

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12738

研究課題名(和文)肝切除術後患者のメタボロミクス栄養学の確立

研究課題名(英文) Establishment of metabolomics nutrition of perioperative patients with hepatectomy

研究代表者

奥村 仙示 (OKUMURA, Hisami)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・講師

研究者番号：30322259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：術前に比べて術後は栄養代謝が大きく変動する。そこで、肝切除術後患者における代謝障害の問題を評価するために、肝切除前後の血中および尿中のメタボローム解析を行い血液生化学検査も併せて検討した。また、間接熱量計を用いて、安静時エネルギー消費量(REE)と非蛋白性呼吸商(npRQ)を測定した。

術後14日目では、REEの変動はなかった。しかし、npRQは低下しており、早朝空腹時の飢餓が認められた。また、バリンおよびロイシンも術後14日目に低下しており、回復していなかった。間接熱量計とメタボローム解析を行うことにより術後の変動を改善するBCAAを含む就寝前夜食の投与が必要ではないかと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The nutritional metabolism greatly changes after the surgery, as compared prior to the surgery. Therefore, in order to evaluate the problem of metabolic disorder in the hepatic resection after the surgery, metabolome analysis in blood and urine was performed before and after hepatectomy. Furthermore, blood biochemical examination was also examined. In addition, resting energy expenditure (REE) and non-protein respiratory quotient (npRQ) were measured using an indirect calorimeter.

On day 14, postoperatively, there was no change in REE. However, npRQ was declining and starvation was observed in the early morning at fasting state. Valine and leucine also declined on the 14 postoperative day and did not recover. It was thought that administration of late evening snack including BCAA which improves postoperative fluctuation by indirect calorimeter and metabolome analysis is necessary.

研究分野：食生活

キーワード：食生活 臨床栄養 肝疾患 メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

分岐鎖アミノ酸(BCAA)は、肝硬変に有用な栄養素で、アンモニア(NH₃)を解毒する筋肉の重要な構成成分である。一方、肥満者はBCAAやその異化副産物のC3、C5カルニチンが高く(Newgard, Cell Metab 2009)、BCAA、スレオニン、フェニルアラニンが高いヒトは将来糖尿病になるリスクが高いので(Wang, Nature Med 2011)、BCAAは糖尿病の初期バイオマーカーということが明らかにされた。

筋肉は肝疾患にとって重要な組織であり、術後の飢餓や炎症から筋肉の分解を最小限にする栄養療法が求められる。また、術後はインスリン抵抗性のため高インスリンになる。術後のアミノ酸の変動は、血清で上昇し、尿でも排出が増加するアミノ酸と、BCAAのように、血清での見かけ上は低値を示すが、尿には排出が増加するアミノ酸がある。これは、BCAA源の筋肉が分解し、血清で上昇したはずが、術後の高インスリンによって、BCAAが血中から組織へ移動するためと考えられる(Thomas, Metabolomics 2010)。さらに、BCAAがNH₃の解毒や術後早期の栄養源として利用され低下していることも考えられる。同一ヒトで血清と尿を両方あわせて代謝動態を経時的に正しく評価することで、根拠のある必要な栄養素や投与タイミングの開発や食生活への提案が期待できる。

2. 研究の目的

術前に比べて術後は栄養代謝が大きく変動する。術後に異化亢進することは多数報告されているが、術後のアミノ酸代謝動態を詳細に報告は少ない。術後の代謝変動を詳細に評価し、新しい栄養療法の開発に役立てることが望まれる。そこで、肝切除術周術期における代謝障害の問題を評価するために、肝切除前後の血中および尿中のメタボローム解析を行い血液生化学検査も併せて検討する。また、全身のエネルギー代謝を評価するため間接熱量計を用いて、安静時エネルギー消費量(REE)と非蛋白性呼吸商(npRQ)を測定する。

3. 研究の方法

【対象】

肝細胞癌患者 16名とした。キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計(CE-TOFMS)を用いて、早朝空腹時の血清(S)を、術前、術後1、3、14日目(S0、S1、S3、S14)および尿(U)を、術前、術後3日目(U0、U3)に採取し、測定を行った。

【メタボローム解析】

(1) 血清サンプルの前処理および測定
Methionine sulfone、2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) および D-Camphol-10-sulfonic acid (CSA) を各 20 μM となるように調製した MeOH 溶液 450 μL に血

