



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14707
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/83032
Type	doctoral thesis
File Information	Kengo_Shibata.pdf



学 位 論 文

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)

2021 年 9 月

北海道大学

柴田 賢吾

Kengo Shibata

学 位 論 文

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)

2021 年 9 月

北海道大学

柴田 賢吾

Kengo Shibata

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語表	6 頁
緒言	7 頁
方法	11 頁
結果	17 頁
考察	33 頁
結論	38 頁
謝辞	40 頁
利益相反	41 頁
引用文献	42 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Shibata K, Hayasaka T, Hashimoto S, Umemoto K, Ishikawa T, Sakamoto S, Kato K, Shimada S, Kawamura N, Wakayama K, Kobayashi N, Hama Y, Fukai M, Shimamura T, Taketomi A.

Imaging Mass Spectrometry Reveals the Changes in the Taurine Conjugates of Dihydroxycholeanoic Acid During Hepatic Warm Ischemia and Reperfusion in a Rat Model *Transplant Proc.* 2020;6:1880-1883.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1) 柴田賢吾、橋本咲月、早坂孝宏、深井原、加藤紘一、中薮拓哉、島田慎吾、小林希、梅本浩平、鈴木崇史、大谷晋太郎、三野和宏、嶋村剛、木村太一、武富紹信
肝温阻血再灌流障害におけるリゾリン脂質の役割に関する基礎的研究 -イメージング質量分析による解析

2019年4月19日 第119回日本外科学会定期学術集会

2) Kengo Shibata, Takahiro Hayasaka, Moto Fukai, Koichi Kato, Takahisa Ishikawa, Kohei Umemoto, Shingo Shimada, Nozomi Kobayashi, Tsuyoshi Shimamura, Taichi Kimura, Akinobu Taketomi
Elucidation of the Mechanisms of Hepatic Warm Ischemia and Reperfusion Injury in Rats (Exploration of predictive markers of IRI by imaging mass spectrometry)

19th Congress of the European Society for Organ Transplantation 15 – 18 September 2019

3) Kengo Shibata, Takahiro Hayasaka, Moto Fukai, Koichi Kato, Takahisa Ishikawa, Kohei Umemoto, Shingo Shimada, Nozomi Kobayashi, Tsuyoshi Shimamura, Taichi Kimura, Akinobu Taketomi

Elucidation of the Mechanisms of Hepatic Warm Ischemia and Reperfusion Injury in Rats (Exploration of predictive markers of IRI by imaging mass spectrometry)

16th CAST 2019, 30th, Sep, 2019 India Exposition Mart Limited (IEMML) Greater Noida (Delhi)

4) 柴田賢吾、橋本咲月、早坂孝宏、深井原、加藤紘一、中薮拓哉、島田慎吾、小林希、梅本浩平、鈴木崇史、大谷晋太郎、三野和宏、嶋村剛、木村太一、武富紹信
温阻血再灌流障害における肝内脂質局在変化の視覚化～リン脂質分布と機能の基礎的
解明と治療標的としての可能性～

2020年8月15日 第120回日本外科学会定期学術集会

要 旨

【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 (IRI) 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障害の原因となり、脂肪肝ではさらに障害は増悪する。本邦でも食の欧米化に伴う nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) 患者の増加に伴い、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、肝臓外科手術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、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、障害の進展に寄与する因子、障害予測マーカーを見出すことである。さらに、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。ラットを購入し、入舎後に標準飼料を与えた正常肝ラットと、2日間の絶食後に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た。麻酔下で肝動脈左枝、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。正常肝は阻血開始から15分、30分、90分後に、脂肪肝は30分後に血流を再開した。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)。阻血前の状態と比較するために、正常肝、脂肪肝各々において阻血操作を行わずに試料を採取し、各測定における基準とした (Pre, PreF, 合計 108 頭)。肝障害は血清 ALT 活性、組織のヘマトキシリンエオジン (H&E) 染色による Suzuki's Score、酸化ストレスは肝過酸化脂質 (LPO) 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た。脂肪肝では阻血時間を30分とし、正常肝の30分阻血群との相違を比較した。また高度の障害を受ける正常肝の90分阻血群と脂肪肝の30分阻血群の再灌流後生存を7日間観察した (合計 12

頭)。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。探索にて検出された候補分子をタンデム質量分析にて分子同定した。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。

Wistar ラット由来の肝細胞株 RL34、肝星細胞株 RI-T を用いて肝温阻血再灌流を模倣した *in vitro* 低酸素・再酸素化実験を行った。8 時間の低酸素曝露の後に通常培養に戻し再酸素化した。ダイズ由来 L- α -リソホスファチジルイノシトール ナトリウム塩 (32 μM) を添加し、低酸素終了時の上清 LDH 活性と再酸素化後の細胞質 Ca^{2+} 濃度を測定した。

【結果】

- 1) 肝障害：血清肝逸脱酵素活性 (ALT)、Suzuki's Score (HE 染色) は阻血時間に伴い上昇した。再灌流 1 時間後または 6 時間後がピークであった。また、脂肪肝の方が正常肝より高値であった。
- 2) 酸化ストレス：過酸化脂質量は阻血終了時に阻血時間に伴い上昇傾向を認め、脂肪肝では正常肝より上昇した。
- 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)、リゾホ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。ホ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。
- 4) 細胞実験：LPI 添加によって、肝細胞株では低酸素終了時の上清 LDH は減少し、星細胞株では上昇した。細胞内カルシウムイオン濃度は、肝細胞株では細胞外液にカルシウムイオンが存在する場合にのみ LPI 添加で濃度が上昇し、細胞外液にカルシウムイオンが存在する場合もしない場合でも LPI 添加により細胞質イオン濃度が増加した。

【考察】

本研究ではラット肝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に変動する。また、LPO 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、低分子化合物を網羅的に解析し、その量と局在の経時変化を示した。変動分子の 1 つである TDHCA や UDP-HEXNAc は特徴的な量的変化と局在変化を示したが、完全な分子同定のためには立体異性体を区別する必要がある。興味深

いことに、正常肝、脂肪肝共に zone1 で PI (18:0/20:4) のアラキドン酸 (20:4) 側鎖が加水分解により切り取られた LPI (18:0) が増加することが見出された。阻血終了時の LPI (18:0) / PI (18:0/20:4) 比はもとより、同値の阻血前からの増加率においても、脂肪肝では正常肝よりも有意に高値であった。脂肪肝の 30 分阻血は正常肝の 90 分阻血に近似した。阻血中に進行する PI (18:0/20:4) の減少と LPI (18:0) の生成が、再灌流後の障害進展に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) 比が最も再灌流障害の程度を反映すると考えられた。しかし、LPI(18:0) が阻血時間の遷延に伴って門脈域で増加して障害の増悪要因となるのか、あるいは、障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。今回の細胞実験では LPI が肝細胞、星細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させることを見出したが、肝細胞や肝臓全体に対する LPI の作用は未解明である。今後、温阻血中の zone1 における LPI、PI の制御機構を精査することで新規治療標的の発見に寄与することが期待される。

【結論】

脂肪変性の有無によらず肝温阻血中に増加する 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候補となり、また、これらの変化が脂肪肝における阻血再灌流障害増悪に関与することが示唆された。

略 語 表

本文中および図表に記載した略語は以下の通りである。

4-HNE	4-hydroxy-2-nonenal
ALT	alanine aminotransferase
ATP	Adenosine tri-phosphate
cPLA	cytosolic phospholipase A
DCD	donation after cardiac death
FA	fatty acid
GPR55	G-protein coupled receptor 55
EWI	end of warm ischemia
HCD	high-carbohydrate diet
HE	hematoxylin-eosin
IMS	imaging mass spectrometry
IRI	ischemia reperfusion injury
LPI	Lysophosphatidylinositol
LPIAT1	lysophosphatidylinositol-Acyltransferase-1
LPO	lipid peroxidation
MDA	Malondialdehyde
MS	mass spectrometry
NAFLD	nonalcoholic fatty liver disease
NMR	nuclear magnetic resonance
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PI	Phosphatidylinositol
O.C.T.	optimal cutting temperature
TBARS	2-thiobarbituric acid reactive substances
TDHCA	taurine conjugates of dihydroxycholeanoic acid
TIC	total ion current
UDP	uridine diphosphate

緒 言

肝温阻血再灌流障害は肝移植や肝切除術などの肝臓外科手術の予後を規定する要因の一つである (Lentsch et al., 2000)。肝移植領域ではドナー源拡大のために心停止後ドナー (Donation after Cardiac Death: DCD) や脂肪肝などの非標準的グラフト (Expanded Criteria donor: ECD) の利用が徐々に増加している (Monbaliu et al., 2012; Orman et al., 2013)。DCDグラフトを用いた肝移植では、心停止による温阻血 (低酸素)、その後の冷阻血 (低温、低酸素)、再灌流 (復温、再酸素化) の3段階で障害が進行する (Casavilla et al., 1995)。通常の脳死ドナー (Standard Criteria Donor) と比較して、DCDでは温阻血再灌流障害が不可避であり、グラフト生存率は低下する。DCDは来院時心停止 (I)、蘇生不成功 (II)、予測される心停止 (III)、脳死後の心停止 (IV)、ICU患者で予測されていなかった心停止 (V) の5つに分類される (Modified Maastricht category)。心肺蘇生の開始までの時間、心肺蘇生中 (低灌流)、蘇生中止後の無治療観察 (No-touch time) の合計が総温阻血時間であり、概ね温阻血時間に依存して分類される (Thuong et al., 2016)。中でも uncontrolled DCDグラフト (Modified Maastricht category I, II, V) は温阻血による障害が強く現在は安全に利用できないため、これらの肝グラフトの移植適応拡大が目標とされる (Gottin and Taiana, 2020)。

肝切除術において、一時的に肝血流を遮断し出血量を減少させる Pringle法 (Pringle, 1908) は標準的な手術手技だが、残肝の温阻血再灌流障害が術後肝不全などの合併症のリスクになる。近年、Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) 患者の増加に伴い、脂肪肝を母地とする肝細胞癌の切除件数が増加している。ラットの非脂肪肝では30分、45分、60分の温阻血による再灌流後の1週生存率が100%、90%、70%であり、脂肪肝になると75%、20%、0%と低下する。脂肪肝では非脂肪肝よりも温阻血による易傷害性が増強するため (Hui et al., 1994)、脂肪肝切除の安全性向上が求められている。

温阻血時間の遷延や脂肪変性は温阻血再灌流障害 (IRI) を増強し、術後の肝再生不良、肝不全のリスク因子となるため、その進展を担う分子機構の解明とその治療法の開発が肝臓外科における急務である。これまでに報告されたIRIの機序に実質細胞 (肝細胞) と非実質細胞の両者が関わる障害機転が知られている。クッパー細胞は活性酸素種の産生・放出 (酸化ストレス)、NF kappa B の活性化と引き続くTNF α 等の炎症性サイトカイン、ケモカインの産生、プロテアーゼの活性化等によって肝細胞を直接的に傷害する。また、クッパー細胞から放出されるこれらの分子が類洞内皮細胞の接着分子発現を増強し、好中球の走化、接着、浸潤、炎症増強を介して、肝細胞

死を引き起こす(Jaeschke and Woolbright, 2012)。また、酸化ストレスは脂質、タンパク質、核酸の酸化変性によって細胞の傷害 (Injury) と障害 (Dysfunction) を引き起こす(Kehrer, 1993)。また、脂肪肝では細胞内に脂質や遊離脂肪酸が蓄積することで炎症プロセスが進行して活性酸素種の放出を促す。その結果ミトコンドリア機能が低下し、さらに酸化ストレスを増強する悪循環を形成し、結果として細胞死を招く(Evans et al., 2008)。他にも、阻血再灌流ストレスの後にアデノシン三リン酸(ATP)合成能が低下し、炎症性因子に対する感受性が高まることも障害の増強に関連している(Sutter et al., 2014)。脂肪肝の形成は中性脂肪の過剰摂取、脂肪組織の沈着と脂肪細胞の肥大化等の肝外の要因と、肝細胞の小胞体を起点として進行する脂肪滴 (lipid droplet) の融合、増大に大別される。肝臓の脂肪化が進行すると、アポトーシスや炎症経路の活性化により、肝星細胞が筋線維芽細胞に分化して線維化を進行させる(Mollica et al., 2011)。さらにアポトーシスにはATPが必要であるため、脂肪肝によってATP産生能が低下していると阻血中に迅速にATPが枯渇する。その結果、細胞死経路がある程度制御されたアポトーシスではなく、無秩序に進行するネクローシスに切り替わり障害が増悪する(Jaeschke and Lemasters, 2003)。正常肝では、アポトーシスが細胞死の主な経路である(18%)。一方、脂肪肝は中程度のアポトーシスと大量のネクローシス(73%)を特徴とするため、肝障害がより増悪する。

これまで当研究室では、阻血再灌流障害による細胞障害を軽減することに目を向けて研究を重ねてきた。抗酸化剤 (Tahara et al., 2005; Yokota et al., 2000) や ROCK阻害剤 (Takeda et al., 2003) 等の治療が障害を軽減することや、再灌流時の水素や硫化水素投与が障害を軽減することを報告した (Ishikawa et al., 2018; Shimada et al., 2015)。治療法の発見とともに障害の進展とその抑制の機序、随伴する分子の変動の重要性を認識するに至った。当教室ではこれらの分子変動が新たな治療標的の発見や予後予測につながるとの仮説の下、温阻血時間依存的な温阻血中の脂質過酸化の進展が再灌流後の不可逆な障害の原因となる (Fukai et al., 2005) ことを発見した。しかし、脂質の分子構造を特定するには至らず、未解明な点が残されている。また、その温阻血再灌流障害を事前に予測するマーカー、評価方法は現状臨床応用されているものはない。

イメージング質量分析 (imaging mass spectrometry; IMS) は凍結切片をレーザー照射し、イオン化した分子のマスペクトルを取得する方法である。質量分析の原理は、サンプルをイオン化し、イオンを種々の方法で分類、同定し解析をすることで、質的・量的に解析できる。IMSのイオン化にはマトリックスレーザー支援型レーザー脱離イオン化(matrix assisted laser desorption/ionization; MALDI法) と呼ばれる方法がある。サンプルにマトリックスを塗布し、領域ごとにレーザー光を当てること

