

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19885

研究課題名(和文) 脂肪肝切除後の分子病態解明と抗酸化能増強による易障害性、易転移性克服法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of molecular pathology and development of a method for overcoming susceptibility to disabilities and metastasis by enhancing antioxidant capacity after hepatectomy for fatty liver.

研究代表者

島田 慎吾 (Shimada, Shingo)

北海道大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：40755576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラット脂肪肝、肝温虚血再灌流、70%肝切除等の動物実験モデル、質量分析イメージング(IMS)法による肝組織の脂質・脂肪酸の網羅的解析法を確立した。脂肪肝の微小環境を模倣し、肝癌細胞株をオレイン酸・パルミチン酸添加下で培養し、増殖、悪性度変化等を分子生物学的、脂質・脂肪酸分析により評価した。温虚血再灌流では虚血中に虚血時間依存的にLysophosphatidylinositol (LPI) や胆汁酸類が肝組織のZone1に集積し、その傾向は脂肪肝で増強された。LPI投与は肝細胞株、星細胞株の細胞質Ca²⁺濃度を速やかに上昇させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪肝では軽度の持続的障害により抗酸化酵素、脂肪酸代謝酵素の発現が低下しており、虚血再灌流や肝切除後に障害を受け易いため、これらを軽減する方法の確立が望まれる。LPIとその特異的受容体(GPR55)が肝虚血再灌流、肝切除後の傷害、再生、癌細胞発育に与える影響を、種々の阻害剤、賦活剤を用いて検討中であるが、これらの検討は、肝癌細胞の微小環境におけるリソリン脂質、脂肪酸の役割に焦点をあてる新たな試みであり、新たな細胞間相互作用の発見と治療法開発の基礎的知見になるはずである。

研究成果の概要(英文)：We established a comprehensive analysis method of lipids and fatty acids in the liver tissue using rat fatty liver, animal model for liver ischemia-reperfusion, 70% hepatectomy, and mass spectrometry imaging (IMS). Mimicking the fatty liver microenvironment, hepatoma cell lines were cultured in the presence of oleic acid / palmitic acid, and proliferation, changes in malignancy, etc. were evaluated by molecular biology and lipid / fatty acid analysis. During warm ischemia-reperfusion, Lysophosphatidylinositol (LPI) and bile acids accumulated in the hepatic tissue Zone 1 in an ischemic time-dependent manner during ischemia, and this tendency was enhanced in fatty liver. LPI administration rapidly increased the cytosolic Ca²⁺ concentration in hepatocyte and stellate cell lines.

研究分野：肝臓外科

キーワード：脂肪肝 肝癌 虚血再灌流障害 抗酸化 脂肪酸 IMS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

< 脂肪肝からの発癌 >

NAFLD は成人の約 30%に認められ、内 20%は NASH に進展し、肝硬変、発癌リスクが増加する¹。NASH を経ない発癌もあり、糖・脂質代謝シグナル、それらを制御する micro RNA¹、星細胞の活性化²、遺伝子多型・修飾が関与する³。

- 1) Tian Y et al. Seminar Cancer Biol 2013; 23:471-82.
- 2) Yoshimoto S et al. Nature 2013; 499:97-101.
- 3) Eslam M et al. Nat Commun 2015; 6: 6422-31.
- 4) Haga S et al. Anti Redox Signal 2014; 21:2515-29.
- 5) Solt DB et al. Cancer Res 1980; 40:1112-8.
- 6) Orci LA et al. Dig Dis Sci 2014; 59: 2058-68.
- 7) Hayasaka T et al. J Hepatol 2013; 59:292-9.
- 8) Wu D et al. Med Gas Res 2015; 5:1-8.
- 9) Hayasaka T et al. BBRC 2011; 408:120-5.

< 脂肪肝切除の動向、問題点 > 当科の HCC 切除(815 例;直近 15 年)の約 30%は非感染、内 90%以上は糖尿病を合併し、脂肪酸取り込み酵素(FABP5)の強発現例の予後は不良であり、増殖、転移、EMT の促進に関与した(Ohata T, et al. Cancer Med 2017; 6(5): 1049-61)。脂肪肝部分肝切除(PH)では酸化ストレス、炎症、アポトーシスにより肝再生が遅延し⁴、mitosis 下での酸化ストレス、炎症は発癌を促進し⁵、PH 後の CTC の生着が促進される⁶。残肝は Pringle 法、PH のストレスが上乘せされ、切除組織以上に線維化、発癌のリスクを有するはずである。脂肪肝からの発癌の研究は国内外で進んだが^{1-3,7}、切除後の脂肪肝(残肝)の病態は不明である。