清 50 μL を加え攪拌した。さらに、CHCl₃ 500 μL、MilliQ 水 200 μL を加えて攪拌し、4、4,600 × g (7,000 rpm) で 5 分間遠心分離した。上層の 200 μL を限外ろ過フィルター(分画分子量 5,000 Da)にとり、4、9,100 × g (10,000 rpm) で 2 時間遠心分離した。ろ液 150 μL を 35 で遠心濃縮したものをサンプルとした。測定前に、3-Aminopyrrolidine、1、3、5-Benzenetricarboxylic acid (Trimesate) 各 200 μM 水溶液 100 μL で溶解し、下記に記した CE-TOF/MS 測定条件で測定した。

(2) 尿サンプルの前処理および測定

Methionine sulfone、MES、CSA、3-Aminopyrrolidine および Trimesate を各 200 μM となるように調製した水溶液 20 μL に、サンプルごとの希釈率となるように尿、Milli-Q 水を加え攪拌し、CE-TOFMS で測定した。希釈率は、ダイヤカラー・CRE-V(酵素法)で測定した Creatinine 濃度により決定した。

【エネルギー代謝測定】

測定前日は、7:00PM 以降はエネルギーのないお茶や水以外は禁止とした。食事量の計算は、聞き取り調査により測定前日の1日摂取量調査を行った。また、測定前日の7:00AM から当日の7:00AM までの24時間蓄尿を行い、尿中尿素窒素を測定した。測定は間接熱量計(AEROMONITOR、AE-300S、ミナト医科学社製)を用いて、早朝空腹時の7:30AM もしくは8:00AM に行った。酸素消費量(VO₂)、二酸化炭素産生量(VCO₂)を30秒間ごとに15分間測定し、後半10分の平均値を結果として用いた。さらに、測定したVO₂、VCO₂と24時間尿中尿素窒素排泄量より非蛋白性呼吸商(npRQ)を算出した。

4. 研究成果

術前および術後の代謝物の変動と、エネルギー代謝について評価した。glutamine は S3 で S0 に比較して低下する傾向があった。BCAA は、glutamate や glutamine の前駆体でありアンモニアの処理のため使用されたこと、またエネルギー源として使用されたことなどが考えられた。しかし、どのような理由で低下したかは明らかではない。

血液生化学分析に含まれる8つの変数(WBC、CRP、AST、ALT、PLT、TP、Alb、およびT-Bil)の変化とアミノ酸および glutamate や glutamine、taurine レベルの変化との関連性を調べるために重回帰分析を行った(表1)。glutamine は S3 において、減少する傾向があり、CRP とは負の相関を示した。taurine は S3 で S0 より有意に高値を示し、WBC と関連があった。S3 において、glutamine と taurine は炎症に関連が示された。glutamine と taurine は、骨格筋のアミノ酸に多く含まれているため、OP 後の骨格筋の異化に大きな影響がみられると考えられた。

S0 に比し、S1、S3、S14 および U3 で up した代謝物と、down した代謝物を表 2 と表 3 に示す。また、血清について、代謝図に示した(表 4)

REE は術前、 1171 ± 53 kcal、術後 14 日目に、 1153 ± 53 kcal と有意な変動はみられなかった。npRQ は術前、 0.90 ± 0.01 、術後 14 日目に 0.86 ± 0.02 と有意な低下がみられた。REE の変動はなく、術後 14 日目では、エネルギー消費量の亢進はみられなかった。しかし、npRQ は低下しており、早朝空腹時の飢餓が認められた。術後 14 日目は、食事の必要量は摂取できているため、この飢餓は、肝切除により小さくなった肝臓のため、グリコーゲンの蓄積が不十分であることを示していると考えられた。

また、バリンおよびロイシンも術後 14 日目に低下しており、回復していなかった。間接熱量計とメタボローム解析を行うことにより術後の変動を改善する BCAA を含む就寝前夜食の投与が必要ではないかと考えられた。