で、急速に加熱されたマトリックスが、サンプルとともに気化しイオン化する。その領域ごとのMSスペクトルを繰り返すことで切片全体のMS情報を得る(図1)。異なる質量電荷比 (m/z) として検出された分子イオンをピークごとに解析する。そのシグナル強度を各ピクセルに疑似色として表示し、物質の分布と量を可視化する(Hayasaka et al., 2008)。IMSは脂質抽出操作を要さず、薄切した切片をそのままの形で測定できるため、これまで他の装置では検出できなかった局所の分布と変化を評価でき、タンデムMSによって物質を同定できることが利点である(Miyamura et al., 2011; Morita et al., 2013)。IMSを用いた最近の研究では、ラット脳の阻血再灌流時の脂質分布の解析(Wang et al., 2012)、ヒト心臓弁の先天性の弁膜疾患と脂質調節の関連を述べた病態解析(Angel et al., 2016)や、薬物動態の解析と治療効果の評価(Giordano et al., 2016)など、多岐にわたる分野へ応用されており、肝温阻血再灌流障害の機序解明にも有用であると考えられる。

脂質、脂肪酸などの低分子化合物の詳細な解析により、肝温阻血再灌流障害進展の責任分子、予後予測マーカーの候補物質が同定され、新規の治療標的分子の発見に寄与するとの仮説をたて、正常肝および脂肪肝の温阻血再灌流における作用を解明することを目的とし、イメージング質量分析を用いて肝組織内の低分子化合物の経時的、空間的変動を探索した。

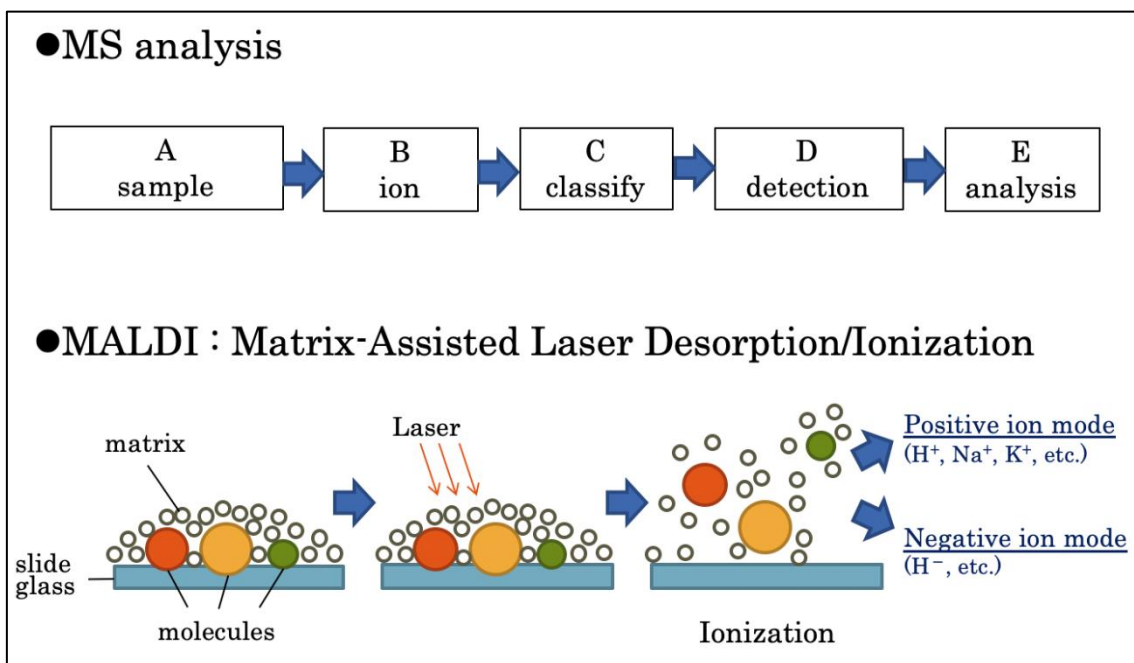


図1 質量分析装置の原理

質量分析は、イオン化、分類、同定、解析の順に行い、サンプルを質的・量的に解析する。マトリックスレーザー支援型レーザー脱離イオン化(matrix assisted laser

desorption/ionization; MALDI 法) はマトリックスをサンプルに塗布し、レーザー光で急速に加熱され、サンプルと共に気化しイオン化する。

方 法

薬品と試薬

入手先を記載していない試薬は富士フィルム和光純薬株式会社（大阪、日本）より購入した。

動物

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 (No.17-0032)。9 週齢の雄 Wistar ラット (日本エスエルシー株式会社、静岡、日本) を購入し、入舎後 1 週間、水、標準的な小動物用飼料 MF (オリエンタル酵母工業株式会社、東京) を自由摂取させ定常環境 (23 ± 2 °C、湿度 50 ± 10 %、明期 12 時間/暗期 12 時間) で飼育後に実験に供した。

脂肪肝モデルと実験デザイン

入舎後 3 日間は標準飼料を与え、2 日間の絶食後、3 日間高炭水化物食 (HCD; high-carbohydrate diet) を給餌した (Delzenne et al., 1997)。HCD 用の飼料 (Research Diets Inc., New Brunswick, USA) の組成は、総カロリーの 85% は糖質 (Sucrose 50%、Corn Starch 50%)、15% はタンパク質であり、脂質は含有しない。脂肪肝の評価は NAS scoring を使用した。S (脂肪沈着) 0 : < 5%, 1 : 5-33%, 2 : 33-66%, 3 : > 66% I (小葉内炎症) 0 : なし, 1 : < 2 カ所, 2 : 2-4 カ所 3 : > 4 カ所 B (風船様変性) 0 : なし, 1 : 少数, 2 : 多数の合計 8 点で評価した (Kleiner et al., 2005)。鏡検は病理専門医が盲検した。

肝温阻血再灌流モデル

イソフルランで麻酔導入し、術中は空気 (2-2.5 ml/分)、イソフルラン (1-2.5%) の吸入により麻酔を維持した。常法の如く門脈左枝、動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。閉腹して全身麻酔のまま保温に努め、正常肝は阻血開始から 15 分、30 分、90 分後に、脂肪肝は 30 分後にクリップを外して血流を再開した。阻血終了時、再灌流後 1 時間、6 時間、24 時間後に犠牲死させ (各群 6 匹)、血液と肝臓を採取した (図 2)。

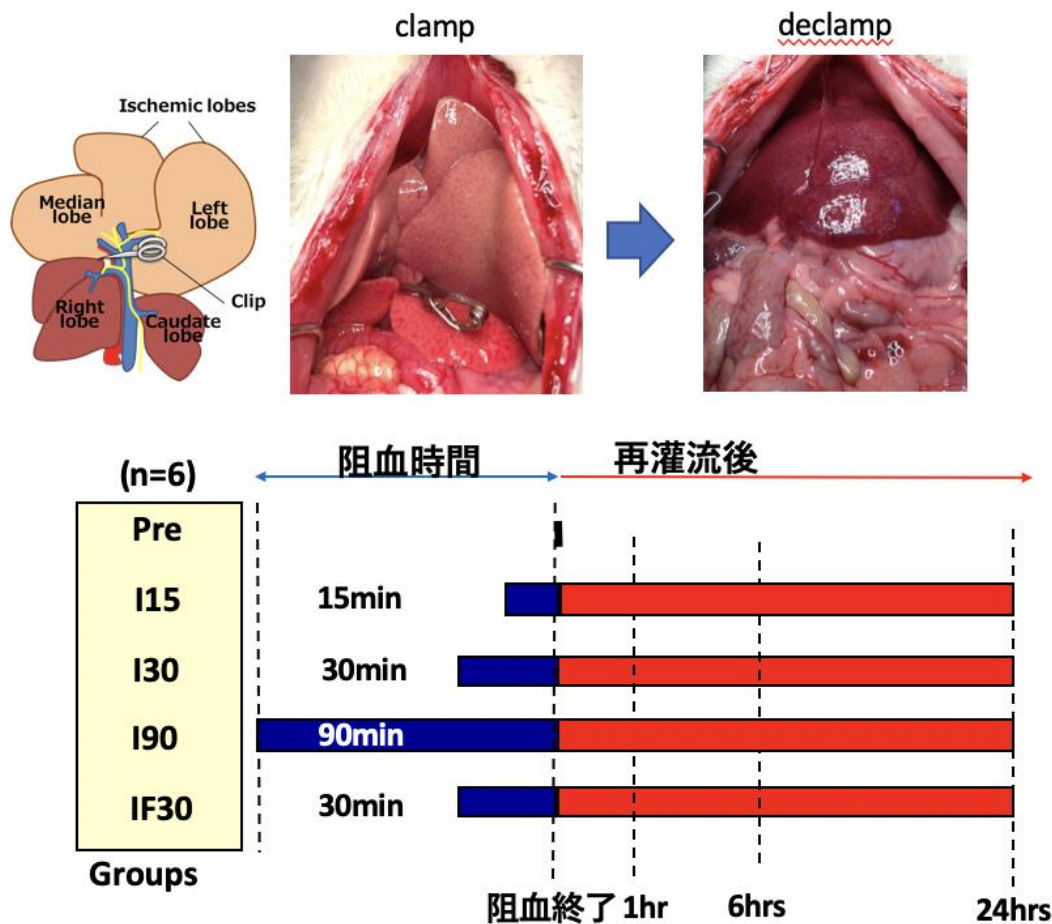


図2 温阻血再灌流モデル (70% 阻血モデル)

左葉と中間葉の血流を遮断し阻血後再灌流させた。正常肝では温阻血を15分、30分、90分、脂肪肝は30分行い再灌流させ、阻血終了時、1、6、24時間後にそれぞれサンプルを抽出した。Group: Pre (開腹直後)、I15 (15分阻血群)、I30 (30分阻血群)、I90 (90分阻血群)、IF30 (脂肪肝30分阻血群)、min: minutes, hr: hour

実験群

ラットを無作為に分け、採取時点により以下の亜群 (全18群) に分けた (計108匹)。

- 1) 正常肝で阻血に晒されていない開腹直後の群 (Pre)。
- 2) 正常肝で15、30、90分の温阻血終了時。
(End of warm ischemia; EWI15, EWI30, EWI90)。
- 3) 正常肝で温阻血15分後に再灌流した1、6、24時間後の群。
(Ischemia/Reperfusion; I15/R1h, I15/R6h, I15/R24h)。
温阻血30分後に再灌流した1、6、24時間後の群。
(I30/R1h, I30/R6h, I30/R24h)。

温阻血 90 分後に再灌流した 1、6、24 時間後の群。

(I90/R1h, I90/R6h, I90/R24h)。

4) 脂肪肝で阻血に晒されていない開腹直後の群 (PreF)。

5) 脂肪肝温阻血 30 分終了時の群 (EWIF30)。

6) 脂肪肝温阻血 30 分再灌流後 1、6、24 時間の群

(IF30/R1h, IF30/R6h, IF30/R24h)。

別途、正常肝で温阻血 90 分後に再灌流させた群と脂肪肝で温阻血 30 分後に再灌流させた群は 7 日間の生存を確認した (各 n=6)。

サンプル採取

犠牲死時に下大静脈より採血後、直ちに肝臓を摘出した。ホルマリン固定用サンプルは常温で 24 時間固定後パラフィン包埋した。凍結切片用の組織は O.C.T.コンパウンドに包埋し、IMS 用サンプルはそのまま -80°C で凍結保管した。

Alanine aminotransferase (ALT) 活性の測定

血清 ALT 活性は自動分析装置 (AU5400、ベックマンコールター社) によって血清中の ALT を測定した。

病理組織学的評価 : Hematoxylin-eosin (HE) 染色

OCT 包埋凍結組織から凍結切片 (厚さ 10 μm) を作成し、10% 緩衝ホルマリンで固定後、マイヤーヘマトキシリン溶液 (サクラファインテックジャパン株式会社、東京)、エオジン溶液 (同社) により常法の如く染色した。HE 染色標本は障害の評価として Suzuki's Score を使用し、うっ血 (0-4 点)、空胞化 (0-4 点)、壊死 (0-4 点) で評価し、スコアの合計を比較した (Suzuki et al., 1993)。鏡検は病理専門医が盲検した。

過酸化脂質の測定

肝組織の Malondialdehyde (MDA) + 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) を Lipid peroxidation (LPO) 586 kit (Oxis International, Foster City, CA) を用いて、取扱説明書に従って測定した。凍結肝組織を butylated hydroxytoluene (0.05%) 含有 Tris-HCl (20 mM) でホモジナイズし、遠心分離した (3000xg、10 分、4°C)。上清を試薬とインキュベートし、再度遠心して上清の吸光度 (586 nm) を測定した。4-HNE 標準品を用いて検量線を作製し、測定結果はタンパク質量あたりの 4-HNE 換算量 (nmol 4-HNE equivalent per mg of protein) で表した。タンパク質濃度は

Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Altham, MA, USA) を用いて BCA 法で測定した。

イメージング質量分析 (IMS) による評価

(1) イメージング質量分析。

凍結切片を $10\ \mu\text{m}$ に薄切し Indium Tin Oxide (ITO) コートスライドガラス (松波硝子工業、大阪) に貼付し、マトリックス (9-aminoacridine: ACROS, New Jersey, USA, $5\ \text{mg/mL}$, $70\ \%$ EtOH) を噴霧した。質量分析装置 solariX XR system (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) を使用し、 $200\ \mu\text{m}/\text{pixel}$ と $20\ \mu\text{m}/\text{pixel}$ の間隔で組織にレーザーを照射。ネガティブイオンモードで m/z 200-2000 のマススペクトルデータを取得した。マトリックス塗布の条件は TM-Sprayer M3 (HTX Technologies, Chapel Hill, NC) を用い、18 passes、flow rate : $0.1\ \text{mL}/\text{min}$ 、 75°C 、track spacing: $2\ \text{mm}$ 、pressure: $10\ \text{psi}$ 、gas flow: $2\ \text{L}/\text{min}$ 、velocity: $1200\ \text{mm}/\text{min}$ で塗布した。

1 枚のスライドガラス上には正常肝の比較では測定対象の正常肝各群 13 サンプルと内部標準の計 14 サンプルを配置し同時に測定した。正常肝、脂肪肝の比較では各々の 30 分阻血群と内部標準の計 11 サンプルを同時に測定した。内部標準として 1 つの肝臓に由来する正常の reference 検体を全てのスライドに配置し、同一スライド内で測定した。

得られたデータは total ion current (TIC) で標準化することにより試料間のイオン化効率による変動を補正し、内部標準試料の値に対する比で表すことにより測定スライドごとの補正を行なった。また、特定の分子シグナルで手術いた。補正されたシグナルを reference 検体に対する比で全てのデータを表した。得られたマススペクトルには m/z をシグナル強度が高い順に検索した (Shibata et al., 2020)。

