

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18023

研究課題名(和文)細胞間接着分子発現抑制を介した脂肪肝虚血再灌流障害機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of ischemia-reperfusion injury in fatty liver caused by suppression of intercellular adhesion molecule expression

研究代表者

藤井 武宏 (FUJII, TAKEHIRO)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00640690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究結果は、食事成因の違いによって、脂肪肝の虚血再灌流傷害(肝IRI)に違いが生じることを示唆した。フルクトース食によってもたらせられた脂肪肝は、脂肪食によってもたらせられたものくらべ、より高度な肝IRIを示した。

また、各脂肪肝によって障害前からE-cadherinの発現に違いが認められ、発現が低い脂肪肝ほど、再灌流後の発現も低くなり、肝障害度も強く認められた。この結果はE-cadherinのIRIにおける細胞保護効果を示唆するものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一見同じ脂肪肝でも、食事成因によって肝IRIに対する脆弱性に違いがあり、臨床においては、それを考慮して術前評価を行う必要があることを示した。E-cadherinは肝IRIにおいて、細胞保護効果を担う可能性が示唆され、今後これをターゲットとしたIRI治療法の確立や、術前肝障害度予測診断の進歩に期待が持てる。

研究成果の概要(英文)：The results of this study suggested that different dietary factors caused differences in ischemia-reperfusion injury (IRI) in fatty liver. Fatty liver caused by the fructose diet showed a severe liver IRI than that caused by the fat diet.

The expression of E-cadherin was different depending on each etiology before IRI. The lower the expression of E-cadherin, the stronger the degree of liver damage was observed. This result suggested the cytoprotective effect of E-cadherin on hepatic IRI.

研究分野：肝虚血再灌流傷害

キーワード：虚血再灌流傷害 脂肪肝 細胞間接着分子 E-cadherin アポトーシス 肝移植

## 1. 研究開始当初の背景

肝移植手術での肝流入血行遮断は、血流再開時に肝虚血再灌流障害 (IRI) を惹起し、術後の肝機能異常や移植グラフト機能不全の原因となる。昨今のメタボリックシンドロームに伴う脂肪肝患者の増加とドナー不足から、脂肪肝グラフトの適応拡大が進められているが、過度の適応拡大は移植術後に肝 IRI を助長し、高度の肝機能障害や移植グラフト機能不全を惹起し予後不良の経過をたどる。脂肪肝の成因は、アルコールや脂肪の過剰摂取に加え、最近では食事の欧米化や清涼飲料水の摂取量増加に伴った果糖 (フルクトース) の過剰摂取が注目を集め、現代の脂肪肝の成因はもはや一様ではない。しかし、食事成因の違う脂肪肝の IRI 脆弱性の違いは不明で意識されることはなかった。そのため、臨床においても患者の食生活などの背景は考慮されず、術前の脂肪肝患者の IRI リスク評価もまた一様に行われていた。

E-cadherin をはじめとする細胞接着分子は細胞生存に深く関与し癌の治療ターゲットとして注目を集めている。肝 IRI における E-cadherin の細胞保護効果と脂肪肝内発現低下を仮説とした実験計画をたて、本研究に先立ち、脂肪肝内の E-cadherin 発現を調査し、正常肝と比して高脂肪食で作成した脂肪肝で E-cadherin の発現低下と肝 IRI 下での同分子のさらなる発現低下を見いだしていた。

## 2. 研究の目的

本研究は、食事成因による脂肪肝の違いで肝 IRI への脆弱性の差異が生じ、その違いは術前からの細胞間接着分子の発現量に起因するという仮説を立て、その検証を目的とした実験をおこなった。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス食事成因別脂肪肝作成

高脂肪食過剰摂取モデル 9 週投与 (高脂肪モデル Hi-Fat)

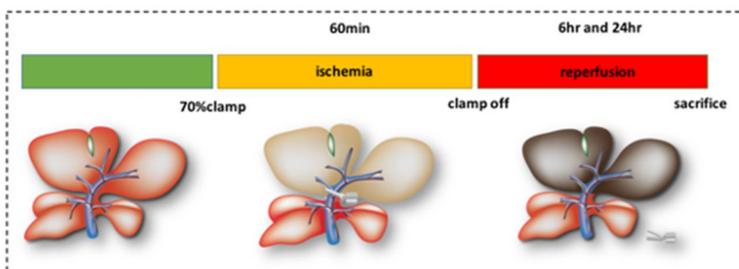
高フルクトース食過剰摂取モデル 5~8 週投与 (高果糖モデル Hi-Fru)