表 1 術前からの代謝物の変化量に対する血液生化学検査値の重回帰分析

Dependent variable	Independent variable	Regression coefficient	Standardized regression coefficient	P	
S1	-	-	-	-	
S3	Δ Gln	Δ CRP	-7.742	-0.502	0.048
S14	-	-	-	-	
S1	Δ T-Bil,	Δ WBC,	-165.831,	-0.576,	0.005,
	Δ Glu	Δ Pt	0.016,	0.719,	0.002, 0.015
S3	Δ CRP	Δ CRP	-13.397	-5.111	0.028
S14	-	-	-	-	
S1	Δ WBC	Δ WBC	0.008	0.536	0.032
S3	Δ Tau	Δ WBC	0.02	0.775	0.001
S14	Δ ALT	Δ ALT	-0.081	-0.516	0.043

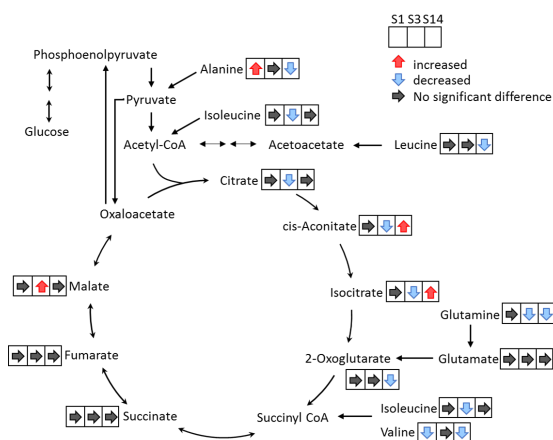
表 2 術前に比べ up した代謝物

Ranking	UP		FC
	UP	FC	
S1	1	Hypoxanthine	4.74
	2	Pyruvate	2.62
	3	5-Oxoproline	2.57
	4	Lactate	2.47
	5	Azela	2.41
	6	Asp	2.10
	7	2-Oxoglutarate	2.10
	8	Cysteine S-sulfate	2.04
	9	N1-Acetylspermidine	1.95
	10	Sebacate	1.92
S3	1	Hypoxanthine	11.50
	2	3-Phenyllactate	3.11
	3	Phe-Phe	3.02
	4	Azela	2.51
	5	5-Oxoproline	2.46
	6	Lactate	2.37
	7	Asp	2.35
	8	Glucuronate	2.22
	9	2-Oxoglutarate	2.21
	10	Sebacate	1.92
S14	1	3-Hydroxybutyrate	1.81
	2	Cytidine	1.50
	3	Pipecolate	1.50
	4	N-epsilon-Acetylysine	1.45
	5	5-Hydroxylysine	1.45
	6	Hydroxyproline	1.39
	7	3-Phenyllactate	1.38
	8	3-Aminoisobutyrate	1.35
	9	Proline betaine	1.34
	10	Taurine	1.31
U3	1	Mucate	9.36
	2	o-Hydroxyhippurate	5.22
	3	Citrulline	3.64
	4	Lys	3.59
	5	Cysteine S-sulfate	3.59
	6	Cystine	3.08
	7	Pro	2.92
	8	p-Hydroxyphenylacetate	2.76
	9	trans-Aconitate	2.46
	10	Lactate	2.25

表 3 術前に比べ down した代謝物

Ranking	DOWN		FC
	DOWN	FC	
S1	1	Trimethylamine N-oxide	0.31
	2	3-Indoxyl sulfate	0.43
	3	3-Hydroxybutyrate	0.47
	4	Cysteine-glutathione disulphide -Divalent	0.47
	5	3-Methylhistidine	0.56
	6	Proline betaine	0.58
	7	g-Glu-Glu	0.59
	8	Arg	0.64
	9	g-Glu-Ornithine	0.66
	10	2-Hydroxyisobutyrate	0.66
S3	1	Proline betaine	0.27
	2	3-Hydroxybutyrate	0.47
	3	NN-Dimethylglycine	0.49
	4	3-Methylhistidine	0.50
	5	3-Indoxyl sulfate	0.54
	6	Glycerophosphate	0.58
	7	Urate	0.61
	8	Cysteine-glutathione disulphide -Divalent	0.66
	9	N-Acetyl-beta-alanine	0.66
	10	g-Glu-Ornithine	0.67
S14	1	Glycerophosphorylcholine	0.58
	2	3-Indoxyl sulfate	0.60
	3	Glycerophosphate	0.64
	4	N6,N6,6-Trimethyllysine	0.73
	5	Guanidinoacetate	0.76
	6	Trp	0.80
	7	Thr	0.80
	8	His	0.80
	9	2-Hydroxyglutarate	0.81
	10	4-Methyl-2-oxopentanoate	0.81
U3	1	Quinate	0.10
	2	Trigonelline	0.11
	3	Hippurate	0.32
	4	Piperidine	0.32
	5	Guanidinoacetate	0.34
	6	2-Oxoglutarate	0.35
	7	Glycerophosphate	0.38
	8	3-Methylhistidine	0.43
	9	NN-Dimethylglycine	0.45
	10	Creatine	0.50