(2) データ処理

MALDI 法によりイオン化された分子が測定され、設定した間隔で測定し、各測定点のスペクトルを得た。得られたスペクトルを専用ソフトウェア flexImaging® (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) を用いて、シグナル強度の強弱によって色彩を描画した。各スペクトルについて同様に処理、描画、比較した。 $200\ \mu\text{m}$ ピッチの測定で得られた結果から全体の傾向を掴み (経時変化)、 $20\ \mu\text{m}$ ピッチの高解像度測定で得られた結果から局在を解析した (局在変化)。SCiLS lab 2016a (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) を使用して補正した分子の $m/z \pm 0.05\ \text{Da}$ (tolerance : exact mass $m/z \pm 0.05\ \text{Da}$) の数値を抽出しそれぞれの分子のシグナル強度の数値とした。

(3) 分子同定

IMS 測定と同様にマトリックスを塗布後、レーザー照射を二回行うタンデム質量分析を行い、対象分子の断片化パターンから分子を同定した (MS/MS)。

細胞培養

Wistar ラット由来の肝細胞株 RL34、肝星細胞株 RI-T は Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (JCRB) より購入した。Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma-Aldrich) に 10% (v/v) の非働化ウシ胎児血清 (Sigma Chemical Co, MO, USA)、ペニシリン (100 U/mL)、ストレプトマイシン (100 µg/mL) を添加した培地を用い、CO₂ インキュベーターにて 37 °C、5% CO₂ / 95% 大気下で培養した。

低酸素・再酸素化モデル

肝温阻血再灌流を模倣した *in vitro* 低酸素・再酸素化モデルを作成した。96 well plate に各細胞を 2x10⁴ (cells/well: n=7-15) を播種し、24 時間の前培養の後に実験に供した。低酸素チャンバー (Billups-Rothenberg, Del Mar, CA) 内に plate を静置し、混合ガス (5% CO₂ / 95% N₂) を 6 L/分、15 分間通気後にドレーンをクランプした。この方法により 10 分間の通気後のチャンバー内酸素濃度は 1.3% になる (Ozaki et al. 2003 Cell Death Differ. 10(5):508-15.)。8 時間の低酸素曝露の後に通常培養に戻すことで再酸素化した。

低酸素ストレスに対する LPI の影響

低酸素曝露時の培地中にはダイズ由来 L- α -リソホスファチジルイノシトール ナトリウム塩 (32µM) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) もしくは DMSO を添加し、LPI の影響を低酸素終了時の上清 LDH 活性と再酸素化後の細胞質 Ca²⁺ 濃度によりスクリーニングした。LDH 活性は Takara Cytotoxicity Detection Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いてマニュアルに準じて測定した。

細胞質 Ca²⁺ 濃度の測定

再酸素化後の細胞質 Ca²⁺濃度を Fura2-AM (Dojindo Lab. Kumamoto, Japan) を用いて添付マニュアルに準じて測定した。低酸素曝露前に培地を Fura2-AM を含む loading buffer に替え、30 分通常培養し、細胞外の色素を洗浄、除去後に通常培地に戻して低酸素に曝露した。低酸素終了時に培地を recording buffer (HEPES base) に替えて細胞質 Ca²⁺濃度を測定した。蛍光プレートリーダーは励起波長(Ex.) 340nm, 380 nm, 検出波長 (Em.) 510nm とした。細胞質 Ca²⁺濃度は蛍光強度比 MFI_{340/510} / MFI_{380/510} と比例する。ストレス負荷後の値を経時的に測定し、定常状

態の $\text{MFI}_{340/510} / \text{MFI}_{380/510}$ の平均値に対する変化率 (MFI ratio: fold change vs. normal) をモニターした。細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が細胞外からの Ca^{2+} 取り込みと細胞内に貯蔵された Ca^{2+} の放出を区別するために、蛍光測定時の recording buffer は Ca^{2+} 濃度が 0, 1.8 mM のものを用いた。

統計学的解析

数値は平均±標準偏差 (SD) で示した。総計ソフト JMP® (SAS Institute、東京) を用いて 2 群間の比較は Student t 検定で、多群間の比較は Tukey-Kramer 検定で各ペアを検定した。 p 値は 0.05 未満を有意とした。

結 果

脂肪肝

脂肪肝のNAS scoring は正常肝0点に対して 2.3 ± 0.5 点 (内 S: 2.3 点、 I: 0 点、 B: 0 点) であった (図 3)。

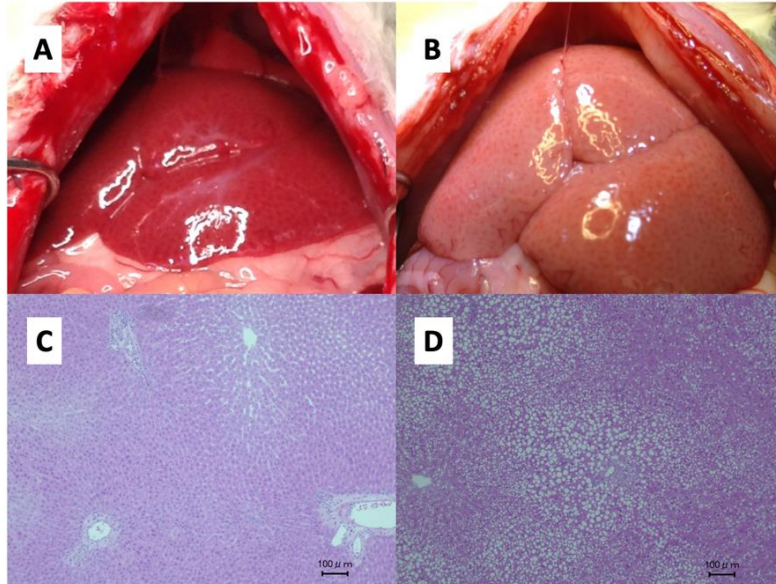


図 3 脂肪肝の作成 A) 開腹時の正常肝、B) 開腹時の脂肪肝、C) 正常肝の HE 染色(10x)、D) 脂肪肝の HE 染色 (10x)

7日生存

最も高度の障害を呈した 90 分温阻血群、脂肪肝 30 分阻血群の生存確認ではどちらの群も全ての術後 7 日目の生存を確認した。

血中肝逸脱酵素活性

血清 ALT 活性は Pre 群では 42.7 ± 7.7 IU/L であった。障害のピークは温阻血再灌流 1 時間後もしくは 6 時間後に認めた。正常肝で温阻血再灌流 1 時間後を比較すると、正常肝の阻血群ではそれぞれ I15/R1h: 362.8 ± 89.3 IU/L ($p < 0.0001$)、I30/R1h: 840.7 ± 328.1 IU/L ($p < 0.0001$)、I90/R1h: 1830.3 ± 396.4 IU/L ($p < 0.0001$) と I30、I90 群が Pre 群より有意に増加し、それぞれの群間でも有意差を認めた (I15/R1h vs. I30/R1h $p < 0.0001$ 、I30/R1h vs. I90/R1h $p = 0.0031$)。

PreF 群の 67.5 ± 51.0 IU/L と比較し再灌流 1 時間後は IF30/R1h: 1683.3 ± 392.2 IU/L ($p < 0.0001$)、6 時間後は IF30/R6h: 2191.2 ± 683.6 IU/L ($p < 0.0001$) と有意に増加した。脂肪肝と正常肝の比較では、再灌流 1 時間後ではそれぞれ I30/R1h: 840.7 ± 328.1 IU/L vs. IF30/R1h: 1683.3 ± 392.2 IU/L ($p < 0.0001$)、再灌流 6 時

間後では I30/R6h : 569.7 ± 94.5 IU/L vs. IF30/R6h : 2191.2 ± 683.6 IU/L ($p < 0.0001$) と脂肪肝が有意に高値だった。

再灌流 6 時間後の ALT は I15 群、I30 群では減少したが、I90 群、IF30 群では減少せず差が拡大した (図 4)。

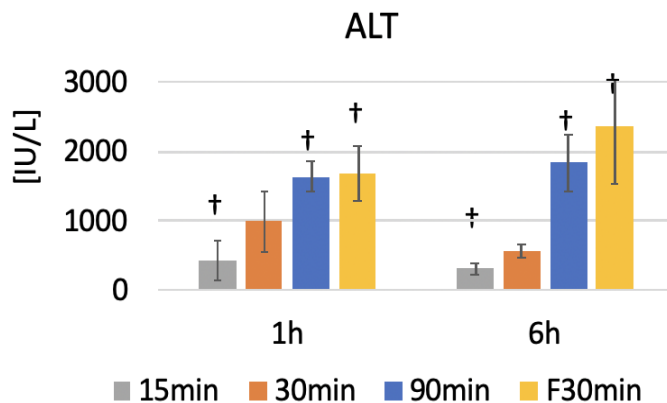


図 4 血液検査結果 血清 ALT 値 正常肝では阻血時間依存性に ALT が優位に上昇しており、脂肪肝で最も ALT 値は上昇した。(† $p < 0.05$, vs. I30)

組織障害スコア (Suzuki's Score)

阻血前のスコアは 0 であり、再灌流障害のスコアのピークは温阻血再灌流 1 時間後もしくは 6 時間後に認められた。再灌流 1 時間後で比較すると、正常肝ではそれぞれ I15/R1h : 2.0 ± 0.6 ($p = 0.0023$ vs. Pre) 、 I30/R1h : 5.5 ± 1.0 ($p = 0.0027$ vs. Pre) 、 I90/R1h : 6.5 ± 1.0 ($p = 0.0027$ vs. Pre) 、脂肪肝では IF30/R1h : 7.0 ± 1.3 ($p < 0.0001$ vs. Pre) と増加した。

正常肝と脂肪肝の比較では、再灌流 1 時間後で I30/R1h : 5.5 ± 1.0 vs. IF30/R1h : 7.0 ± 1.3 ($p = 0.2085$) と差はなかったが、再灌流 6 時間後では I30/R6h : 1.7 ± 1.2 vs. IF30/R6h : 5.0 ± 1.1 ($p < 0.0001$) と有意に脂肪肝が高値だった。再灌流 6 時間後には I15、I30 群では減少したが I90、IF30 群では減少せず、正常肝と脂肪肝の比較では 30 分阻血後の障害スコアの差が拡大した (図 5)。

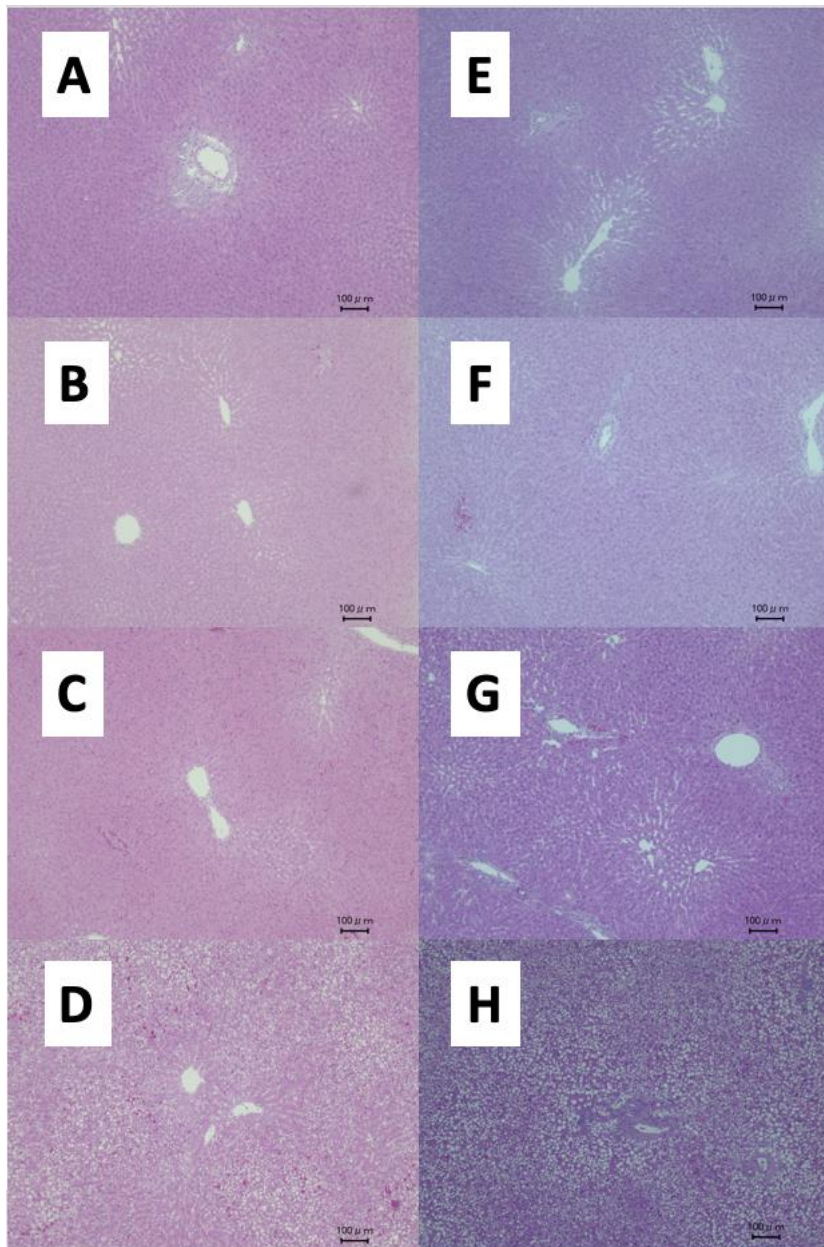


図 5-1 HE 染色標本の肝細胞障害、類洞のうっ血、ballooning を 0-3 点に grading し、その合計点を比較した。A-H) HE 染色 A : I15/R1h、B : I30/R6h、C : I90/R6h、D : IF30/R6h、E : I15/R6h、F : I30/R6h、G : I90/R6h、H : IF15/R6h

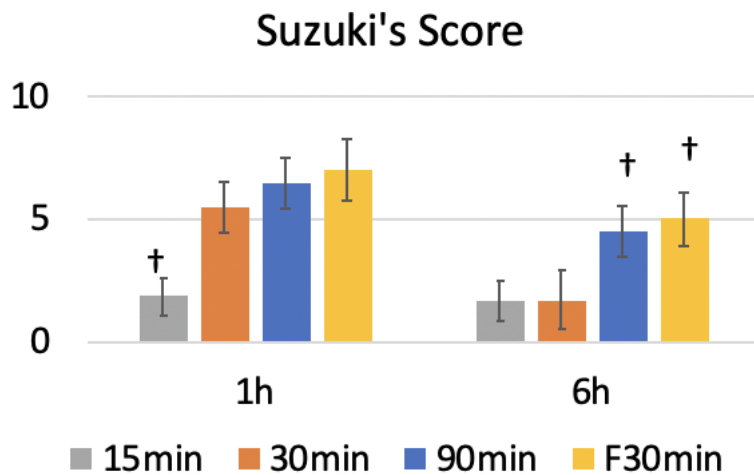


図 5-2 Suzuki's score グラフ († $p < 0.05$, vs. I30) 脂肪肝 30 分阻血 (IF30) 群は正常肝の 90 分温阻血 (I90) 群と同等の障害を呈し、R6h で両群は障害から回復しなかった。

