

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560056

研究課題名(和文)メタボローム解析を活用した肝癌の代謝物解析と肝癌再発を予防する食生活の解明

研究課題名(英文)Analysis of metabolite and food habit in preventing recurrence for liver cancer by metabolomics

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

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)：メタボローム解析は生体の代謝評価に有益な手段である。肝切除前後の代謝物動態をCE-TOFMSを用いて評価した。術前術後の血清および尿を採取し測定を行った。肝癌切術後3日目に血清分岐鎖アミノ酸(BCAA)は、術前に比し有意な変化はみられなかったが、芳香族アミノ酸は上昇し、Fischer比は低下がみられた。一方、尿中BCAAは著明な上昇がみられ、血清と尿は必ずしも一致しないことが示された。栄養評価を行う際、血清あるいは尿のいずれか一方で評価することが多いが、血清のみではBCAAの変化がみられず筋蛋白の分解を評価できなかったが、尿を同時にみることで筋蛋白質の分解をとらえることができた。

研究成果の概要(英文)：Metabolome analysis can make metabolite and metabolic pathway understand clearly. Perioperative nutritional management is an important for early recovery after surgery. Patients with hepatocellular carcinoma were recruited in this study. Serum and spot urine were collected before and post operative days of hepatectomy. Metabolites in serum and urine were analysed by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS). At POD3, serum BCAA levels did not change and AAA significantly increased, so Fischer ratio significantly decreased after liver resection. Metabolome analyses to assess both serum and urine were useful for evaluation of metabolite accurately.

研究分野：臨床栄養学

キーワード：食生活 肝疾患 メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

肥満は肝臓の強い危険率因子である。近年、肥満による脂肪肝が肝硬変、NASHへと進行し、肝臓を発症する患者が増えている。従来、肝硬変の栄養治療は、分岐鎖アミノ酸(BCAA)が推奨されているが、メタボローム解析により、肥満者はBCAAやその異化副産物のC3、C5カルニチンが高く、BCAAが高いヒトは将来糖尿病になる危険率が高い事が示された。BCAAは筋肉の主要な構成成分で健康に良いイメージがあるが、肥満者が健康のためにBCAAを摂取するのは代謝的に悪影響と推察される。従って、肥満度、肝硬変の進行度、肝疾患の病因によりBCAAの必要性は全く異なる事が明らかになってきた。また、肝臓は生体内で栄養素代謝の重要な拠点であることから、肝切除により栄養代謝障害を引き起こすことが予想される。肝臓患者では、肝切除後、既存の代謝障害に手術侵襲が加わり、さらに肝臓の量的減少という条件が加わる。したがって、術後の管理、特に栄養代謝管理は非常に重要と考えられる。しかし、肝切除後の生体内におけるアミノ酸の代謝機構や調節機構については不明な点が多い。

2. 研究の目的

1 滴の血液から、網羅的に代謝物を測定できるメタボローム解析により、今まで検討する事ができなかった代謝物や代謝経路を明らかにする事ができるようになってきた。一般的に、周術期の栄養評価においては、血清あるいは尿で評価されることが多い。しかし、血清あるいは尿の一方では、正しく生体の代謝変動をとらえられない可能性がある。従って、本研究では、肝臓切除後の代謝物の変動について血清と尿について併せて評価する。

3. 研究の方法

対象は肝細胞癌患者16名(年齢:67±2歳、男性13名/女性3名、BMI:22.2±0.6kg/m²)とした。HBV7名、HCV3名、アルコール性2名、HCV+アルコール性1名、nonBnonC3名であった。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)に採取した。

術前、術後1、3、14日目の早朝空腹時に採血し、白血球数(WBC)、血小板数(PLT)、アスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST)、アラニンアミノ基転移酵素(ALT)、中性脂肪(TG)、血清アルブミン濃度(Alb)、血清インスリン値(インスリン)、血糖値(BS)を測定した。

キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計(CE-TOFMS、Agilent Technologies、Waldbronn、Germany)により、陰イオン性代謝物測定モードと陽イオン性代謝物測定モードで、代謝物の測定を行った。

メタボローム解析

(1)血清サンプルの前処理及び測定

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、CHCl₃500 μL、MilliQ水200 μLを加えて攪拌し、4、4,600 g(7,000rpm)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、9100 g(10,000rpm)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-TOFMS測定条件で測定した。

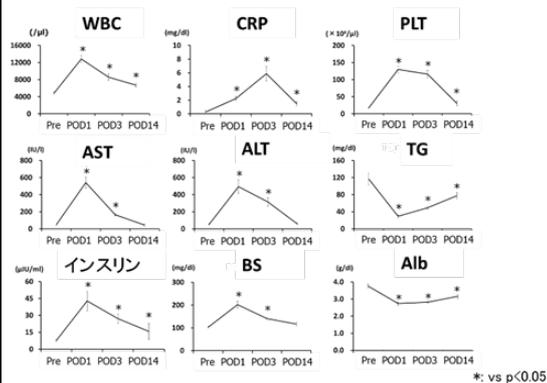
(2)尿サンプルの前処理及び測定

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。

4. 研究成果

(1)血液生化学検査の経時的変化

術前はAST、ALTの軽度上昇、腫瘍マーカーのPIVKA-II、AFPおよび繊維マーカーの型コラーゲン、ヒアルロン酸が高値を示した。術後、WBC、CRP、PLT、AST、ALT、T-Bil、インスリン、BSは術後上昇した。一方、Alb、TGは術後有意に減少した。また、AST、ALTは術後14日に術前値まで戻った。



