



Title	肝再生機構におけるDiacylglycerol kinaseの機能解析
Author(s)	中本, 裕紀
Description	配架番号 : 2940
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16549号
Issue Date	2025-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16549
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95987
Type	doctoral thesis
File Information	NAKAMOTO_Hiroki.pdf



学 位 論 文

肝再生機構における

Diacylglycerol kinase の機能解析

(Studies of diacylglycerol kinase in liver
regeneration mechanism)

2025 年 6 月

北海道大学

中本 裕紀

学 位 論 文

肝再生機構における

Diacylglycerol kinase の機能解析

(Studies of diacylglycerol kinase in liver
regeneration mechanism)

2025 年 6 月

北海道大学

中本 裕紀

目次

発表論文目録および学会発表目録.....	1 頁
要旨.....	2 頁
略語表	5 頁
緒言.....	7 頁
方法.....	9 頁
結果.....	12 頁
考察.....	40 頁
結論.....	45 頁
謝辞.....	47 頁
利益相反	48 頁
引用文献	49 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として発表した

Hiroki Nakamoto, Shunsuke Shichi, Chisato Shirakawa, Takuto Suzuki, Hidemitsu Kitamura, Akinobu Taketomi

Diacylglycerol kinase alpha regulates post-hepatectomy liver regeneration
Scientific Reports. 2025 Jan 2; 15(1): 555.

本研究の一部は以下の学会に発表した

肝再生分子機構における DGK の新しい機能解析

中本裕紀、鈴木琢士、白川智沙斗、志智俊介、長津明久、折茂達也、柿坂達彦、北村秀光、武富紹信

第 124 回 日本外科学会定期学術集会 名古屋 2024 年 4 月 18 日-20 日

要旨

【背景と目的】

肝腫瘍に対して肝切除術を行う際、腫瘍の局在・体積によっては切除限界を超える切除量を必要とする場合があるが、このような症例に対しては致死性肝不全回避のため門脈塞栓術や肝離断を加えた二次的肝切除(ALPPS)など肝再生を前提とした治療法が行われている。しかし、これらの治療を用いても十分に残肝体積の増大が得られない例もあり、新しい肝再生治療戦略が求められる。当教室では悪性腫瘍の増殖・進展における DGK α の関与について研究を行ってきたが、その細胞内機能から DGK α は肝再生にも関与することが予想される。本研究は肝再生機構における DGK α の関連性を検討し、そのメカニズムを解明するとともに新しい肝再生治療開発に資する科学的エビデンスを構築することを目的として計画した。

【方法】

C57BL/6 雄性野生型マウスおよび雄性 DGK α KO マウス8～12 週齢を使用し、古典的な肝部分切除(PH)モデルである Higgins&Anderson モデルに習い、マウス肝臓の中葉・左葉を切除する 70%PH を施行した。野生型マウスでの DGK α 分子の動態、また両者のマウスでの生存率、肝再生率、血液検査データ、組織学的所見の比較・解析を行った。肝 total lysate 組織での定量 PCR・ウエスタンブロットを行い、各種 mRNA・蛋白発現状況の解析を行った。またクロマトグラフィで肝ホモジナイズ組織の ATP・AMP・ADP を測定し Energy Charge を算出した。肝組織を phalloidin 蛍光免疫染色による細胞骨格染色を行い 70%PH 後の細胞肥大について検討を行った。死亡原因の検索として血清エンドトキシン濃度を測定し比較・検討を行い、肺組織についても観察を行った。DGK α KO マウスに抗酸化物質ビタミン C 投与下で 70%PH を施行し、死亡率や肝再生率が改善されるか検討を行った。さらには in vitro の検討として、マウス耳組織から Fibroblast を初代培養し、増殖刺激下での肝再生関連 mRNA 群の変化・動態について解析を行った。

【結果】

70%PH モデルは learning curve が十分に安定し、野生型マウスにおいて既報の 70%PH 後肝再生率曲線の再現性を確認した後に各種解析に進んだ。野生型マウスでは、70% PH 後に DGK α mRNA 発現量は一時的に低下し、肝再生が完了する day7 に向けて回復した。DGK α KO マウスを用いた検討では、70%PH 後 day7 までに約 40%の高い死亡率を示し、肝再生率は野生型マウスに比べ低く、高肝胆道系酵素、低アルブミン血症と関連していた。また DGK α KO マウスは 70%PH 後 PAS 染色でグリコーゲン貯留およびインスリン抵抗性の増大を認めた。HE 染色像で小滴性脂肪滴沈着像を認め、小滴性脂肪滴を強く認める個体は高肝胆道系酵素、低アルブミン血症と関連していた。定量 PCR では脂質消費遺伝子群の mRNA 低下を認め脂質利用障害が

示唆された。クロマトグラフィによる解析では DGK α KO マウスで有意に Energy Charge 低下を認め死亡原因の一つと推察された。また DGK α KO マウスは 70%PH 後に酸化ストレスマーカー貯留像を認め肝再生過程において非代償状態となっている可能性が示唆された。Phalloidin 蛍光免疫染色による細胞骨格染色では DGK α KO マウスは PH 後に肝細胞肥大障害を認め、グリコーゲン・脂質消費障害の一因と考えられた。細胞肥大障害の原因を検索したところ、サイクリン D の mRNA・蛋白発現が低下しており、細胞肥大障害の原因と考えられた。サイクリン D の上流カスケードである mTORC1 や ERK シグナル分子は免疫染色やウエスタンブロットによる解析において活性が亢進していた。血清エンドトキシン濃度を測定すると DGK α KO マウスにおいて陽性率が高く、死亡原因の一つとして高エンドトキシン血症が挙げられた。肺組織は DGK α KO マウスにおいて肉眼的に出血を疑う赤色斑を認め、組織染色では細気管支内に出血を示唆する赤血球凝集像を認めた。ビタミン C 併用下での DGK α KO マウスへの 70%PH では、非投与群に比して死亡率のさらなる上昇を認め、低肝再生率や低アルブミン血症を認めた。抗酸化ストレスマーカーは非投与群に比してさらなる増大を認めた。Fibroblast への FBS 刺激実験では、野生型マウス・DGK α KO マウス由来の細胞群間において cyclinD1、p21、PCNA などの細胞周期関連マーカーの mRNA 量に有意差は認めなかった。

【考察】

Lutkewitte らはマウスへのアセトアミノフェン投与による肝障害モデルにおいて、PA の増加と DGK α mRNA 発現低下を認めたと報告しており、野生型マウスにおける 70%PH 後の DGK α mRNA 低下は蛋白質レベルでの活性化亢進によるネガティブフィードバックの可能性が想起された。また Nakatani らはウサギに対して 70%PH を施行し、エネルギーチャージ低下のピーク時に最も個体死亡が顕著になることを報告している。本研究においても DGK α KO マウスで 70%PH 後に Energy charge が有意に低下しており、個体死亡の一因で推察された。野生型マウスでは PH 後 16h 程まではグリコーゲンをエネルギー源として消費し、その後は必要であれば脂質消費にスイッチし肝再生に必須なエネルギーを供給している。本研究では DGK α KO マウスにおいてグリコーゲン・脂質消費障害を示す所見を認め、Energy Charge 低下の原因となっていると思われた。肝細胞肥大は肝再生過程において最も初期に起きる急性応答動態であるが、DGK α KO マウスでは 70%PH 後に有意に平均細胞面積が低下しており細胞肥大障害が示唆され、この細胞肥大障害がエネルギー産生障害と関連している可能性が考えられた。さらに、細胞肥大障害の原因としてサイクリン D の発現低下が関連しているものと推察された。サイクリン D の上流に位置し、DGK による産生産物である PA の結合部位を持ち、正に細胞周期を制御する mTORC は免疫染色において DGK α KO マウスで活性化を示唆する所見を認め、サイクリン D 発現低下によるネガティブフィードバックが示唆された。今後 DGK α とサイクリン D 発現についての関連性

を in vivo、in vitro 両面において詳細に解析・研究していくことが望ましいと考える。

【結論】

DGK α KO マウスにおいて 70%PH 後に各肝再生過程の遅延・障害を示す所見を認め、また高死亡率を示したことから、DGK α は肝再生過程において個体存続に必要なレベルで重要な分子であることが示唆された。DGK α KO マウスでは 70%PH 後に肝細胞肥大障害を生じ、Energy Charge 低下の原因と成り得るグリコーゲン・脂質利用障害の所見を認めた。細胞肥大障害の主要な原因としてはサイクリン D 発現低下が考えられ、その詳細な関連性については今後の詳細な解析・研究が必要である。

略語表

略語: 正式名称

4EBP1:	eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
4-HNE:	4-hydroxynonenal
Acaca:	acetyl-CoA carboxylase
ACAD:	acyl-CoA dehydrogenase
ACSL:	long-chain acyl-CoA synthetase
ACSM:	middle-chain acyl-CoA synthetase
ACSS:	short-chain acyl-CoA synthetase
ADP:	adenosine diphosphate
AGPAT1:	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1
Alb:	albumin
ALP:	alkaline phosphatase
ALT:	alanine aminotransferase
AMP:	adenosine monophosphate
AST:	aspartate aminotransferase
ATF4:	activating transcription factor 4
ATF6:	activating transcription factor 6
ATP:	adenosine triphosphate
C/EBP:	CCAAT enhancer binding protein
CACT:	carnitine-acylcarnitine translocase
CHOP:	C/EBP-homologous protein
CPT1a:	carnitine palmitoyl transferase 1A
D-bil:	direct bilirubin
DG:	diacylglycerol
DGK α :	diacylglycerol kinase alpha
eIF4E:	eukaryotic translation initiation factor 4E
eNOS:	endothelial nitric oxide synthase
ERK:	extracellular signal-regulated kinase
Fasn:	fatty acid synthase
FBS:	fetal bovine serum
FLR/BW:	future liver remnant / body weight
GPAT:	G3P acyltransferase
Hadha:	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit alpha
Hadhb:	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex

	subunit beta
HDL-cho:	high density lipoprotein cholesterol
HE:	hematoxylin eosin
HOMA-IR:	homeostatic model assessment of beta cell function
iNOS:	inducible nitric oxide synthase
KO:	knock out
LDL-cho:	low density lipoprotein cholesterol
LPA:	lysophosphatidic acid
MCAD:	middle-chain acyl-CoA dehydrogenase
MEK:	mitogen-activated protein kinase
MMP9:	matrix metalloproteinase-9
MPO:	myeloperoxidase
mTORC:	mammalian target of rapamycin
nNOS:	neuronal nitric oxide synthase
NRF2:	nuclear actor erythroid-derived 2
OCT:	optimal cutting temperature
PA:	phosphatidic acid
PAS:	periodic acid schiff
PC:	phosphatidylcholine
PCNA:	proliferating cell nuclear antigen
PCR:	polymerase chain reaction
PH:	partial hepatectomy
PKC:	protein kinase C
PLD1:	phospholipase D1
Raf:	rapidly accelerated fibrosarcoma
S6K1:	ribosomal protein S6 kinase
SCAD:	short-chain acyl-CoA dehydrogenase
Scd1:	stearoyl-CoA desaturase 1
TBA:	total bile acid
TG:	triglyceride
TRAS:	transient regeneration-associated steatosis
TUNEL:	terminal transferase dUTP nick end labeling
α SMA:	alpha-smooth muscle actin

緒言

肝腫瘍に対して肝切除術を行う際、腫瘍の局在・体積によっては切除限界を超える切除量を必要とする場合があるが、このような症例に対しては致死性肝不全回避のため門脈塞栓術や肝離断を加えた二期的肝切除(ALPPS)など肝再生を前提とした治療法が行われる。しかし、これらの治療を用いても十分に残肝体積の増大が得られない例もあり、新しい肝再生治療戦略が求められる。

肝切除後の肝再生は様々な肝構成細胞が数多くのシグナルを介して展開される。肝切除後は残存肝への門脈血流再分布により類洞内皮細胞がせん断応力増加を検知し、クッパー細胞・星状細胞を介し、最終的に肝再生の主要構成細胞である肝細胞へとシグナルが伝達される。肝細胞は細胞表面に hepatocyte growth factor (HGF) receptor を持ち、細胞内で RAS/MAPK pathway を中心にシグナル伝達され、mammalian target of rapamycin (mTORC)等を介して細胞周期が正に制御される(Clavien et al. 2007)。肝再生過程にはエネルギー産生・供給が必要不可欠であり、肝切除後早期はグリコーゲンが消費され、切除境界に近い肝切除などのグリコーゲン消費のみではエネルギー供給が不十分な場合、脂質を肝組織以外から動員・蓄積し、二次的エネルギー源として消費する(Kachaylo E et al. 2017)。

今回我々は細胞シグナル伝達の重要な調節因子の一つである DGK に着目した。DGK は細胞膜上の脂質メディエーターである基質 DAG をリン酸化して、PA を産生するキナーゼである。DGK はセカンドメッセンジャーである DAG、PA を制御して細胞内の情報伝達に重要な役割を果たす。DGK は 10 種類のアイソザイムから構成され、構造により type I ~ V に分類される。Protein kinase C (PKC)は、DGK の基質 DAG や産生物 PA を結合部位に持ち、RAS/MAPK pathway を含め様々な細胞内 pathway に関連していることが報告されている(Merida I et al. 2019)。DGK I 型アイソザイムに分類される DGK α (アルファ)は、肝細胞がんにおいて同 MAPK pathway を介して肝細胞がんの増殖・生存を調節する上流因子であることが報告されている(Takeishi et al)。また当教室において Okada et al は、肝細胞がん細胞株に対して DGK α 阻害薬投与により増殖・viability 抑制効果を認め、また経門脈的に肝細胞がん細胞株を肝に生着させた肝転移モデルにおける検討で DGK α 阻害により T 細胞を含めた抗腫瘍免疫活性化を認めたと報告した。このように DGK α 阻害は肝細胞がんに対して①腫瘍増殖抑制、②腫瘍免疫亢進を期待できる双方向性の次世代がん治療法と成り得ると報告している(Okada N et al. 2022)。このように DGK α は悪性腫瘍での組織増殖に関与しており、また肝切除後の肝再生過程においても増殖刺激が必須の行程であることから、DGK α が肝再生過程においても細胞増殖・生存に関与している可能性を想起した。マウスに 70%肝部分切除(PH)を施行し、DGK α の肝再生過程への関連性を詳細に検討して、肝再生における新たな分子制御メカニズムを明らかにすれば、肝再生を

基軸とした肝切除治療の適切な治療判断、適応拡大、安全性向上に資すると考え、
本構想の計画に至った。

方法

マウス

C57BL/6 雄性野生型マウス(日本チャールス・リバー、日本、神奈川)および雄性 DGK α KO マウス(山形大学、日本)は、昼夜 12 時間サイクル、餌と水への自由アクセス、病原体フリー条件下で飼育された。マウスは 8-12 週齢を使用した。すべてのマウス実験は、北海道大学動物倫理委員会(No.19-0036、No.22-0015)の承認を受け、安楽死・犠牲死はイソフルラン麻酔下で頸椎脱臼により行った。本研究で実施された動物実験は「北海道大学動物実験に関する規程」に則って、適切に行われた。DGK α KO マウスは定期的に KO 状態を遺伝子学的に確認を行った。

マウス手技

麻酔はイソフルラン吸入(2%~4%)および塩酸キシラジン(0.2%、10mg/kg)の腹腔内投与により施行・維持した。麻酔深度は臨床パラメータ(呼吸数と深さ、粘膜と内臓の色調、運動、反射)によってモニターした。手術後、動物は完全に意識が戻るまで別のケージ内において加温し回復させた。マウス 70%PH モデルは、肝臓の 3 分の 2 を外科的に切除した。すべての肝切除は午前 8 時から午前 12 時に施行した。血清インスリン値は、インスリン ELISA キット(森永製菓、東京、日本)を用いて測定した。HOMA-IR は以下のように計算した： $(\text{血清血糖値} \times \text{血清インスリン濃度}) \div 405$ 。HOMA-IR 測定を行ったマウスは、70%PH の前に 1 日間絶食させた。ビタミン C(富士フイルム和光、大阪、日本)は、70%PH の前日から 1 日 1 回犠牲死の日まで 500mg/kg を腹腔内投与した。

肝再生率

肝臓再生率は体重(g)に対する残肝重量(g)の比を用いた。体重は犠牲死を行う直前の体重を用いた。

クロマトグラフィ

エネルギーチャージは生体細胞のエネルギー状態を測定するための指標である。Atkinson らが 1967 年に提唱した概念であり、Atkinson らは代謝におけるエネルギー状態把握のためには、ATP・ADP のみならず、AMP を含めた 3 つのヌクレオチド濃度を考慮する必要があることを報告した (Atkinson et al. J Biol Chem. 1969)。エネルギーチャージ算出のため ATP・ADP・AMP をクロマトグラフィ法により測定を試みた。肝臓組織は摘出後直ちに液体窒素で凍結した。肝臓サンプル(50 mg)を 0.4 M 過塩素酸でホモジナイズし、上清を 0.5M 炭酸カリウム($\leq$ pH7.4)で中和した。沈殿物を除去し、0.2M 酢酸緩衝液を加えて pH を維持し、0.47 μ m のフィルターに通した後、Gastorr BG-42 脱気装置(フロム株式会社、東京、日本)、L-7100 ポンプ(株式会社

ハイテック、東京、日本)、モデル 234 オートインジェクター(ギルソン社、ミドルトン、ウィスコンシン州、米国)、ATC-10 カラムオープン(エイコム社、京都、日本)、NOD-10 UV 検出器(エイコム社)で構成される HPLC システムにロードした。移動相はメチルアルコール非含有 0.2M リン酸二水素アンモニウムで、流速は 0.7mL/分とした。注入量は 25 μ L/サンプルとした。ATP、ADP、AMP 濃度は、各実験でそれぞれの二ナトリウム塩水和物(シグマ、川崎、日本)の純粋溶液を用いて作成した検量線から算出した。エネルギーチャージは、(ATP + ADP + AMP)に対する(ATP + 0.5 $\times$ ADP)の比として計算した。

組織染色

ホルマリン固定、パラフィン包埋肝切片を HE 染色、PAS 染色、各免疫染色に使用した。OCT コンパウンド(サクラファインテックジャパン株式会社、東京、日本)と液体窒素を用いて作製した凍結切片を Phalloidin 染色に使用した。陽性染色率、陽性面積は ImageJ (バージョン 1.53)を用いて算出した。TUNEL 染色は In Situ Cell Death Detection Kit, peroxidase (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland)を用いて行った。

PCR

肝臓組織サンプル(50 mg)から ISOGEN(株式会社ニッポンジーン、東京、日本)を用いて全 RNA を抽出した。Revertra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO, 大阪、日本)を用いて cDNA を作成した後、Step OnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)を用いて qPCR 増幅とデータ解析を行った。サンプルシグナルは、 $\Delta \Delta C_t$ 法を用いて解析した。コントロール遺伝子はアクチン β を用いた。実験に使用したプライマー配列リストを別紙に添付する。