→脂肪肝レベル: 肝組織 Oil red 染色、肝内トリグリセリド定量

### (2) マウス肝虚血再灌流 (IRI) 試験

60 分の 70% 肝流入血行遮断後、6 時間および 24 時間時点で肝組織と血液を採取 (図 1)

(図 1)



### (3) 評価項目

肝障害度 (IRI 評価): 血中 ALT 定量、組織炎症細胞浸潤 (免疫染色)・サイトカイン (PCR)

肝組織 E-cadherin 発現: 免疫染色 ウェスタンブロット法

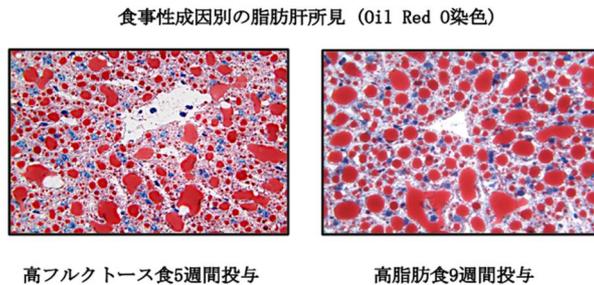
肝組織アポトーシス: カスパーゼ定量、TUNEL 免疫染色

## 4. 研究成果

### (1) 脂肪肝

Hi-Fat モデルでは 9 週間で安定して高度脂肪肝の発生を認め、これを Hi-Fat 群とした。一方 Hi-Fru モデルでは 5-8 週間で脂肪肝の発生を認めたが、その程度は個体差が大きかった。Hi-Fru モデルについては 5-8 週間投与でもたらされた高度の脂肪肝を Hi-Fru 群と定義した。Hi-Fat 群と比してより脂肪沈着は小滴である傾向がみられ (図 2)、肝組織内トリグリセリド値の平均は、Hi-Fru 群 vs. Hi-Fat 群:  $115.5 \pm 35.5$  vs.  $126.4 \pm 20.4$  ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) であった。

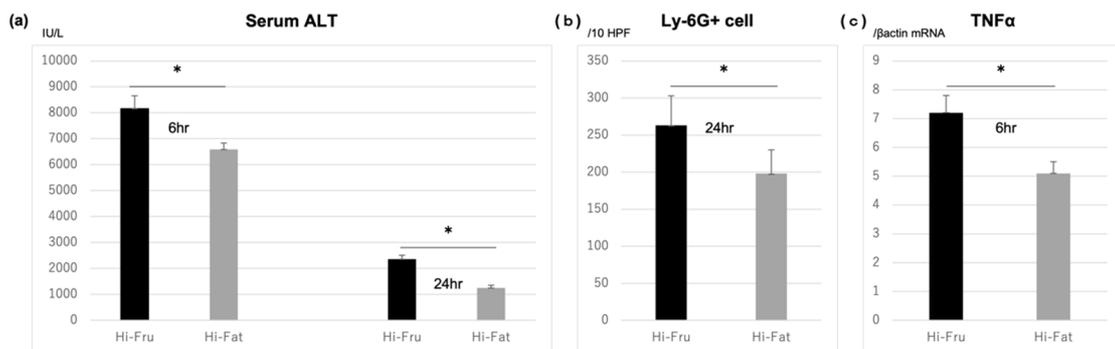
(図 2)



### (2) 肝障害

再灌流 6 時間および 24 時間時点での ALT レベルは有意に Hi-Fru 群で高値であった (図 3a)。再灌流 24 時間時点での肝組織内炎症細胞浸潤 (Ly-6G+細胞) は Hi-Fru 群で有意に高度であった (図 3b)。再灌流 6 時間時点での肝組織内炎症性サイトカイン TNF $\alpha$  発現は有意に Hi-Fru 群で高値であった (図 3c)。

