

令和元年5月29日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10566

研究課題名(和文) 門脈塞栓術後肝再生への脂質の関与

研究課題名(英文) The relationship between lipid and liver regeneration after portal vein embolization

研究代表者

坂口 孝宣 (Sakaguchi, Takanori)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70313955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は臨床の門脈塞栓術を模倣したマウス門脈結紮術モデルを用いて非門脈結紮葉肥大過程での脂質変化から肥大促進機構を解明することを目的とした。本モデルで非結紮葉内の一過性 triglycerides(TGs)増加、引き続き細胞膜構成成分であるphosphatidylcholines(PCs)増加が確認された。この現象は細胞分裂に伴うPCs需要増多に備えた反応を示唆している。種々の分子生物学的解析で、術直後の門脈血流増加および脂質輸送蛋白であるfatty acid binding proein(FABP)による遊離脂肪酸取り込みが非結紮葉のTGs貯留を介した肥大に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非門脈結紮葉で観察された一過性TGs貯留現象は、門脈結紮(塞栓)後予定残肝の肥大にはTGsが重要な因子であることを示唆する。本研究ではその詳細な機構を解明するには至らなかった。しかし、門脈塞栓術や大量肝切除の際に残肝葉のTGs貯留をコントロールすることが大量肝切除後肝不全の予防に繋がる可能性を示したことは非常に意義がある。また、TGsがその後減少する機構が判明すれば、メタボリックシンドローム随伴性脂肪肝治療にも寄与するであろう。

研究成果の概要(英文)：Liver failure after massive hepatectomy is lethal. To prevent this complication, portal vein embolization of the future-resected lobe is performed. The purpose of this study is to investigate how hepatic lipid composition in the non-ligated lobe (future remnant liver) changes after portal vein ligation (PVL) in the mouse model. In this study, we found transient increase of triglycerides (TGs) and subsequent elevation of phosphatidylcholines (PCs) in non-ligated lobe. We could not find the key enzyme which drives increase of TGs and PCs, even by recent molecular biological studies. However, we found rapid recovery of fatty acid binding protein (FABP) and rapid increase of portal vein blood flow into non-ligated lobe. Such increase of uptake fatty acids (ingredient of TGs) would be stored and subsequently used as a source of PCs, important components of the cellular membrane.

研究分野：肝臓外科

キーワード：肝臓 脂質 門脈塞栓術 門脈血流 インドシアニングリーン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝臓は肝動脈と門脈の両方から血流支配を受ける特異な臓器である。肝動脈完全閉塞は虚血に伴う肝細胞の壊死を生じる。一方、門脈閉塞では肝細胞の壊死はしないものの閉塞区域容積縮小とそれ以外の区域の容積増大が生じる。この現象を応用し、大量肝切除後の残肝容量不足による肝不全予防目的で予定切除葉門脈塞栓術が施行される。しかし、門脈塞栓術で生じる遺伝子発現や蛋白発現の増減についての研究は存在するものの、脂質に関する研究は稀少である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、門脈塞栓術に伴う脂質の時間的および空間的变化の観察から、肝再生に関与する脂質およびその関連酵素などを導き出すことである。また、それらの責任因子を標的とした肝再生促進両方の開発に繋げていく。