< 脂肪肝における肝再生と抗酸化能 > 脂肪肝では軽度の持続的障害により Stat3, Akt が活性化(リン酸化)しているが、増殖は起こらない。脂肪化による p62/SQSTM1 の発現低下、Keap1 の分解阻害、Nrf2 活性化の阻害により⁴、抗酸化酵素、脂肪酸代謝酵素(CPT-1)^{4,8} の発現が低下する。それ故阻血再灌流や肝切除後に障害を受け易い⁴。肝の脱脂肪、再生、阻血再灌流に対する Nrf2 活性増強の有用性が推測され、抗酸化、抗炎症、血管弛緩を同時に達成する方法の確立が望まれる。

< Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging mass spectrometry (MALDI-IMS); 以下 IMS >

ヒト HCC 切除試料の IMS 解析では Lyso-PC と脂肪酸から PC を生成させる LPCAT1 が悪性度を減弱させること⁷、また、マウス正常肝切除では肝再生マーカーとなる脂質が見出された⁹。しかし、脂肪肝の肝再生、癌化、悪性度と脂肪酸代謝の関係は未解明な部分が多い。

2. 研究の目的

本課題は Pringle 法を併用した脂肪肝切除の予後を改善する方法を確立し、予後予測マーカーを見出すために行う。動物モデルと In vitro の系を用いて Pringle 法併用脂肪肝切除における、1) 術後肝再生不良、2) 線維化、3) 発癌、4) CTC 転移のリスク因子を見出だし、5) NaHS(硫化水素ナトリウム)、H₂(水素ガス)による抗酸化、Nrf2 活性化のリスク軽減効果を明らかにする。

3. 研究の方法

ラット、マウスの各種動物モデル、質量分析イメージング法(IMS)の条件設定を行う。部分肝切除(PH)、Pringle 法併用部分肝切除(P-PH)、脂肪肝(耐糖能異常、食餌性)、脂肪肝の線維化、発癌のモデルを検討し、「脂肪肝の P-PH 後のリスク因子を見出す為に最適なモデル」を選定する。

脂肪肝の P-PH 後線維化、発癌の好発モデルの経時的犠牲死により採取した試料を用いて、耐糖能、NAFLD activity score (NAS)、遺伝子(RT-PCR, cDNA array)、タンパク(免染、SDS-PAGE)、酸化ストレスマーカー、肝内小分子(IMS)の推移を評価する。肝再生、線維化、発癌の程度で群分けし、各病態に対する予測因子を主に cDNA array、IMS で探索する。IMS で見出されたピーク(m/z)を物質同定し、他の評価項目と融合し、病態変化に先行する物質変化を見出す。さらに、マーカー候補分子の血中濃度の推移を検討し、各病態の近未来を予測可能な血中マーカーを確立する。

4. 研究成果

H28 年度

ラットを用いて、動物モデルの作成、解析技術の確立を中心に実施した。

- (1) 脂肪肝モデル
- (2) 脂肪肝の線維化、発癌モデル
- (3) 正常肝の部分肝切除(PH)、Pringle法併用部分肝切除(P-PH)モデル
- (4) 肝のMatrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging mass spectrometry(MALDI-IMS)解析手法

脂肪肝モデルは、2日間絶食後、高炭水化物食を3日間摂取させた。ラットに対する部分肝切除はすでに確立されているので、モデル作成は容易であった。MALDI-IMS法については、ラット温虚血再灌流モデルに対して行ったが、傷害の早期予測マーカーとなりうる脂肪酸を同定できた。脂肪肝の線維化、発癌モデルはSolt & Farber法に準じ、2-Acetylaminofluoren (2-AAF; 0.02%含有食)、Diethylnitrosamine (DEN; 10-200 mg/kg ip.)を検討したが、線維化、発癌ともに安定した結果が得られず、確立できていない。なお、ラット脂肪肝虚血再灌流モデルおよび肝切除モデル対しての水素ガス、硫化水素ナトリウムによる治療効果を検証した。

H29年度

ラットモデルを作成し、その治療法を検討・評価した。

オイルレッドO染色で確認し、microsteatosis、macrosteatosisの脂肪肝を作り分けるprotocolを確立した。

脂肪肝の線維化、発癌モデルは難渋している。そのため、発癌モデルとしてラット肝癌細胞株を投与するモデルを検討している。

また、ラット脂肪肝虚血再灌流モデルおよび肝切除モデル対しての水素ガス、硫化水素ナトリウムによる治療効果を検証した。質量分析イメージングおよび病理検査、肝酵素による評価はできたが、分子生物学的評価までには至らなかった。

