓への影響を明らかにすることを目的とする。

さらに、胃切除を行うことで死亡例を一定数認めているため、胃切除により起こる死亡例に、胃切除後の期間との関連が無いが、胃切除モデルを作製する中で観察的に解析を行い、胃切除による致死的な影響と、それが起こる時期について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 胃切除モデルラットの作製

8-9 週令の Wistar 系雄ラットを購入し、1 週間馴致後、麻酔下で開腹を行い、噴門と幽門で胃を切除し、食道と十二指腸を吻合し、閉腹した。コントロール群では、開腹後に閉腹した。術後 24 時間は絶食を行い、その後は摂餌量を毎日測定し、胃切除群で消費した餌の量を、コントロール群に与え、摂餌量を調節した。

2) 胃切除における肝臓への影響についての解析

胃切除 5 週間後に、深麻酔下で開腹し、下大静脈および門脈より採血を行った。その後、肝臓を採取した。

RNA 用の肝組織より、RNAeasy を用いて RNA を抽出し、2100 Bioanalyzer で RNA の質を確認し、Whole Rat Genome Array によりマイクロアレイ解析を行った。更に Ingenuity Pathway Analysis によるパスウェイ解析を行い、発現変化した遺伝子群との関係性が統計学的に高い生物学的なフェノタイプおよびパスウェイについて特定した。

下大静脈より採取した血液から、血清と血漿を採取した。血清サンプルより、肝機能マーカーである AST および ALT 濃度を測定した。更に、LC-MS 解析を行い、門脈と静脈血で変化のあるステロイドの解析を行った。また、血漿サンプルは二次元電気泳動を行い、胃切除群において、コントロール群よりも有意に 1.5 倍以上増加または減少したタンパク質スポットをリストアップし、LC-MS/MS 解析により、これらスポットのタンパク質を同定した。

ホルマリンにより化学固定した肝組織をパラフィン包埋し、薄切後 HE 染色を行い、組織学的解析を行った

3) 胃切除による死亡例についての経時的解析

2016 年以降の、同一術者で胃切除を行ったラットの実験履歴より、胃切除後 5 週間の肝臓評価の為に作製した全ての症例 (コントロール群 15 例、胃切除群 40 例) を 5 日間隔でカイ 2 乗検定を行い、死亡したのは胃切除群とコントロール群に差がないという帰無仮説を棄却する期間が存在するか検定した。

4. 研究成果

1) 胃切除ラット肝臓における遺伝子発現変化

胃切除により肝臓において発現が 2 倍以上変化した遺伝子をマイクロアレイにより解析を行ったところ、増加した遺伝子が 345 遺伝子、減少した遺伝子が 228 遺伝子の計 573 遺伝子であった。この発現変化した遺伝子群についてパスウェイ解析を行ったところ、糖質コルチコイドおよびエストロゲンに関連したシグナルパスウェイと脂質代謝に関するフェノタイプについて、遺伝子発現変化との統計学的に有意な関連性を認めた。

更に、門脈中および下大静脈のステロイド濃度を探索的に解析したところ、特定のステロイドが胃切除ラットの門脈で増加しており、胃粘膜で代謝されていたステロイドが、胃切除により代謝できず増加したのだと考えられる。

また、血漿タンパク質解析を行ったところ、胃切除により有意に増減したタンパク質のうち脂質代謝に関わるものが 20 タンパク質中 8 タンパク質含まれており、そのうち 4 タンパク質は、胃切除後 24 時間の肝臓においてこれらタンパク質をコードする遺伝子の発現が有意に低下していた。

このため、胃粘膜で本来起こっていたステロイド代謝が胃切除により喪失し、本来受けるべきステロイドシグナルが、肝臓で受けられず、胃切除 24 時間後から脂質代謝に関わる遺伝子について発現変化する可能性が明らかとなった。