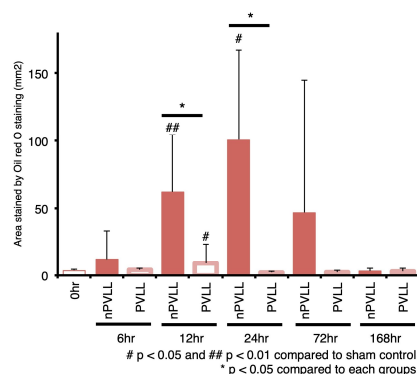
3. 研究の方法

- ・門脈結紮術(portal vein ligation, PVL)マウスモデルの作成：本学動物実験施設理林委員会の承認を受け、C57BL/6J マウスを使用、肝臓の約3分の2を栄養する門脈を結紮し、術前・術後(6~168時間後)にサンプルを採取した。非結紮側肝臓を non portal vein ligation lobe (以下 nPVLL)、萎縮する結紮側肝臓を portal vein ligated lobe (以下 PVLL) とした。
- ・Oil red O (ORO)染色：上記サンプルに ORO 染色を行い、染色領域を Image J を用いて算出し、Triglycerides(TGs)量を経時的に評価した。
- ・質量顕微鏡解析：PVL マウスモデルで採取したサンプルをクライオスタットで凍結切片を作成し、DHAP マトリックスを塗布後に質量顕微鏡(iMScope, 島津製作所)を用いて解析をした。
- ・液体クロマトグラフィー(LC-MS)解析：質量顕微鏡解析では TGs の解析が行えないため、上記肝組織から Bligh-dyer 法で脂質を抽出し、液体クロマトグラフィー解析装置(Q Exactive, Thermo Scientific)を用いて解析を行った。また脂質の特定には Lipid Search(三井情報株式会社)を用いた。
- ・qRT-PCR 解析：上記肝組織から抽出した RNA をもとに、TGs 分解酵素および TGs 由来脂質から phosphatidylcholines(PCs)を作成する酵素の mRNA 発現量を検討した。
- ・インドシアニングリーン(ICG)近赤外線観察法：肝機能評価薬 ICG が血液中では近赤外線刺激で蛍光を発する性質を利用した観察法である。0.375mg/kg の ICG を PVL 未施行マウス・PVL 直後マウス・PVL7 日後マウスの眼窩静脈叢から経静脈的に投与し、近赤外線カメラを用いて肝表 ICG 蛍光輝度を ICG 投与前から投与 15 分後まで測定した。

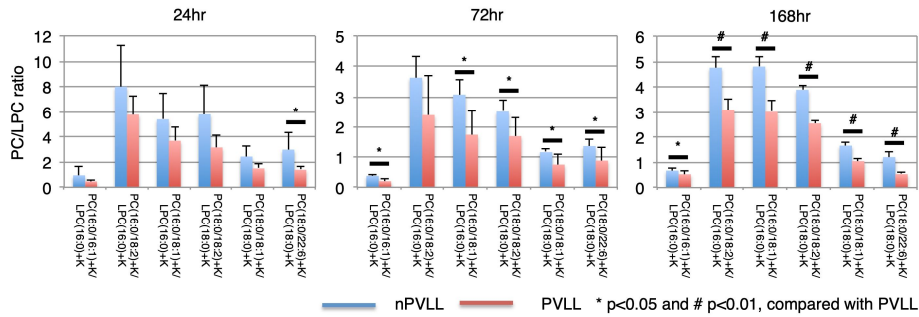
4. 研究成果

(1) PVL マウスモデルの作成：PVL を行うことで3日後以降 nPVLL は有意に増大し、一方で PVLL は縮小した。また HE 染色で PVLL において代償性に肝動脈径の拡張を確認し、臨床での門脈塞栓術を模倣するモデルであることを確認出来た。

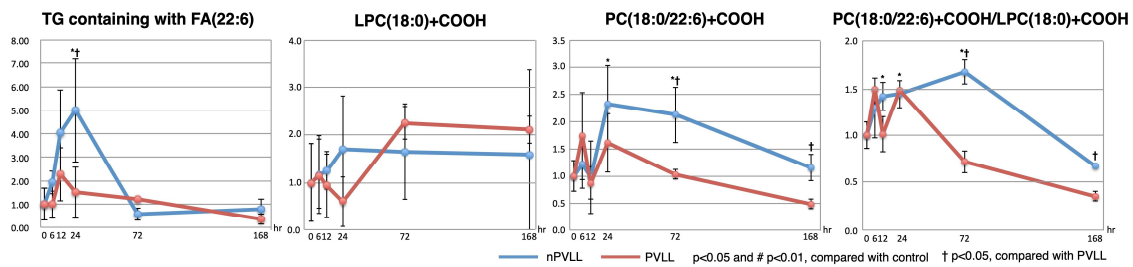
(2) ORO 染色結果：下のグラフが示すように、PVL 後 12~24 時間の一過性 nPVLL の ORO 染色領域が増加、すなわち TGs 蓄積が確認された。PVLL ではこの反応は見られなかった。