酸化ストレス

肝組織中の過酸化脂質 (MDA+4-HNE) は、LPO は全ての阻血群で阻血終了時に上昇しピーク値となり再灌流後は低下した。正常肝の阻血前 Pre 群は Pre : 159.2 ± 48.4 nmol/mg protein であり、I30 , I90 群で有意に増加した。正常肝では阻血時間と共に増加傾向を示したが群間の差はなかった。15 分阻血終了時 EWI15 : 262.2 ± 61.4 nmol/g protein ($p = 0.0771$)、30 分阻血終了時 EWI30 : 296.2 ± 104.8 nmol/mg protein ($p = 0.0128$)、90 分阻血終了時 EWI90 : 349.6 ± 44.4 nmol/mg protein ($p = 0.0006$) であった。

脂肪肝は阻血前 PreF : 314.8 ± 46.8 nmol/mg protein から阻血終了時 EWIF30 : 529.7 ± 45.4 nmol/mg protein ($p < 0.0001$) と阻血終了時有意に上昇した。脂肪肝は阻血終了後に正常肝より有意に増加しており酸化ストレスが強いことが示された (図 6)。

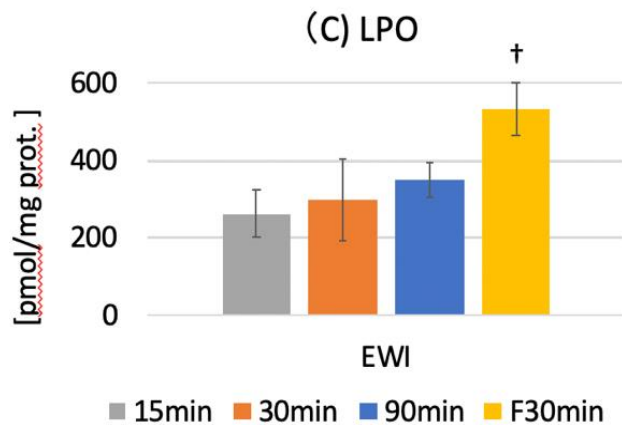


図6 阻血終了時の肝過酸化脂質量 (LPO) を、4-HNE を検量線として LPO586 kit(R) で測定した。全て阻血終了時に増加を認めた。正常肝同士では時間による有意差はなかったが、脂肪肝では優位に増加した ($\dagger p < 0.05$, vs. I30)。

イメージング質量分析 (IMS) の結果

1) m/z 498.28 [taurine conjugates of dihydroxycholeanoic acid (TDHCA)]

経時変化

各群阻血終了時が最大であり、Pre 群の 0.62 ± 0.34 と比較して温阻血時間 30 分以上有意に増加した。15 分阻血終了時 EWI15: 1.75 ± 0.56 ($p = 0.1846$)、30 分阻血終了時 EWI30: 2.19 ± 0.75 ($p = 0.0402$)、90 分阻血終了時 EWI90: 2.69 ± 1.6 ($p = 0.0053$) であった。30 分阻血では再灌流 1 時間後には差がなくなったが、90 分阻血では 1 時間後 I90/R1h: 2.20 ± 1.1 ($p = 0.0016$) も有意に増加しており、6 時間後には pre の値に復した I90/R6h: 1.02 ± 0.6 (図 7-1)。

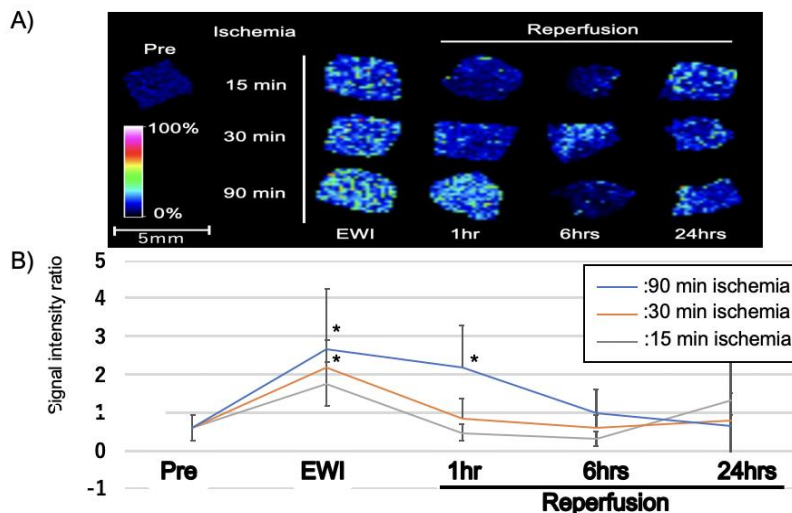


図 7-1 A) IMS 結果 (m/z 498.28) B) 数値 阻血終了時に時間依存的にシグナル強度比が上昇した。90 分阻血のみ再灌流 1 時間後にシグナル強度が遷延した。(* $p < 0.05$, vs. Pre)

分子同定

m/z 498.28 を多段階質量分析 (MS/MS) した。タウリン抱合側鎖 (m/z 106.98 m/z 124.00)、ジヒドロキシ胆汁酸 (m/z 355.26) の特徴的なフラグメントイオンから taurine conjugates of dihydroxycholanoic acid (TDHCA) が同定された (図 7-2)。

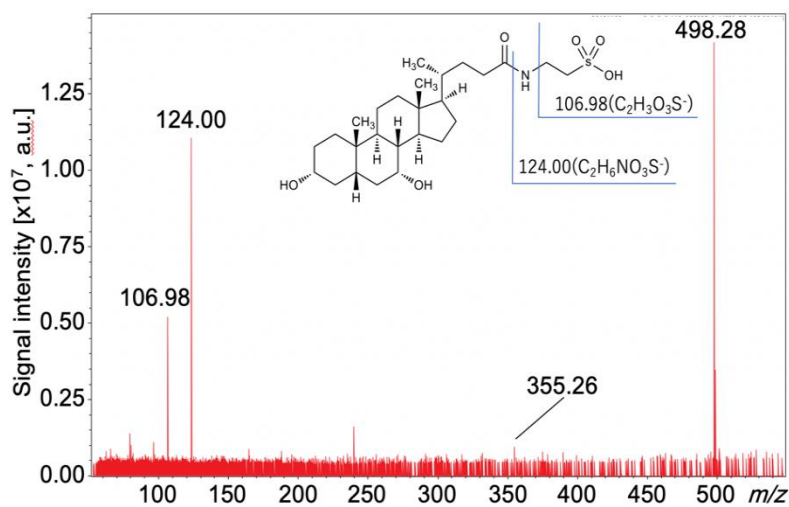


図 7-2 m/z 498.28 の多段階質量分析 (MS/MS)

局在変化

TDHCA の局在解析を行い阻血終了時に TDHCA は胆管内に特徴的に増加していた (図 7-3)。

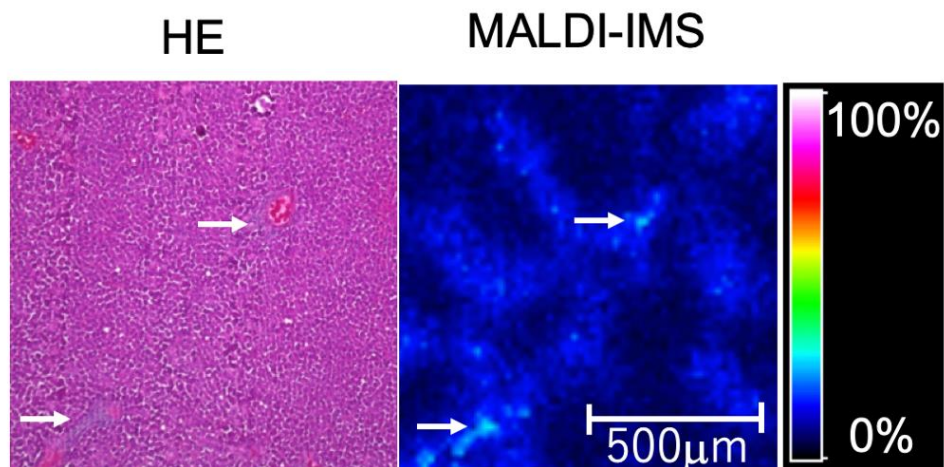


図 7-3 90 分阻血終了時の正常肝における TDHCA の局在 胆管内 (矢印) での増加を認めた。

2) m/z 606.07 [Uridine diphospho-N-acetylhexosamine (UDP-HEXNAc)]

経時変化

Pre 群 0.92 ± 0.38 と比較して 15 分阻血終了時 $EWI_{15} : 1.19 \pm 0.52$ ($p = 0.5067$)、30 分阻血終了時 $EWI_{30} : 0.30 \pm 0.17$ ($p = 0.0225$)、90 分阻血終了時 $EWI_{90} : 0.19 \pm 0.08$ ($p = 0.0061$) で 30 分と 90 分阻血終了時、有意に減少した。再灌流 1 時間後も同様に低値であり ($I_{30/R1} : 0.45 \pm 0.23$ ($p = 0.0368$)、 $I_{90/R1} : 0.26 \pm 0.08$ ($p = 0.0024$))、6 時間後には差を認めなかった (図 8-1)。

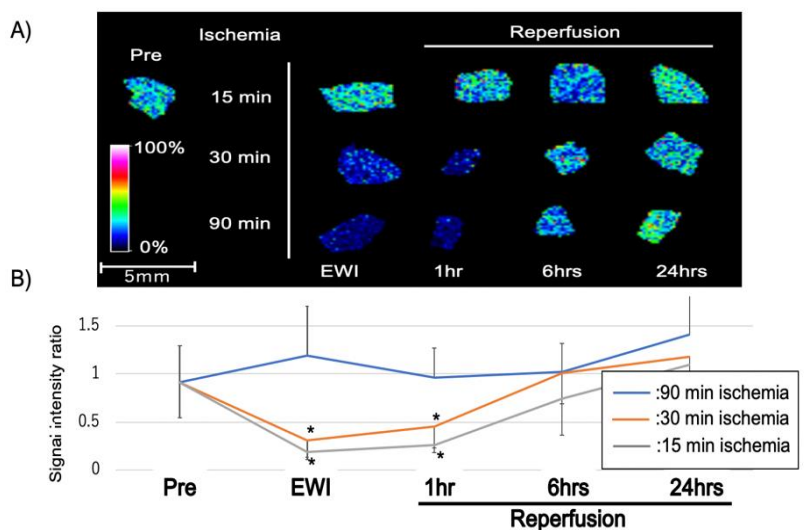


図 8-1 m/z 606.07 A) IMS 結果 B) シグナル強度比 30 分と 90 分阻血終了時、再灌流 1 時間後に優位に減少しており、その後差は消失した。(* $p < 0.05$, vs. Pre)

分子同定

m/z 606.07 を多段階質量分析 (MS/MS) した。UDP (m/z 402.99) および UDP-H₂O (m/z 384.98) を検出し [Uridine diphospho-N-acetylhexosamine (UDP-HEXNAc)] と考えられた (図 8-2)。

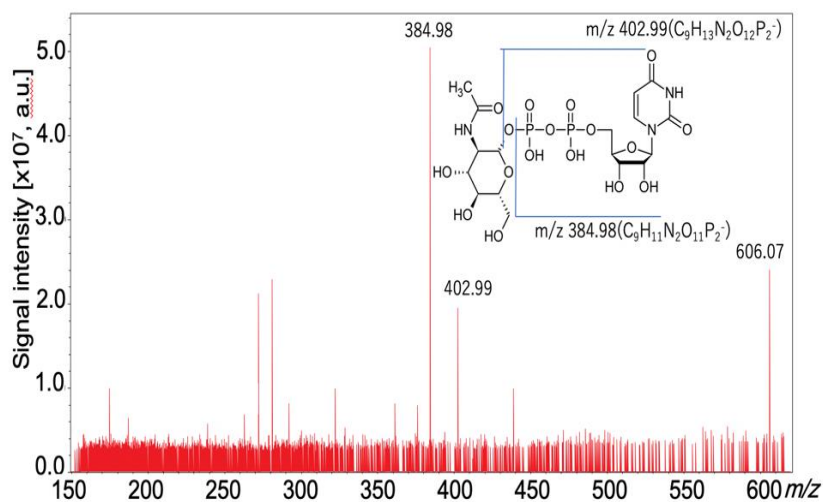


図 8-2 m/z 606.07 の多段階質量分析 (MS/MS)

局在変化

UDP-HEXNAc の局在を解析し、臓器全体としては減少するが、zone3 で UDP-HEXNAc が保たれていた (図 8-3)。

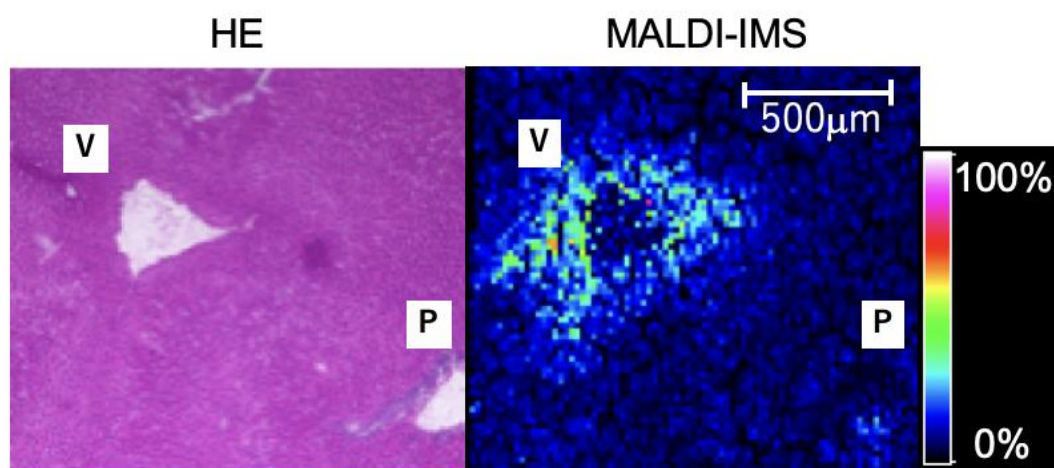


図 8-3 正常肝 90 分阻血終了時の UDP-HEXNAc の局在 P : 門脈 (グリソン鞘) V : 中心静脈域

2) m/z 599.32 [LPI (18:0)] m/z 885.55 [PI (18:0/20:4)]

