

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：11401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06056

研究課題名(和文)短腸症候群における 3系脂肪酸の肝線維化抑制作用

研究課題名(英文)To determine the efficacy of n-3 PUFAs in short bowel syndrome

研究代表者

森井 真也子 (Morii, Mayako)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：10375280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：新生児癩症短小腸症候群患者2例への魚油由来死亡乳剤単独投与を臨床研究として施行した。病理学的検討にて本剤使用開始後には脂肪性肝炎による炎症細胞浸潤や肝細胞壊死像は消失し、肝線維化が抑制されていた。本症例の血漿中の92種類の脂肪酸およびその代謝産物を液体クロマトグラフィー質量分析計(3連四重極型)で網羅的に解析し、複数の脂肪酸代謝産物が正常小児に比し4～10倍に増加していることを見出した。これらの代謝産物を申請者らは仮にOIF(Omegaven-induced-factor)と名付けた。OIFには抗炎症作用や糖代謝促進作用など作用が既知の物質の他に生体内での意義が未知のものも含まれていた。

研究成果の概要(英文)：We performed the lipidomics of two patients successfully treated with the fish oil lipid emulsion (FOLE) to clarify the effective component in the FOLE. The liver biopsy was performed every year, and fibrosis with fatty degeneration was getting worse through several years. The periportal inflammation and fibrosis with bile ductular proliferation was obvious just before the supplemental FOLE. After the introduction of FOLE (0.5~1 g/kg/day), replacing the same amount of soybean oil emulsion (SOLE), inflammatory cell infiltration was disappeared and furthermore there was a improvement of the hepatic fibrosis. Lipid extraction and measurement of lipid metabolites by LC-MS/MS was performed in the patients and six healthy volunteers. according to the lipidomics, it was revealed that the n-3 fatty acid and metabolites of the patients were approximately 10-times greater than those of healthy volunteers.

研究分野：小児外科学

キーワード：短腸症候群 -3系脂肪酸 腸管機能不全合併肝障害

## 1. 研究開始当初の背景

腸管より十分な栄養を吸収できない短腸症候群 (short bowel syndrome: 以下 SBS) において、中心静脈栄養のカロリー源として、また必須脂肪酸の補充として脂肪乳剤投与が必要である。1965年 Wretlingらによって大豆油を用いた脂肪乳剤が開発され、SBSの救命率は飛躍的に上昇し長期生存が可能となった。しかし近年、脂肪酸投与量に加え、製剤に含まれる植物性ステロールや脂肪酸の組成が、SBSの致命的合併症である腸管機能不全合併肝障害 (intestinal failure-associated liver disease: 以下 IFALD) の発症・進展に強く関与しているとする報告を受け製剤の組成や投与方法に関して再評価が進んでいる。中でも注目されているのは 3系脂肪酸の豊富な 100%魚油由来の Omegaver (Fresenius Kabi, Germany) である。

長期の静脈栄養管理を要する小児で IFALD は高率に発症する。その要因の一つは新生児・乳児においては胆汁排泄障害により急激に進行する肝線維化であり、年長児・成人においては非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis: NASH) を伴う肝線維化である。Parkらは2014年5月までのメタ解析によって静脈栄養管理を受けた新生児の IFALD 発症率は40-85%であり、胆汁鬱滞は植物油由来脂肪乳剤使用例においては腸管リハビリなど総合的な治療でおよそ20%が改善したが、魚油を配合した脂肪乳剤を使用した場合の改善率はおよそ60%とさらに高率であったと報告している。

本邦で現在唯一薬事認可を受けた脂肪乳剤である大豆油由来脂肪乳剤 (Soy oil lipid emulsion: 以下 SOLE) から魚油由来脂肪乳剤 (Fish oil lipid emulsion: 以下 FOLE) への変更が IFALD による胆汁鬱滞を改善するという報告は多い。しかし、SOLE に変えて本剤を脂肪酸補充のために使用した場合 IFALD の進行を長期的に抑制しうるのかということに関して臨床症例、実験的検証とも報告はほとんどなくいまだ不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、SOLE が腸管不全合併肝障害の治療に有効であることに関して、その作用機序をあきらかにし、新たな治療戦略を構築することである。