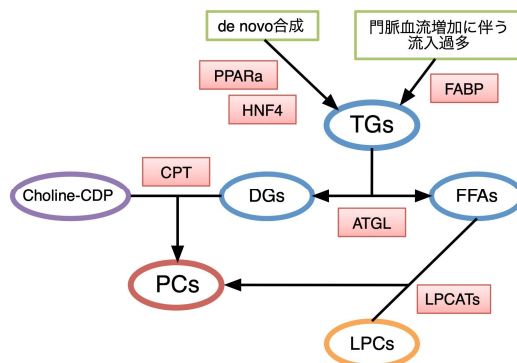
(3) 質量顕微鏡による脂肪酸定性および定量的結果：PVL 後の時間経過によって PCs 前駆体である lyso-PCs (LPCs) に変化は見られなかったが、nPVLL において PCs が PVL 後 72 時間で有意に増加していた。PCs のリモデリング経路である Land 経路 (LPCs に遊離脂肪酸 free fatty acids (FFAs) を付加して PCs を作成する経路) との関連を評価するために PCs/LPCs 比を算出すると、下図のように PCs/LPCs 比は nPVLL で PVL 後 72 から 168 時間で有意に上昇していた。



(4) LC-MS 解析による定性および定量的結果: 下図が示すように ORO 染色の結果と同様、nPVLL で PVL 後 24 時間をピークに TGs が一過性に増加していた。また、LPCs は結紮如何に関わらず変化を認めなかったが、PVL 後 24~72 時間で PCs は増加していた。また PCs/LPCs 比を算出すると PVL 後 72 時間で有意に上昇していた。