経時変化

m/z 599.32 [LPI (18:0)]は各群阻血終了時が最大であり、Pre 群 0.88 ± 0.26 と比較して阻血時間に伴い増加し阻血時間が 30 分以降で有意に増加した。(EWI15: 1.56 ± 0.2 ($p = 0.1479$)、EWI30: 2.39 ± 0.53 ($p = 0.0004$)、EWI90: 2.85 ± 0.85 ($p < 0.0001$))。再灌流後差はなくなった(図 9-1 : A、B)。

m/z 885.55 [PI (18:0/20:4)]は Pre 群 0.87 ± 0.25 と比較して各群有意差はなかったが再灌流後は阻血時間に伴い減少しており、15 分、30 分阻血群では再灌流 1 時間後に最も減少した(I15/R1h: 0.90 ± 0.25 、I30/R1h: 0.82 ± 0.31)。また、90 分では再灌流後 6 時間で最も減少した(I90/R6h: 0.68 ± 0.09) (図 9-1 : C、D)。

m/z 599.32/ m/z 885.55 [LPI (18:0)/PI (18:0/20:4)]は各群阻血終了時が最大であり、Pre 群 1.01 ± 0.04 より全ての阻血終了時で有意に増加し(EWI15: 1.56 ± 0.14 ($p = 0.0045$)、EWI30: 2.21 ± 0.33 ($p < 0.0001$)、EWI90: 2.92 ± 0.34 ($p < 0.0001$))、阻血時間依存的に有意差を認めた。(EWI15 vs. EWI30 ($p = 0.0009$)、EWI30 vs. EWI90 ($p = 0.0004$))。また、再灌流後は差が消失した(図 9-1 : E、F)。

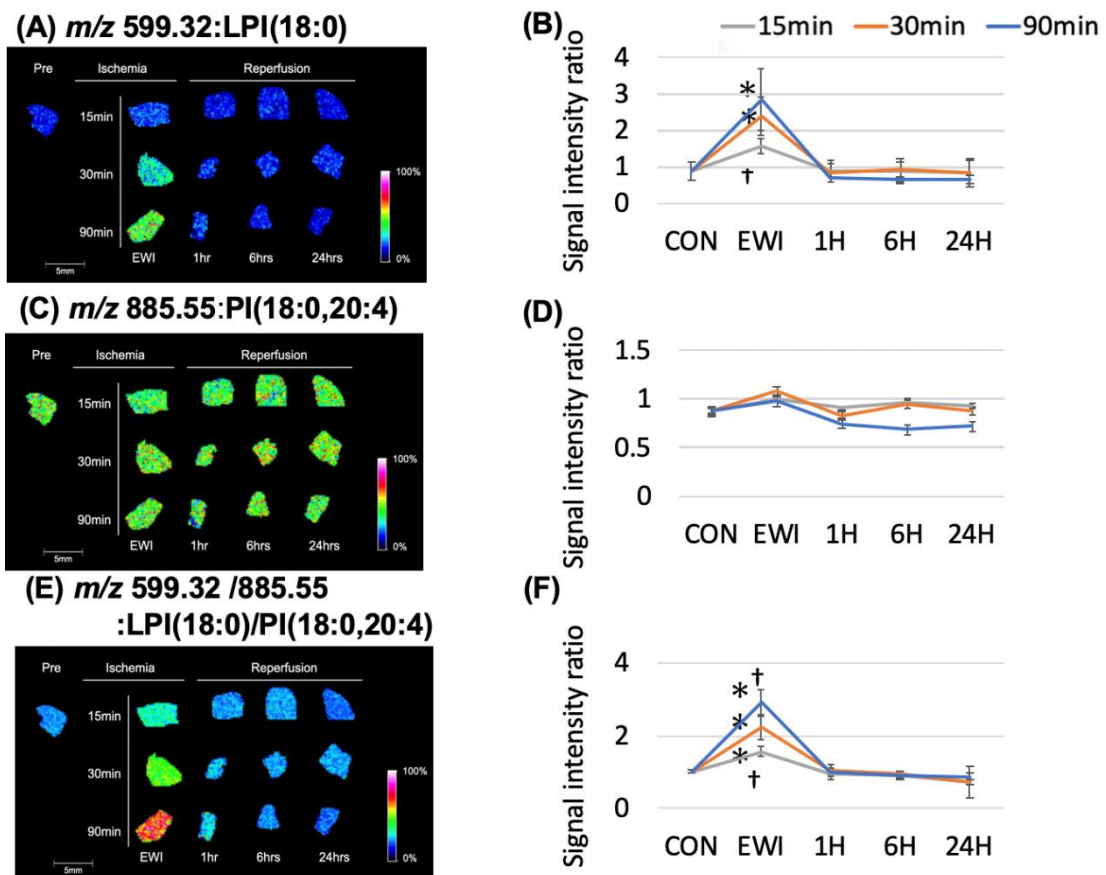


図 9-1 正常肝における阻血時間と再灌流後の分子変動 (経時変化)

正常肝でラット 70 % 温阻血再灌流モデルを作成し、阻血時間の違いによる比較を行った。阻血時間は 15、30、90 分再灌流後 1、6、24 時間で犠牲死させて試料を採取した。臓器切片を IMS で m/z 200-2000 で変動する分子を網羅的に解析した。

(*: $p < 0.05$, vs. Pre、†: $p < 0.05$, vs. EWI30)、A、B : m/z 599.32 C、D : m/z 885.55 E、F : m/z 599.32/ m/z 885.55 A、C、E : IMS 結果、B、D、F : シグナル強度比の推移 m/z 599.32 は阻血終了時増加し、 m/z 599.32/ m/z 885.55 はより阻血時間依存的に増加した。

分子同定

m/z 885.54 を多段階質量分析 (MS/MS) した。PI のヘッドグループ : (m/z 241.01 m/z 259.24)、ステアリン酸 (18:0) : (m/z 283.26)、アラキドン酸 (20:4) : (m/z 303.23)、CPA (18:0) : (m/z 419.26)、LysoPI (18:0) : (m/z 581.30 m/z 599.32) が検出され、PI (18:0/20:4) と同定された (図 8-2A)。

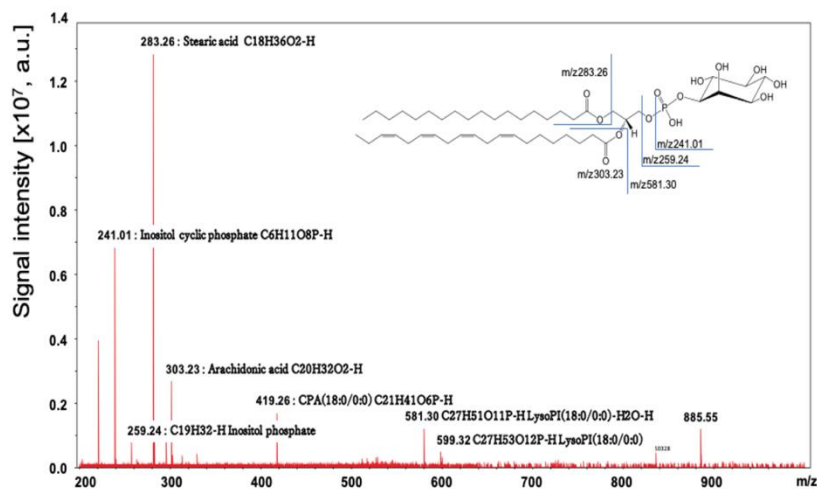


図 9-2 A m/z 885.55 の多段階質量分析 (MS/MS)

m/z 599.32 を多段階質量分析 (MS/MS)

PI のヘッドグループ : (m/z 241.01 m/z 315.05)、ステアリン酸 (18:0) : (m/z 283.26)、CPA (18:0) : (m/z 419.26) が検出され、LysoPI (18:0) と同定された (図 9-2B)。

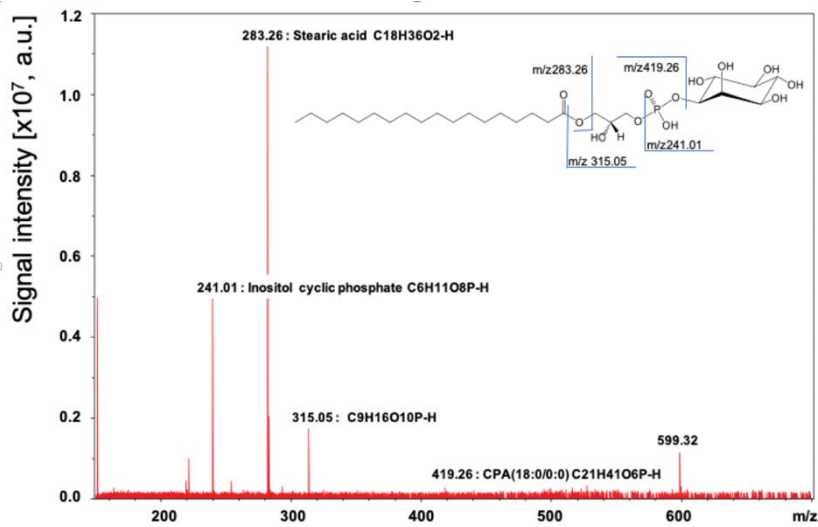


図 9-2 B m/z 599.32 の多段階質量分析 (MS/MS)

局在変化

LPI (18:0) は阻血前の Pre 群では変化が無いが (図 9-3 : B)、阻血時間と共に全体のシグナルが増強し、門脈周囲 (zone1) でシグナルが高く、中心静脈周囲の (zone3) でシグナルが低く変化している (図 9-3 : F、J、N)。PI (18:0/20:4) はどの阻血時間でも全体のシグナルの違いは見られないが、zone 1 でシグナルが低く、zone 3 でシグナルが高く変化している (図 9-3 : C、G、K、O)。LPI (18:0)/PI (18:0/20:4) では LPI (18:0) 同様阻血時間と共に全体シグナルは増強し、zone 1 で高く、zone 3 で低く変化し、阻血時間と共に明確な偏在を示す (図 9-3 : D、H、L、P)。

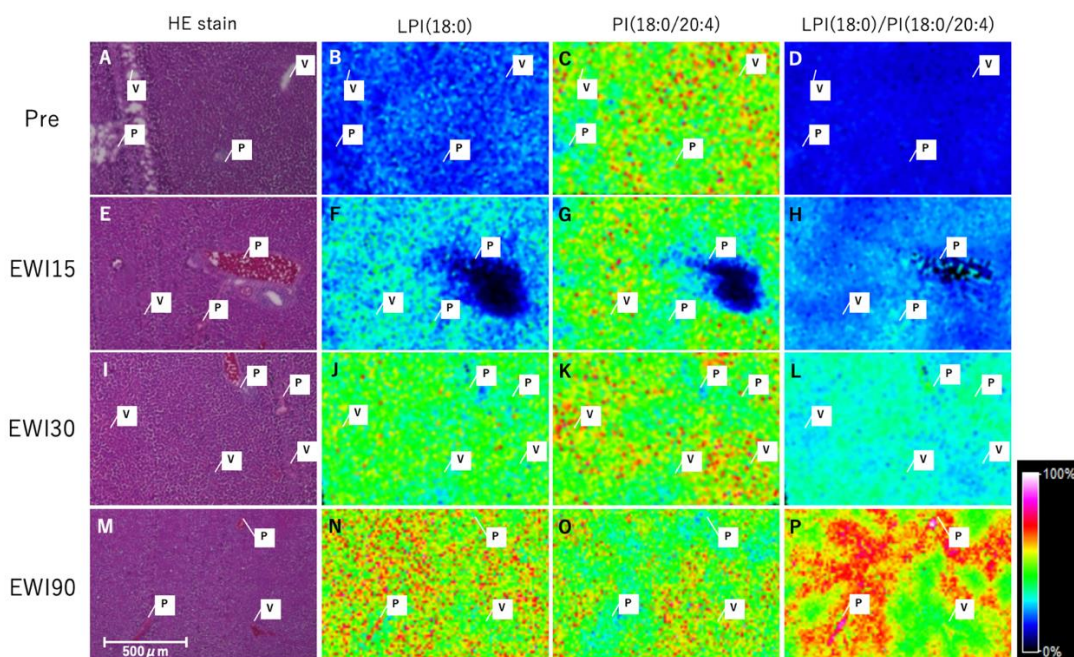


図 9-3 正常肝の阻血時間に伴う局在変化(阻血前と 15 分、30 分、90 分阻血終了時) A、E、I、M : HE 染色、B、F、J、N : LPI (18:0) の局在、C、G、K、O : PI (18:0/20:4) の局在、D、H、L、P : LPI (18:0) /PI (18:0/20:4) の局在、A、B、C、D : 阻血前 (Pre) 、E、F、G、H : 15 分阻血終了時 (EWI15) 、I、J、K、L : 30 分阻血終了時 (EWI30) 、M、N、O、P : 90 分阻血終了時 (EWI90) P : 門脈 (グリソン鞘) V : 中心静脈域 LPI (18:0) は zone1 でシグナルが増強し zone3 でシグナルが減少。PI (18:0/20:4) は zone 1 でシグナルが低下し、zone3 でシグナルが増加。LPI (18:0) /PI (18:0/20:4) は zone1 で高く、zone3 で低く変化し、阻血時間と共に明確な偏在を示した。

正常肝と脂肪肝の比較

脂肪肝との比較は立体異性体の無い LPI (18:0) および PI (18:0/20:4) の変動と局在を解析した。

経時変化

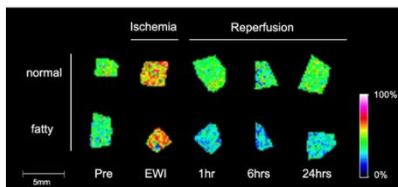
m/z 599.32 [LPI (18:0)] はどちらの群も、阻血前 (正常肝 Pre : 1.29 ± 0.56 脂肪肝 PreF : 0.92 ± 0.18) と比較して阻血終了時に有意に増加しシグナル強度が最大となった。正常肝の阻血終了時のみ有意に高かった (EWI30 : 3.93 ± 1.1 ($p < 0.0001$) EWIF30 : 1.94 ± 1.0 ($p < 0.0001$)。全てのタイムポイントで正常肝の方が高値であ

ったが、EWIのみで有意差を認めた(EWI30 : 3.93 ± 1.1 EWIF30 : 1.94 ± 1.0 $p = 0.0013$) (図 10-1 : A、B)。

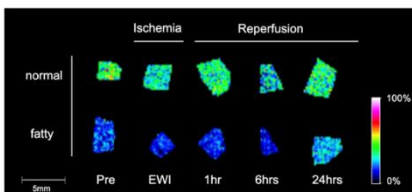
m/z 885.55 [PI (18:0/20:4)]は正常肝も脂肪肝も阻血再灌流による有意な変化はなかったが、全てのタイムポイントで正常肝の方のシグナルが脂肪肝より高く、EWI、1h、6h、24h では有意に高値 ($p < 0.0001$) であった (図 10-1 : C、D)。

m/z 599.32/ m/z 885.55 [LPI (18:0) /PI (18:0/20:4)]は各々阻血前(Pre : 1.01 ± 0.23 PreF : 1.83 ± 0.24) と比較して阻血終了時が最大となり有意に高値であった (EWI30 : 2.60 ± 0.45 ($p = 0.0138$)、EWIF30 : 5.95 ± 1.0 ($p < 0.0001$))。また、脂肪肝の方が正常肝と比較して阻血終了時 ($p < 0.0001$) で有意に高値であった (図 10-1 : E、F)。