2) 胃切除におけるラット肝臓への影響

胃切除により、肝臓への影響を検討するた

め、肝機能マーカーである血清ASTおよびALTを測定したところ、胃切除後5週間で血清ASTは変化を認めなかったが、血清ALT濃度は有意に増加した(図1)。そこで、肝臓のHE染色標本より、肝組織の病変を探索したところ、胃切除ラットの肝細胞において、小滴性脂肪を有する細胞を認めた。しかし、大滴性脂肪はいずれの群も認めなかった。また、リンパ球の浸潤も、胃切除群で認めなかった。

小滴性脂肪は病理学的には、ミトコンドリア異常を有する場合に認める所見であり、胃切除により攪乱された内分泌異常が、肝細胞に影響を及ぼし、肝疾患を引き起こしている可能性が考えられる。実際、胃切除後に肝機能障害を引き起こす症例報告があり、本研究は、この症例報告のメカニズムを説明できる可能性が考えられる。

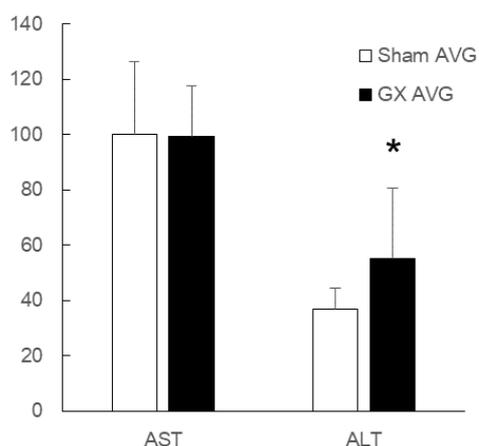


図1 胃切除後5週間のラットにおいて、肝機能マーカーであるALTが増加し、肝障害の可能性を認めた

3) 胃切除が引き起こす致死的事件の発生時期の解析

胃切除後5週間の肝臓への影響を解析するため、2016年より51匹のWistar雄ラットを用いて解析を行ったところ、胃切除群で55例中19例が死亡し、コントロール群では死亡例を認めなかった。このため、胃切除により、有意に致死的事件が発生することが明らかとなった($\chi^2 = 8.85$, $P < 0.001$)。更に、この5週間を7分割し各期間の、致死的事件の発生に有意な差を認める期間があるか解析したところ、第三期間(Day 11-15)においてのみ、致死的事件の発生に有意な差を認めた($\chi^2 = 3.59$, $P < 0.05$)。このため、胃切除後10日目以降に肝臓に重篤な障害が発生している可能性が考えられる。

これらの結果より、胃切除は肝臓へ障害を及ぼす可能性を示唆し、一部は重篤化し死亡することを明らかとした。今後、胃切除10日目でのラット肝臓を解析し、肝障害が重篤

化するメカニズムを明らかにする予定である。

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25件)