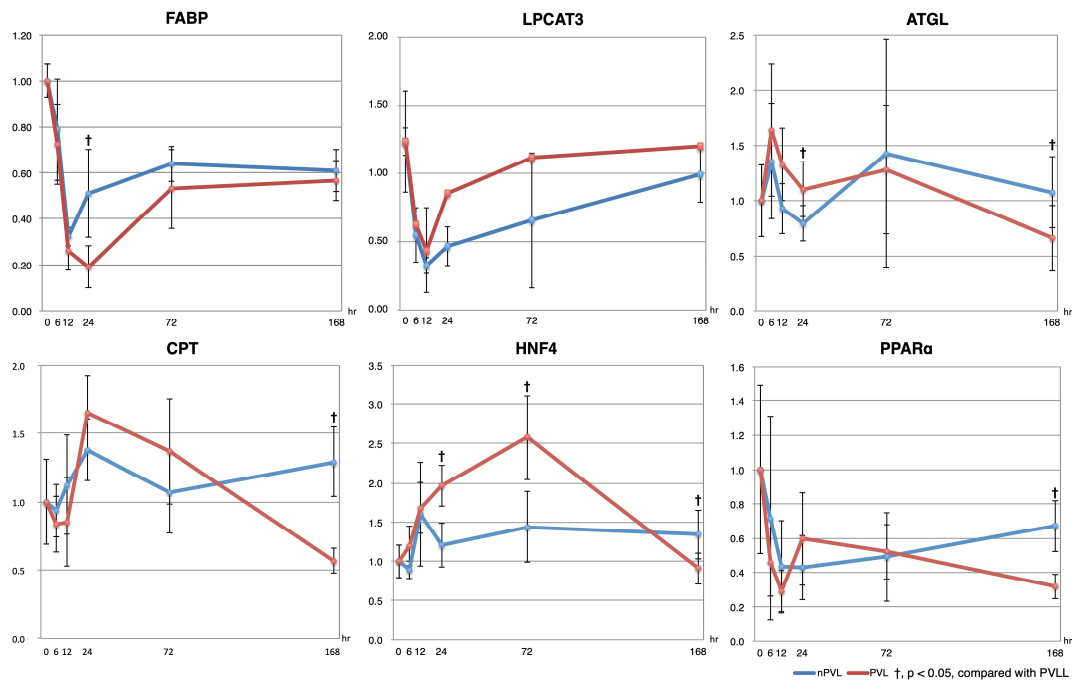


このことから TGs (特に炭素数 22 個で不飽和結合 6 個を持つ脂肪酸で構成される TGs) の一過性増加とそれに引き続いて生じる PCs 増加には関連があると考えた。そこで TGs から PCs 合成に関すると思われる酵素 (Lysophosphatidylcholine acyltransferase, LPCAT3; adipose triglyceride lipase, ATGL; cholinephosphotransferase, CPT) の mRNA 発現量評価目的で qRT-PCR を行った。また一過性の TGs 増加の原因が TGs 合成促進によるものか (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR; hepatocyte nuclear factor 4)、門脈からの脂肪酸取り込み促進 (fatty acid binding protein, FABP) なのかを検討した (下図参照)。



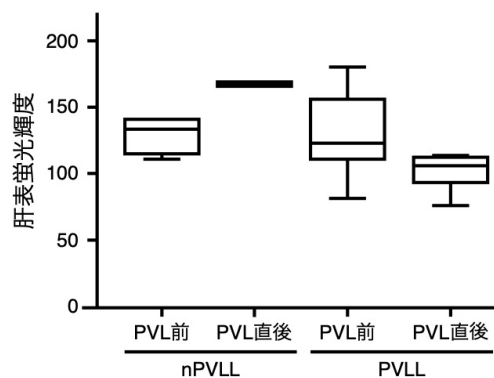
(5) qRT-PCR 解析結果:

FABP は下図左上のグラフが示すように PVL 直後に低下するが、nPVLL でより早期に回復した。一方で、TGs を DG (diacyl glycerol) と FFAs に分解する酵素 ATGL、それら TG 由来脂質から PCs を合成する酵素 LPCAT3 や CPT、そして TGs 合成促進因子 PPAR、HNF4 は時間経過において今回の想定していた理論を立証するような有意な変化は認められなかった (下図参照)。



以上の結果より、PVL 後の一過性 TGs 増加は de novo TGs 合成亢進ではなく、PVL に伴う門脈血流不均衡および脂肪酸取り込み transporter FABP 発現不均衡（いずれも nPVLL >> PVLL）に伴うものと考えられた。FABP は細胞内で FFAs のシャペロンとして作用して死亡の蓄積や細胞分裂を引き起こすと報告されており、FABP が PVL 後の一過性 TGs の増加および肝肥大に關与する可能性が示された。

(6) ICG 近赤外線観察の結果：ファントムを用いた実験系で ICG 濃度（量）と ICG 蛍光輝度が相関することを確認、ICG 静注後の肝表面 ICG 由来蛍光輝度の多寡で ICG 取り込み量が推察出来ると考えた。下図が示すように PVL 施行直後の観察では、nPVLL の肝表輝度は PVL 未施行マウス肝表輝度と比較して高く、逆に PVLL 肝表輝度は 75%程度に減少した。



以上の結果から、PVL 直後既に肝表蛍光輝度に変化が生じており、門脈血流不均衡に伴って ICG の肝取り込みが変化していることから、肝細胞への物質取り込みは門脈血流依存であることが示唆された。

以上の結果より、我々は以下の結論を導き出した。

PVL によって nPVLL には肝容量に比して多量の門脈血流が流入、すなわち血液中 FFAs の多くが門脈経路で nPVLL に運び込まれる、肝細胞内に取り込まれた FFAs が細胞内で詳細は不明だが FABP と結合して TGs 合成経路に運び込まれ、脂肪滴として貯留される。この際、PVL 直後に低下していた FABP は nPVLL で早期に回復することが一つの鍵になっている。そして、大量に蓄えられた TGs を利用し、細胞分裂時に相当量要求される細胞膜構成成分 PCs を TGs 由来 FFAs、DGs をもとに産生して肝肥大に繋げている。

