



HOKKAIDO UNIVERSITY

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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 柴田 賢吾

	主査	教授	坂本 直哉
審査担当者	副査	教授	平野 聡
	副査	教授	小林 弘一

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)

申請者は部分肝温阻血再灌流モデルで変動する分子をイメージング質量分析装置を用いて解析し、LPI(18:0)、PI(18:0/20:4)、taurine conjugates of dihydroxycholeanoic acid (TDHCA)、Uridine diphospho-N-acetylhexosamine (UDP-HEXNAc)が阻血再灌流に伴う特異的な変動と局在を示すことを見出した。特に LPI は主な生成源である PI の変化と共に追跡することで障害の予測マーカーになる可能性を示唆した。そこで zone1 で阻血中に時間依存的に上昇する LPI がどのように阻血再灌流障害に関与するかを検証した。申請者は LPI が肝細胞株では障害を軽減し、星細胞株では障害を増強することを見出した。これらの結果は、LPI 生成に関わる経路が肝温阻血再灌流における新規の治療標的になる可能性を示唆している。

審査にあたり、まず副査の平野教授から阻血再灌流障害の機序としてわかっていること、わかっていないこと、脂質の酸化、過酸化がどの程度再灌流障害に関与しているかについて質問があった。申請者は、本研究で示したように温阻血によって脂質過酸化の連鎖反応が進行し、細胞を構成するリン脂質の機能異常や細胞死経路が進行し、また、過酸化脂質との共有結合により生じる変性タンパク質の機能低下を介して細胞障害が進行することが知られている。しかし、これらの障害性反応における脂質、脂肪酸の特異性はない。また当教室では抗酸化剤によって障害が軽減することを報告しており、障害の程度が異なるモデルを用いて、脂質、脂肪酸の種類と変化を調べることで阻血再灌流障害の機序解明に繋がるはずである旨を回答した。また、今回発見された分子の局在や変化がどれほど関与しているかを質問された。申請者は、本研究では LPI などの幾つかの脂質の変化や局在を見出したが、LPI は肝細胞には保護性に、星細胞には障害性に作用する可能性が示唆され、LPI がその後の障害進展の原因となるか否かまでは解明していない。さらに精査が必要だが、他臓器での知見と同様に LPI が肝障害を増強することが明らかになれば、門脈域をターゲットとした治療法により肝臓を保護できると考えている旨を回答した。最後になぜ阻血中に着目したかを問われた。申請者は、阻血中に変動するものでグラフトを評価できれば、移植の適否の判断材料になる旨を回答した。阻血前にどうなるかというマーカーも大切であるというご意見いただき今後の研究課題として参考にさせていただくことを明示した。

次に副査の小林教授から HMGB-1 は温阻血再灌流障害で増加するののかとの質問があった。核内から細胞外への放出が増加し、炎症と細胞死のカスケードを増強することが知られている旨を回答した。次に、脂肪肝モデルに関して 3 日間で作成したモデルで良いのかと質問があった。申請者は、今回の脂肪肝モデルは急造モデルであり、コリンメチオニン欠乏食を 4 週間給餌する等

の別のモデルでも同様の検討が必要である。また、遺伝子欠損マウスを使用することで観察自称の普遍性が増す旨を回答した。さらに本研究の結果では、予後を予測するバイオマーカーとまでは言えないこと、阻血時間変化と脂肪肝の程度が予後とどう繋がるか、また、その時のバイオマーカーがどうなるか、詳細な相関解析が重要であることを指摘された。さらに、LPI、PI の増減が原因なのか結果なのか判明しておらず、細胞株で LDH の増減の不一致があるため、今回の研究では LPI の役割の解明には至らず、初代培養肝細胞や臓器レベルでの検討が必要であることをご指摘、ご提案いただいた。

最後に主査の坂本教授から、イメージング質量分析、ホモジネートする評価法の違いを問われた。今回過酸化脂質は市販キットを用いてホモジネート中の量を測定した。また、本研究ではデータを提示していないが、ホモジネートから脂質を抽出して LCMS 測定も経験した。これらの測定は確立された手法であり、精密分析が可能な方法である。しかし、組織の秤量値は含水量、血栓量の影響を受け、さらに、Bligh & Dyer 法のような脂質抽出、その後の濃縮、乾固、再溶解等の多くの手技で誤差を生じるポイントがある。一方でイメージング質量分析では、標本の薄切し、マトリックスを均一に噴霧するポイント以外にほとんど誤差を生じ得る手技が無いことがメリットである。デメリットとしては絶対定量ができないため、他の評価方法との整合性や相関の確認が必要である旨を回答した。また、障害の評価には ALT を用いているが、それだけで障害と言って良いかと問われた。障害は Suzuki's score でも評価しており、過酸化脂質量、GSH レドックスのデータなどと主に評価している。これらの障害マーカーと今回発見した 4 分子との関連についてはさらに精査が必要である旨を回答した。

この論文は、温阻血再灌流障害で起こる低分子化合物 (LPI(18:0)、PI(18:0/20:4)、TDHCA、UDP-HEXNAc) の経時変化と局在変化を証明した点、zone1 で阻血中に時間依存的に上昇する LPI が温阻血再灌流障害に関与している可能性を示した点において高く評価され、今後の障害抑制の臨床応用が期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。