Western blotting

50mg の肝組織サンプルから全細胞溶解物を抽出した。細断した肝臓サンプルを Collagenase type I (富士フイルム和光、大阪、日本)で 25°C、30 分間インキュベートし、70 μ m のセルストレーナー(SPL Life Sciences、京畿道、韓国)でろ過した。赤血球は RBC lysis buffer (Tonbo BioSciences, San Diego, CA, USA)を用いて除去した。細胞融解には、溶解バッファー(25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA 2Na, 5 mM NaF, 5 mM sodium orthovanadate, 0.5% Nonidet P-40)とプロテアーゼ阻害剤カクテル(Sigma-Aldrich)を用いた。タンパク質サンプル(10 μ g)を溶解バッファーと 4 $\times$ Laemmli サンプルバッファー(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)で希釈し、5 分間煮沸し、Mini-PROTEAN TGX ゲル電気泳動(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)で分離し、ポリフッ化ビニリデン膜に転写し、

5%BSA を添加した 1×TBS-T を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。その後、メンブレンを 4℃で一晩一次抗体とインキュベートし、続いて抗ウサギおよびマウス IgG (1:5000 希釈) 二次抗体と室温で 1 時間インキュベートした。タンパク質のバンドは、ChemiDoc XRS+システム (Bio-Rad) と SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific) を用いて可視化し、Image Lab Software (Bio-Rad) を用いて解析・定量した。Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific) を用いて結合抗体を除去した後、再度ブロッキング・抗体インキュベート行程へ入った。

Fibroblast 初代培養実験

RPMI 溶液(10%FBS、50 μ M 2-メルカプトエタノール、2mM グルタミン、1%ペニシリン-ストレプトマイシン含有)を用意した。マウスの耳を 1cm 角に裁断し 70%エタノール溶液に 5 分間浸軟した。その後取り出して 5 分間乾燥させた後、細かく裁断し RPMI 溶液に浸した。コラゲナーゼ D 溶液(コラゲナーゼ D((Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland))10mg+RPMI 溶液 4ml) 1.8ml に置換し 200rpm、90 分、37℃で水平振盪した。その後 70 μ m cell strainer で 5 分以上かけてシリンジプランジャーで加圧・濾過し、7 分、580g、4 分遠心分離した。上澄みを捨て 10ml RPMI 溶液を加え再度同条件で遠心分離を行った。上澄みを捨て 10ml RPMI および 10 μ l アムホテリシン B を加え、37℃、5% CO₂ で 3-4 日培養を行った。70%程度の範囲に増殖を認めたら PBS で洗浄し、2ml トリプシン-EDTA 溶液を加え、37℃、5% CO₂ で 5 分インキュベートした。5 分後にタッピングし 6ml RPMI 溶液を加え、5 分、450g、℃で遠心分離した。上澄みを捨て、5ml RPMI 溶液を加えた後に 2×10⁵個の細胞を 10cm 細胞培養用 dish に加え再培養を行った。定量 PCR での実験では 10cm 細胞培養用 dish に 2×10⁵個の細胞を加え、FBS 含有培地で 3 日間インキュベート行い、その後 FBS 抜き培地で 1 日間培養し、その後 FBS 含有培地に再度変更し、3h、6h 後の各種遺伝子を解析した。

統計学的解析

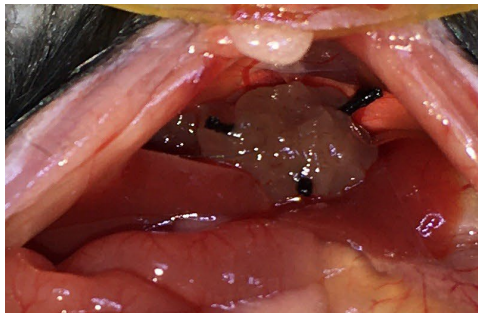
群間の差は Mann-Whitney U 検定を用いて評価した。2 つのカテゴリ変数の解析にはカイ二乗検定を用いた。統計的有意水準は P<0.05 とした。統計解析は Prism 4.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA) を用いて行った。

結果

1. マウス 70%肝切除モデルの作成

肝再生モデルとして Higgins&Anderson モデルに習いマウス中葉・左葉を切除する 70%PH モデルを構築した(Higgins et al. 1931)。PH 後の写真を供覧する(図 1. A)。実験条件を揃えるため手術時間、手技の安定した 30 例目以降からの 70%PH を解析対象とし(図 1. B)、既報の肝再生曲線(図 1. C)と同様の肝再生曲線となることを確認した(図 1. D)。

図1
A



マウス手術時間

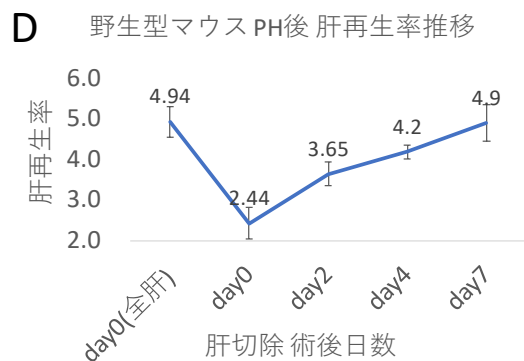
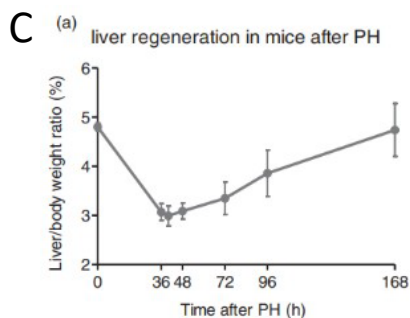
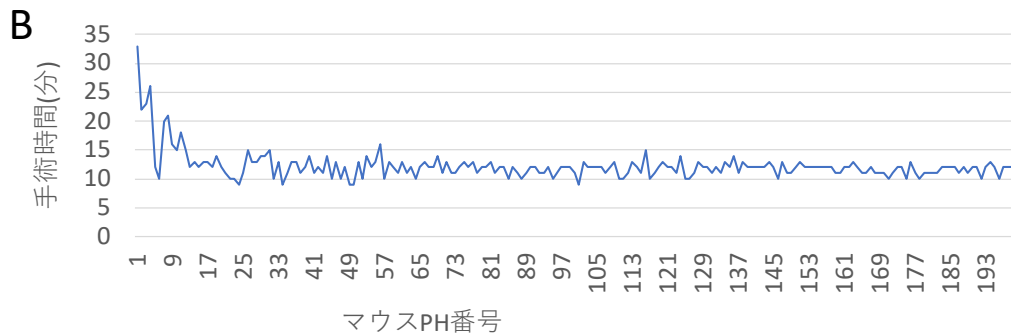


図1. マウス肝切除モデルの確立

- A. 70%PH後 残存肝写真
- B. マウスPH番号と手術時間の推移
- C. Nevzorova らの野生型マウスPH後 肝再生率推移
- D. 本研究での野生型マウスPH後 肝再生率推移

2. 野生型モデルでの DGK α の動態

野生型マウスでの DGK α 分子の動態を解析した。定量 PCR で 70%PH 後 DGK α mRNA を解析したところ、肝切除早期に mRNA 発現が低下し、肝再生が完了する day7 に向けて mRNA 発現量の回復を認めた(図 2)

図2

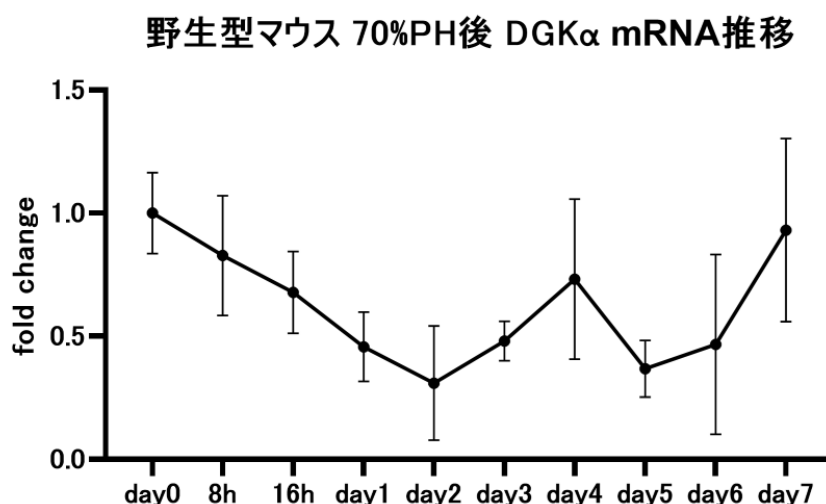


図2. 野生型マウスでの肝切除後 DGK α mRNA推移

3. 70%PH 後の生存率、肝再生率、血液検査データに関する検討

DGK α KO マウスを用いて各種解析を行った。PA を産生する経路には DG 由来で DGK 変換による経路、LPA 由来で LPAAT 変換(AGPAT ファミリー)による経路、PC 由来で PLD 変換による経路がある(Foster et al. 2014)。Lutkewitte AJ らはマウス肝障害モデルにおいて PA 産生分子の mRNA 発現低下を報告し(Lutkewitte AJ, et al. 2018)、PA 産生分子の蛋白レベルでの活性化亢進のネガティブフィードバックの可能性が考えられた。DGK α KO マウスでは、野生型マウスに比して PA 供給のため DGK 以外の PA 産生分子が代償作用としてより強い活性化を生じ、mRNA 発現がより低下している可能性を想起した。定量 PCR では PH 後 PLD1、AGPAT1 発現量がそれぞれ DGK α KO マウスで野生型マウスに比して有意に低下を認めた(図 3)。実験前の予想と同様に DGK α KO マウスでは野生型に比して 70%PH 後に PLD、AGPAT の有意な mRNA 低下を認め、蛋白レベルでのより強い活性化の可能性が示唆された。

図3

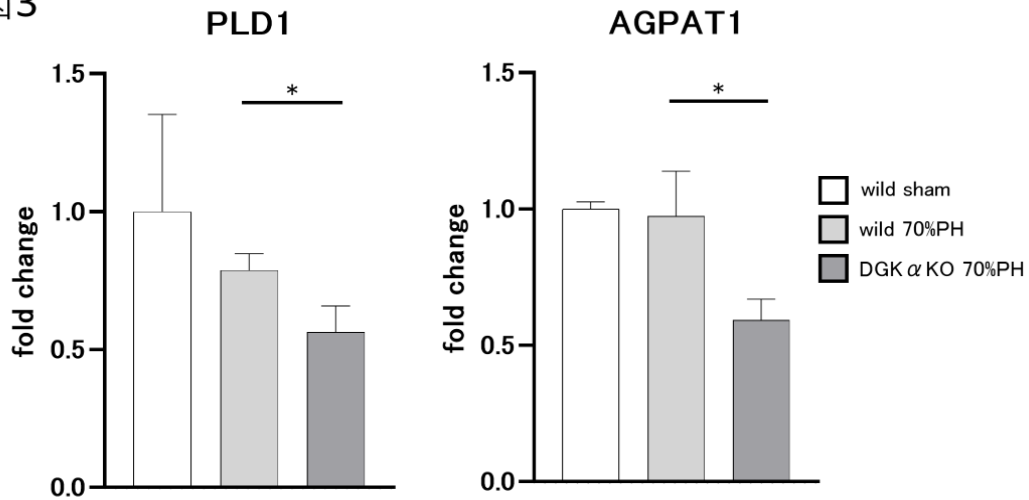


図3. 肝切除後のPA産生因子のmRNA推移

70%PH 後の生存率について検討したところ、DGKα KO マウスは PH 後 day1 から個体死亡を認め、肝再生が完了する day7 までに約 40%の個体死亡を認めた(図 4)。

図4

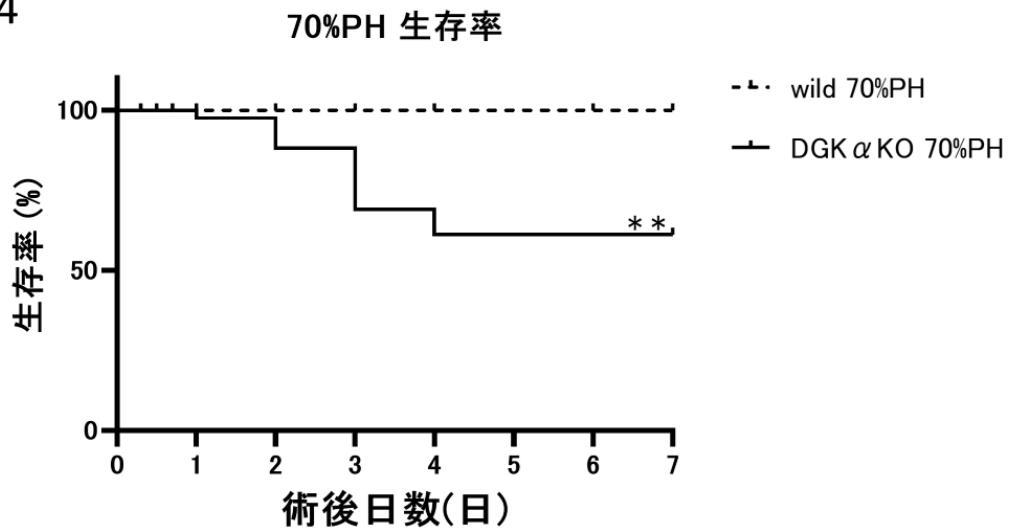


図4. 70%PH後 生存率の比較

野生型(点線)と DGKαKO mice(実線)、**P<0.01

70%PH 後の肝再生率を検討した。day0 において 2 群間で有意差は認めなかった。day2、day4 で有意に DGKα KO マウスの肝再生率が低い結果となった(図 5)。

図5

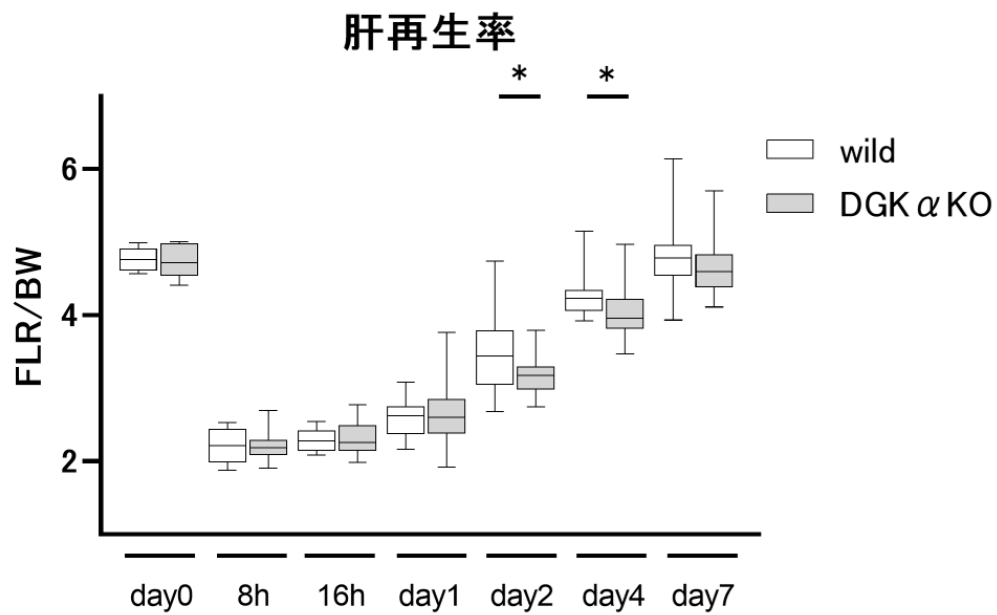


図5. 70%PH後 肝再生率の比較

*P<0.05

70%PH 後の血液検査データを検討したところ、ALP、ALT、AST、D-bil、TBA、TG、HDL-cho、LDL-cho において DGK α KO マウスで PH 後に有意に高値である時相が存在した。黄疸発生率についても DGK α KO マウスで発生率が有意に高値であった。Alb は DGK α KO マウスで PH 後に有意に低値である時相が存在した(図 6)。

図6

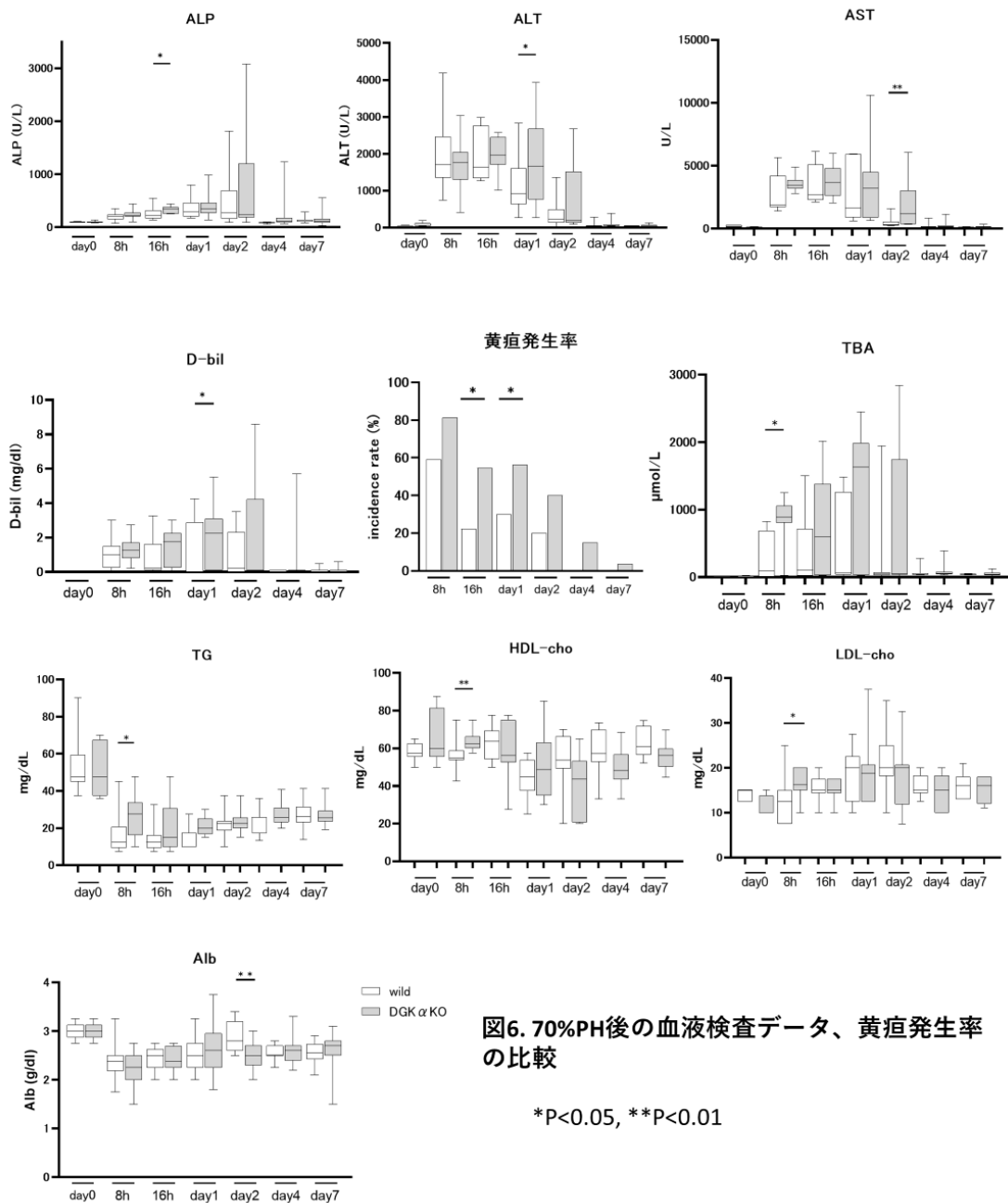


図6. 70%PH後の血液検査データ、黄疸発生率の比較

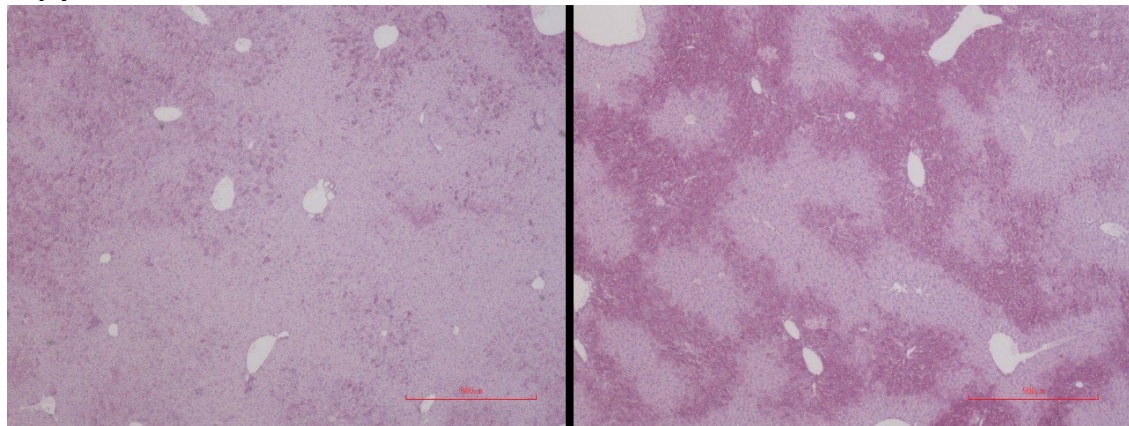
* $P<0.05$, ** $P<0.01$

4. 70%PH 後のグリコーゲン、脂質消費に関する検討

マウス 70%PH 後の肝再生後の主要なエネルギー源としてグリコーゲン・脂質が報告されており解析を試みた(Kachaylo et al. 2017)。70%PH 8h 後のマウス肝組織 PAS 染色像で DGK α KO マウスでより強い PAS 陽性像を認めた(図 7. A)。染色陽性率は DGK α KO マウスで有意に高値であった(図 7. B)。