表 4 術後の血清代謝物の変動図



術前血清 (S0) に対する術後 1 日目 (S1)、術後 3 日目 (S3)、術後 14 日目 (S14) の代謝物の変化を示す。

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)

1) Y Saito, Y Morine, S Iwahashi, T Ikemoto, S Imura, H Yamanaka-Okumura, A Hirayama, T Soga, M Tomita, M Shimada. Changes of liver metabolites following hepatectomy with ischemia reperfusion towards liver regeneration. *Ann Gastroenterol Surg.* 2018;1-8. DOI: 10.1002/ags3.12058 (査読有)

2) S Wada, H Yamanaka-Okumura, T Katayama, Y Morine, S Imura, M Shimada. Major liver resection reduces non-protein respiratory quotient and increases non-esterified fatty acid at postoperative day 14 in patients with hepatocellular carcinoma. *Clinical Nutrition ESPEN*, 2018;23:194-199. doi: 10.1016/j.clnesp.2017.10.001 (査読有)

[学会発表](計 8 件)

1) 奥村仙示 肝切除周術期の代謝物はどのように変化するのか? -メタボローム解析を用いた網羅的な周術期の評価- 第 33 日本静脈経腸栄養学会学術集会 2018 年 2 月 22 - 23 日 (神奈川県、横浜市)

2) 牧宏樹, 奥村仙示, 片山貴文, 細田昭仁, 小澤優佳, 倉田なおみ, 雨宮史武 肝硬変患者への夜食 (LES) 投与により翌朝空腹時の Fisher 比が改善した 1 症例 第 33 日本静脈経腸栄養学会学術集会 2018 年 2 月 22 - 23 日

(神奈川県、横浜市)

3) 牧宏樹, 奥村仙示, 片山貴文, 細田昭仁, 倉田なおみ, 雨宮史武 肝性脳症に対するアミノレバン点滴使用時の増悪因子に関する後方視的検討 第 24 回山梨 NST 研究会 2017 年 12 月 8 日 (山梨県、甲府市)

4) 木下翔平, 多々納浩, 梶浦大資, 奥村仙示, 島田光生, 森根裕二, 平山明由, 曾我朋義, 富田勝 患者組織と腫瘍切除前後の血清を用いたメタボローム解析による新規バイオマーカー探索 分子細胞生物学会 2017 年 11 月 30-12 月 2 日 (神奈川県、横浜市)

5) 梶浦大資, 奥村仙示, 平山明由, 片山貴文, 島田光生, 富田勝, 曾我朋義 肝細胞癌切除患者における周術期の血清及び尿のメタボローム解析 2017 年 10 月 19~21 日、第 10 回メタボロームシンポジウム (山形県、鶴岡市)

6) H Maki, H Yamanaka-Okumura, T Katayama, A Hosoda, N Kurata, F Amemiya. Late evening snack with branched chain amino acids improves Fischer ratio at fasting, in the next morning. 39th European Congress for Nutrition and Metabolism, Hague, Netherlands, 2017, September 9-12

7) 齋藤 裕, 奥村 仙示, 森根 裕二, 平山 明由, 良元 俊昭, 吉川 雅登, 岩橋 衆一, 池本 哲也, 居村 暁, 島田 光生 メタボローム解析を用いた肝切除後代謝物解析と肝再生因子の解明 2017 年 7 月 6 - 7 日 日本外科代謝栄養学会 (新潟県、新潟市)

8) 奥村仙示, 和田宵湖, 片山貴文, 居村暁, 島田光生 肝切除後退院時のエネルギー代謝状態は回復しているのか? -重症度と切除量の違いによる検討 2017 年 2 月 23-24 日 第 32 日本静脈経腸栄養学会学術集会 (岡山県、岡山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 仙示 (OKUMURA, Hisami)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師
研究者番号: 30322259