

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670674

研究課題名(和文)炎症消退脂質分子とオートファジー誘導における術後回復力強化について

研究課題名(英文)Enhanced recovery after surgery induced by pro-resolving mediators and autophagy

研究代表者

影山 京子(Kageyama, Kyouko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：80347468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究課題に基づき、炎症消退脂質分子の周術期病態下における炎症消退反応やオートファジーの誘導について、術後回復力(ERAS)に関連するメカニズムを解明することを目的とした。最初のステップとして、C57BL/6マウスをコントロール群と飢餓群に設定し、肝細胞の変化を観察した。生理活性脂質であるレゾルビン投与で、飢餓状態の肝細胞内のオートファジーの進行が抑制される可能性を見出した。また、オートファジーに関連する可能性のあるmicroRNAを肝細胞内のmicroRNAの網羅的発現解析から探求した。結果、候補と考えられていたmicroRNAについて、有意差を得るには至っていない。

研究成果の概要(英文)：Our research aimed to elucidate the contributions of the disappearance of inflammatory responses of pro-resolving mediators and the induction of autophagy on the mechanism of Enhanced Recovery After Surgery (ERAS). Firstly, we divided C57BL/6 mice into control and starvation groups and observed the alterations of hepatic cells. Thereafter, we identified the possibility of suppressing hepatic cell autophagy in a starved state, which was induced by Resolvin. Finally, we examined the microRNAs associated with hepatic cell autophagy in a starved state by conducting comprehensive microRNA analysis with a next generation sequencer. To the present, we have not identified microRNAs showing significant differences correlated with hepatic cell autophagy.

研究分野：術後回復力強化

キーワード：術後回復力強化 microRNA 炎症消退脂質分子 オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

近年、オメガ( )6 多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA) であるアラキドン酸由来の脂質分子リポキシンや、fish oil に含まれる 3-PUFA であるドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 由来のニューロプロテクチン D1 やレゾルビン D 系列、エイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid, EPA) 由来のレゾルビン E1 などの脂質分子が炎症消退に関わることが報告されている。

これらは cyclooxygenase-2 (COX-2) lipooxygenase (LOX) の作用により中間代謝物質を経由して生成され、抗原提示細胞や単球細胞膜上の G タンパク競合受容体を介して抗炎症性に作用することで、抗炎症性サイトカインの分泌やアポトーシスの誘導、貪食能の亢進など、侵襲に対する正常な生理反応として能動的に炎症の消退を誘導させている事が示唆されている。われわれは術前絶飲食による「飢餓状態」および患者の原疾患「癌細胞の存在」に、手術侵襲による「炎症」が加わった特殊な病態下においてこれらの生理活性脂質分子の負荷による炎症消退反応、さらに癌細胞の死滅にかかわるオートファジー誘導について、術後回復力に関わるメカニズムを解明したい。

## 2. 研究の目的

ヨーロッパでは、ヨーロッパ静脈経腸栄養学会を中心に ERAS (Enhanced recovery after surgery) プロトコールが進行しており、エビデンスのある各種の管理方法を集学的に実施することで、術後患者回復力強化を目指している。今回、我々は術前絶飲食による「飢餓状態」および患者状態である「担癌状態」

に、手術侵襲である「炎症」が加わった特殊な周術期病態下において、これらの生理活性物質負荷による炎症消退反応、さらには癌細胞の死滅に関わるオートファジー誘導のメカニズムについて解明し、術後回復力強化に向けた新たな知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

1) 始めに、絶食および自由摂食時における手術侵襲モデルマウスの肝細胞でのオートファジー抑制効果および炎症消退脂質分子の測定を行った。

具体的には、C57BL/6-Apc/J: 大腸癌モデルマウスをトランジェニックマウス (GFP-LC3 マウス) に変換し、自由経口食事摂取量の 1/4 の食事を与えた群 (飢餓群) と自由摂取を行った群の二群に分け、飼育を行った。一週間の肝細胞の変化を観察した。(mTOR activity, mTOR リン酸化比率, Akt/MAPK/AMPK/IPMK リン酸化比率, 等)