(A) m/z 599.32:LPI(18:0)



(C) m/z 885.55:PI(18:0,20:4)



(E) m/z 599.32 /885.55 :LPI(18:0)/PI(18:0,20:4)

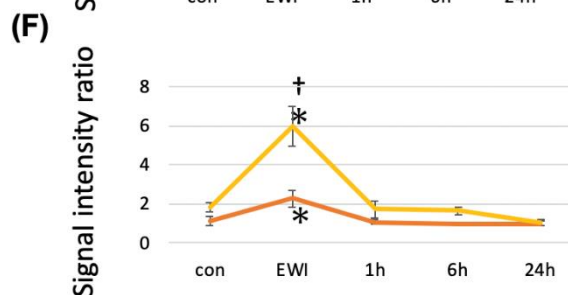
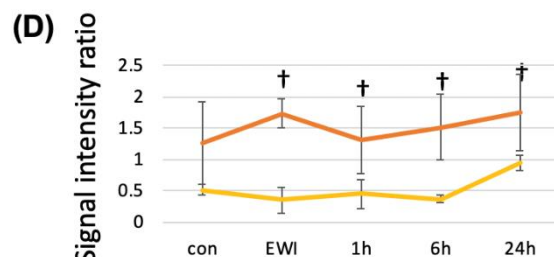
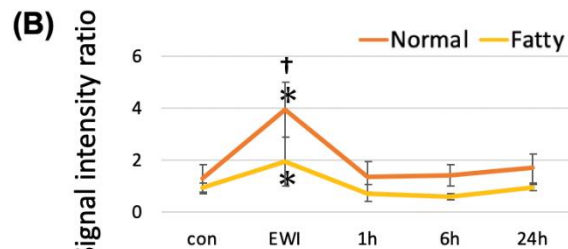
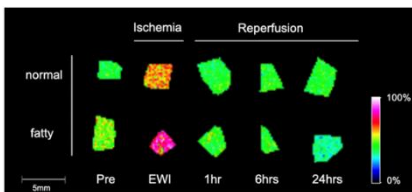


図 10-1 正常肝と脂肪肝の比較 30 分阻血再灌流後の分子変動

ラット 70 % 温阻血再灌流モデルを作成し、阻血時間は 30 分再灌流後 1、6、24 時間で犠牲死させて試料を採取した。臓器切片を IMS で m/z 200-2000 で変動する分子を網羅的に解析し、正常肝と脂肪肝を比較した。 (* $p < 0.05$ vs. 各々の Pre、† $p < 0.05$ 同じタイムポイントでの正常肝脂肪肝の比較) A、B : m/z 599.32、C、D : m/z 885.55、E、F : m/z 599.32/ m/z 885.55、A、C、E : IMS 結果、B、D、

F : シグナル強度比の推移 脂肪肝で PI(18:0/20:4) は低下しているが m/z 599.32/ m/z 885.55 は正常肝より高値であった。

局在変化

LPI (18:0) は脂肪肝でも正常肝同様に zone1 でシグナルが高値であり、zone3 でシグナルが低値であった (B、F)。

PI(18:0/20:4) は、zone 1 でシグナルが低値であり、zone3 でシグナルが高値であったが (C、G)、全体のシグナルが著明に脂肪肝で低下していた。

LPI(18:0)/PI(18:0/20:4) は、zone1 でシグナルが高値であり、zone3 でシグナルが低値であった。脂肪肝でそれらの変化が増強された (D、H) (図 10-2)。

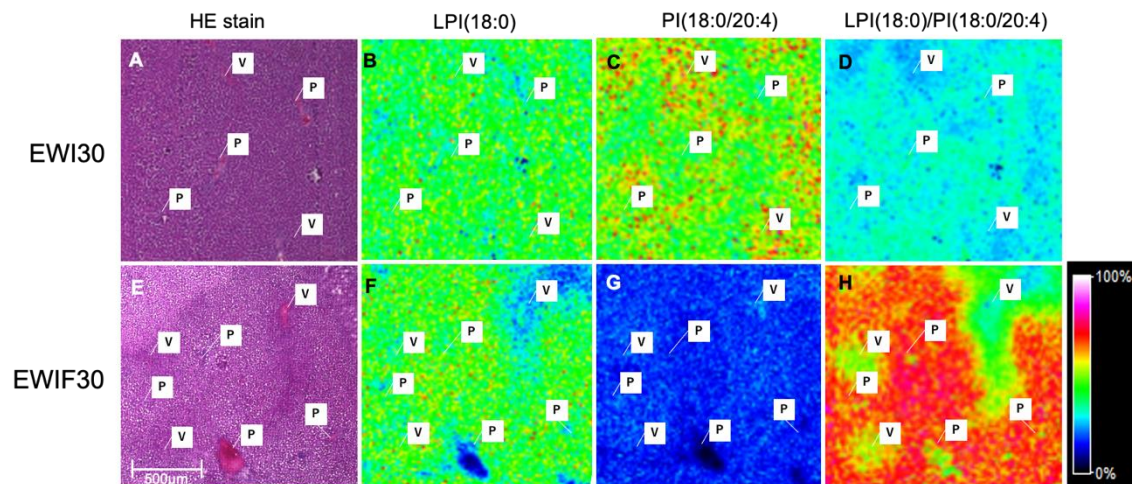


図 10-2 30 分阻血終了時における正常肝と脂肪肝の局在変化

A、E : HE 染色、B、F : LPI (18:0) の局在、C、G : PI (18:0/20:4) の局在、D、H : LPI (18:0) /PI (18:0/20:4) の局在 A、B、C、D : 正常肝の 30 分阻血終了時 (EWI30)、E、F、G、H : 脂肪肝の 30 分阻血終了時 (EWIF30) P : 門脈 (グリソン鞘) V : 中心静脈域 LPI (18:0) LPI (18:0) /PI (18:0/20:4) が正常肝と同様に zone1 でシグナルが増強し、より明確な偏在を示した。

LPI の肝細胞株への影響

肝細胞株では、LPI 添加によって低酸素終了時の上清 LDH は減少した。

細胞内 Ca^{2+} 濃度は、細胞外液に Ca^{2+} が存在する場合にのみ LPI 添加によって濃度が上昇した。(図 11-1)

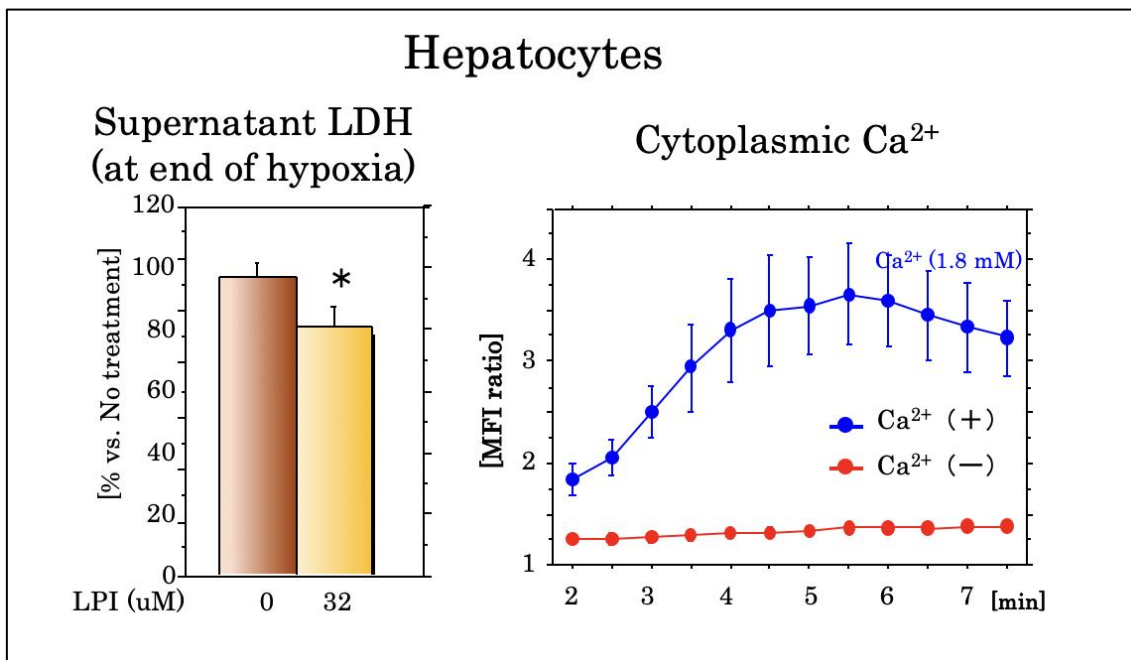


図 11-1 Wistar ラット由来の肝細胞株 RL34 に LPI を添加し 8 時間の低酸素後に再酸素化した。

上清 LDH は、低酸素終了時に減少した。細胞内 Ca²⁺ 濃度は、細胞外液に Ca²⁺ が存在する場合にのみ濃度が上昇した。

LPI の星細胞株への影響

星細胞株では LPI 添加により低酸素終了時の LDH 漏出は増強した。

細胞質カルシウムイオン濃度は、細胞外液にカルシウムイオンが存在する場合もしい場合でも LPI 添加により細胞質イオン濃度が増加した。(図 11-2)

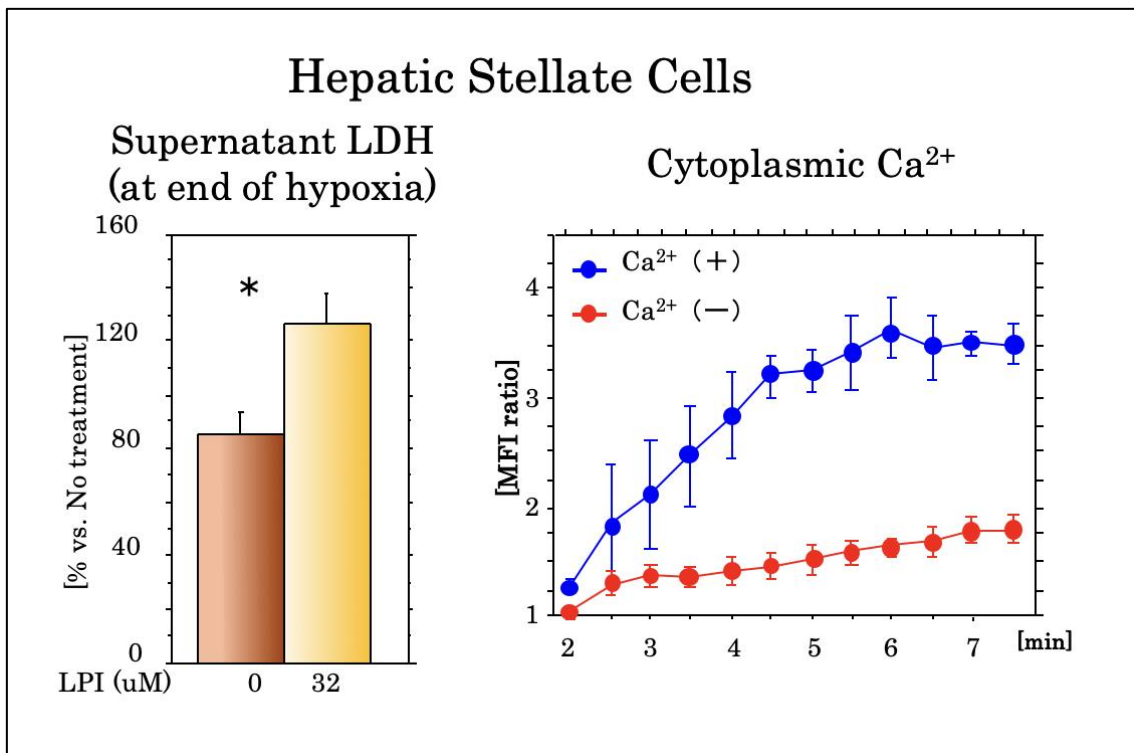


図 11-2 Wistar ラット由来の肝星細胞株 RI-T に LPI を添加し 8 時間の低酸素状態の後に再酸素化した。上清 LDH は低酸素終了時に上昇した。細胞内カルシウムイオン濃度は、細胞外液にカルシウムイオンが存在する場合も存在しない場合も濃度が上昇した。

考 察

モデルと障害評価法の意義

本研究ではラットの温阻血再灌流モデルを作成し、正常肝では阻血時間を 15-90 分とし、脂肪肝では 30 分として阻血時間による変化、肝脂肪化による変化を比較した。本モデルは正常肝の 90 分阻血群、脂肪肝の 30 分阻血群でも非致死性モデルであり、循環・呼吸不全などの肝臓以外の要因による肝の 2 次的な障害機転を排除した評価ができるモデルである。血中 ALT 活性は正常肝では再灌流 1 時間後で阻血依存的に高値となり、30 分以下の阻血群では再灌流 6 時間後には低下したが 90 分阻血群では回復せず、既報と合致していた (Ohi et al., 2006; Yurtkap et al., 2021)。脂肪肝は 30 分の阻血時間でありながら、再灌流 1 時間後で 90 分阻血群と同等の値であり、再灌流 6 時間後には 90 分阻血群の値よりも高値であった。組織障害スコア (Suzuki's score) でも阻血時間依存的な障害と脂肪肝における増悪を確認した。また、阻血時間が閾値を超えると障害からの回復ができず、再灌流後のストレス応答の質の違いを予測し得る評価法と考えられた。しかし、これらの評価は阻血中には有意な変化はなく障害の予測マーカーとはならず、新規マーカーの探索が望まれる。