図7

A



wild × 40

DGKαKO × 40

B

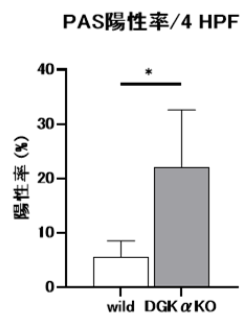


図7. 70%PH後のグリコーゲン動態

A. 70%PH除 8h後のPAS染色像

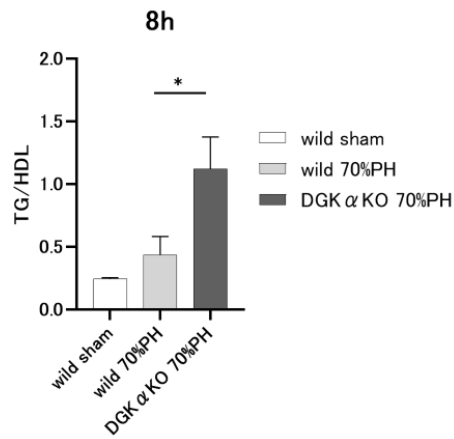
B. 4強拡大視野でのPAS染色陽性面積割合の比較

*P<0.05

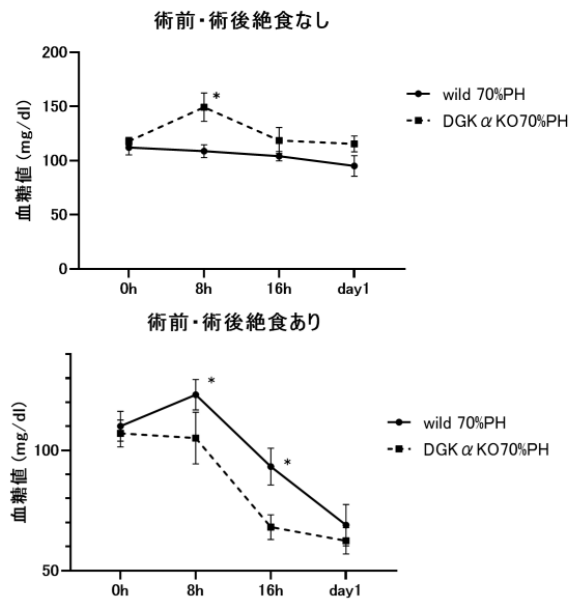
インスリン抵抗性の検討では、TG/HDL 比が HOMA-IR と同等のインスリン抵抗性の指標と成り得ることが報告されており(Takashima et al. 2010)、同比は 70%PH 8h 後解析において DGK α KO マウスで有意に高値であった(図 8. A)。血糖値は術前絶食状態でない DGK α KO マウスで有意に高値、逆に術前絶食状態である DGK α KO マウスで有意に低値であり、DGK α KO マウスの 70%PH 後のインスリン抵抗性の上昇が示唆された(図 8. B)。HOMA-IR を測定したところ、DGK α KO マウスで高い傾向にあったが 2 群間で有意差は認めなかった(図 8. C)。

図8

A



B



C

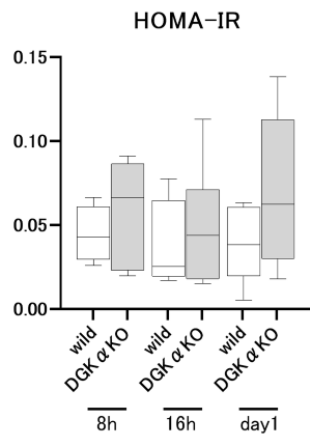


図8. 70%PH後 インスリン抵抗性の検討

- A. 70%PH後 8h後のTG/HDL比の比較
 B. 70%PH後の血糖値の変動。術前絶食なし (上段)および術前絶食あり(下段)
 C. 70%PH後 HOMA-IRの比較
 *P<0.05

グリコーゲン消費に関連する分子群について定量 PCR で mRNA 発現を分析したが、2 群間で有意差を認める項目は認めなかった(図 9)。

図9

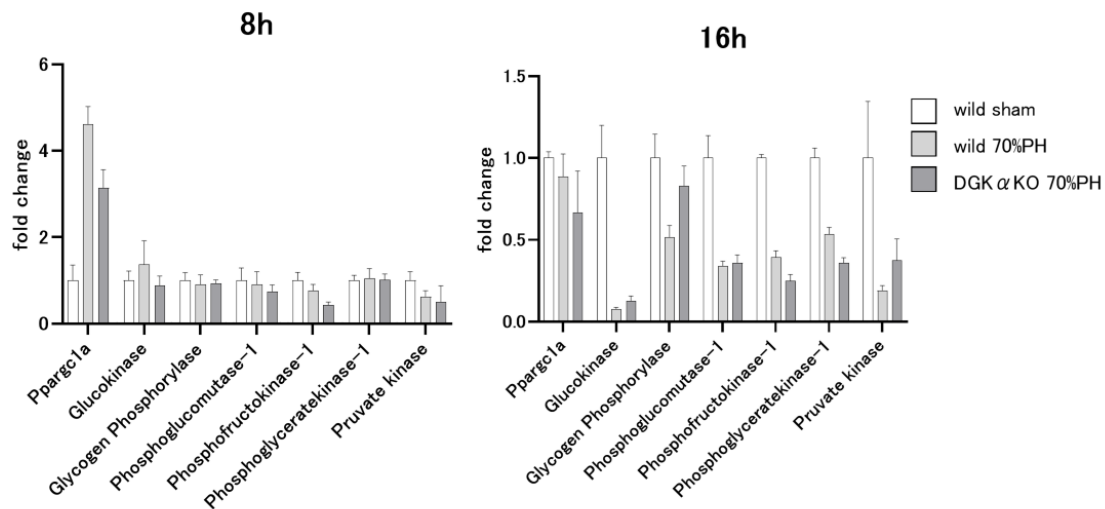


図9. グリコーゲン消費に関連する遺伝子群の定量PCR

続いて脂質貯留・消費に関して検討を行った。day0 において2群間で肝マクロ所見、HE 染色像に有意な差は認めなかった。70%PH 24h 後の摘出肝は DGKα KO マウスで肉眼的に脂肪沈着を示唆する黄色変化を認める傾向にあった(図 10)。

図10

A

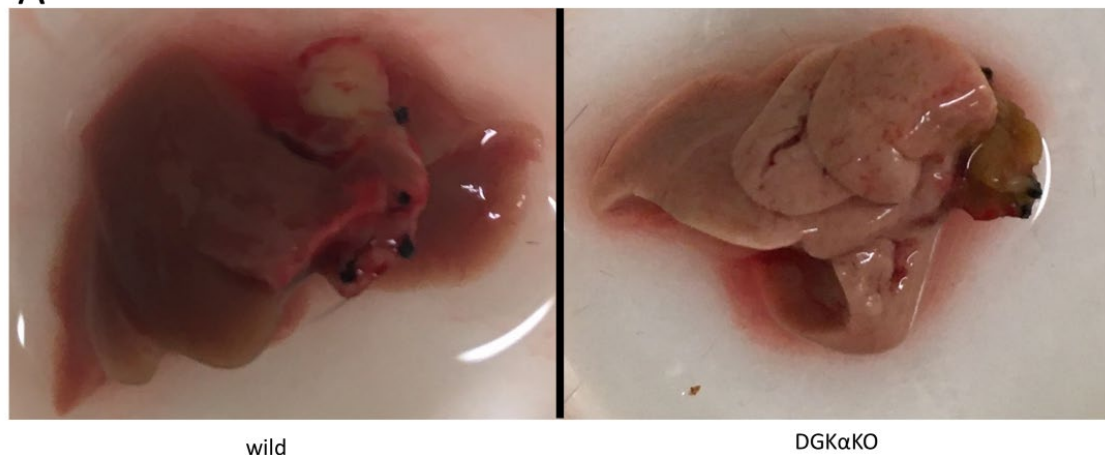


図10. 70%PH後 脂肪沈着像の検討

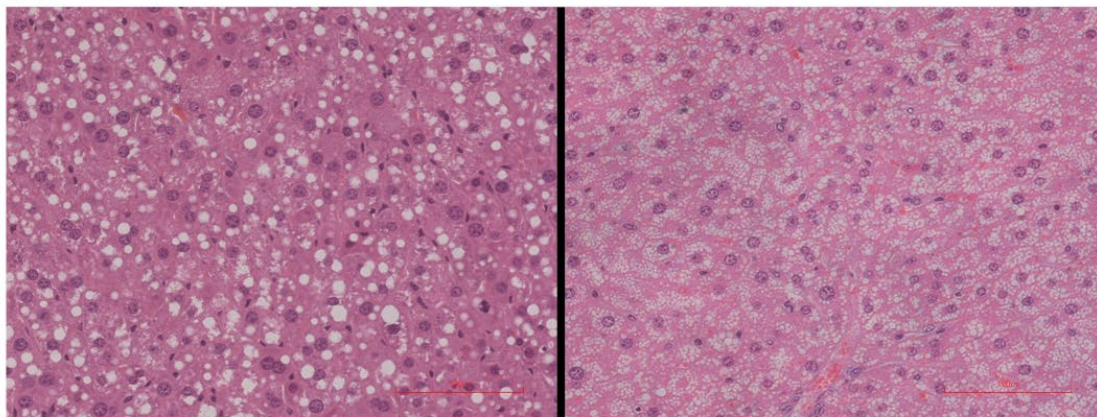
70%PH 24h後 摘出肝マクロ写真

PH 後に肝再生過程におけるエネルギー源として、肝切除早期に脂肪滴沈着を認めることが報告されている(Kachaylo et al. 2017)。70%PH 後に HE 染色を観察すると、野生型マウスで大滴性脂肪滴沈着を、DGKα KO マウスで小滴性脂肪滴沈着を認める傾向にあった(図 11. A)。Oil Red O 染色で脂肪滴を染色すると、DGKα KO マウス

で染色陽性面積が有意に高値であった(図 11. B, C)。

図11

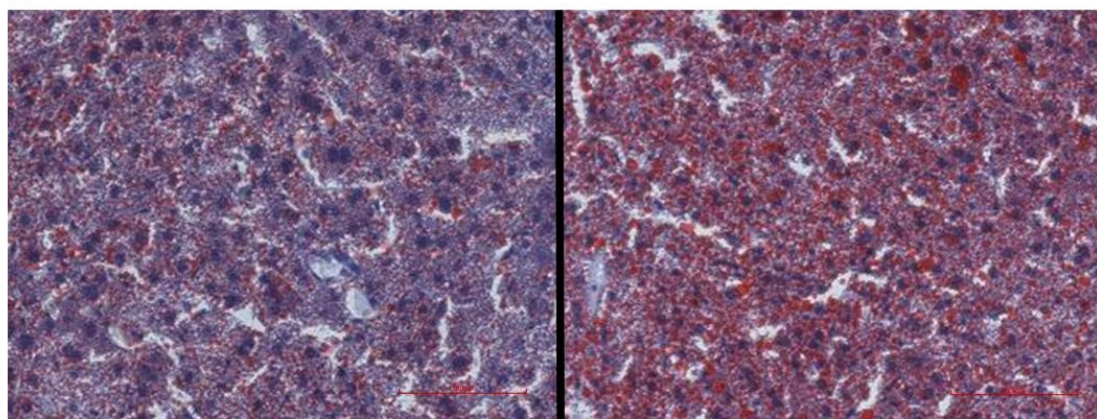
A



wild × 200

DGKαKO × 200

B



wild × 200

DGKαKO × 200

C

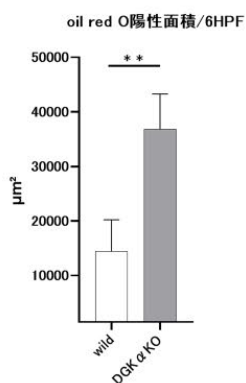


図11. 70%PH後 脂肪沈着像の検討

A. 70%PH 24h後 組織HE写真

B. 70%PH 24h後 組織Oil red O染色写真

C. 70%PH 24h後 組織Oil red O染色 6強拡大視野での染色陽性面積の比較

**P<0.01

HE 染色において、大滴性脂肪滴沈着および小滴性脂肪沈着を1個体毎にそれぞれ沈着度を分類した。小滴性脂肪沈着に関してはDGKαKOマウスで70%PH 24h後にDGKαKOマウスで有意に高値であった。大滴性脂肪沈着に関しては2群間で有意差は認めなかった(図 12)。

図12

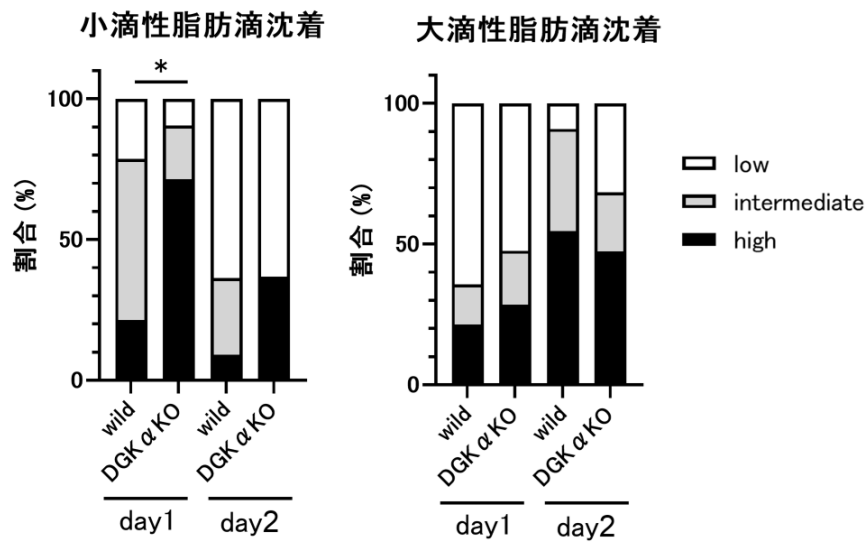


図12. 70%PH後 脂肪滴沈着の割合

脂肪沈着程度と血液検査データの関連性について解析したところ、小滴性脂肪沈着の程度が強い程、肝胆道系酵素が高値、アルブミン低値の傾向にあった(図 13. A)。逆に大滴性脂肪沈着の程度が弱い程、肝胆道系酵素が高値、アルブミン低値の傾向にあった(図 13. B)。

図13

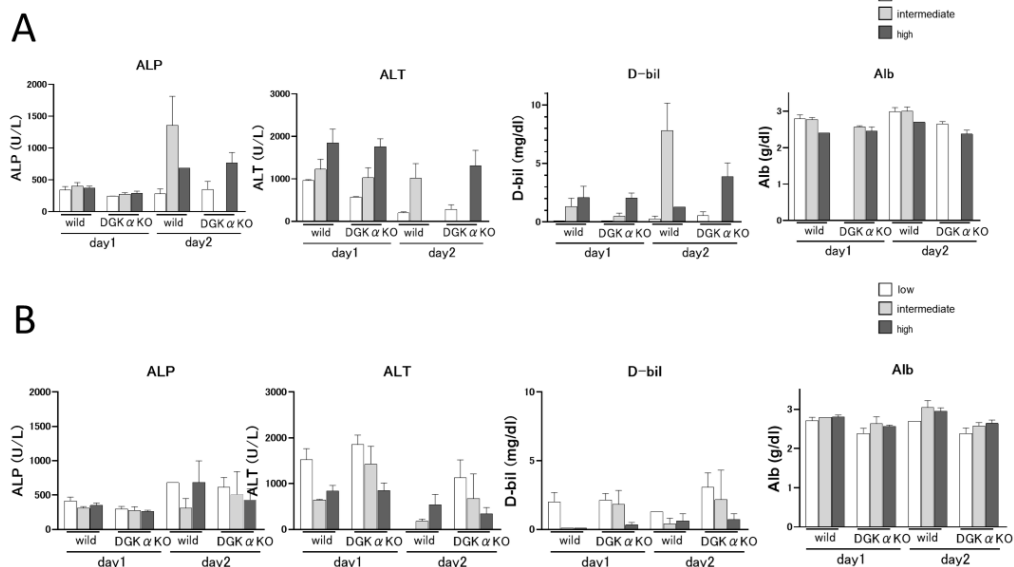


図13. 脂肪滴沈着様式と血液検査データの関連性について

A. 70%PH後 day1, day2の小滴性脂肪滴沈着と血液検査データの関連
B. 70%PH後 day1, day2の大滴性脂肪滴沈着と血液検査データの関連

脂質消費・貯留に関連する分子群を定量 PCR で mRNA 量を解析したところ、DGK α KO マウスで有意に脂肪消費に関連する mRNA 群が低値であり、逆に脂肪貯留に関連する mRNA 群が高値であった(図 14)。