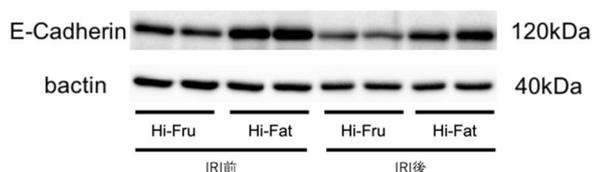
(図 3)



### (3) 肝組織 E-cadherin 発現

虚血前および再灌流後 6hr 時点で、Hi-Fru 群で肝組織内 E-cadherin 発現量の著明な低下を認めた (図 4)。

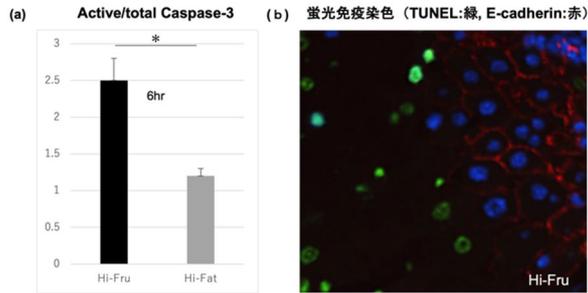
(図 4)



### (4) 肝組織アポトーシス

再灌流 6 時間後の肝組織 Caspase-3 の蛋白発現は Hi-Fru 群で有意に上昇していた (図 5a)。また Hi-Fru と Hi-Fat の両群で TUNEL 発現領域と E-cadherin 発現抑制領域の一致が観察された (図 5b)。

(図 5)



#### (5) E-cadherin の発現メディエーター

同実験系において、E-cadherin 発現の上流制御メディエーターとしての、Edoxaban Tosilate の役割を検討した。組織障害度を血中トランスアミナーゼ値と HE 染色による Suzuki 's score で評価し、Edoxaban Tosilate の IRI における保護効果を示した。炎症性メディエーター (IL-6、MCP-1、CXCL-2 他) およびアポトーシス評価にてこの保護効果をさらに支持する結果を得た。しかし、Edoxaban Tosilate と E-cadherin の相互関係については有意なデータを得られず、Edoxaban Tosilate の IRI 保護効果機序については、凝固カスケード内の制御因子としての可能性を検討していく方針とした。

#### 考察

本研究における Hi-Fru 群と Hi-Fat 群間での IRI 比較は、各群内での食事投与期間は均一とし、同程度の脂肪沈着を認める脂肪肝同士での評価を前提として計画されたが、Hi-Fru 群での脂肪肝生成の安定性を得られず、同モデルは食事投与期間が不均一な脂肪肝で構成されることになり、同モデル全体で脂肪肝レベルの低下とバラツキが見られる傾向があった。そのため、Hi-Fat 群との客観的公平な比較に一部疑問を残すこととなった。しかし、より脂肪沈着が低いにも関わらず Hi-Fru 群で肝障害が高度に認められたことは、フルクトース成因の脂肪肝の IRI 脆弱性を強く示唆するものと考えられた。また E-cadherin の発現は IRI 前後で Hi-Fru 群で低く、IRI 後の E-cadherin 発現の消失の分布は肝細胞アポトーシスの分布と一致しており、E-cadherin 発現が IRI において細胞生存に寄与し、保護的役割を果たしている可能性を示唆した。一方で、この研究内ではアポトーシス出現後に E-cadherin の発現低下が二次的に起こった可能性を検証できていない。今後 E-cadherin の肝 IRI における保護的役割を完全に証明するためには、E-cadherin の発現調整をおこなった実験系での検証が必要と考えられた。

#### 結語

本研究結果は高脂肪食成因脂肪肝にくらべ、フルクトース成因脂肪肝の肝 IRI の脆弱性を強く示唆した。その機序については E-cadherin の肝 IRI 内における保護的役割と食事成因による同分子の発現変動の関与も示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田光貴、栗山直久、伊藤貴洋、堯天一、早崎碧泉、藤井武宏、飯澤祐介、村田泰洋、種村彰洋、岸和田昌之、櫻井洋至、水野修吾
2. 発表標題 FXa inhibitor (Edoxaban tosilate)によるマウス肝虚血再灌流障害の軽減と細胞保護効果
3. 学会等名 第122回 日本外科学会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------