本研究では TGs や PCs 代謝に関する酵素に nPVLL および PVLL で差を認めなかったことから、上記一過性 TGs 増加および引き続き PCs 増加は PVL 直後からの門脈血流そして PVL24 時間前後の FABP の不均衡（いずれも nPVLL >> PVLL）が原因と考えられた。

また副次的ではあるが、ICG 近赤外線観察法は実臨床において門脈結紮術直後に行うことで

将来的な肝機能評価を推察出来る可能性があると思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Yasushi Shibasaki, Makoto Horikawa, Koji Ikegami, Ryota Kiuchi, Makoto Takeda, Takanori Hiraide, Yoshifumi Morita, Hiroyuki Konno, Hiroya Takeuchi, Mitsutoshi Setou, Takanori Sakaguchi: Stearate-topalmitate ratio modulates endoplasmic reticulum stress and cell apoptosis in non-B non-C hepatoma cells. Cancer Science、査読有、2018年、DOI:10.1111/cas.13529

Makoto Takeda, Takanori Sakaguchi, Takanori Hiraide, Yasushi Shibasaki, Yoshifumi Morita, Hiroto Kikuchi, Koji Ikegami, Mitsutoshi Setou, Hiroyuki Konno, Takanori Sakaguchi: Role of caveolin-1 in hepatocellular carcinoma arising from non-alcoholic fatty liver disease. Cancer Science、査読有、2018年、DOI:10.1111/cas.13659

Ryota Kiuchi, Takanori Sakaguchi, Ryo Kitajima, Satoru Furuhashi, Makoto Takeda, Takanori Hiraide, Yoshifumi Morita, et al: Hepatic angiomyolipoma with early drainage vein into the hepatic and portal vein. Clinical Journal of Gastroenterology、査読有、2019年、DOI:10.1007/s12328-019-00946-2

〔学会発表〕(計6件)

木内亮太、坂口孝宣、古橋 暁、武田 真、平出貴乗、柴崎 泰、森田剛文ら：門脈塞栓術後によって生じる肝内脂質組成変化の検討、第71回日本消化器外科学会総会、2016年

Ryota Kiuchi, Takanori Sakaguchi, Tuyen Minhn Le, Satoru Furuhashi, Makoto Takeda, Takanori Hiraide, Yasushi Shibasaki, Yoshifumi Morita, et al: Changes of intrahepatic lipid composition after portal vein embolization. American Hepato-Pancreato-Biliary Association Annual meeting 2017、2017年

木内亮太、坂口孝宣、Minh Tuyen Le、古橋 暁、武田 真、平出貴乗、柴崎 泰、森田剛文ら：門脈塞栓術後の肝再生と肝内脂肪酸変化との関連、第117回日本外科学会定期学術集会、2017年

Ryota Kiuchi, Takanori Sakaguchi, Tuyen Minhn Le, Satoru Furuhashi, Makoto Takeda, Takanori Hiraide, Yasushi Shibasaki, Yoshifumi Morita, et al: Liver functional assessment of individual segments by indocyanine green-fluorescent technique. 29th Meeting of Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, 2017年

Ryota Kiuchi, Takanori Sakaguchi, Tuyen Minhn Le, Satoru Furuhashi, Makoto Takeda, Takanori Hiraide, Yasushi Shibasaki, Yoshifumi Morita, et al: Functional assessment of individual hepatic lobe by indocyanine green-fluorescent technique in mouse model of portal vein ligation. European Society of Surgical Research 2017, 2017年

木内亮太、坂口孝宣、北嶋 諒、古橋 暁、武田 真、平出貴乗、柴崎 泰、森田剛文ら：ICGによる肝機能評価は何を反映している？-ICG蛍光法からの新知見、第73回日本消化器外科学会総会、2018年

〔図書〕(計1件)

坂口孝宣、バリュウメディカル、「知っておきたい、病気のこと、治療のこと、浜松医科大学医学部附属病院の最新医療」、2018年、p84-85

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：森田 剛文

ローマ字氏名：MORITA YOSHI FUMI

所属研究機関名：浜松医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：6046129

(2)研究協力者

研究協力者氏名：木内 亮太

ローマ字氏名：KIUCHI RYOTA

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。