図14

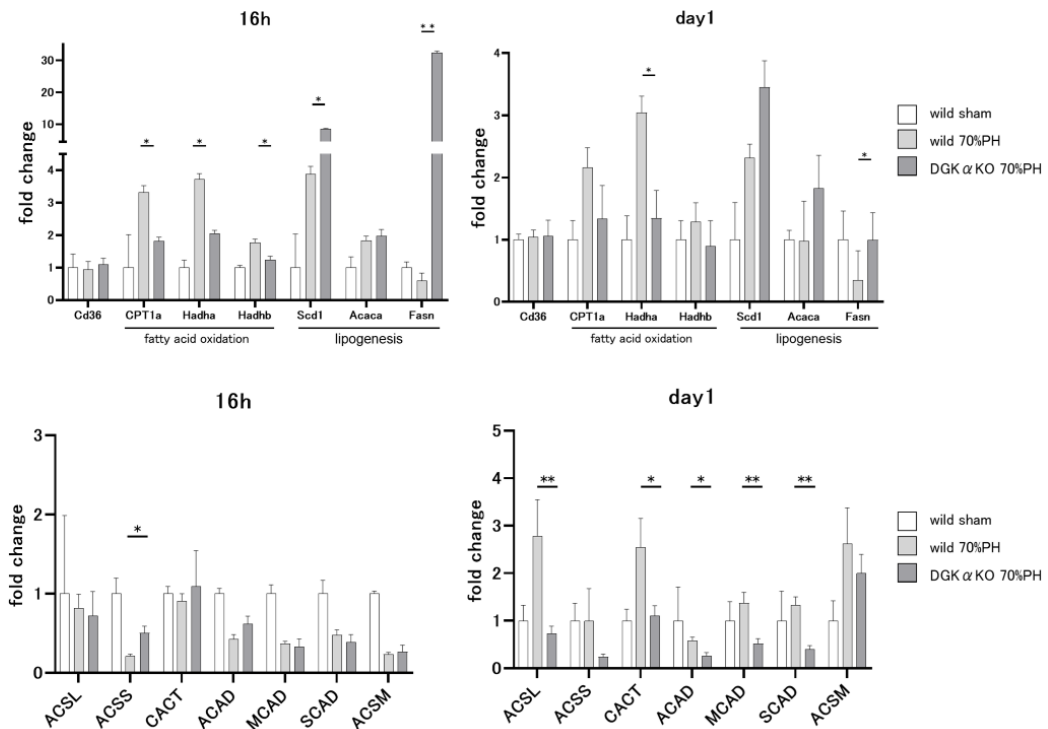


図14. 脂質合成・代謝関連遺伝子の定量PCR

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

グリコーゲンおよび脂質消費障害が示唆されたため、70%PH 後のエネルギー産生状態についての解析を行った。マウス肝切除後に Energy Charge 低下が死亡原因に成り得ると報告されており(Nakatani et al. 1981)、クロマトグラフィで解析したところ、DGK α KO マウスで ATP・ADP 分画が低値であり、AMP 分画が高値である傾向にあった(図 15. A)。Energy Charge 計算値は DGK α KO マウスで有意に低値であり(図 15. B)、Energy Charge 低下が死亡原因の一つであると推察された。

図15

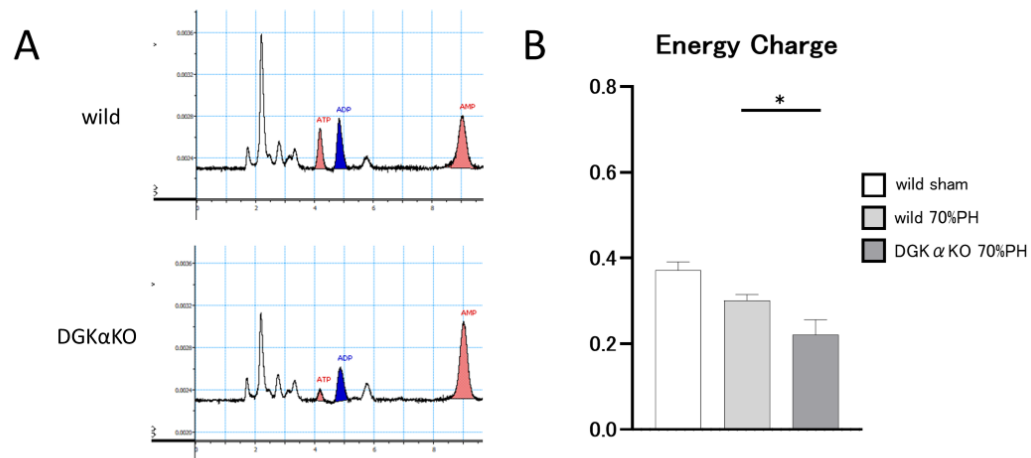


図15. 70%PH 24h後 エネルギー産生について

A. 70%PH 24h後のクロマトグラフィ
B. 70%PH 24h後 Energy Chargeの比較
*P<0.05

5. 70%PH 後の酸化ストレス状態に関する検討

酸化ストレスマーカー群の mRNA を定量 PCR で解析したところ、DGK α KO マウスでより高値であった(図 16A)。NOS 群 mRNA も同様に DGK α KO マウスでより高値で

図16

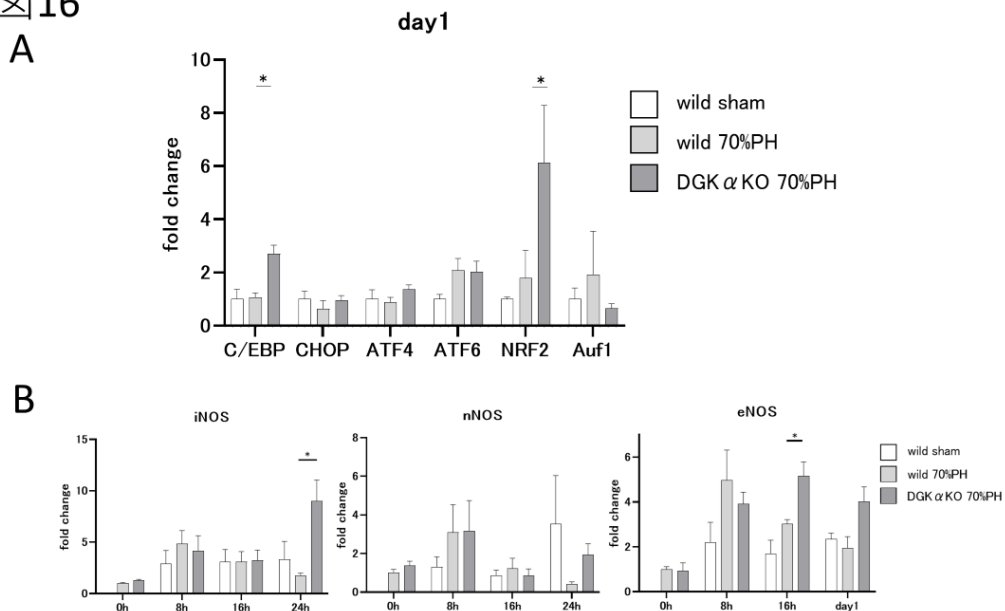


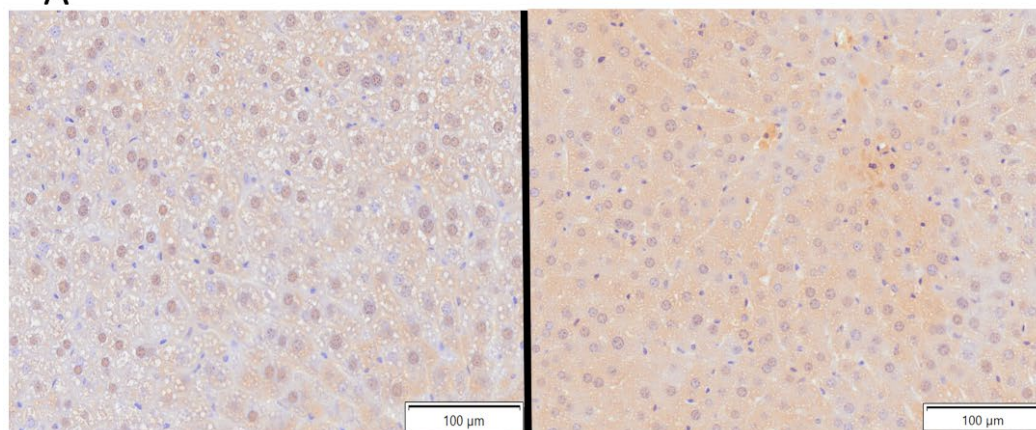
図16. 70%PH除 抗酸化関連マーカーの解析

A. 70%PH 24h後 抗酸化関連マーカーの定量PCR
B. 70%PH後 NOS群の定量PCR
*P<0.05

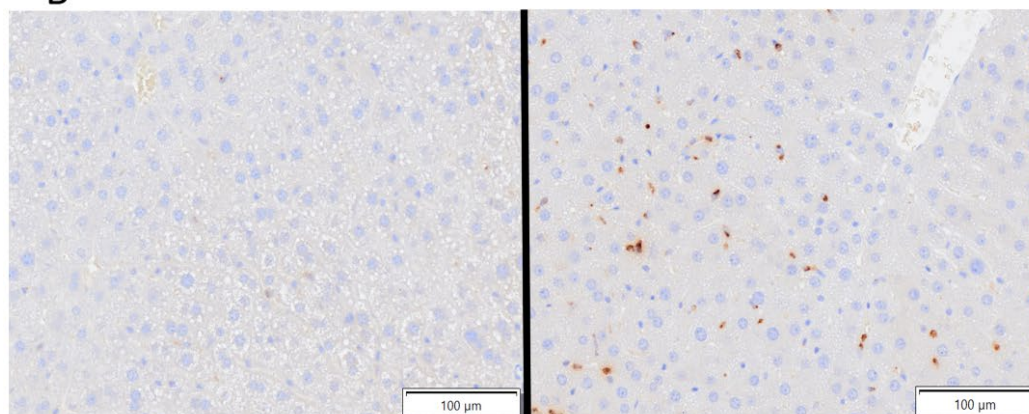
あった(図 16 B)。

免疫染色においても、4-HNE 染色(図 17A)、MPO 染色(図 17 B)、TUNEL 染色(図 17 C)それぞれにおいて DGK α KO マウスでより強い染色像を認め、70%PH 後に DGK α KO マウスにおいてより酸化ストレス物質群の貯留および組織壊死像が示され

図17 A



B



C

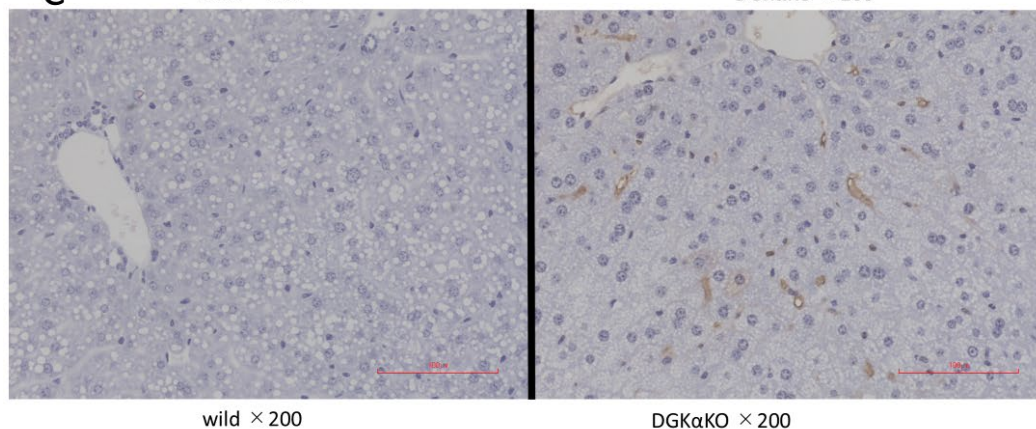


図17. 70%PH後 抗酸化マーカー染色

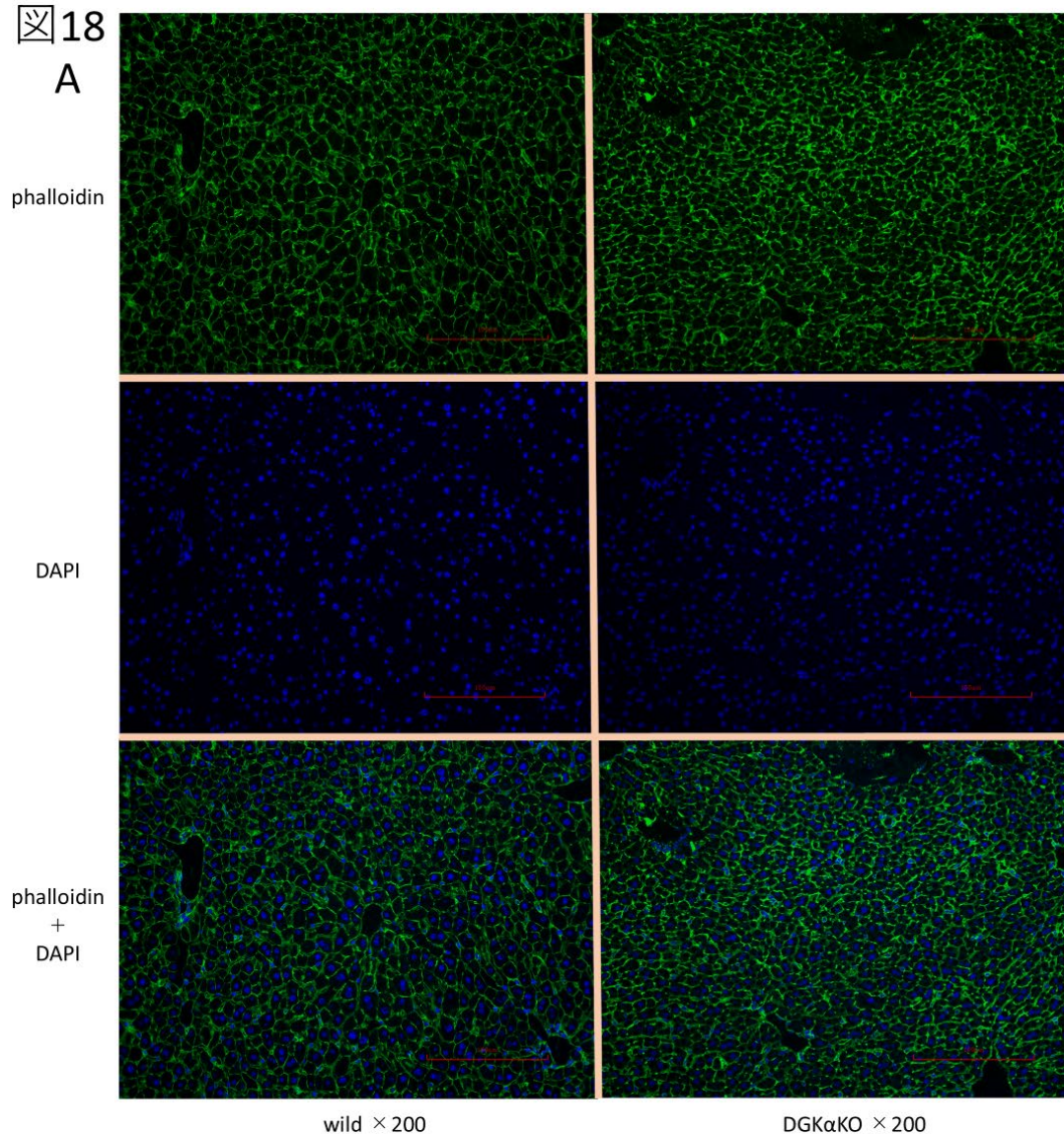
A. 70%PH 24h後 4-HNE染色, B. 70%PH 24h後 MPO染色, C. 70%PH 24h後 TUNEL染色

た。

6. 70%PH 後の肝細胞の肥大・形態に関する検討

細胞肥大は様々な刺激や環境変化に対応し、ホメオスタシスを維持するために生じ

図18



B

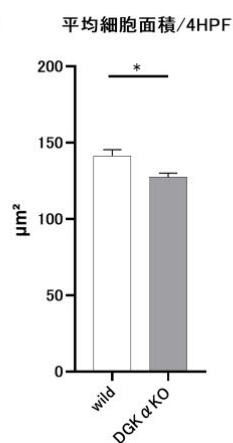


図18. 70%PH後 細胞肥大の検討

A. 70%PH 24h後 phalloidin染色(上段)、DAPI染色(中断)、phalloidin + DAPI染色(下段)

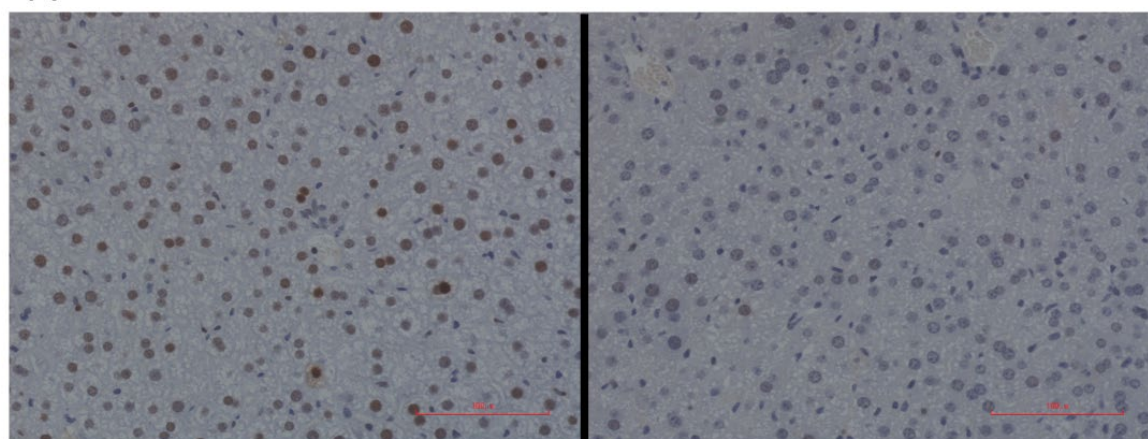
B. 4強拡大視野あたりの平均細胞面積の比較

*P<0.05

る急性応答変化であり、様々な臓器・細胞でも認め得る(Dai et al. 2017, Kuma et al. 2021, Azhar et al. 2003, Tang et al. 2015)。肝細胞においても肝再生過程の最も初期に認められる動態であり(Miyaoka et al. 2012)、同動態が肝切除後のホメオスタシス維持に不可欠な過程である。エネルギー消費の低下の原因として細胞肥大障害の関連がないか解析を試みた。Phalloidin 蛍光免疫染色により細胞骨格を染色したところ、70%PH 後 DGK α KO マウスで平均細胞面積が小さい傾向にあった(図 18 A)。細胞面積を測定すると DGK α KO マウスで有意に低値であった(図 18 B)。