2) 1) で用いた自由摂食および飢餓状態のマウスに、生理活性脂質であるレゾルビン投与を行い、各々における肝細胞内のオートファジーを検証した。

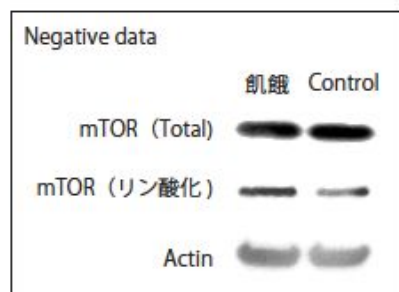
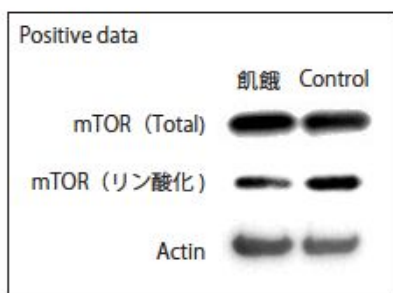
3) 2) の採取した肝細胞から microRNA を抽出し、次世代型シーケンサーによる microRNA の網羅的発現解析を行った。具体的な方法として、得られた肝細胞をホモジナイズし、専用のキットを用いて microRNA を抽出し、バイオアナライザーにて確認した。その後、十分な濃度の検体についてのみ、cDNA 化を行った。その後、次世代高速シーケンサーを用いて microRNA 発現量の解析を行

った。発現定量解析には、CLC バイオ社の解析ソフト( Genomic Work Bench )を使用した。

#### 4 . 研究成果

1)まず、動物モデルの作成が容易ではなく、安定するのに時間を要した。自由経口摂取群と経口群における肝細胞の変化は、次図のように、飢餓群において、リン酸化 mTOR の低下が観察されるものと認められないものが、1/3(positive)および 2/3 程度(Negative)となり、飢餓群でオートファジーが必ずしも抑制されていることが示されなかった。

また、Akt/MAPK/AMPK/IPMK に関しても、同様であった。考察としては、マウスの個々の飢餓状態に対する耐性の違いや、自由経口摂取群における摂食量の違いなどの影響などを排除しきれしていない可能性が考えられた。有意差を得ることは出来なかったため、マウスの個体差を加味しつつ、検体数を増加させながら、2 )も並行して行うことにした。

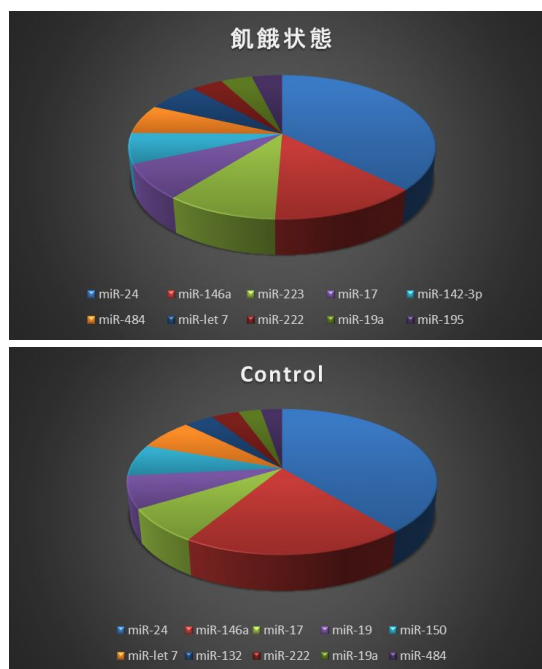


2 ) レゾルピンの投与によるオートファジーの誘導に関しては、肝細胞の培養にやや難渋

した。やはり、1 )にて、有意差を得たマウスが少なかったことが影響し、期待された結果が得られなかった。

3 )

当初、肝細胞より採取する microRNA 濃度が低く、cDNA 作成において、プライマーダイマーを形成し、シーケンスに持ち込めない検体が続いた。その後、抽出条件を検討し、改変を加えたことで、濃度が安定する検体を得られるようになった。現段階で、シーケンスまで至った検体は少ないが、今後、継続していく予定である。次図は、得られた検体における発現量上位 10 の microRNA である。今のところ、特定の microRNA で発現量に有意差を認めるに至っていないが、可能性のある microRNA がいくつか考えられている段階である。



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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

該当なし

名称：-

発明者：-

権利者：-

種類：-

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

該当なし

名称：-

発明者：-

権利者：-

種類：-

番号：-

取得年月日：-

国内外の別：-

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

影山 京子 (Kageyama Kyoko)

京都府立医科大学 医学(系)研究科(研究院) 客員講師

研究者番号：80347468

(2)研究分担者

佐和 貞治 (Sawa Teiji)

京都府立医科大学 医学(系)研究科(研究院) 教授

研究者番号：10206013

中嶋 康文 (Nakajima Yasufumi)

関西医科大学 医学部 教授

研究者番号：70326239

(3)連携研究者

該当なし