1. Nishi T, Yamamoto Y, Yamagishi N, Iguchi M, Tamai H, Ito T, Tsuruo Y, Ichinose M, Kitano M, Ueyama T. Lansoprazole prevents the progression of liver fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis model rats. *J Pharm Pharmacol*. 2018 Mar;70(3):383-392.
2. Kawanishi K, Kato J, Kakimoto T, Hara T, Yoshida T, Ida Y, Maekita T, Iguchi M, Kitano M. Risk of colonic diverticular rebleeding according to endoscopic appearance. *Endosc Int Open*. 2018 Jan;6(1):E36-E42.
3. Taki S, Tamai H, Ida Y, Shingaki N, Kawashima A, Shimizu R, Moribata K, Maekita T, Iguchi M, Kato J, Nakao T, Kitano M. The Real-World Safety and Efficacy of Daclatasvir and Asunaprevir for Elderly Patients. *Gut Liver*. 2018 Jan 15;12(1):86-93.
4. Tamai H, Ida Y, Kawashima A, Shingaki N, Shimizu R, Moribata K, Nasu T, Maekita T, Iguchi M, Kato J, Nakao T, Kitano M. Simeprevir-Based Triple Therapy with Reduced Doses of Pegylated Interferon α -2a Plus Ribavirin for Interferon Ineligible Patients with Genotype 1b Hepatitis C Virus. *Gut Liver*. 2017 Jul 15;11(4):551-558.
5. Tamai H, Ida Y, Shingaki N, Shimizu R, Fukatsu K, Itonaga M, Yoshida T, Maeda Y, Moribata K, Maekita T, Iguchi M, Kato J, Kitano M. Add-on Pegylated Interferon Alpha-2a Therapy in Chronic Hepatitis B Japanese Patients Treated with Entecavir. *Hepat Res Treat*. 2017;2017:2093847.
6. Tamura T, Yamashita Y, Ueda K, Kawaji Y, Itonaga M, Murata SI, Yamamoto K, Yoshida T, Maeda H, Maekita T, Iguchi M, Tamai H, Ichinose M, Kato J. Rapid On-Site Evaluation by Endosonographers during Endoscopic Ultrasonography-Guided Fine-Needle Aspiration for Diagnosis of Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clin Endosc*. 2017 Jul;50(4):372-378.
7. Shagdarsuren B, Tamai H, Shingaki N, Mori Y, Maeshima S, Nuta J, Maeda Y, Moribata K, Niwa T, Deguchi H, Inoue