細胞周期マーカーである PCNA の免疫染色では DGK α KO マウスで染色性が低い傾向にあった(図 19 A)。PCNA 陽性細胞の割合を比較したところ DGK α KO マウスで有意に低値であった(図 19 B)。定量 PCR で PCNA mRNA を比較したところ、DGK

図 19
A

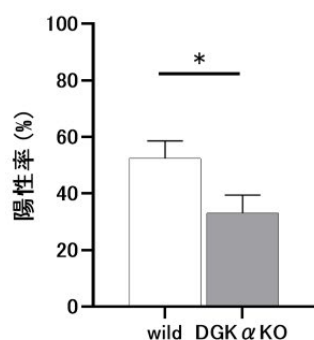


wild × 200

DGK α KO × 200

B

PCNA陽性率/4HPF



C

PCNA day1

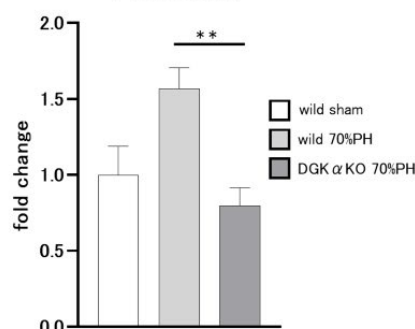


図19. 70%PH後 細胞周期マーカーPCNAの検討

A. 70%PH 24h後 PCNA染色

B. 70%PH 24h後 4強拡大視野あたりのPCNA陽性割合の比較

C. 70%PH 24h後 PCNA 定量PCR

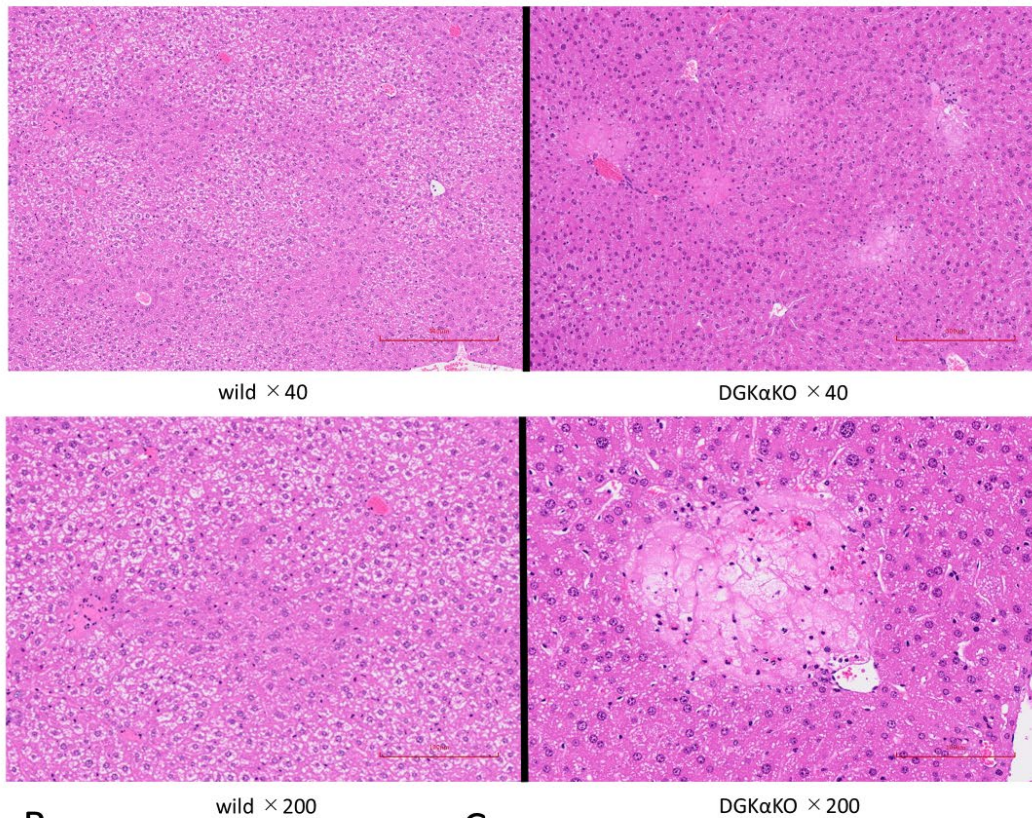
*P<0.05, **P<0.01

α KO マウスで有意に低値であった(図 19 C)。

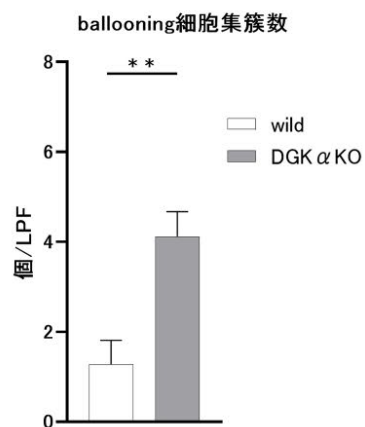
70%PH 後の HE 染色で正常な肝細胞骨格が消失し風船様変化を伴う細胞 (ballooning cell)群を認めた。DGK α KO マウスでより多く認められる傾向にあり(図 20A)、同細胞集簇数を比較したところ DGK α KO マウスで有意に高値であった(図

図20

A



B



C

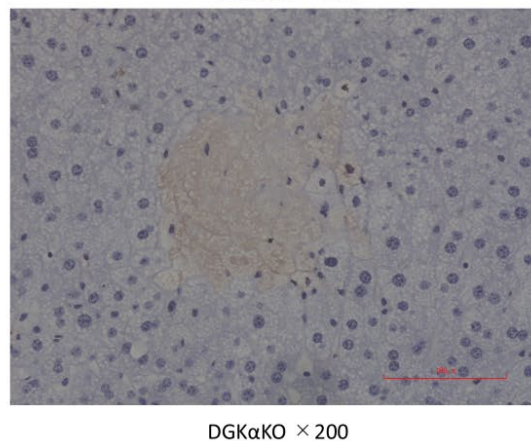


図20. 70%PH後 細胞バルーニングの検討

A. 70%PH 24h後 HE染色 弱拡大(上段)、強拡大(下段)

B. 1弱拡大視野あたりのバルーニング細胞領域数の比較

C. バルーニング細胞領域でのTUNEL染色像

*** $P < 0.01$

20B)。ballooning cell 集簇領域は TUNEL 染色で陽性であり、細胞死の過程を見ている可能性が示唆された(図 20C)。

肝切除後の細胞肥大に EMT 動態が関与していることが報告されており(Oh et al. 2018)、E-cadherin 免疫染色を行ったところ、DGK α KO マウスでより強い染色陽性所見を認めた(図 21)。

図21

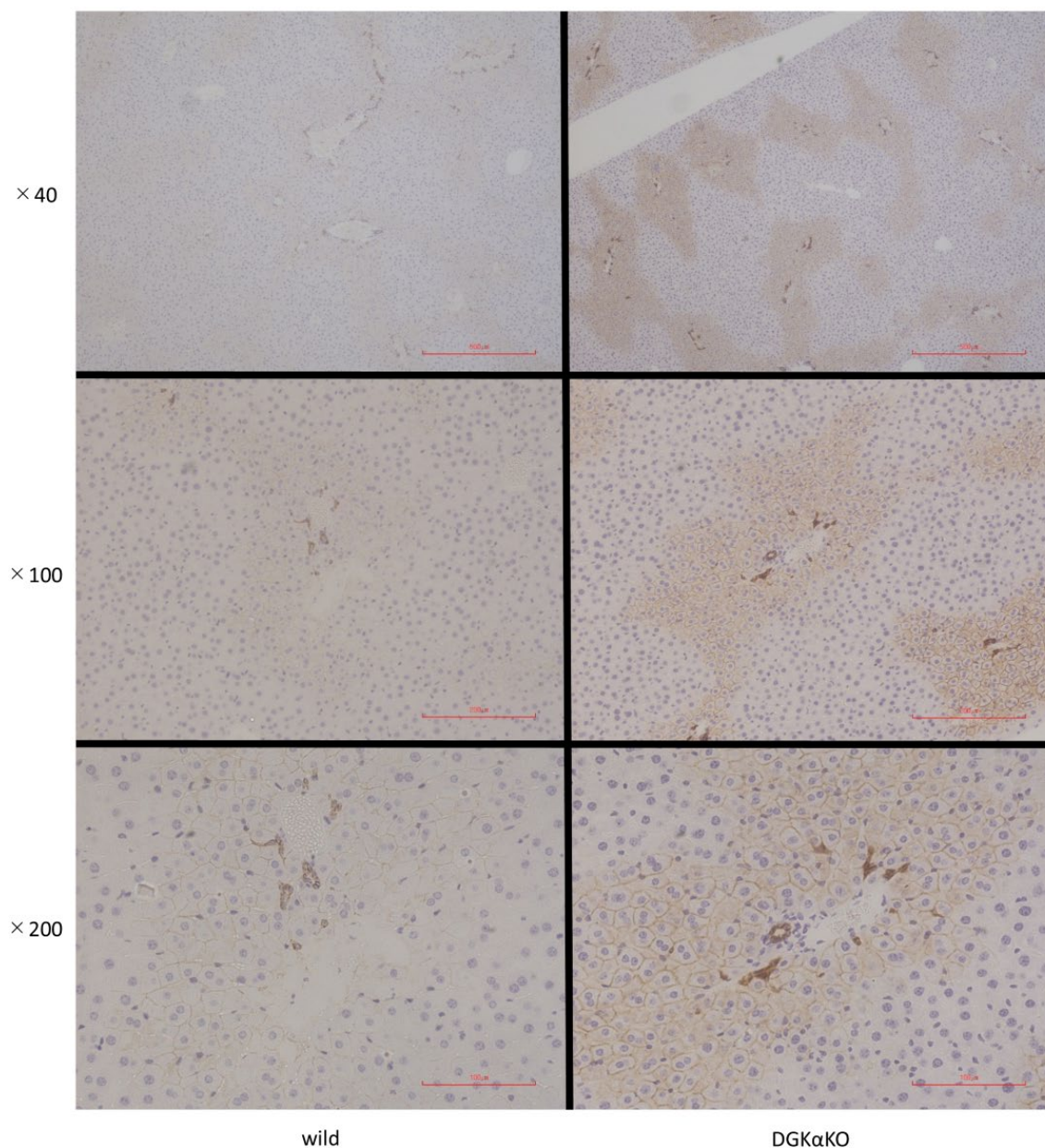


図21. 70%PH 24h後 E-cadherin免疫組織染色画像

EMT に関連する各マーカーmRNA を定量 PCR で解析したところ、EMT 動態に一致する動態が認められたが、一部では反する動態も認められた(図 22)。

22

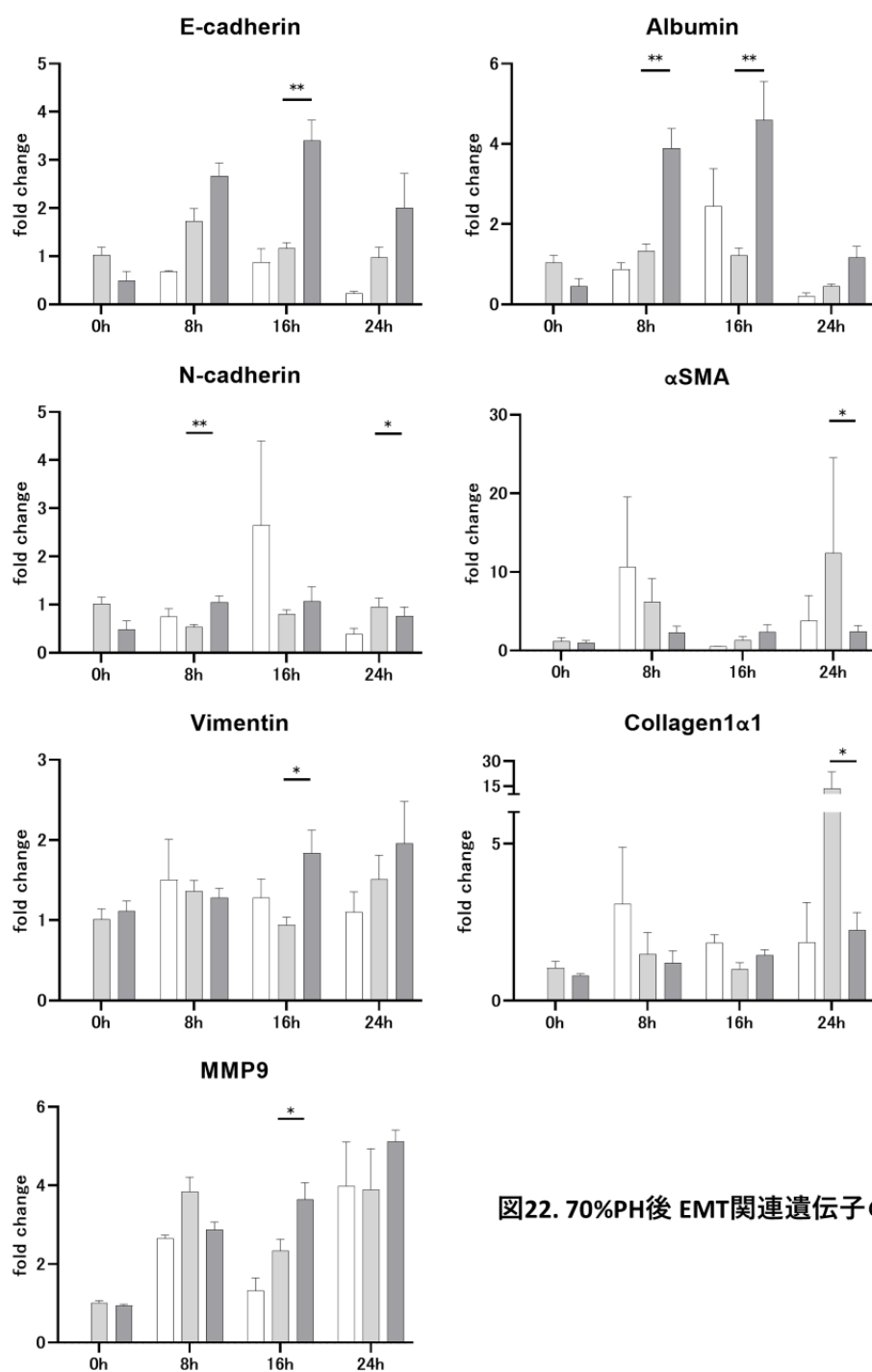


図22. 70%PH後 EMT関連遺伝子の定量PCR

7. DGK α KO マウスの 70%PH 後細胞肥大障害の責任因子の検討

DGK α KO マウスで 70%PH 後細胞肥大障害を来す責任因子の検索を行った。肝細胞を標的とする肝再生過程に関連する分子群の mRNA を定量 PCR 解析したが、有意差を認めるものは認めなかった(図 23)。

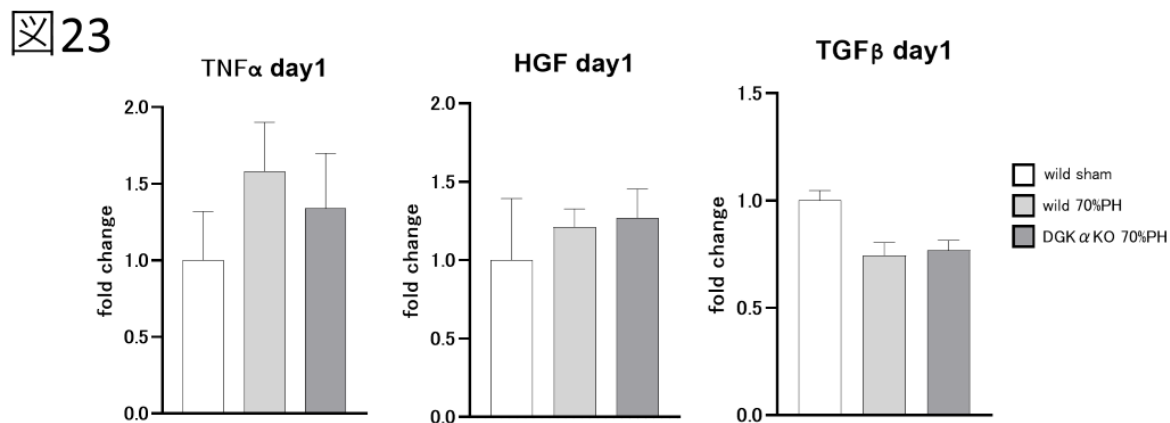


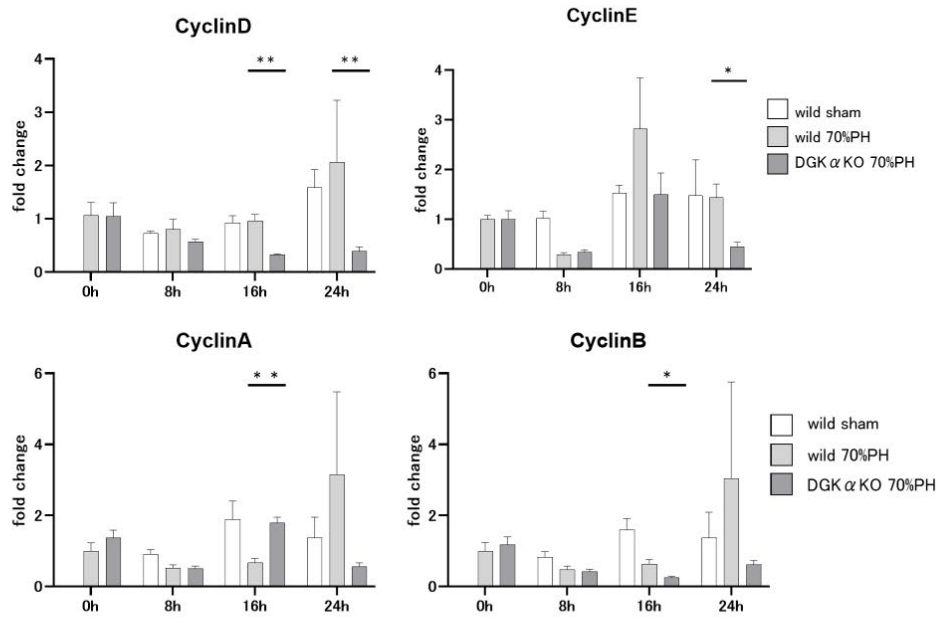
図23. 70%PH後 肝再生関連因子の解析

70%PH 24h後 肝再生関連因子の定量PCR

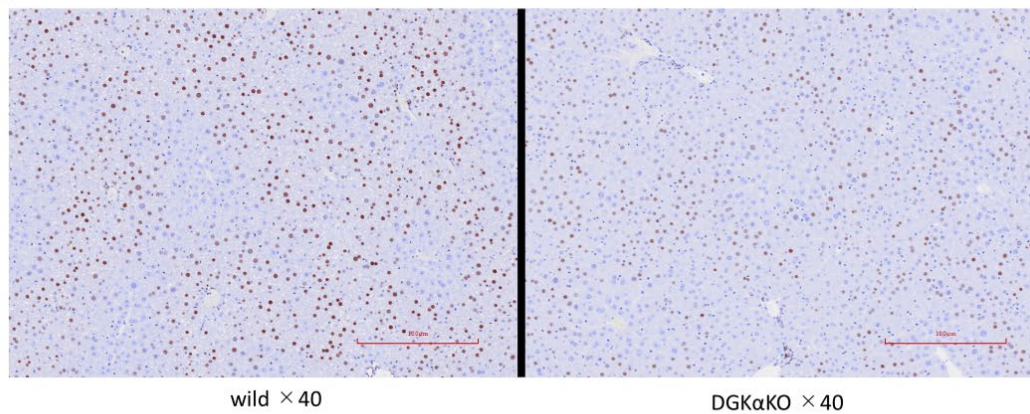
細胞周期マーカーであるサイクリン群の mRNA を定量 PCR で解析したところ、DGK α KO マウスで発現低下を認めたが、特にサイクリン D でその傾向が強かった(図 24 A)。サイクリン D1 免疫染色を施行したところ DGK α KO マウスで染色性が低下する傾向にあり(図 24. B)、染色陽性細胞の割合を比較したところ DGK α KO マウスで有意に低値であった(図 24. C)。