## 3. 研究の方法

新生児発症短小腸症候群患者2例への SOLE 投与を臨床研究として施行した。秋田大学倫理委員会の承認 (受付番号: 680: 肝機能障害を伴う腸管不全症例に対する 3系脂肪乳剤による治療) を得て、規定に従い十分なインフォームド Consent のもと施行

した。本症例の血漿中で正常コントロールに比し、4~10倍に増加している複数の脂肪酸および脂肪酸代謝産物を見出し、これらの仮に OIF (Omegaven-induced-factor) と名付けた。

マウス肝臓初代培養細胞 (肝細胞・クッパー細胞) およびラット星細胞株を用いて申請者らが特定した OIF の IFALD 病態改善に働く作用点を検討した。

肝細胞に対しては、本剤を投与した臨床例より、脂肪滴中の脂肪代謝および、胆汁酸合成・分泌が促進していること予想されたのでこれを検証した。種々の OIF を添加した肝細胞にオレイン酸やリノール酸を添加し脂肪滴を形成させた肝細胞に対して、FBS を含まない低グルコース培地による細胞飢餓刺激を加え OIF を添加し脂肪滴の消失過程を評価した。

星細胞について、本細胞は病的環境においてビタミン A 脂肪酸エステルを豊富に含む脂肪滴を失い活性化し細胞外マトリックスを合成することから肝線維化の責任細胞と考えられている。星細胞に、種々の脂肪酸・代謝産物を添加し、脂質滴の合成・分解について脂肪染色によって評価した。また細胞外マトリックス合成・分泌に対するシグナル伝達系について評価した。

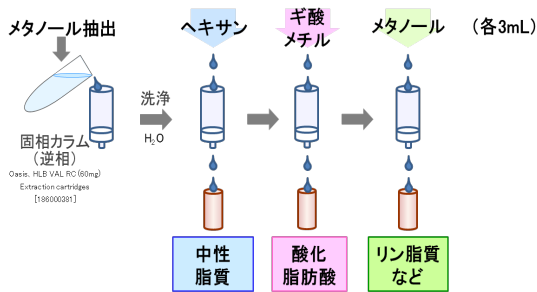
クッパー細胞について、OIF を添加したのち LPS 刺激を加え種々の炎症性サイトカイン分泌について評価した。

## 4. 研究成果

臨床症例において本剤使用前の肝生検では、一部に脂肪を蓄積した肝細胞を認めその脂肪滴サイズは 4 $\mu$ m 程度であった。肝細胞の巣状脱落壊死を認め、マクロファージが集簇し、線維化が進行していた。本剤使用開始後には肝細胞全体に 1 $\mu$ m 程度の微細な脂肪滴を認めるものの炎症細胞浸潤や肝細胞壊死像は消失していた。また本症例の血漿を用い、92種類の脂肪酸およびその代謝産物について液体クロマトグラフィー質量分析計 (3連四重極型) を用いて解析した。投与開始後の血漿で、遊離脂肪酸とその代謝産物52種類が検出され、37種類は検出限界以下であった。13種類の脂肪酸 (18-HEPE、Protectin D、17-HDoHE、他) は、投与開始前に比べ FOLE 投与開始2週間後に著しく上昇していた。レゾルビン E 前駆物質である 18-HEPE は EPA 代謝産物であり、Protectin D やレゾルビン D 前駆物質である 17-HDoHE は DHA 代謝産物である。一方アラキドン酸代謝物質は FOLE 投与後増加するものだけではなく 16-HETE など減少するものも見られた。製剤を分析した結果、増加した13種類は検出されなかったことから、投与された脂肪酸から体内で合成されたものと考えられた。