H30年度

ラット脂肪肝モデルを用いて、1)肝温虚血再灌流障害の評価を行った。全身麻酔下で開腹し、脳動脈瘤クリップを用いて70%の部分温虚血を行い、閉腹した。麻酔覚醒後、飲食は自由とした。異なるタイムポイントで全身麻酔下にて再開腹し、血液と肝組織をサンプリングしてAST/ALTおよび病理組織を評価した。単開腹のみ (Control群)、45分温虚血終了時 (EWI45群)、75分温虚血終了時 (EWI75群)、45分温虚血 1時間。再灌流終了時 (I45/R1h群)、75分温虚血 1時間再灌流終了時 (I75/R1h群)、75分温虚血 6時間再灌流終了時 (I75/R6h群)。さらに、2)ラット70%肝切除モデルを確立した。また、3)ラット脂肪肝温虚血再灌流障害モデルにおいて質量分析イメージングを用いた評価を行った。4)肝癌細胞の培養を行った。

- (1) 血中ALT、AST活性では、正常肝・脂肪肝ともにI75/R6h群でControl群と比べて有意に高値を示したが、脂肪肝では著明に上昇した。病理組織学的評価による傷害スコアはControl群とEWI45群、EWI75群では、それぞれ群間に有意差を認めなかった。I75/R6h群では正常肝・脂肪肝ともに高度のうっ血と空胞化を認めた。その傷害は脂肪肝で有意に増強した。さらに、脂肪肝の門脈周囲ではうっ血が非常に強く、ネクロシス途上の所見も確認された。
- (2) 安定した70%肝切除モデルを確立した。全例生存しえた。
- (3) Lysophosphatidylinositol (LPI) は障害の程度に応じてASTやALTよりも、ごく早期に上昇することを見出し、脂肪肝における虚血再灌流障害のバイオマーカーとなる可能性があることがわかった。

H31(R1)年度

H30 年度までに、ラット脂肪肝、肝温虚血再灌流、70%肝切除等の動物実験モデル、質量分析イメージング(IMS)法による肝組織の脂質・脂肪酸の網羅的解析法を確立した。また、脂肪肝の微小環境を模倣し、肝癌細胞株をオレイン酸・パルミチン酸添加下で培

養し、増殖、悪性度変化等を分子生物学的、脂質・脂肪酸分析により評価した。

温虚血再灌流では虚血中に虚血時間依存的に Lysophosphatidylinositol (LPI) や胆汁酸類が肝組織の Zone1 に集積し、その傾向は脂肪肝で増強された。LPI 投与は肝細胞株、星細胞株の細胞質 Ca^{2+} 濃度を速やかに上昇させた。しかし、 Ca^{2+} burst は必ずしも細胞死を増加させず、 $37^{\circ}C$ 低酸素中の細胞死も促進させなかった。LPI が傷害促進要因か、保護性のストレス応答か、脂肪酸側鎖 (m/z) の相異の影響等の検討が必要である。