図24

A



B



C

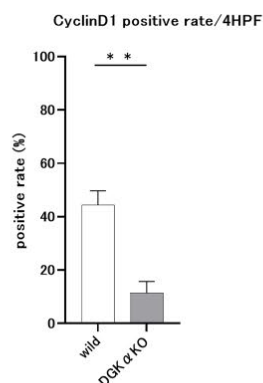


図24. 70%PH後 サイクリンの解析

- A. 70%PH後 サイクリン 定量PCR
 - B. 70%PH 24h後 サイクリンD1染色
 - C. 4強拡大視野あたりのサイクリンD1染色陽性細胞割合の比較
- *P<0.05, **P<0.01

サイクリンDの上流カスケードであるmTORC1関連因子群のmRNAを定量PCRで解析を行ったが、有意な動態を示す因子は認めなかった(図 25. A)。t-mTORC 免疫染色では野生型マウス、DGKα KO マウスともにびまん性に染色陽性像を認めたが(図

25. B)、

図25

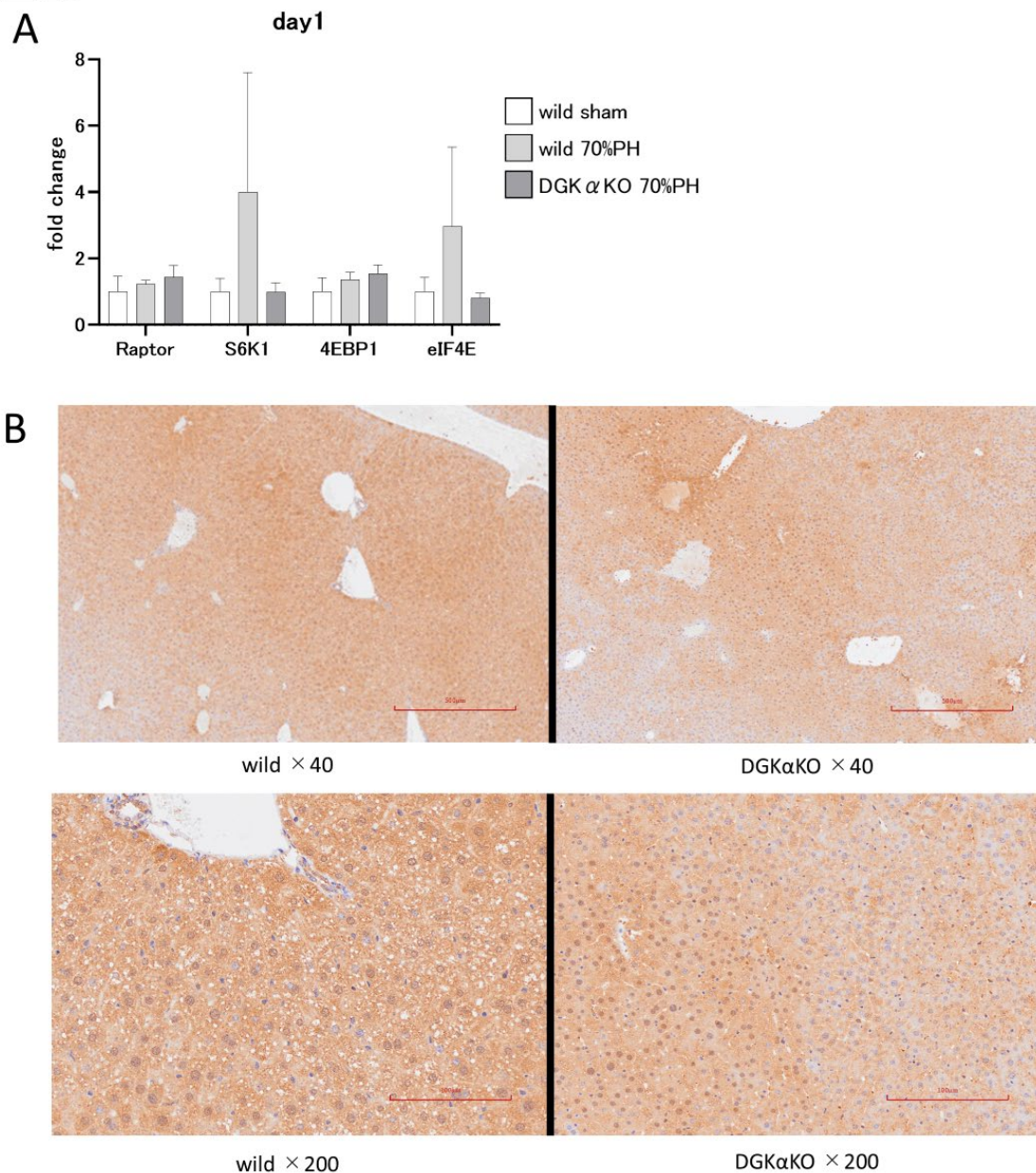


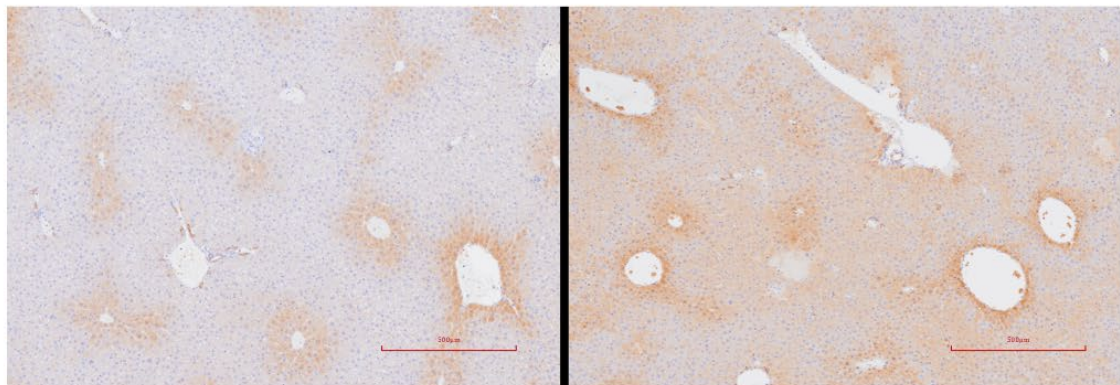
図25. mTORC関連マーカーの検討

- A. 70%PH 24h後 mTORC関連遺伝子 定量PCR
B. 70%PH 24h後 t-mTORC免疫組織染色

p-TORC 免疫染色では DGK α KO マウスで染色性が強い傾向にあった(図 26. A)。ウエスタンブロットによる蛋白解析では、DGK α KO マウスで p-ERK 蛋白量が多い傾向にあり(図 26. B)、定量解析では p-ERK/t-ERK 比が DGK α KO マウスで有意に高値であり(図 26. C)、DGK α KO マウスでの ERK 活性化が示唆された。

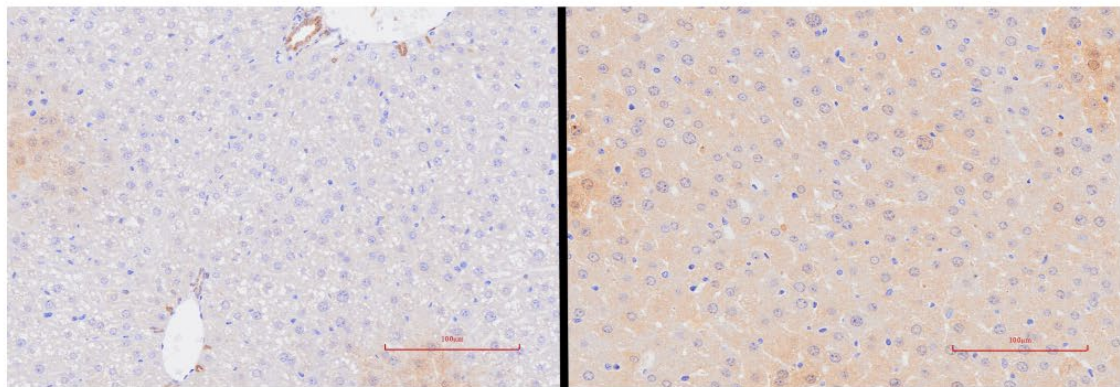
図26

A



wild × 40

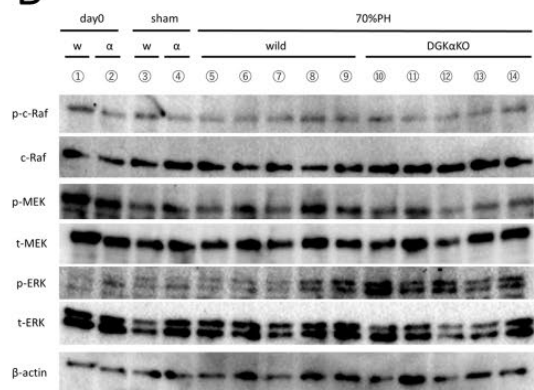
DGKαKO × 40



wild × 200

DGKαKO × 200

B



C

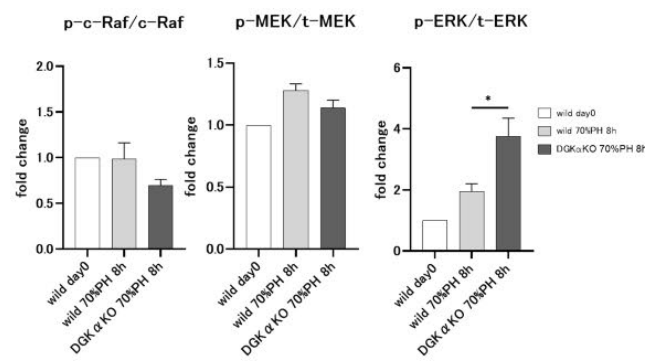


図26. mTORC関連マーカーの検討

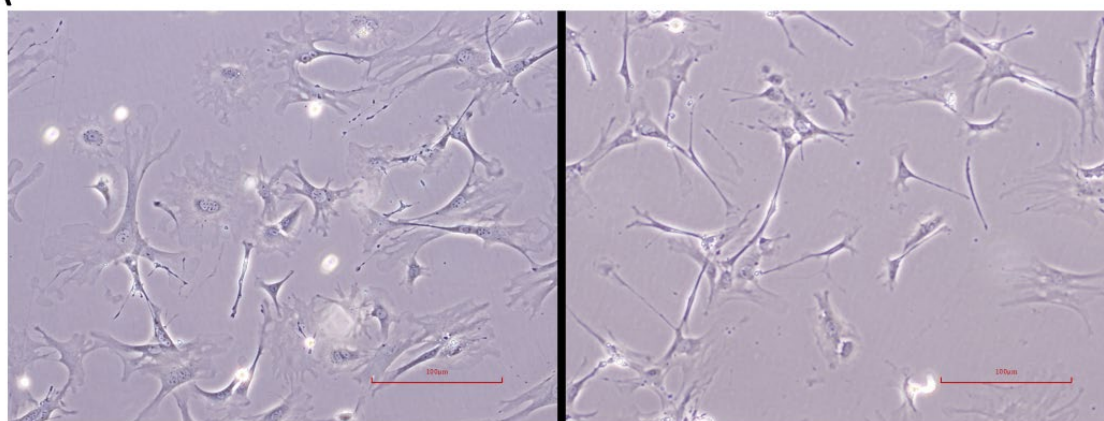
A. 70%PH 24h後 p-mTORC免疫組織染色
 B. 70%PH 24h後 mTORC関連蛋白 western blotting
 C. Western blotting 定量解析
 *P<0.05

8. Fibroblast を用いた初代培養実験

DGK α KO マウスから樹立したマウス線維芽細胞を用いて、70%PH 後サイクリン D 発現低下が細胞レベルでも認められるか検討を行った。野生型マウスおよび DGK α KO マウス耳から初代培養した fibroblast の写真を供覧する(図 27. A)。FBS 刺激によりサイクリン D1 を含めた細胞周期関連マーカー群 mRNA 解析を行ったが、有意な動態は認められなかった(図 27. B)。

図27

A



B

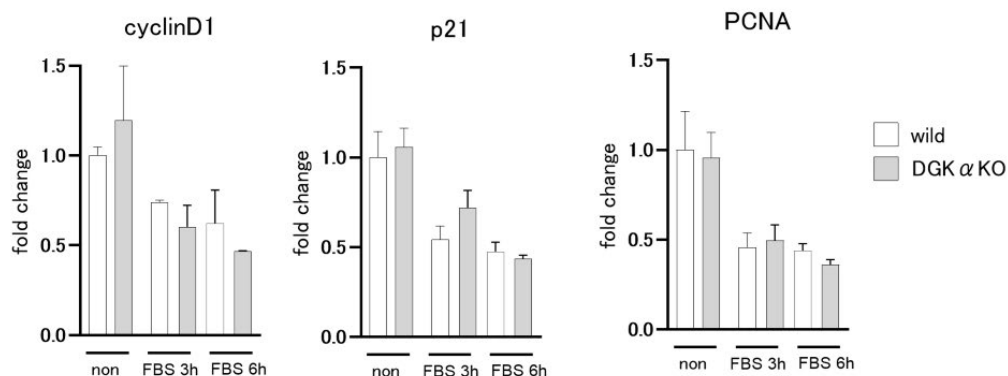


図27. vitroでの検討

A. マウス耳から初代培養によって作成したfibroblast写真
B. Fibroblast細胞の細胞増殖関連マーカーの定量PCR

9. 抗酸化物質投与による DGK α KO マウスレスキュー実験

70%PH 後に DGK α KO マウスが day7 までに約 40%と高死亡率を示し、かつ酸化ストレスマーカーの有意な上昇や免疫染色での陽性像を認めた。抗酸化物質投与下で肝切除を行い、死亡率を含め各種データが改善されるか解析を行った。ビタミン C は抗酸化物質として酸化ストレスや炎症性侵襲を低減する報告があり(Zhao et al.

2023)、同薬剤を DGK α KO mice に投与し解析した。生存率に関してはビタミン C 投与群においてさらなる死亡率の上昇を認めた(図 28. A)。肝再生率においてもビタミン C 投与群において有意に低値であり(図 28. B)、また血液検査データではビタミン C 投与群で ALP、Alb、TBA で有意に低値、HDL-cho で有意に高値であった(図 28. C)。

図 28

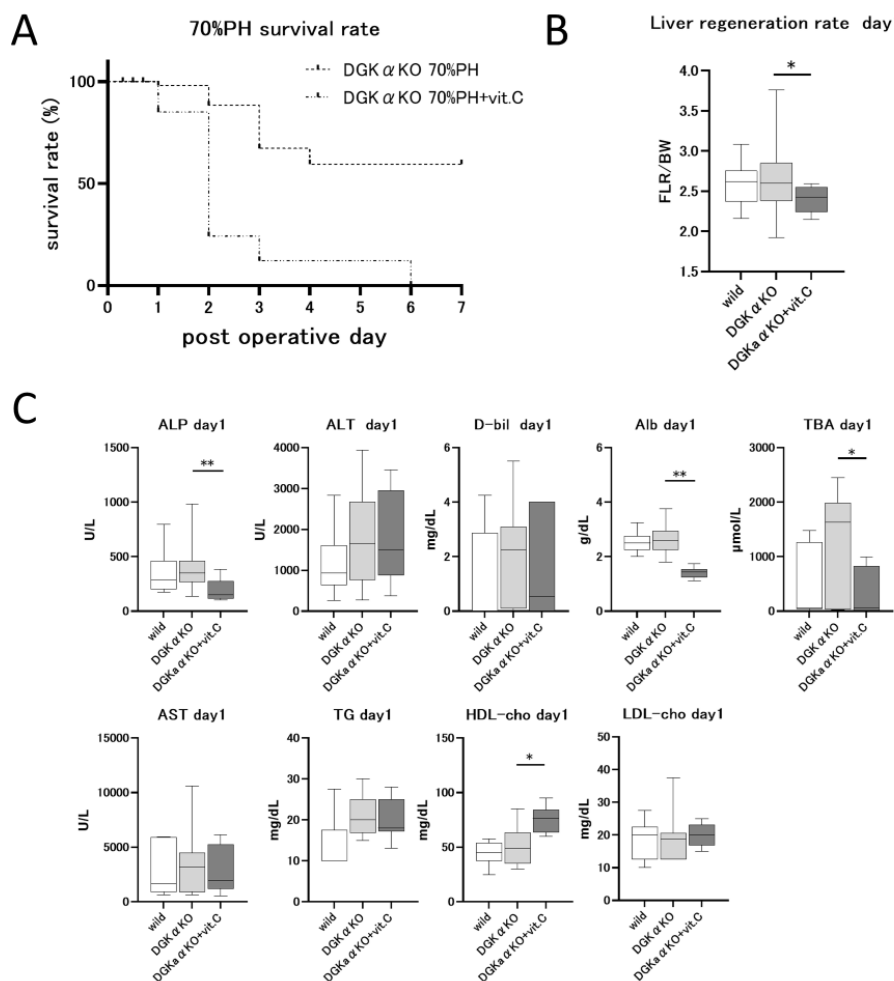


図28. 抗酸化物質投与による70%PH後の解析①

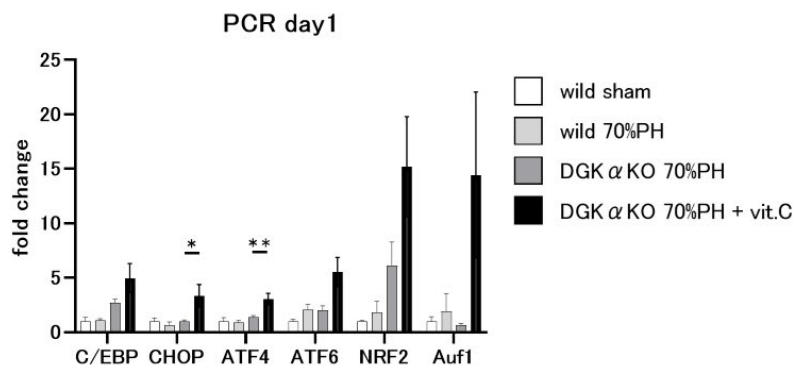
- A. 70%PH後 生存率の検討
 - B. 70%PH 24h後 肝再生率の検討
 - C. 70%PH 24h後 血液検査データの検討
- *P<0.05, **P<0.01