- I, Maekita T, Iguchi M, Kato J, Ichinose M. Contribution of Contrast-Enhanced Sonography With Perfluorobutane Microbubbles for Diagnosis of Recurrent Hepatocellular Carcinoma. *J Ultrasound Med*. 2016 Jul;35(7):1383-91.
8. Iguchi M, Kato J, Yoshida T, Yamamoto Y, Nakachi K, Fukatsu K, Mori Y, Maeda Y, Moribata K, Shingaki N, Niwa T, Deguchi H, Inoue I, Maekita T, Tamai H, Ichinose M. Serum pepsinogen levels can quantify the risk of development of metachronous gastric cancer after endoscopic resection. *Int J Cancer*. 2016 Sep 1;139(5):1150-6.
 9. Yamashita Y, Ueda K, Kawaji Y, Tamura T, Itonaga M, Yoshida T, Maeda H, Magari H, Maekita T, Iguchi M, Tamai H, Ichinose M, Kato J. The Wire-Grasping Method as a New Technique for Forceps Biopsy of Biliary Strictures: A Prospective Randomized Controlled Study of Effectiveness. *Gut Liver*. 2016 Jul 15;10(4):642-8.
 10. Nuta J, Tamai H, Mori Y, Shingaki N, Maeshima S, Shimizu R, Maeda Y, Moribata K, Niwa T, Deguchi H, Inoue I, Maekita T, Iguchi M, Kato J, Ichinose M. Kupffer Imaging by Contrast-Enhanced Sonography With Perfluorobutane Microbubbles Is Associated With Outcomes After Radiofrequency Ablation of Hepatocellular Carcinoma. *J Ultrasound Med*. 2016 Feb;35(2):359-71.
 11. Tamai H, Shingaki N, Mori Y, Moribata K, Kawashima A, Maeda Y, Niwa T, Deguchi H, Inoue I, Maekita T, Iguchi M, Kato J, Ichinose M. Low-Dose Pegylated Interferon -2b Plus Ribavirin for Elderly and/or Cirrhotic Patients with Genotype 2 Hepatitis C Virus. *Gut Liver*. 2016 Jul 16;10(4):617-23.
 12. Shimizu R, Tamai H, Mori Y, Shingaki N, Maeshima S, Nuta J, Maeda Y, Moribata K, Muraki Y, Deguchi H, Inoue I, Maekita T, Iguchi M, Kato J, Ichinose M. The arterial tumor enhancement pattern on contrast-enhanced computed tomography is associated with primary cancer death after radiofrequency ablation for small hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int*. 2016 Mar;10(2):328-39.
 13. Maeda Y, Moribata K, Deguchi H, Inoue I, Maekita T, Iguchi M, Tamai H, Kato J, Ichinose M, Tamai H. An efficiently identify patients who require double-balloon enteroscopy. *BMC Gastroenterol*. 2015 Oct 14;15:132.
 14. Mori Y, Tamai H, Shingaki N, Hayami S, Ueno M, Maeda Y, Moribata K, Deguchi H, Niwa T, Inoue I, Maekita T, Iguchi M, Kato J, Terada M, Yamaue H, Ichinose M. Hypointense hepatocellular carcinomas on apparent diffusion coefficient mapping: Pathological features and metastatic recurrence after hepatectomy. *Hepatol Res*. 2016 Jun;46(7):634-41.
 15. Deguchi H, Kato J, Maeda Y, Moribata K, Shingaki N, Niwa T, Inoue I, Maekita T, Iguchi M, Tamai H, Ichinose M. Argon plasma coagulation is effective for prevention of recurrent esophageal varices after endoscopic injection sclerotherapy: Single-center case-control study. *Dig Endosc*. 2016 Jan;28(1):42-9.
 16. Ueyama T, Donishi T, Ukai S, Yamamoto Y, Ishida T, Tamagawa S, Hotomi M, Shinosaki K, Yamanaka N, Kaneoke Y. Alterations of Regional Cerebral Blood Flow in Tinnitus Patients as Assessed Using Single-Photon Emission Computed Tomography. *PLoS One*. 2015 Sep 2;10(9):e0137291.
 17. Maekita T, Kato J, Enomoto S, Yoshida T, Utsunomiya H, Hayashi H, Hanamitsu T, Inoue I, Maeda Y, Moribata K, Muraki Y, Shingaki N, Deguchi H, Ueda K, Iguchi M, Tamai H, Ichinose M. Japanese apricot improves symptoms of gastrointestinal dysmotility associated with gastroesophageal reflux disease. *World J Gastroenterol*. 2015 Jul 14;21(26):8170-7.
 18. Yamashita Y, Kato J, Ueda K, Nakamura Y, Kawaji Y, Abe H, Nuta J, Tamura T, Itonaga M, Yoshida T, Maeda H, Maekita T, Iguchi M, Tamai H, Ichinose M. Contrast-Enhanced Endoscopic Ultrasonography for Pancreatic Tumors. *Biomed Res Int*. 2015;2015:491782.
 19. Yamamoto Y, Ueyama T, Ito T, Tsuruo Y. Downregulation of growth hormone 1 gene in the cerebellum and prefrontal cortex of rats with depressive-like behavior. *Physiol Genomics*. 2015 May;47(5):170-6.
 20. Tamai H, Mori Y, Shingaki N, Shimizu R, Nuta J, Moribata K, Maeda Y, Muraki Y, Deguchi H, Inoue I, Maekita T, Iguchi M, Kato J, Takifuji K, Yamaue H, Ichinose M. Prognostic effect of