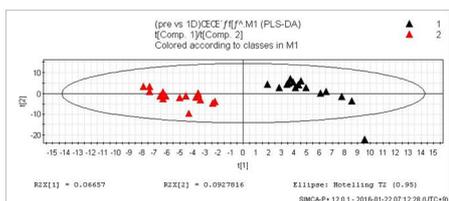
(2)PLS-DA

PLS-DAによって、代謝物が変動するかを検討した。血清では術前と比較し、術後1日目、3日目、14日目において判別可能であり、尿においても術前と比較し、術後3日目において判別可能であった。

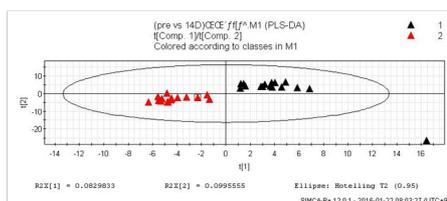
S-Plotにおいて、特に変動の大きな代謝物が検出されたが、その意義づけについては、まだ、明らかにできていない。今後さらなる検討を行う必要がある。

PLS-DA

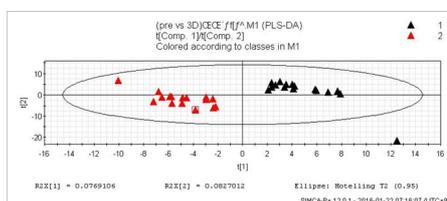
術後1日目(血清)



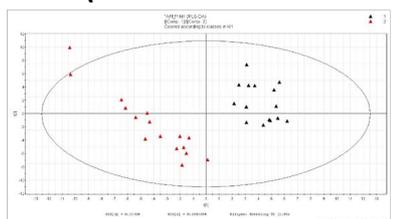
術後3日目(血清)



術後14日目(血清)

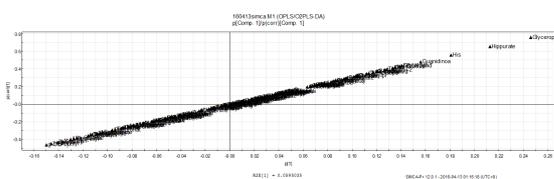


術後3日目(尿)



S-Plot

術後14日目(血清)



(3)分岐鎖アミノ酸 (BCAA) と芳香族アミノ酸 (AAA) の経時的濃度変化

血清バリン (Val) 濃度は、術後に低下がみられた。尿中では、術後3日目において術前に比し有意に増加した。ロイシン (Leu) 濃度は、術後1日目の血中で減少傾向が見られたが、その後、術前値に比べ変化は見られなかった。尿中では、術後3日目で増加傾向がみられた。イソロイシン (Ile) 濃度は、術後1日目の血清で減少傾向がみられたが、その後、術前値に比べ変化は見られなかった。尿中では、術後3日目で増加傾向がみられた。チロシン (Tyr) 濃度は、術後1日目の血中で増加傾向がみられた。尿中では、術後3日

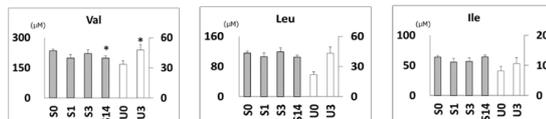
目で有意に増加した。フェニルアラニン (Phe) 濃度は、術後1日目、3日目の血中で有意に増加した。尿中では、術後3日目で有意に増加した。血液中のFischer比は、肝機能を反映することが知られている。これらの結果から、BCAA濃度とAAA濃度よりFischer比を算出したところ、術後1日目に、Fischer比は有意に低下した。術後3日目は、血清BCAAは変化がなく、血清AAAでは高値を示したことから、Fischer比は低下傾向を示した。さらに尿中では、血清BCAA、血清AAA共に上昇がみられ、Fischer比は差がなかった。術後14日目は、Fischer比は有意に低値を示した。

インスリンは血中のアミノ酸を組織へ移動させるため、血中アミノ酸を低下させることが知られている。術後1日目に血清インスリン濃度は上昇するため、血清BCAAが低下する傾向を示すが、血清インスリン濃度が正常である場合よりみかけ上低値を示している可能性がある。術後3日目の血清BCAAでは有意な差がなかったが、尿においては著明に高値を示していることから、体蛋白異化が起こり筋肉から血中へBCAAが分解されて、尿中へ排出されたと考えられる。

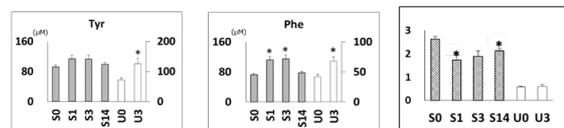
結果には示していないが、肝切除1年後に再発群と非再発群で血清の代謝物の違いを検討したが、術前及び術後2週間までの経過において、代謝物に差は見られなかった。ただし、症例数が少ないため、症例を重ね長期的に検討する必要がある。