酸化ストレスマーカーの解析ではビタミン C 投与群で mRNA の有意な上昇を認めた(図 29. A)。HE 染色では ballooning 細胞集簇部位を多く認め、ballooning 細胞集簇部位に血液凝集像も伴っていた(図 29. B)。ballooning 細胞集簇個数はビタミン C 投

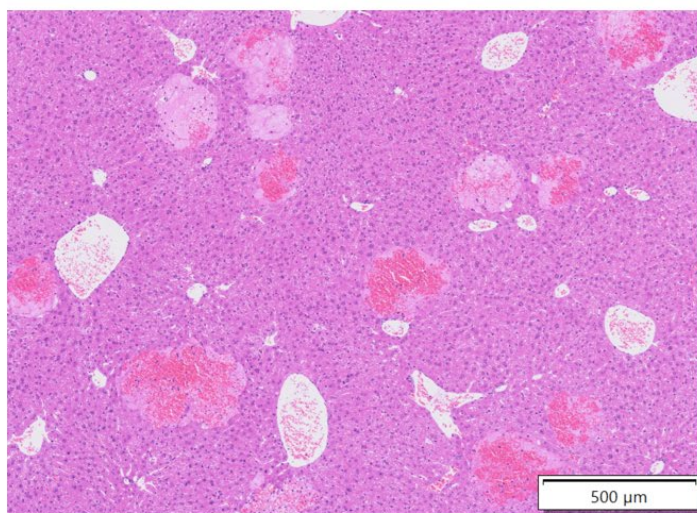
与群でより多い傾向にあったが有意差は認めなかった(図 29. C)。

図29

A



B



DGKα KO + vit.C × 40

C

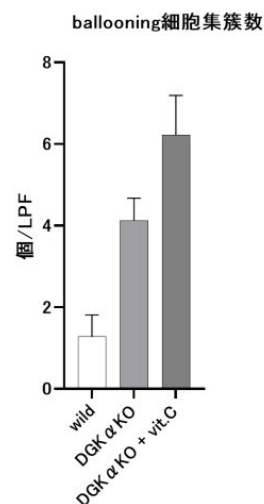


図29. 抗酸化物質投与による70%PH後の解析②

- A. 70%PH 24h後 抗酸化マーカー遺伝子群の定量PCR
- B. 抗酸化物質併用70%PH 24h後 HE染色
- C. 70%PH 24h後 HE染色 1弱拡大視野あたりのバルーニング細胞領域数の比較

*P<0.05, **P<0.01

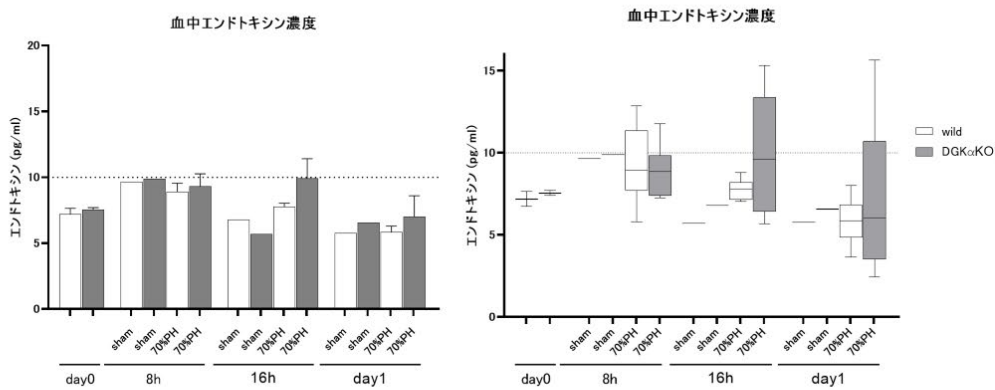
10. エンドトキシン血症に関する検討

90%PH といったマウス大量肝切除では高死亡率を示し、その原因の一つとして高エンドトキシン血症が報告されている(Kawasaki et al. 1989)。肝切除後の恒常性維持機能破綻の一結果として高エンドトキシン血症を呈する可能性が想起され、高死亡率を示す DGKα KO マウス 70%PH でも解析を行った。血中エンドトキシン濃度は 2 群間で有意差は認めなかったが、DGKα KO マウスで陽性判定となる 10 μg/ml を超える個体が存在し(図 30. A)、エンドトキシン陽性率は DGKα KO マウスで高い傾向にあっ

た(図 30. B)。肺に出血を示唆する赤色変化を認め(図 30. C)、HE 染色では気管支内
に出血を示唆する赤血球凝集像を認めた(図 30. D)。

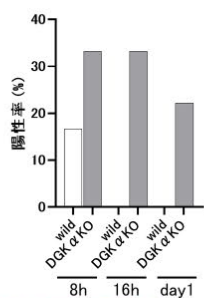
図30

A

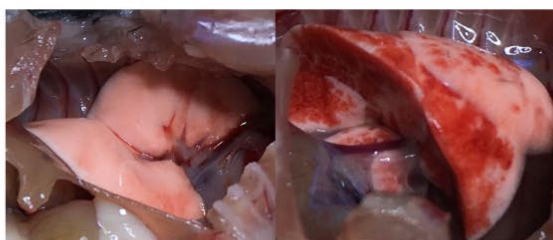


B

エンドトキシン陽性率
(エンドトキシン>10pg/ml)



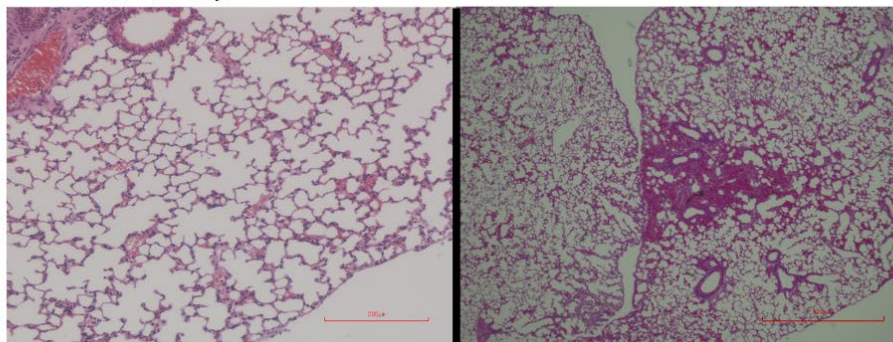
C



wild

DGKαKO

D



wild × 100

DGKαKO × 40

DGKαKO × 200

図30. 70%PH後 エンドトキシンに関する検討

- A. 70%PH後 血中エンドトキシン濃度。
平均値±SE(左図)、箱ひげ図(右図)
- B. 70%PH後 血中エンドトキシン
陽性率の比較
- C. 70%PH 24h後 肺マクロ写真
- D. 70%PH 24h後 肺HE染色画像

70%PH 後の体重減少率の解析では DGK α KO マウスで有意に減少率が低く(図 31. A)、腎 HE 写真では腎実質に出血や変性像を認めた(図 31. B)。

図31

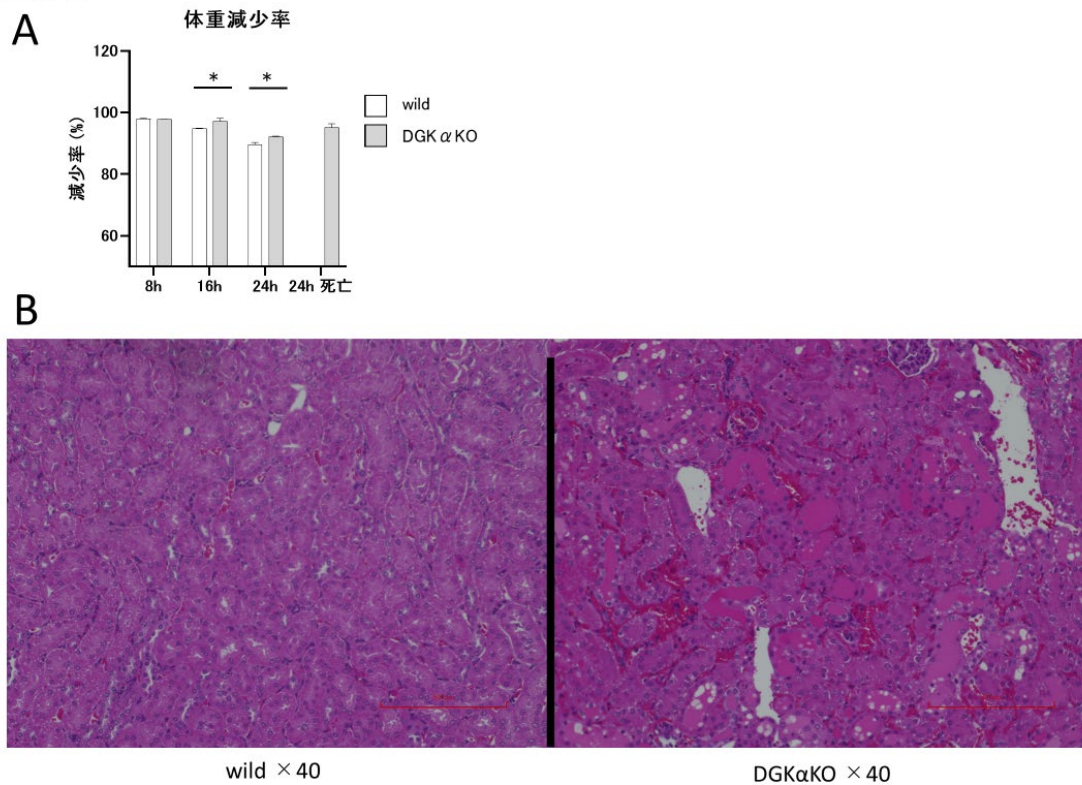


図31. 70%PH後 体重減少に関する検討

A. 70%PH後 体重減少率の比較

B. 70%PH 24h後 腎HE写真

*P<0.05

腸管から門脈を介して肝へエンドトキシンが供給されるが、肝 Kupper 細胞がトラップし体循環への漏出を防止している(Onoue. 1981)。F4/80 免疫染色による Kupper 細胞の染色像では DGK α KO マウスでより強い染色像を認めた(図 32)。高エンドトキシン血症による影響かは染色像だけでは不明であるが、留意すべき所見と考える。

図32

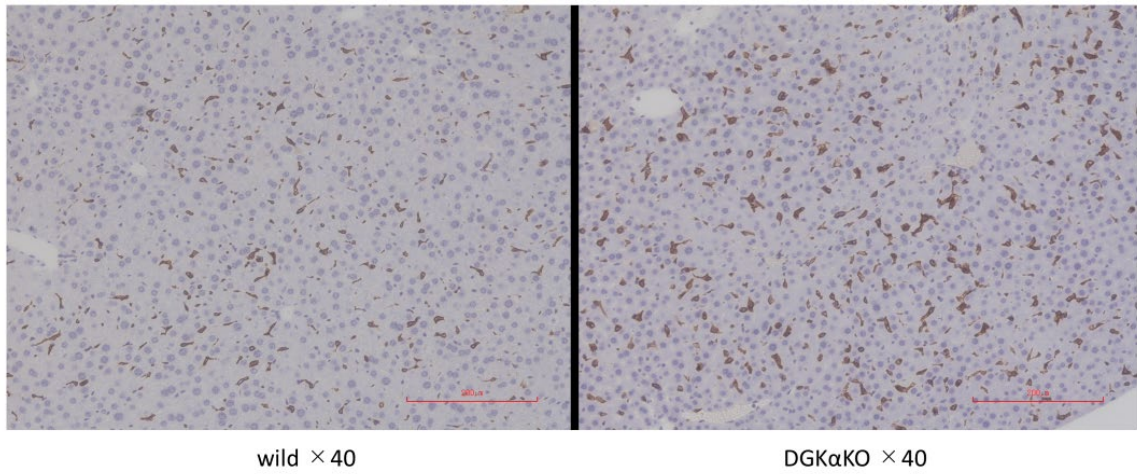


図32. 肝非実質細胞の検討

70%PH 24h後 F4/80 免疫組織染色

考察

本研究では、①DGK α KO マウスが 70%PH 後に約 40%と高死亡率を認め、低肝再生率、高肝胆道系酵素を示した。②DGK α KO マウスは 70%PH 後にグリコーゲン、脂質消費障害の所見を示し、Energy Charge 低下を認めた。③DGK α KO マウスは 70%PH 後酸化ストレスマーカー貯留を認めた。④DGK α KO マウスは 70%PH 後に細胞肥大障害を示した。⑤DGK α KO マウスは 70%PH 後にサイクリン D 発現低下を認めた。

70%PH 後の DGK α KO マウスにおける野生型に比較し高率に個体死しており、その原因について考察する。Lutkewitte らは、野生型マウスへのアセトアミノフェン投与による肝障害実験において、PA の産生亢進と AGPAT $\cdot$ DGK α mRNA の発現低下、また AGPAT 上流の GPAT 阻害剤 FSG67 を投与すると、PA レベルと PCNA 発現の双方が低下することを報告した (Lutkewitte AJ, et al. 2018)。哺乳類ラパマイシン標的 (mTOR) には PA 結合ドメインがあり (Fingar DC et al. 2004)、PA は mTOR 複合体 (mTORC) シグナル伝達を正に制御し細胞サイクルを促進する (Fang Y et al. 2001, Yoon MS et al. 2011)。したがって、アセトアミノフェン投与を介した PA 産生亢進および DGK α 転写の減少は、活性化されたタンパク質による負のフィードバックを反映している可能性がある。本研究では、DGK α mRNA レベルは野生型マウスで 70%PH 後低下しており、さらに PLD1 と AGPAT1 の mRNA レベルが 70%PH 後の DGK α KO マウスで有意に低下していた。このことは、DGK α が肝再生時にタンパク質レベルで活性化され、PLD1 と AGPAT1 経路が DGK α の欠損を補っている可能性を示唆している。DGK α タンパク質とその活性化メカニズムに関してはさらなる研究・解析が必要と考える。

1980 年代、ウサギを用いた Nakatani らの研究では、25%肝切除ではエネルギーチャージが減少しなかったが、70%肝切除では減少したと報告している。さらに彼らは、エネルギーチャージが最も低くなるピーク期に、個々のウサギ死亡が顕著になることを報告した (Nakatani T et al. 1981)。我々の研究では、DGK α KO マウスのエネルギーチャージは、70%肝切除後に低下し、死亡原因となった可能性を考える。グリコーゲンは、PH 後の ATP の最初の供給源となり、その大部分は 16 時間以内に消費される。この後、ATP の主な供給源は、必要であれば脂肪酸の消費に移行する (Kachaylo E et al. 2017)。PH 後のグリコーゲン消費は、PAS 染色の結果から DGK α KO マウスで障害されていることが推察され、また術前絶食下での BS 低値はグリコーゲン利用障害を反映している可能性がある。また DGK α KO マウスは、PH 後の TG/HDL-C 比高値と術前絶食がない状況下での BS 高値が観察された。TG/HDL-C 比がインスリン抵抗性レベルを反映することを示した報告 (Lee YC et al. 2022) を考えると、DGK α KO マウスでは 70%PH 後にインスリン抵抗性が上昇している可能性が疑われる。糖原病とイ

ンスリン抵抗性の密接な関係(Maiorana A et al. 2023)を考慮すると、この現象はグリコーゲン利用障害由来の事象かもしれない。実際にインスリン抵抗性指標である HOMA-IR(Ren Q et al. 2022)測定を行ったが、本研究では DGK α KO マウスで 70%PH 後 HOMA-IR が高い傾向を示したが、その差は有意ではなかった。

PH 後の一過性脂肪沈着は TRAS と報告され、その障害は肝再生障害と関連している(Rudnick DA et al. 2012)。脂肪滴の大きさは、肝細胞における脂肪分解と脂肪食性異化の状態に反映される(Schott MB et al. 2019)。小滴性脂肪滴沈着はミトコンドリアの機能障害と関連しており(Benador IY et al. 2018, Oba D et al. 2018)、エネルギーチャージ低下と関連している可能性がある。80%PH のような高死亡率 PH モデルでも同様に、小滴性びまん性脂肪沈着が認められる(Despeyroux A et al. 2018, Yu Y et al. 2017)。小滴性脂肪滴沈着は高肝胆道系酵素や低アルブミン値とも関連しており、高死亡率を示す PH モデルの一終末期像の可能性はある。

DGK α KO マウスで 70%PH 後にグリコーゲンと脂質の利用が障害されることの説明のためにまず肝再生過程における肝細胞の動態について考察する。肝再生は肝細胞肥大、増殖、脱分化・肝前駆細胞の産生など、様々な種類の肝細胞反応・動態によって特徴づけられる(Yagi S et al. 2020)。切除範囲が小さい場合(例えば 30%)には、肝細胞の肥大のみが起こる。切除範囲が大きくなるにつれ(例えば 70%)、肝細胞の肥大に加えて肝細胞の増殖が起こり(Miyaoka Y et al. 2012)、さらに切除境界を超える程の大きな再生刺激では肝細胞の脱分化と前駆細胞の出現につながる(Zhao L et al. 2020, Schlegel A et al. 2014, So J et al. 2020)。70%PH の正常マウスでは、肝再生は術後 7 日目までに完了し、PH 後 3 時間から 24 時間、最大 36 時間の間に主に肝細胞の肥大が起こる(Miyaoka Y et al. 2012)。細胞肥大は、他の多くの組織でも報告されており、刺激に対する急性応答動態と考えられ、組織の恒常性を維持する役割を果たしている(Dai H et al. 2017, Kuma YI et al. 2021, Azhar M et al. 2003, Tang X et al. 2015)。したがって、DGK α KO マウスでは、70%PH に対する肝細胞の肥大が障害もしくは遅延しているため、グリコーゲンや脂質の利用障害などの細胞機能が損なわれている可能性がある。また 90%肝切除などの広範な肝切除は、酸化ストレス関連分子の蓄積(Gardner LB et al. 2012)およびミトコンドリア機能障害を引き起こすと報告されており(Xiaopeng C et al. 2023)、これらの肝切除後非代償状態を示唆する所見、特にミトコンドリア機能障害は脂質利用障害と深く関連している可能性がある。本研究では、DGK α KO マウスにおいて 70%PH 後 肝胆道系酵素の上昇、肝細胞肥大障害、小滴性びまん性脂肪沈着像、高死亡率が観察され、DGK α KO マウスは 70%PH 後に非代償状態を呈するという考えを支持する。さらに DGK α KO マウスの 70%PH 後 酸化ストレスマーカー貯留像はこの考えをさらに支持する。抗酸化作用のエビデンスが報告されているビタミン C(Zhao ZM et al. 2023)と併用して 70%PH を行ったが、死亡率が上昇し、肝臓の再生率が低下し、低アルブミン血症を引き起こした。さらに、酸化ストレスマーカー