酸化ストレスと脂質変化

脂質過酸化の評価はチオバルビツール酸反応物質 (TBARS) が汎用されてきたが、非特異的呈色反応がありストレスに対する特異性に問題があるため、本研究では比較的安定な過酸化脂質分解産物 MDA や 4-HNE の総和を市販の測定キットを用いて簡便に評価した。MDA や 4-HNE はタンパク質と結合して機能障害をもたらす (Uchida et al., 1999)、また、細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過性上昇の促進を介して Ca^{2+} 依存性の障害反応を促進する (Wakayama et al., 2012)。それ故、阻血再灌流障害進展の重要な因子の一つである。本研究では MDA+4-HNE が脂肪肝の阻血中に著明に増加したが、正常肝では虚血時間に伴う差は認めず、他の障害評価とは異なる結果となり、正確に結果を反映するとは言えなかった。PC-OOH、PE-OOH などの脂質過酸化の初期反応産物は阻血時間依存的に阻血中に増加し、再灌流後の障害を予測できるが (Yokota et al., 2000) 抽出時の自動酸化や分解、標準品の作成等の技術的な難しさがあり、臨床応用には不向きと言わざるを得ない。しかし、MDA、4-HNE で脂質過酸化を論じる場合には、PC-OOH、PE-OOH から MDA、4-HNE が生成する反応は低酸素下では進行しにくいために阻血中の酸化ストレスを過小評価する可能性があることを銘記すべきである (Fukai et al., 2005)。これらの問題点を解決し得る方法論として本研究では IMS を採用した。IMS は切片から網羅的に変動分子を探索できる簡便な方法であるのみならず、抽出や濃縮、乾固等の操作によるアーチファ

クトを生じないため、分析結果の生物学的意義を強化される。実際、IMS で同定した変動分子は、温阻血再灌流によって阻血中あるいは再灌流後に様々な増加、減少パターンを示す分子が検出され、阻血時間の影響を鋭敏に反映する分子が見出された。

IMS によって探索された候補分子とその挙動

本研究ではイメージング質量分析 (IMS) によって taurine conjugates of dihydroxycholeanoic acid (TDHCA)、Uridine diphospho-N-acetylhexosamine (UDP-HEXNAc)、Lysophosphatidylinositol (LPI)、Phosphatidylinositol (PI) を検出しその変動と局在情報を得た。

TDHCA はタウリン抱合したケノデオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸やオキシコール酸の総称であり、UDP-HEXNAc のヘキソサミンにはグルコサミンとガラクトサミンの可能性がある。IMS の分子同定はフラグメントの m/z から構造を決定するため、立体異性体がある化合物の構造を一つに絞りこめないことが方法論の限界だが、特徴的な変動と局在を同時に評価できるのは IMS 法のみである。これら立体異性体の分子同定には LC-MS/MS や Nuclear Magnetic Resonance (NMR) などの測定法が必要であり、本法と併用することは夫々の測定法が補完し合い意義が強化される。

LPI (18:0) は PI (18:0/20:4) などのステアリン酸 (FA18:0) を持つリン脂質の側鎖脂肪酸が脱落したリゾリン脂質の一つである。脂肪酸全体の組成、あるいは、リン脂質側鎖の組成は臓器、細胞種によって異なるが (Oka et al., 2009)、ラットの肝臓における PI の側鎖脂肪酸は FA18:0 が 36.4% FA20:4 が 51.3% とされるので (Newman et al., 1968)、PI (18:0/20:4) が大部分をしめる。Cytosolic Phospholipase A2 α (cPLA2 α) がアラキドン酸 (FA20:4) の遊離に関与していることから LPI (18:0) 生成の主な経路の一つと考えられる (Murakami et al., 2003)。

本研究では LPI (18:0) /PI (18:0/20:4) は短時間の阻血でも阻血終了時に肝臓全体で有意に増加し、特に zone1 で顕著であった。LPI (18:0) /PI (18:0/20:4) 比が肝臓内、特に zone1 で起こる PI (18:0/20:4) から LPI (18:0) への変化を反映する鋭敏な指標となり得る。肝温阻血再灌流障害は PLA₂ 阻害剤 (LY329722) によって軽減され (Ogata et al., 2001)、肝阻血再灌流におけるアラキドン酸カスケードと cPLA₂ の関与 (Kim et al., 2017) は既に知られており (Kim et al., 2017)、PLA の各種アイソザイムの発現、局在、活性の変化を解明し制御法を確立することが新規治療の開発へつながる可能性がある (Mariggio et al., 2006)。温阻血を反映する分子種が同定され

たことに加え、本測定結果のもう一つの重要な点は、このリゾリン脂質の変化は血中 ALT や組織像の変化に先んじて起こることであり、阻血中に変動する分子は再灌流障害の予測マーカーとなることが期待される。現時点では LPI (18:0) の増加が再灌流障害を増強するか、肝臓を保護するか、また、その増加が実際の障害の強さや予後に関連があるかは系統的に解析しておらず、今後の重要な検討課題である。

脂肪肝では LPI (18:0) が正常肝と同様に阻血終了時に増加したが、正常肝よりシグナル強度は低かった。その他の障害評価との相異は脂肪肝では LPI (18:0) の原料となる PI (18:0/20:4) が少ないことに起因すると推測された。阻血終了時の LPI (18:0) / PI (18:0/20:4) は正常肝より有意に高値であり、正常肝の 90 分阻血と近似した挙動を示した。これらの事実は主な原料となる PI (18:0/20:4) を加味した LPI (18:0) / PI (18:0/20:4) の値がストレスをより反映する可能性を示唆している。しかし、異なる脂肪肝モデルや種が異なれば脂質、脂肪酸の挙動も異なる可能性があり、ニーズに合うモデルを用いた解析が必要なことは本研究の *limitation* として挙げておかねばならない。

今回の研究では LPI の特異的な量的変化や局在変化が確認されたが、肝温阻血再灌流障害への影響は未解明である。LPI の生物学的活性は最近になり解明されつつある。LPI による癌細胞のインスリン分泌調節やミトジェン活性 (Falasca and Corda, 1994; Metz, 1986)、リン脂質脂肪酸リモデリング酵素 LPIAT1 の機能低下による NAFLD の発症と増悪 (Tanaka et al., 2021)、LPI をリガンドとするレセプター : G-protein coupled receptor (GPR55) の存在 (Kuboki et al., 2007a)、GPR55 が癌細胞の増殖 (Hu et al., 2011) や、遊走/転移に関与すること (Ford et al., 2010) が相次いで報告された。GPR55 は癌以外にも肥満/2 型糖尿病との相関 (Moreno-Navarrete et al., 2012)、免疫細胞の機能制御 (Oka et al., 2010)、肝臓での発現 (Bullo et al., 2012)、ヒトや動物の障害肝で増強していること (Fondevila et al., 2021; Robertson-Gray et al., 2019) が示された。肝温阻血で増加する LPI も GPR55 を介して阻血再灌流障害の進展に何らかの役割を果たしていることが推測される。心筋の阻血再灌流では GPR55 の上流に位置する Rho-ROCK 経路が障害を悪化させ (Robertson-Gray et al., 2019)、肝温阻血再灌流は ROCK 阻害により障害が軽減される (Takeda et al., 2003)。本研究の細胞実験で LDH の動きから LPI を肝細胞に添加すると低酸素障害を軽減し、星細胞に添加すると低酸素障害を増強することを示唆したが、LDH 以外での評価、すなわち別の障害を評価する実験系でも同様の結果となるか確認は必要である。細胞内カルシウムイオン濃度の一過性上昇は多数のカルシウムイオン依存性タンパク質の活性化を介して阻血再灌流や炎症病態を増悪

させるが、今回は増加したことの確認のみであり、障害を増悪させるかはわからない。まして、肝臓臓器レベルで保護的か、障害性なのかを結論付けることはできていない。ただし、GPR55 を介した反応が顕在したため、LPI-GPR55 経路が肝障害のエフェクター機構に近い現象の可能性があり、治療標的となることが期待される。しかし、肝温阻血再灌流で肝実質細胞、非実質細胞各々における GPR55 を介した障害機構の報告はないため今後の重要な課題である。

ストレス応答における zone の影響

肝温阻血再灌流障害に関わる zone による知見には、類洞内の酸素濃度が高い zone1 (門脈域) よりも酸素濃度が低い zone3 (中心静脈域) で著明に生じるとされることや (Thurman et al., 1984)、低酸素環境の zone3 の肝細胞は Hsp70 の発現等のストレス応答により阻血に対する耐性があることが知られている (Kuboki et al., 2007b)。本研究では zone1 で LPI (18:0) の増加が見られたが、本研究ではグリソン鞘を一括遮断したため zone1 の類洞、肝の酸素濃度は速やかに低下したことが LPI (18:0) の増加のトリガーとなっている可能性がある。一方で zone3 ではその変化が乏しかったが、本研究のモデルでは肝静脈は開存しているために back flow によって zone3 に酸素供給が保たれている可能性があり、今回の局在が完全な血流遮断下でも同様の結果となるかの確認は必要である。ただ、低分子化合物の推移を Zonation (zone1-3) と共に評価できたことは IMS ならではの結果である。今後、これらの低分子化合物の変化の原因、あるいは、その下流で起こる生体反応をタンパク質、エピゲノムレベルで解析することにより、病態の解明と新たなマーカー分子、治療標的の発見が期待される。

LPI による評価の意義と将来展望

LPI (18:0) は阻血時間を反映して細胞死に先んじて阻血中に劇的に変動し、化学的に比較的安定である。また、脂溶性、水溶性の両面分に存在し得るので阻血中でも開存した肝静脈から血液中に漏出する可能性がある。それ故、阻血中の血液によって肝臓の阻血性変化を検出できる可能性がある。ヒトの血中 LPI を LC/MS によって定量した報告もあり、血中 LPI 定量により、低侵襲性に肝障害を予測する方法論となることが期待される (Cable et al., 2021; Nestel et al., 2017)。また、PI (18:0/20:4) を基質とした酵素反応で生成するので、非酵素的な反応とは異なりアーチファクトを生じにくいと推測され、阻血再灌流障害の予後予測マーカーとして有望である。

肝の温阻血で増加する LPI の発見は、肝臓の状態によって温阻血再灌流障害の程度や進み方が異なる原因を解明する手がかりとなるかもしれない。現在は 20 μ m ピ

ツチの高解像度分析はコストが高く時間もかかるため、臨床検査としては実用化し難いが、演算装置の進歩により低価格化と解析時間は短縮化がされるはずである。また、IMS と同様にシングルセルレベルで RNA seq を行い多数の遺伝子についてその発現レベルと局在をマッピングできる技術 (VISIUM 解析) との併用によりさらに高度のメカニズム探索ができるはずである (Cable et al., 2021)。また、脂質、脂肪酸、アミノ酸をはじめ多くの低分子化合物の局在は Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) によって定量、マッピングできるので (Dietz et al., 2017)、IMS や LC-MS/MS により見出した興味分子の磁場特性 (chemical shift) を MRS/MRI で評価できるはずであり、解像度、演算速度の進歩が望まれる。

結 論

1) 本研究全体から得られた新知見

ラットの正常肝、脂肪肝の温阻血再灌流障害における経時的変動分子と組織内局在
経時的変動分子

1. 正常肝の温阻血再灌流モデルにおける

1-1. 阻血時間依存的な阻血中の TCDHA、LPI (18:0) の増加、UDP-HEXNAc、PI (18:0/20:4) の減少

1-2. 阻血時間依存的な阻血中の LPI (18:0) / PI (18:0/20:4) の増加

1-3. 再灌流後 TCDHA、UDP-HEXNAc、LPI (18:0) は元の値に復するが障害によって遷延する。

2. 脂肪肝の温阻血再灌流モデルにおける

2-1. 阻血中の LPI (18:0) の増加、PI (18:0/20:4) の減少

2-2. 阻血中の LPI (18:0) / PI (18:0/20:4) の増加

2-3. 再灌流後 LPI (18:0) / PI (18:0/20:4) は速やかに減少し元の値に復する

2-4. 脂肪肝では正常肝の長時間阻血と同様の推移 (阻血に対する易障害性)

3. 温阻血再灌流障害の予測マーカー

3-1. 正常肝、脂肪肝何れにおいても各種の障害評価マーカーに先んじて変動
・阻血中の LPI (18:0) / PI (18:0/20:4) が最も鋭敏な指標

3-2. 再灌流後早期に元値に復するか否かで障害の推移を予測できる可能性

組織内局在

4. 阻血中の zone1 での LPI (18:0) の増加、PI (18:0/20:4) の減少、LPI (18:0) / PI (18:0/20:4) 比の低下は、再灌流後の障害領域の分布と近似していた

5. TCDHA は胆管内で増加

6. UDP-HEXNAc は zone3 で残存。

肝温阻血再灌流障害における LPI の役割

7. LPI の細胞株に対する機能

7-1. LPI は肝細胞には保護性に、星細胞には障害性に働く可能性がある。

7-2. LPI によって肝細胞、星細胞共に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する

7-3. 何れの細胞においても細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は細胞外からの Ca^{2+} の取り込みが関与する

7-4. 星細胞では小胞体から Ca^{2+} の放出が関与する

2) 新知見の意義

肝温阻血再灌流障害において、阻血中の LPI (18:0) の増加や PI (18:0/20:4) の減少が zone1 から始まり、再灌流後の障害増悪に関与することが始めて示された。阻血方法、阻血時間、脂肪化の程度を加味した障害評価により再灌流後の肝障害を正確に予測できる可能性を提示した。

LPI は細胞実験から温阻血再灌流障害での関与が示唆され、さらに臓器レベルで探索することで、肝組織の生化学的、分子生物学的な解析が肝温阻血再灌流障害のメカニズム解明に繋がる可能性を提示した。

3) 今後の研究、課題

- ・ zone1 に存在する実質細胞、非実質細胞に対する LPI (18:0) の autocrine, paracrine な作用は不明であり、保護性か傷害性かも不明である
- ・ 心停止ドナー肝では肝静脈からの back flow が無いので病態が異なる可能性がある
- ・ 脂肪肝の作り方によって結果が異なる可能性がある
- ・ TCDHA と UDP-HEXNAc の立体異性体は解明がされていない
- ・ 細胞、臓器レベルでのさらなる機序解析、個体レベルでの解析が必要である
- ・ 臨床応用を実現するためには、臨床データやヒトの臓器での検討が必要である

謝 辞

大学院博士課程を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、終始御指導御鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究科消化器外科学教室 I 武富紹信教授ならびに深井原特任講師、早坂孝宏特任助教に深く感謝いたします。

また卓越した技術により実験を終始支援して頂きました堀米正敏、三好早香の諸氏、ならびに貴重な御助言と技術的な御指導を賜りました同講座の皆様に厚く御礼申し上げます。

利益相反

本研究に関して、研究にバイアスをもたらす可能性のある利害関係（金銭的・個人的関係）はありません。

引用文献

Angel, P.M., Bayoumi, A.S., Hinton, R.B., Ru Su, Y., Bichell, D., Mayer, J.E., Scott

Baldwin, H., and Caprioli, R.M. (2016). MALDI Imaging Mass Spectrometry as a Lipidomic Approach to Heart Valve Research. *J Heart Valve Dis* 25, 240-252.

Bullo, M., Moreno-Navarrete, J.M., Fernandez-Real, J.M., and Salas-Salvado, J. (2012).

Total and undercarboxylated osteocalcin predict changes in insulin sensitivity and beta cell function in elderly men at high cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 95, 249-255.