通常、代謝物の測定は血液あるいは尿のみであることが多く、正確に代謝物を評価できていないのではないかと考えられた。血液と尿を両方測定することで、より正確に術後の変動を検討できると考えられた。

分岐鎖アミノ酸 (BCAA)



芳香族アミノ酸 (AAA)



* : vs S0 group, p<0.05 (Friedman検定)

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4件)

1) K Sugihara, H Yamanaka-Okumura, E Urano, A Teramoto, T Katayama, Y Morine, S Imura, T Utsunomiya, M Shimada, E Takeda. Recovery of nutritional metabolism after liver transplantation. Nutrition, 2015;31(4):105-110 (査読有)

2)K Sugihara, H Yamanaka-Okumura, A Teramoto, E Urano, T Katayama, H Mori, T Utsunomiya, M Shimada, E Takeda. Recovery pattern of non-protein respiratory quotient and non-esterified fatty acid after liver resection. *Nutrition*, 2014,30(4):443-448 (査読有)

3)A Teramoto, H Yamanaka-Okumura, E Urano, T Nakamura-Kutsuzawa, K Sugihara, T Katayama, H Miyake, S Imura, T Utsunomiya, M Shimada, Eiji Takeda. Comparison of measured and predicted energy expenditure in patients with liver cirrhosis. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2014;23(2):197-204 (査読有)

4)E Urano, H Yamanaka-Okumura, A Teramoto, K Sugihara, Y Morine, S Imura, T Utsunomiya, M Shimada, E Takeda. Pre- and post-operative nutritional assessment and health related quality of life in recipients of living-donor liver transplantation. *Hepatology Res*, 2014;44:1102-1109 (査読有)

〔学会発表〕(計 9 件)

1)(シンポジウム)奥村仙示、和田宵湖、片山貴文、居村暁、島田光生 間接熱量計を用いない就寝前夜食の適応と適正量の評価の検討 第 31 回日本静脈経腸栄養学会 2016 年 2 月 25 - 26 日 福岡国際会議場(福岡県、福岡市)

2)奥村仙示、平山明由、梶浦大資、居村暁、島田光生、曾我朋義 「メタボローム解析による肝切除周術期の生体内代謝物の網羅的な評価」 2016 年 2 月 25 - 26 日 第 31 回日本静脈経腸栄養学会学術集会、福岡国際会議場(福岡県、福岡市)

3)和田宵湖、奥村仙示、竹谷豊、松村晃子「肝癌患者における肝切除前後のエネルギー代謝変化の検討」 2015 年 9 月 24 日-26 日 第 62 回日本栄養改善学会学術総会、福岡国際会議場(福岡県、福岡市)

4)H Yamanaka-Okumura, A Hirayama, S Wada, D Kajiura, M Masuda, E Takeda, Y Taketani, T Soga. Perioperative serum and urine metabolome analysis in patients with hepatocellular carcinoma. 37th European Congress for Nutrition and Metabolism, Lisbon, Portugal, the international Congress Centre of Lisbon (CCL), 2015 September 5-8

5)梶浦大資、奥村仙示、竹谷豊、片山貴文、島田光生、平山明由、富田勝、曾我朋義 「肝癌患者における肝切除前・後の血清及び尿中メタボローム解析」 2015 年 8 月 2 日 第 251 回徳島医学会、徳島大学大塚講堂(徳島県、徳島市)

6)(oral)S Wada, H Yamanaka-Okumura, Y Taketani, T Katayama, A Yusuke, S Imura, M Shimada, E Takeda. Effect of hepatectomy on energy metabolism in patients with

liver cancer and cholangiocarcinoma by the difference of resection volume. 12th Asian Congress of Nutrition (ACN), Pacifico Yokohama(Kanagawa pref., yokohama city) Japan, 2015 May 14-18

7)和田宵湖、奥村仙示、武田英二、竹谷豊、片山貴文、荒川悠佑、居村暁、島田光生 「肝癌患者における肝切除前後のエネルギー代謝変化の検討」 2015 年 4 月 25 日 第 2 回日本栄養改善学会四国支部学術総会、徳島大学大塚講堂(徳島県、徳島市)

8)H Yamanaka-Okumura, K Sugihara, M Yamamoto, Y Taketani, T Ikemoto, Y Morine, S Imura, M Shimada, E Takeda. Recovery of non-protein respiratory quotient and health related quality of life after living-donor liver transplantation. 36th European Congress for Nutrition and Metabolism, Geneva, Switzerland, 2014 September 6-9

9)K Sugihara H Yamanaka-Okumura, A Teramoto, M Yamamoto, Y Taketani, Y Saito, Y Arakawa, M Shimada, Eiji Takeda. The non-protein respiratory quotient as biomarker for the recover from hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma. 36th European Congress for Nutrition and Metabolism, Geneva, Switzerland 2014 September 6-9

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