



Title	肝温阻血再灌流における阻血時間と脂肪化に起因する生化学的変動の探索：新規障害予測マーカー確立のための基礎的研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	柴田, 賢吾
Description	配架番号：2647
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14707号
Issue Date	2021-09-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/83031
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kengo_Shibata_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 柴田 賢吾

学 位 論 文 題 名

肝温阻血再灌流における阻血時間と脂肪化に起因する生化学的変動の探索 ～新規障害予測マーカー確立のための基礎的研究

(Search for the biochemical changes due to varying ischemia time and fatty change in warm ischemia and reperfusion of rat liver - Basic study to identify novel markers for predicting post-reperfusion injury)

【背景と目的】

温阻血再灌流障害は肝臓外科において予後を規定する要因の一つである。肝臓移植ではドナー源拡大のために心停止後ドナー（Donation after Cardiac Death; DCD）や脂肪肝等の非標準的グラフトの利用が模索されている。DCD肝の移植や、血流遮断を伴う肝切除（Pringle法）では温阻血の遷延や脂肪変性が阻血再灌流障害(ILI)を増強し、術後の肝再生不良、肝不全のリスク因子となる。また、肝温阻血中の遊離脂肪酸の変化や、温阻血中の脂質過酸化が再灌流後の不可逆な傷害の原因となり、脂肪肝で増悪する。本邦でも食の欧米化に伴うnonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) 患者の増加に鑑み、臓器移植ドナーや肝切除患者においても脂肪肝の増加が懸念される。それ故、肝臓外科の安全性向上のためには、脂肪肝における温阻血再灌流障害の進展機構の解明が急務である。我々は脂質、脂肪酸を含む低分子化合物が肝温阻血再灌流障害進展の責任分子になるとの仮説のもと、低分子化合物の経時的、空間的変動をイメージング質量分析によって網羅的に探索した。本研究の目的は、1) 正常肝の肝温阻血再灌流で変動する低分子化合物の時間的、空間的な変化を探索し、傷害メカニズムに寄与する因子、傷害予測マーカーを見出すことである。さらに、2) それらの分子変動の脂肪肝温阻血再灌流における推移を探索し、その役割を解明することである。

【材料と方法】

すべての動物実験は「北海道大学動物実験に関する規定」に従い、北海道大学動物実験倫理委員会の承認の下で実施した。ラットを購入、入舎後に標準飼料のみを与えた正常肝ラットと、2日間の絶食後3日間高炭水化物食を給餌した脂肪肝ラットを対象とし、麻酔下で開腹し肝動脈左枝、門脈左枝を脳動脈瘤クリップで遮断して肝臓の70%を温阻血とした。正常肝では阻血開始から15分、30分、90分後に、脂肪肝では30分後にクリップを外して血流を再開した。それぞれ阻血終了時、再灌流後1、6、24時間後の時点で犠牲死させて肝臓と血液を採取した（各n=6）。正常肝、脂肪肝各々において阻血操作を行わずに犠牲死させた動物を基準（Pre）とした。（合計108頭）。肝傷害は血清ALT活性、組織のヘマトキシリンエオジン（H&E）染色により、酸化ストレスは肝過酸化脂質により評価した。正常肝では阻血時間による相異を比較し、脂肪肝と正常肝での相異は阻血時間を統一30分に統一して比較した。また高度の傷害を受ける正常肝の90分阻血と脂肪肝の30分阻血群の再灌流後生存を7日間観察した（合計12匹）。全ての群の肝切片をイメージング質量分析（imaging mass spectrometry: IMS）に供し、マススペクトルデータ（ m/z 200-2000）を取得した。探索にて見つかった候補分子をタンデム質量分析にて分子同定を行った。200 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ 、20 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ の間隔でレーザーを照射し、それぞれ切片の全体と微細領域を観察した。

【結果】

- 1) 肝障害：血清肝逸脱酵素活性（ALT）、肝傷害スコア（HE染色）は阻血時間に伴い上昇した。再灌流後1hまたは6hがピークであった。また、脂肪肝の方が正常肝より上昇した。

2) 酸化ストレス：過酸化脂質量は肝障害と同様の傾向を示した。

3) IMS：阻血終了時にタウリン抱合ジヒドロキシコラン酸 (TDHCA)、リゾフォスファチジルイノシトール (LPI) (18:0) が有意に増加し、ウリジン 2 リン酸塩 N アセチルヘキソサミン (UDP-HEXNAc) が有意に減少した。フォスファチジルイノシトール (PI) (18:0/20:4) は減少傾向であった。TDHCA は胆管内で、LPI (18:0) は zone 1 で増加し、UDP-HEXNAc、PI (18:0/20:4) は zone 1 で減少した。

【考察】

本研究ではラット温阻血再灌流における変動分子を評価した。血中 ALT 活性、Suzuki's Score などは簡便だが再灌流後の評価であり、また、MDA や 4-HNE は抽出による自動酸化や低酸素による生成効率の低下等のアーチファクトが懸念され、何れも阻血再灌流障害の予測マーカーとしては不向きである。これらの諸問題を解決するために我々は IMS を使用し、低分子化合物の量と局在の経時変化を網羅的に示すことに成功した。変動分子中の TDHCA や UDP-HEXNAc は特徴的な量的変化と局在変化を示したが、今後立体異性体の構造決定が必要である。正常肝、脂肪肝共に zone1 で LPI (18:0) が増加し、PI (18:0/20:4) が減少したことから、PI (18:0/20:4) の加水分解によって LPI (18:0) が生成すると考えられた。LPI (18:0) / PI (18:0/20:4) 比は脂肪肝の阻血終了時に有意に高値であり、正常肝の 90 分阻血に近似した。脂肪肝における再灌流傷害の増悪は、阻血中に進行する PI (18:0/20:4) の減少と LPI (18:0) の生成が関与することが推測された。これらの結果から、LPI (18:0) の原料となる PI(18:0/20:4)を加味した LPI (18:0) / PI (18:0/20:4) 比が最も再灌流傷害の強さを反映する値であると考えられた。しかし、LPI(18:0)が阻血時間の遷延に応答して門脈域で増加して傷害の増悪要因となるのか、あるいは、傷害からの回復に寄与するストレス応答の一種なのかは現時点では不明である。今後、温阻血中の zone1 における LPI、PI の制御機構を解明することで、再灌流障害の予測マーカーとしての有用性や新規治療標的の発見に寄与することが期待される。

【結論】

阻血中に増加する LPI (18:0)、zone1 から始まる PI (18:0/20:4) から LPI (18:0) への変化が肝温阻血再灌流障害の予測マーカーとなることが示唆された。また、これらの変化が脂肪肝における阻血再灌流傷害増悪に関与することが示唆された。