Cable, D.M., Murray, E., Zou, L.S., Goeva, A., Macosko, E.Z., Chen, F., and Irizarry, R.A.

(2021). Robust decomposition of cell type mixtures in spatial transcriptomics. *Nat Biotechnol*.

Casavilla, A., Ramirez, C., Shapiro, R., Nghiem, D., Miracle, K., Bronsther, O.,

Randhawa, P., Broznick, B., Fung, J.J., and Starzl, T. (1995). Experience with liver and kidney allografts from non-heart-beating donors. *Transplantation* 59, 197-203.

Delzenne, N.M., Hernaux, N.A., and Taper, H.S. (1997). A new model of acute liver steatosis induced in rats by fasting followed by refeeding a high carbohydrate-fat free diet. Biochemical and morphological analysis. *J Hepatol* *26*, 880-885.

Dietz, C., Ehret, F., Palmas, F., Vandergrift, L.A., Jiang, Y., Schmitt, V., Dufner, V., Habbel, P., Nowak, J., and Cheng, L.L. (2017). Applications of high-resolution magic angle spinning MRS in biomedical studies II-Human diseases. *NMR Biomed* *30*.

Evans, Z.P., Ellett, J.D., Fariss, M.W., Schnellmann, R.G., Schmidt, M.G., and Chavin, K. (2008). Vitamin E succinate reduces ischemia/reperfusion injury in steatotic livers. *Transplant Proc* *40*, 3327-3329.

Falasca, M., and Corda, D. (1994). Elevated levels and mitogenic activity of lysophosphatidylinositol in k-ras-transformed epithelial cells. *Eur J Biochem* *221*, 383-389.

Fondevila, M.F., Fernandez, U., Gonzalez-Rellan, M.J., Da Silva Lima, N., Buque, X.,

Gonzalez-Rodriguez, A., Alonso, C., Iruarrizaga-Lejarreta, M., Delgado, T.C., Varela-Rey, M., *et al.* (2021). The L-alpha-Lysophosphatidylinositol/G Protein-Coupled Receptor 55 System Induces the Development of Nonalcoholic Steatosis and Steatohepatitis. *Hepatology* 73, 606-624.

Ford, L.A., Roelofs, A.J., Anavi-Goffer, S., Mowat, L., Simpson, D.G., Irving, A.J., Rogers, M.J., Rajnicek, A.M., and Ross, R.A. (2010). A role for L-alpha-lysophosphatidylinositol and GPR55 in the modulation of migration, orientation and polarization of human breast cancer cells. *Br J Pharmacol* 160, 762-771.

Fukai, M., Hayashi, T., Yokota, R., Shimamura, T., Suzuki, T., Taniguchi, M., Matsushita, M., Furukawa, H., and Todo, S. (2005). Lipid peroxidation during ischemia depends on ischemia time in warm ischemia and reperfusion of rat liver. *Free Radic Biol Med* 38, 1372-1381.

Giordano, S., Zucchetti, M., Decio, A., Cesca, M., Fuso Nerini, I., Maiezza, M., Ferrari, M., Licandro, S.A., Frapolli, R., Giavazzi, R., *et al.* (2016). Heterogeneity of paclitaxel

distribution in different tumor models assessed by MALDI mass spectrometry imaging.

Sci Rep 6, 39284.

Gottin, L., and Taiana, M. (2020). Uncontrolled donation after circulatory death and liver transplantation: much still remains to be done. *Minerva Anestesiol* 86, 129-131.

Hayasaka, T., Goto-Inoue, N., Sugiura, Y., Zaima, N., Nakanishi, H., Ohishi, K., Nakanishi, S., Naito, T., Taguchi, R., and Setou, M. (2008). Matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight (MALDI-QIT-TOF)-based imaging mass spectrometry reveals a layered distribution of phospholipid molecular species in the mouse retina. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22, 3415-3426.

Hu, G., Ren, G., and Shi, Y. (2011). The putative cannabinoid receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation. *Oncogene* 30, 139-141.

Hui, A.M., Kawasaki, S., Makuuchi, M., Nakayama, J., Ikegami, T., and Miyagawa, S. (1994). Liver injury following normothermic ischemia in steatotic rat liver. *Hepatology*

20, 1287-1293.

Ishikawa, T., Shimada, S., Fukai, M., Kimura, T., Umemoto, K., Shibata, K., Fujiyoshi, M., Fujiyoshi, S., Hayasaka, T., Kawamura, N., *et al.* (2018). Post-reperfusion hydrogen gas treatment ameliorates ischemia reperfusion injury in rat livers from donors after cardiac death: a preliminary study. *Surg Today* 48, 1081-1088.

Jaeschke, H., and Lemasters, J.J. (2003). Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 125, 1246-1257.

Jaeschke, H., and Woolbright, B.L. (2012). Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. *Transplant Rev (Orlando)* 26, 103-114.

Kehrer, J.P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 23, 21-48.

Kim, J., Yin, T., Shinozaki, K., Lampe, J.W., and Becker, L.B. (2017). Potential of lysophosphatidylinositol as a prognostic indicator of cardiac arrest using a rat model. *Biomarkers* 22, 755-763.

Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., Ferrell, L.D., Liu, Y.C., Torbenson, M.S., Unalp-Arida, A., *et al.* (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41, 1313-1321.

Kuboki, M., Iino, S., Okuno, T., Omata, M., Kiyosawa, K., Kumada, H., Hayashi, N., and Sakai, T. (2007a). Peginterferon alpha-2a (40 KD) plus ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in Japanese patients. *J Gastroenterol Hepatol* 22, 645-652.

Kuboki, S., Schuster, R., Blanchard, J., Pritts, T.A., Wong, H.R., and Lentsch, A.B. (2007b). Role of heat shock protein 70 in hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G1141-1149.

Lentsch, A.B., Kato, A., Yoshidome, H., McMasters, K.M., and Edwards, M.J. (2000).

Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* *32*, 169-173.

Mariggio, S., Sebastia, J., Filippi, B.M., Iurisci, C., Volonte, C., Amadio, S., De Falco, V., Santoro, M., and Corda, D. (2006). A novel pathway of cell growth regulation mediated by a PLA2alpha-derived phosphoinositide metabolite. *FASEB J* *20*, 2567-2569.

Metz, S.A. (1986). Lysophosphatidylinositol, but not lysophosphatidic acid, stimulates insulin release. A possible role for phospholipase A2 but not de novo synthesis of lysophospholipid in pancreatic islet function. *Biochem Biophys Res Commun* *138*, 720-727.

Miyamura, N., Nakamura, T., Goto-Inoue, N., Zaima, N., Hayasaka, T., Yamasaki, T., Terai, S., Sakaida, I., Setou, M., and Nishina, H. (2011). Imaging mass spectrometry reveals characteristic changes in triglyceride and phospholipid species in regenerating mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun* *408*, 120-125.

Mollica, M.P., Lionetti, L., Putti, R., Cavaliere, G., Gaita, M., and Barletta, A. (2011). From chronic overfeeding to hepatic injury: role of endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21, 222-230.

Monbaliu, D., Pirenne, J., and Talbot, D. (2012). Liver transplantation using Donation after Cardiac Death donors. *J Hepatol* 56, 474-485.

Moreno-Navarrete, J.M., Catalan, V., Whyte, L., Diaz-Arteaga, A., Vazquez-Martinez, R., Rotellar, F., Guzman, R., Gomez-Ambrosi, J., Pulido, M.R., Russell, W.R., *et al.* (2012). The L-alpha-lysophosphatidylinositol/GPR55 system and its potential role in human obesity. *Diabetes* 61, 281-291.

Morita, Y., Sakaguchi, T., Ikegami, K., Goto-Inoue, N., Hayasaka, T., Hang, V.T., Tanaka, H., Harada, T., Shibasaki, Y., Suzuki, A., *et al.* (2013). Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression. *J Hepatol* 59, 292-299.

Murakami, M., Das, S., Kim, Y.J., Cho, W., and Kudo, I. (2003). Perinuclear localization of cytosolic phospholipase A(2)alpha is important but not obligatory for coupling with cyclooxygenases. *FEBS Lett* 546, 251-256.

Nestel, P.J., Khan, A.A., Straznicky, N.E., Mellett, N.A., Jayawardana, K., Mundra, P.A., Lambert, G.W., and Meikle, P.J. (2017). Markers of sympathetic nervous system activity associate with complex plasma lipids in metabolic syndrome subjects. *Atherosclerosis* 256, 21-28.

Newman, H.A., Gordesky, S.E., Hoppel, C., and Cooper, C. (1968). The action of digitonin on rat liver mitochondria. Phospholipid content. *Biochem J* 107, 381-385.

Ogata, K., Jin, M.B., Taniguchi, M., Suzuki, T., Shimamura, T., Kitagawa, N., Magata, S., Fukai, M., Ishikawa, H., Ono, T., *et al.* (2001). Attenuation of ischemia and reperfusion injury of canine livers by inhibition of type II phospholipase A2 with LY329722. *Transplantation* 71, 1040-1046.

Ohi, N., Nishikawa, Y., Tokairin, T., Yamamoto, Y., Doi, Y., Omori, Y., and Enomoto, K. (2006). Maintenance of Bad phosphorylation prevents apoptosis of rat hepatic sinusoidal endothelial cells in vitro and in vivo. *Am J Pathol* *168*, 1097-1106.

Oka, S., Kimura, S., Toshida, T., Ota, R., Yamashita, A., and Sugiura, T. (2010). Lysophosphatidylinositol induces rapid phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase and activating transcription factor 2 in HEK293 cells expressing GPR55 and IM-9 lymphoblastoid cells. *J Biochem* *147*, 671-678.

Oka, S., Toshida, T., Maruyama, K., Nakajima, K., Yamashita, A., and Sugiura, T. (2009). 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol: a possible natural ligand for GPR55. *J Biochem* *145*, 13-20.

Orman, E.S., Barritt, A.S.t., Wheeler, S.B., and Hayashi, P.H. (2013). Declining liver utilization for transplantation in the United States and the impact of donation after cardiac death. *Liver Transpl* *19*, 59-68.

Pringle, J.H. (1908). V. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. *Ann Surg* 48, 541-549.

Robertson-Gray, O.J., Walsh, S.K., Ryberg, E., Jonsson-Rylander, A.C., Lipina, C., and Wainwright, C.L. (2019). 1-alpha-Lysophosphatidylinositol (LPI) aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury via a GPR55/ROCK-dependent pathway. *Pharmacol Res Perspect* 7, e00487.

Shibata, K., Hayasaka, T., Hashimoto, S., Umemoto, K., Ishikawa, T., Sakamoto, S., Kato, K., Shimada, S., Kawamura, N., Wakayama, K., *et al.* (2020). Imaging Mass Spectrometry Reveals the Changes in the Taurine Conjugates of Dihydroxycholanoic Acid During Hepatic Warm Ischemia and Reperfusion in a Rat Model. *Transplant Proc* 52, 1880-1883.

Shimada, S., Fukai, M., Wakayama, K., Ishikawa, T., Kobayashi, N., Kimura, T., Yamashita, K., Kamiyama, T., Shimamura, T., Taketomi, A., *et al.* (2015). Hydrogen

sulfide augments survival signals in warm ischemia and reperfusion of the mouse liver.

Surg Today 45, 892-903.

Sutter, A.G., Palanisamy, A.P., Ellet, J.D., Schmidt, M.G., Schnellmann, R.G., and

Chavin, K.D. (2014). Intereukin-10 and Kupffer cells protect steatotic mice livers from

ischemia-reperfusion injury. *Eur Cytokine Netw* 25, 69-76.

Suzuki, S., Toledo-Pereyra, L.H., Rodriguez, F.J., and Cejalvo, D. (1993). Neutrophil

infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating

effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 55, 1265-1272.

Tahara, M., Nakayama, M., Jin, M.B., Fujita, M., Suzuki, T., Taniguchi, M., Shimamura,

T., Furukawa, H., and Todo, S. (2005). A radical scavenger, edaravone, protects canine

kidneys from ischemia-reperfusion injury after 72 hours of cold preservation and

autotransplantation. *Transplantation* 80, 213-221.

Takeda, K., Jin, M.B., Fujita, M., Fukai, M., Sakurai, T., Nakayama, M., Taniguchi, M.,

Suzuki, T., Shimamura, T., Furukawa, H., *et al.* (2003). A novel inhibitor of Rho-associated protein kinase, Y-27632, ameliorates hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. *Surgery* *133*, 197-206.

Tanaka, Y., Shimanaka, Y., Caddeo, A., Kubo, T., Mao, Y., Kubota, T., Kubota, N., Yamauchi, T., Mancina, R.M., Baselli, G., *et al.* (2021). LPIAT1/MBOAT7 depletion increases triglyceride synthesis fueled by high phosphatidylinositol turnover. *Gut* *70*, 180-193.

Thuong, M., Ruiz, A., Evrard, P., Kuiper, M., Boffa, C., Akhtar, M.Z., Neuberger, J., and Ploeg, R. (2016). New classification of donation after circulatory death donors definitions and terminology. *Transpl Int* *29*, 749-759.

Thurman, R.G., Ji, S., and Lemasters, J.J. (1984). Alcohol-induced liver injury. The role of oxygen. *Recent Dev Alcohol* *2*, 103-117.

Uchida, K., Shiraishi, M., Naito, Y., Torii, Y., Nakamura, Y., and Osawa, T. (1999).

Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J Biol Chem* *274*, 2234-2242.

Wakayama, K., Fukai, M., Yamashita, K., Kimura, T., Hirokata, G., Shibasaki, S., Fukumori, D., Haga, S., Sugawara, M., Suzuki, T., *et al.* (2012). Successful transplantation of rat hearts subjected to extended cold preservation with a novel preservation solution. *Transpl Int* *25*, 696-706.

Wang, H.Y., Wu, H.W., Tsai, P.J., and Liu, C.B. (2012). MALDI-mass spectrometry imaging of desalted rat brain sections reveals ischemia-mediated changes of lipids. *Anal Bioanal Chem* *404*, 113-124.

Yokota, R., Fukai, M., Shimamura, T., Suzuki, T., Watanabe, Y., Nagashima, K., Kishida, A., Furukawa, H., Hayashi, T., and Todo, S. (2000). A novel hydroxyl radical scavenger, nicaraven, protects the liver from warm ischemia and reperfusion injury. *Surgery* *127*, 661-669.

Yurtkap, Y., van Rooijen, M.M.J., Roels, S., Bosmans, J.M.L., Uyttebroek, O., Lange, J.F., and Berrevoet, F. (2021). Implementing preoperative Botulinum toxin A and progressive pneumoperitoneum through the use of an algorithm in giant ventral hernia repair. *Hernia* 25, 389-398.