## 当施設における酸化脂肪酸網羅的解析手法

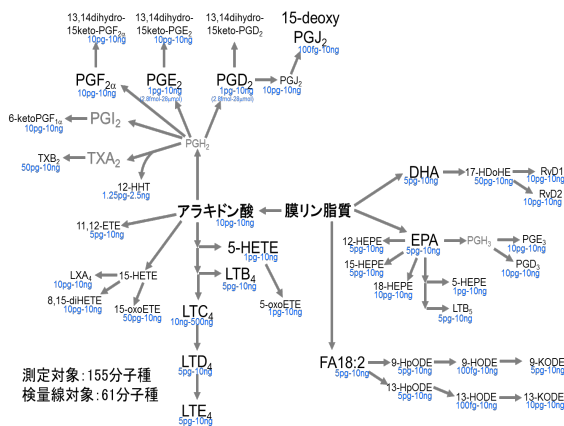
### 1. 抽出方法



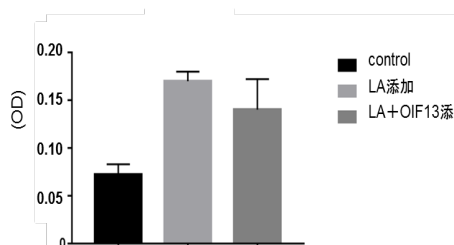
### 2. 測定条件

LCMS-8040 (超高速トリプル四重極型 LC/MS/MS システム) ((株) 島津製作所) (LC system : Nexera) ESI プローブ

### 3. 主な定量可能酸化脂肪酸



さらにこの脂肪酸代謝産物が肝臓脂肪滴に与える影響についてマウス初代培養肝細胞を用いてリノール酸を添加し脂肪滴を生成させたのち 13 種類の酸化脂肪酸を添加し in vitro に検討を行った。その結果として、我々が特定した脂肪酸代謝産物が、脂肪滴形成には影響を及ぼさないものの、低グルコース培地による脂肪動員刺激時の脂肪滴減少を促進傾向があることを見出した(下図)。



また、クッパー細胞に EPA や DHA を添加したのち LPS 刺激を加えたところ、リノール酸添加に比し培養液中の MCP1、IL-6、TNF が

減少する傾向にあった。

ラット培養星細胞株に対し、各種脂肪酸を添加したところ肝細胞脂肪化に關与する脂肪酸とは異なる脂肪酸種において、星細胞脂質滴形成が促進されていた。しかし、線維化に關連する因子 ( SMA、TGF、コラーゲン 1a など) については優位差を認めなかった。

### 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 2 件)

蛇口達造、吉野裕顕、森井真也子、蛇口琢、渡部亮、シトルリン・アルギニンによる消化管順応の評価、日本静脈経腸栄養学会雑誌、査読有、31巻、2016、1105-1108

森井真也子、中西広樹、上野紀子、蛇口琢、渡部亮、佐々木雄彦、妹尾春樹、吉野裕顕、3系脂肪酸製剤の長期単独投与例、小児外科、査読なし、48巻、2016、55-61

[学会発表](計 6 件)

森井真也子、中西広樹、上野紀子、蛇口琢、渡部亮、佐々木雄彦、吉野裕顕、3系脂肪酸を含めた脂肪製剤の臨床的意義と問題点 3系脂肪酸製剤作用機序の検討、第46回日本小児外科代謝研究会、2016年10月、埼玉

森井真也子、中西広樹、上野紀子、蛇口琢、渡部亮、佐々木雄彦、妹尾春樹、吉野裕顕、3系脂肪酸製剤による脂質プロファイルの変化、第53回日本小児外科学会学術集会、2016年4月、福岡

森井真也子、上野紀子、中西広樹、蛇口琢、渡部亮、佐々木雄彦、吉野裕顕、3系脂肪酸代謝産物による肝庇護作用、日本外科代謝栄養学会第53回学術集会、2016年7月、東京

森井真也子、上野紀子、中西広樹、蛇口琢、渡部亮、佐々木雄彦、吉野裕顕、Omegaven 単独投与症例における脂質プロファイルの変化、第32回日本静脈経腸栄養学会学術集会、2017年2月、岡山

森井真也子、上野紀子、中西広樹、蛇口琢、渡部亮、佐々木雄彦、吉野裕顕、

3系脂肪製剤を長期使用した短腸症候群  
の1例、第41回東北小児外科研究会、  
2015年9月、福島

森井真也子、吉野裕顕、妹尾春樹、胆道  
閉鎖症モデル動物 ヤツメウナギにおけ  
る胆汁排泄機構、第29回肝膵洞壁細  
胞研究会、2015年10月、秋田

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森井真也子 (MORII MAYAKO)  
秋田大学 大学院医学系研究科 助教  
研究者番号：10375280