- response to interferon therapy after laparoscopic splenectomy among patients with marked thrombocytopenia and hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology Int.* 2015 Jan;9(1):67-75
21. Nakachi K, Tamai H, Mori Y, Shingaki N, Moribata K, Deguchi H, Ueda K, Inoue I, Maekita T, Iguchi M, Kato J, Ichinose M. Prediction of poorly differentiated hepatocellular carcinoma using contrast computed tomography. *Cancer Imaging.* 2014 Apr 22;14:7.
 22. Tamai H, Shimizu R, Shingaki N, Mori Y, Maeshima S, Nuta J, Maeda Y, Moribata K, Muraki Y, Deguchi H, Inoue I, Maekita T, Iguchi M, Kato J, Ichinose M. Prediction of Sustained Virological Response to Telaprevir-Based Triple Therapy Using Viral Response within 2 Weeks. *Hepat Res Treat.* 2014;2014:748935
 23. Wada Y, Tamai H, Kawashima A, Shingaki N, Mori Y, Kawaguchi M, Moribata K, Deguchi H, Ueda K, Inoue I, Maekita T, Iguchi M, Kato J, Ichinose M. Prediction of a null response to pegylated interferon α -2b plus ribavirin in patients with high viral load genotype 1b hepatitis C. *Gut Liver.* 2014 Jul;8(4):421-7.
 24. Yamashita Y, Kato J, Ueda K, Nakamura Y, Abe H, Tamura T, Itonaga M, Yoshida T, Maeda H, Moribata K, Niwa T, Maekita T, Iguchi M, Tamai H, Ichinose M. Contrast-enhanced endoscopic ultrasonography can predict a higher malignant potential of gastrointestinal stromal tumors by visualizing large newly formed vessels. *J Clin Ultrasound.* 2015 Feb;43(2):89-97.
 25. Yamashita Y, Ueyama T, Nishi T, Yamamoto Y, Kawakoshi A, Sunami S, Iguchi M, Tamai H, Ueda K, Ito T, Tsuruo Y, Ichinose M. Nrf2-inducing anti-oxidation stress response in the rat liver--new beneficial effect of lansoprazole. *PLoS One.* 2014 May 20;9(5):e97419

〔学会発表〕(計 8件)

1. Lansoprazole prevents the progression of liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis model rats. Nishi, Toshio, Yuta Yamamoto 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018). Kyoto (Japan) 2018.7.1-6 発表予定

2. ランソプラゾールはNrf2/Ho1経路を活性化することによって肝細胞障害を抑制する 山岸直子、山本悠太、西利男、伊藤隆雄、上山敬司
3. 胃切除によるラット肝臓への影響について 伊藤隆雄、山本悠太、山岸直子、上山敬司 第122回日本解剖学会総会 2017.3.30 長崎県長崎市
4. 非アルコール性肝炎(NASH)モデルにおいてランソプラゾールはTGF- β 活性を抑制する 山本悠太、山岸直子、西利男、上山敬司 第11回臨床ストレス応答学会 2016.11.12
5. ランソプラゾールはNrf2/HO1経路を活性化することによって肝細胞保護作用を示す 山岸直子、山本悠太、西利男、伊藤隆雄、上山敬司 第11回臨床ストレス応答学会 2016.11.12
6. ランソプラゾールの肝臓におけるNrf2シグナリングを介した抗炎症効果 西利男、山本悠太、伊藤隆雄、上山敬司 第89回日本薬理学会年会 2016.3.11 神奈川県横浜市
7. 薬剤性肝炎モデルにおけるランソプラゾールのNrf2誘導能を介した肝保護効果 山本悠太、上山敬司、山下泰伸、西利男、井口幹崇、玉井秀行、上田和樹、二瀬雅夫 第38回日本分子生物学会年会 2015.12.1 兵庫県神戸市
8. ランソプラゾールの肝保護作用と非アルコール性脂肪肝炎(NASH)治療への応用 山本悠太、西利男、上山敬司 第10回臨床ストレス応答学会 2015.11.6 (若手奨励賞受賞) 東京都小金井市

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：非アルコール性脂肪性肝疾患 / 非アルコール性脂肪性肝炎の治療剤

発明者：山本悠太、上山敬司、西利男

権利者：公立大学法人和歌山県立医科大学

種類：A61K31/4439

番号：特願 2016-046340

出願年月日：平成 28 年 3 月 9 日

国内外の別：PTC 出願

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

井口 幹崇 (IGUCHI, Mikitaka)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：40336889

(2)研究分担者

山本 悠太 (YAMAMOTO, Yuta)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：00580672

一瀬 雅夫 (ICHINOSE, Masao)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：50143425

上山 敬司 (Ueyama, Takashi)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：50264875

上田 和樹 (UEDA, Kazuki)
和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：50405437

鶴尾 吉宏 (TSURUO, Yoshihiro)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (医学系)・教授
研究者番号：90207449

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()