ラットの *in vivo* 肝切除後の残肝は、炎症、接着、酸化ストレス、mitosis 等が増強され、Pringle 法は肝内転移、異時性発がんの何れにおいても癌増殖を助長する素因となることが懸念される。H30 年度に preliminary 実験を検討したが、北海道胆振東部地震時に一部の試料が融解し、破棄した。研究期間を延長し再実験に努めたが、限られたエフォートと研究費の中で全てを再検討はできず、一部の動物実験を断念した。しかし、細胞実験、メカニズム解析に注力し、LPI の役割について新たな可能性を見出した。引き続き、LPI とその特異的受容体 (GPR55) が肝虚血再灌流、肝切除後の傷害、再生、癌細胞発育に与える影響を、種々の阻害剤、賦活剤を用いて検討中である。これらの検討は、肝癌細胞の微小環境におけるリゾリン脂質、脂肪酸の役割に焦点をあてる新たな試みであり、新たな細胞間相互作用の発見と治療法開発の基礎的知見になるはずである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 島田 慎吾	4. 巻 25
2. 論文標題 脂肪肝、虚血再灌流障害をターゲットとしたAMPKの役割	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Organ Biology	6. 最初と最後の頁 134 ~ 139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.11378/organbio.25.134	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shimada Shingo, Wakayama Kenji, Fukai Moto, Shimamura Tsuyoshi, Ishikawa Takahisa, Fukumori Daisuke, Shibata Maki, Yamashita Kenichiro, Kimura Taichi, Todo Satoru, Ohsawa Ikuroh, Taketomi Akinobu	4. 巻 40
2. 論文標題 Hydrogen Gas Ameliorates Hepatic Reperfusion Injury After Prolonged Cold Preservation in Isolated Perfused Rat Liver	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 1128 ~ 1136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/aor.12710	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shimada S, Kamiyama T, Yokoo H, Orimo T, Wakayama K, Einama T, Kakisaka T, Kamachi H, Taketomi A.	4. 巻 41
2. 論文標題 Clinicopathological Characteristics of Hepatocellular Carcinoma with Microscopic Portal Venous Invasion and the Role of Anatomical Liver Resection in These Cases.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 World J Surg	6. 最初と最後の頁 2087 ~ 2094
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00268-017-3964-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shimada S, Kamiyama T, Yokoo H, Orimo T, Wakayama K, Nagatsu A, Kakisaka T, Kamachi H, Abo D, Sakuhara Y, Taketomi A.	4. 巻 19
2. 論文標題 Hepatic hypertrophy and hemodynamics of portal venous flow after percutaneous transhepatic portal embolization.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Surg	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12893-019-0486-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shimada S, Kamiyama T, Yokoo H, Orimo T, Nagatsu A, Ohata T, Kamachi H, Taketomi A.	4. 巻 43
2. 論文標題 Prognoses and Clinicopathological Characteristics for Hepatocellular Carcinoma Originating from the Caudate Lobe After Surgery.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World J Surg	6. 最初と最後の頁 1085 ~ 1093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00268-018-4869-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimada S, Fukai M, Shibata K, Sakamoto S, Wakayama K, Ishikawa T, Kawamura N, Fujiyoshi M, Shimamura T, Taketomi A.	4. 巻 8
2. 論文標題 Heavy Water (D2O) Containing Preservation Solution Reduces Hepatic Cold Preservation and Reperfusion Injury in an Isolated Perfused Rat Liver (IPRL) Model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Med	6. 最初と最後の頁 E1818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8111818.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kengo Shibata, Takahiro Hayasaka, Moto Fukai, Koichi Kato, Takahisa Ishikawa, Kohei Umemoto, Shingo Shimada, Nozomi Kobayashi, Tsuyoshi Shimamura, Taichi Kimura, and Akinobu Taketomi
2. 発表標題 Elucidation of the role of lyso-phospholipids on hepatic warm ischemia and reperfusion injury; Comprehensive analysis by imaging mass spectrometry
3. 学会等名 19th Congress of the European Society for Organ Transplantation (ESOT 2019). Copenhagen, Denmark (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kengo Shibata, Takahiro Hayasaka, Moto Fukai, Koichi Kato, Takahisa Ishikawa, Kohei Umemoto, Shingo Shimada, Nozomi Kobayashi, Tsuyoshi Shimamura, Taichi Kimura, and Akinobu Taketomi
2. 発表標題 Elucidation of the mechanisms of hepatic warm ischemia and reperfusion injury in rats; Exploration of predictive markers of IRI by imaging mass spectrometry.
3. 学会等名 16th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST 2019). Greater Noida, India (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深井原, 柴田賢吾, 坂本聡大, 島田慎吾, 小林希, 石川隆壽, 若山顕治, 藤好真人, 川村典生, 嶋村剛, 武富紹信
2. 発表標題 虚血再灌流傷害に対する水素ガスの作用点の探索
3. 学会等名 第46回 日本臓器保存生物医学会学術集会 (福島, ぶくしま医療機器開発支援センター) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深井原, 柴田賢吾, 島田慎吾, 石川隆壽, 若山顕治, 藤好直, 小林希, 加藤紘一, 早坂孝宏, 三野和宏, 川村典生, 嶋村剛, 武富紹信
2. 発表標題 生存シグナル増強を目指した機械灌流による肝グラフトの薬剤性コンディショニング法の探索
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会, 大阪国際会議場
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田賢吾, 橋本咲月, 早坂孝宏, 深井原, 加藤紘一, 中藪拓哉, 島田慎吾, 小林希, 梅本浩平, 大谷晋太郎, 三野和宏, 嶋村剛, 木村太一, 武富紹信
2. 発表標題 温虚血再灌流障害におけるリゾリン脂質の役割に関する基礎的研究 質量分析イメージング法による解析
3. 学会等名 第119回 日本外科学会定期学術集会 (大阪, 大阪国際会議場)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shingo Shimada, Toshiya Kamiyama, Hideki Yokoo, Tatsuya Orimo, Akihisa Nagatsu, Hirofumi Kamachi, and Akinobu Taketomi
2. 発表標題 Long-term prognostic factors in ten-year survivors after resection of hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 第31回日本肝胆膵外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田慎吾、神山俊哉、折茂達也、長津明久、旭火華、坂本謙、蒲池浩文、武富紹信
2. 発表標題 肝細胞癌切除症例における術前HbA1cと予後および術後合併症
3. 学会等名 第81回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考