一を増加させ、バルーン細胞集簇数も増加させた。抗酸化作用は、PH 後に必要なプロセスを阻害する可能性があり、また抗酸化物質の貯蔵は PH 後の二次的な結果を見ている可能性がある。

70%PH の DGK α KO マウスにおける細胞肥大障害の出現は、核内の遺伝子倍数性に関連している可能性がある。植物で最初に報告された核内倍化現象(Elsner J et al. 2012)とは、通常の 3 倍以上の染色体セット状態と定義され、組織の修復と再生の動態に重要な役割を果たしている(Bailey EC et al. 2021)。肝臓領域における倍数性(Gentric G et al. 2014)は、G2/M 期の停止またはスキップを特徴としており(Chen BB et al. 2012)、PH 後の細胞肥大期における G1/S 期細胞周期関連遺伝子発現の重要性を示している。サイクリン A と B は主に G2/M 期に関連し、サイクリン D と E は主に G1/S 期に関連する(Fisher D et al. 2022)。マウス PH の報告では、サイクリン D と E の mRNA 発現は肝切除量に比例して増加しており(Lehmann K et al. 2012)、PH 後 3 時間から起こる肝細胞肥大に関連する。サイクリン E は p21 のような細胞周期停止遺伝子によってダウンレギュレートされるが(Engeland K et al. 2022)、サイクリン D は影響を受けず、そのほとんどは細胞周期を促進させる上流因子の影響を反映している(Espeillac C et al. 2011, Liu Y et al. 2023)。本研究では、DGK α KO マウスは、同範囲の 70%PH を経験したにもかかわらず、野生型マウスよりも術後のサイクリン D の mRNA およびタンパク質発現が有意に低かった。サイクリン D の低発現は、細胞肥大障害の主要な原因のひとつであると考えられ、グリコーゲンや脂質の利用障害に由来するエネルギーチャージの障害をもたらす可能性がある。また肝再生過程において悪性腫瘍細胞において良く知られている EMT 動態の関与が報告されている(Oh et al. 2018)。本研究においても各種 EMT マーカーを検討したところ、E-cadherin 免疫染色で DGK α KO マウスで E-cadherin のより強い染色像を認めた。定量 PCR で他 EMT マーカーの動態でも DGK α KO マウスで遅延を示唆する所見も認められ、EMT の遅延が細胞肥大障害に関与している可能性が考えられた。しかし肝再生と EMT 関連を示す報告は少なく、今後の詳細な解析が必要であると考ええる。

DGK α KO が 70%PH 後のマウスのサイクリン D 発現にどのような影響を与えるのか、そのメカニズムの解明を試みた。mTORC1 はサイクリン D の上流で密接に作用し(Espeillac C et al. 2011)、mTOR は PA 結合ドメインを持っており、PA はこのドメインに作用し mTORC シグナル伝達を活性化させる(Fang Y et al. 2001, Yoon MS et al. 2011)。Vitro での DGK α の阻害と PA の減少を示した研究では、mTORC1 活性低下が示唆された(Antonescu CN et al. 2010, Avila-Flores A et al. 2005)。本研究でもサイクリン D 低下の原因として DGK α KO による PA の低下および mTORC1 活性低下を疑い解析を行った。mTORC1 関連遺伝子を検索した結果、有意な所見は得られなかった。しかし免疫染色による解析では、DGK α KO マウスでは 70%PH 後に mTORC 活性が上昇していることが示唆された。ウェスタンブロットでは mTORC シグナルの上流である

ERK 活性が DGK α KO マウスにおいて上昇している所見が得られた。サイクリン D 上流のこれらのシグナル活性化は、DGK α KO マウスにおける低サイクリン D レベルのネガティブフィードバックである可能性を考える。よって DGK α KO マウスで 70%PH 後にサイクリン D 低下を来たす誘因が他に存在することを意味し、さらなる解析・研究が望ましい。

またマウス死亡原因について考察を行いたい。マウス 90%PH において術後高エンドトキシン血症が主な死因と報告されており (Kawasaki Y et al. 1989)、本研究でのマウス死亡にも高エンドトキシン血症が関与していないか検討を行った。シュワルツマン反応とは、エンドトキシンを含むグラム陰性菌培養濾液を 24 時間間隔で 2 回静脈注射すると、腎臓、肺、肝臓、心臓などの全身臓器に多数の小さな血栓が形成され、出血傾向を伴って死に至るものであり (Apitz K et al. 1934)、シュワルツマンにより 1928 年に初めて報告された (Shwartzman G et al. 1928)。エンドトキシンへの初回暴露では通常シュワルツマン反応を生じないが、PH は Schwarzman 反応初回、つまり 2 回目の暴露への準備段階に成り得ると報告されている (Shirai M et al. 1985)。DGK α KO マウスでは、70%PH 後に高エンドトキシン血症を示す個体が認められ、肺や腎実質などの臓器に出血や血栓像がみられ、これはシュワルツマン反応の特徴的な所見の一つと報告されている。これに加えて、肝再生の障害・遅延は、肝網状系の正常な発達過程を損ない、高エンドトキシン血症を誘発し得る (Yokota T et al. 1980)。さらに、内毒素血症におけるクッパー細胞の重要性も報告されている (Onoue K et al. 1981)。DGK α KO マウスではクッパー細胞の活性化がみられ、これは高エンドトキシン血症とどのように関連しているかさらなる解析・研究を要する。

図 33 は、本研究で予想される機序の概略図である。DGK α は 70%PH 後の肝再生過程で重要な役割を果たしていることが示唆された。70%PH 後 DGK α KO マウスの肝臓でサイクリン D 発現が低下するメカニズムのさらなる解明が望まれる。

本研究のリミテーションとして、DGK α KO マウスは全身的な遺伝子欠損による影響の可能性があるため肝特異的 DGK α KO マウスの使用や野生型への DGK α 阻害剤投与による解析が望ましいこと、total lysate 組織を用いた解析であり肝構成細胞毎の個別解析が望ましいこと、が挙げられる。

図33

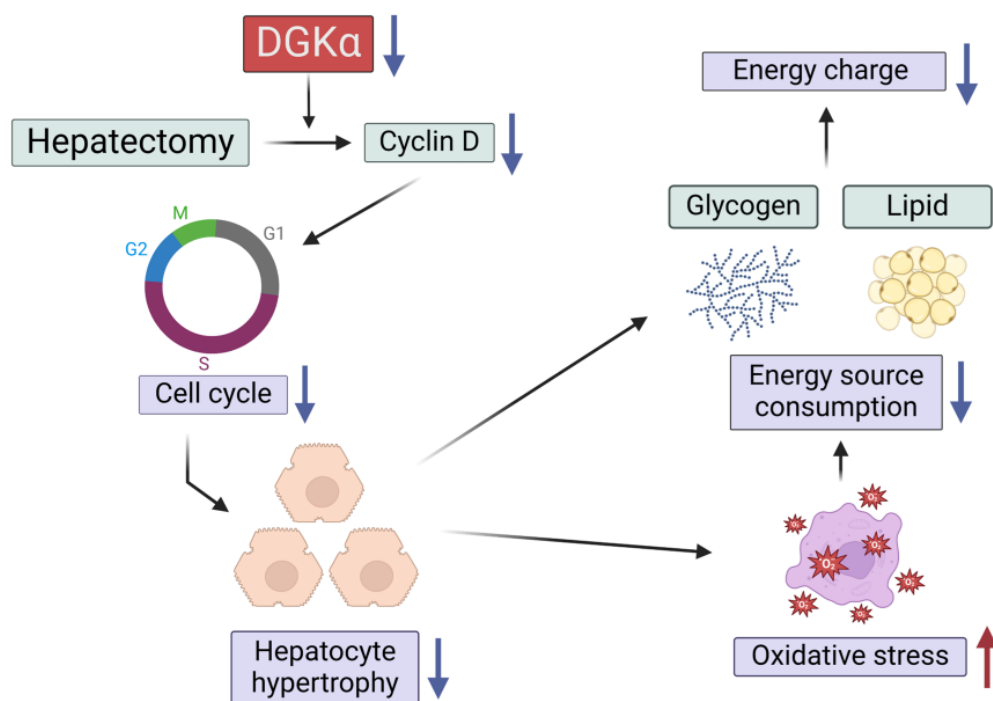


図33. 本研究の予想される機構の概略図

結論

① 本研究全体から得られた新知見

1. 野生型マウスの 70%肝切除において、DGK α mRNA は低下し、蛋白レベルでの活性化が予想された。DGK α KO マウスを使用した解析では、DGK α KO マウスは 40%程の高死亡率、低肝再生率、高肝胆道系酵素を示し、肝再生過程において重要な役割を担っている可能性が示唆された。
2. DGK α KO マウスは 70%PH 後グリコーゲン利用障害を示し、インスリン抵抗性の増大を示唆する所見を認めた。また小滴性びまん性脂肪沈着を認める傾向にあり、小滴性脂肪沈着を強く認める個体は高肝胆道系酵素、低アルブミン血症を認める傾向にあった。DGK α KO マウスでは 70%PH 後 Energy Charge が有意に低下しており個体死亡の主要な原因と考えられた。Energy Charge 低下にグリコーゲン、脂質利用障害が関与していることが予想された。
3. DGK α KO マウスは 70%PH 後 酸化ストレスマーカー貯留を認めた。抗酸化ストレス物質として報告のあるビタミン C 併用下で 70%PH を行ったが死亡率増加や肝再生率低下を認め、逆に参加ストレスマーカーが貯留する所見を認めた。酸化ストレスは肝再生過程に必要であり、酸化ストレス物質貯留は肝再生過程における二次的な結果であることが示唆された。
4. DGK α KO マウスは 70%PH 後肝細胞肥大障害、遅延を生じており、細胞周期マーカーの低下を認めた。細胞肥大は組織恒常性を維持するために必須な急性応答動態であり、グリコーゲン・脂質利用障害や Energy charge 低下の原因と成り得ると考えた。HE 染色による組織像では細胞機構の破綻を示唆する Ballooning 細胞集簇領域を認め、その個数も野生型マウスと比して有意に高値であった。
5. DGK α KO マウスが 70%PH 後細胞肥大障害を示す原因の一つとしてサイクリン D の発現低下が挙げられた。サイクリン D の上流で DGK α による産生物 PA の結合部位を持ち、正に細胞周期を制御する mTORC の活性低下が予想されたが、染色像では DGK α KO マウスで活性が亢進している所見を認め、サイクリン D 発現低下の negative feedback である可能性が考えられた。

② 新知見の意義

DGK α が良性の肝再生過程において個体の存続レベルで必要である可能性が示

唆された。肝再生過程における重要分子であることが示唆され、今後さらなる解析を行うことで、肝再生治療戦略における治療安全性の向上、治療適応の拡大に寄与できる可能性が考えられる。

③ 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

今後の研究課題として、DGK α とサイクリン D 発現の関連性についての詳細な解析が望ましい。また本研究は肝ホモジナイズ組織での解析を主としており、sorting や primary culture を行い、各肝構成細胞毎での DGK α や各シグナル解析を行う必要がある。またマウスの全身 DGK α KO による影響の除外として、野生型マウスへの DGK α 阻害剤投与や肝選択的な DGK α 阻害条件下での解析を行い再現性の確認を行うことが必要と考える。

④ 今後の課題

本研究を臨床応用へ発展させる process として、DGK α 促進による肝再生促進研究:切除境界上や切除境界を超える肝切除において DGK α 促進条件下による解析も検討される。また臨床での肝切除検体を用いて、DGK α 発現程度と肝再生率との関連性を解析する後向き臨床研究も想定される。

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々のご支援とご協力を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

まず、本研究の遂行と論文作成の全過程において、終始丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました消化器外科 I 教室教授 武富紹信 先生に心より感謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、実験機器の使用や実験方法について多大なるご協力をいただきました消化器外科 I 教室の皆様に熱く御礼申し上げます。また北海道大学消化器外科学第一講座の深井原 先生、小林希氏には、技術的な助言を頂きまして熱く御礼申し上げます。本研究の一部は、文部科学省科学研究費基盤 B (19H03724、22H03142)、萌芽的研究 (18K19571、21K19516)、日本医療研究開発機構 (AMED) (22fk0210091h0002) の助成を受けて行われました。ここに記して感謝の意を表します。

利益相反

本研究に開示すべき利益相反状態はない

引用文献

- Antonescu CN, Danuser G and Schmid SL (2010) Phosphatidic acid plays a regulatory role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* 21, 2944-2952.
- Atkinson DE and Walton DE (1967) Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. *J Biol Chem.* 242, 3239-3241.
- Apitz K (1934) Die Wirkung bakterieller Kulturfiltrate nach Umstimmung des gesamten Endothels beim Känninchen. *Virchows Arch. Path. Anat. Phys.* 239, 1.
- Avila-Flores A, Santos T, Rincon E and Merida I (2005) Modulation of the mammalian target of rapamycin pathway by diacylglycerol kinase-produced phosphatidic acid. *J Biol Chem* 280, 10091-10099.
- Azhar M, Schultz Jel J, Grupp I, Dorn GW 2nd, Meneton P, Molin DG, Gittenberger-de Groot AC and Doetschman T (2003) Transforming growth factor beta in cardiovascular development and function. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 391-407.
- Bailey EC, Kobielski S, Park J and Losick VP (2021) Polyploidy in Tissue Repair and Regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 13, a040881.
- Benador IY, Veliova M, Mahdavian K, Petcherski A, Wikstrom JD, Assali EA, Acin-Perez R, Shum M, Oliveira MF, Cinti S, et al (2018) Mitochondria Bound to Lipid Droplets Have Unique Bioenergetics, Composition, and Dynamics that Support Lipid Droplet Expansion. *Cell Metab* 27, 869-885.
- Chen BB, Glasser JR, Coon TA and Mallampalli RK (2012) F-box protein FBXL2 exerts human lung tumor suppressor-like activity by ubiquitin-mediated degradation of cyclin D3 resulting in cell cycle arrest. *Oncogene* 31, 2566-2579.
- Chiu JJ, Chien S (2011) Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev* 91, 327-387.
- Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML and Graf R (2007) Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med.* 356, 1545-1559.
- Dai H, Liu Q and Liu B (2017) Research Progress on Mechanism of Podocyte Depletion in Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res* 2017, 2615286.
- Despeyroux A, Duret C, Gondeau C, Perez-Gracia E, Chuttoo L, de Boussac H, Briolotti P, Bony C, Noel D, Jorgensen C, et al (2018) Mesenchymal stem cells seeded on a human

amniotic membrane improve liver regeneration and mouse survival after extended hepatectomy. *J Tissue Eng Regen Med* 12, 1062-1073.

Elsner J, Michalski M and Kwiatkowska D (2012) Spatiotemporal variation of leaf epidermal cell growth: a quantitative analysis of *Arabidopsis thaliana* wild-type and triple cyclinD3 mutant plants. *Ann Bot* 109, 897-910.

Engeland K (2022) Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ* 29, 946-960.

Espeillac C, Mitchell C, Celton-Morizur S, Chauvin C, Gillet C, Albrecht JH, Desdouets C and Pende M (2011) S6 kinase 1 is required for rapamycin-sensitive liver proliferation after mouse hepatectomy. *J Clin Invest* 121, 2821-2832.

Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A and Chen J (2001) Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294, 1942-1945.

Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C and Blenis J (2004) mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol* 24, 200-216.

Fisher D and Krasinska L (2022) Explaining Redundancy in CDK-Mediated Control of the Cell Cycle: Unifying the Continuum and Quantitative Models. *Cells* 11, 2019.

A

Foster DA, Salloum D, Menon D and Frias A (2014) Phospholipase D and the maintenance of phosphatidic acid levels for regulation of mammalian target of rapamycin (mTOR). *J Biol Chem* 289, 22583-22588.

Gardner LB, Hori T, Chen F, Baine AM, Hata T, Uemoto S and Nguyen JH (2012) Effect of specific activation of gamma-aminobutyric acid receptor in vivo on oxidative stress-induced damage after extended hepatectomy. *Hepatol Res* 42, 1131-1140.

Gentric G and Desdouets C (2014) Polyploidization in liver tissue. *Am J Pathol* 184, 322-331.

He C, Wang K, Xia J, Qian D, Guo J, Zhong L, Tang D, Chen X, Peng W, Chen Y, et al (2023) Natural exosomes-like nanoparticles in mung bean sprouts possesses anti-diabetic effects via activation of PI3K/Akt/GLUT4/GSK-3 β signaling pathway. *J Nanobiotechnology* 21, 349.

Higgins G and Anderson R (1931) Experimental pathology of the liver. *Arch Pathol* 12, 186-202.

Kachaylo E, Txchuor C, Calo N, Borgeaund N, Ungethum U, Limani P, Piguet AC, Dufour JF, Foti M, Graf R, et al (2017) PTEN Down-Regulation Promotes beta-Oxidation to Fuel

Hypertrophic Liver Growth After Hepatectomy in Mice. *Hepatology* 66, 908-921.

Kauffmann R and Fong Y (2014) Post-hepatectomy liver failure. *Hepatobiliary Surg Nutr* 3, 238-246.

Kawasaki Y, Miyara K, Isa T, Honma K, Mutou Y and Toda T (1989) Influence of endogenous endotoxin on the residual liver function following 90% hepatectomy in rats. *Jpn J Gastroenterol Surg* 22, 1778-1782.

Kuma YI, Hosomichi J, Maeda H, Oishi S, Usumi-Fujita R, Shimizu Y, Kaneko S, Suzuki JI, Yoshida KI and Ono T (2021) Intermittent hypoxia induces turbinate mucosal hypertrophy via upregulating the gene expression related to inflammation and EMT in rats. *Sleep Breath* 25, 677-684.

Lee YC, Lee JW and Kwon YJ (2022) Comparison of the triglyceride glucose (TyG) index, triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol (TG/HDL-C) ratio, and metabolic score for insulin resistance (METS-IR) associated with periodontitis in Korean adults. *Ther Adv Chronic Dis* 13, 20406223221122671.

Lehmann K, Tschuor C, Rickenbacher A, Jang JH, Oberkofler CE, Tschopp O, Schultze SM, Raptis DA, Weber A, Graf R, et al (2012) Liver failure after extended hepatectomy in mice is mediated by a p21-dependent barrier to liver regeneration. *Gastroenterology* 143, 1609-1619 e1604.

Liu Y, Cui J, Hoffman AR and Hu JF (2023) Eukaryotic translation initiation factor eIF4G2 opens novel paths for protein synthesis in development, apoptosis and cell differentiation. *Cell Prolif* 56, e13367.

Lutkewitte AJ, Schweitzer GG, Kennon-McGill S, Clemens MM, James LP, Jaeschke H, Finck BN and McGill MR (2018) Lipin deactivation after acetaminophen overdose causes phosphatidic acid accumulation in liver and plasma in mice and humans and enhances liver regeneration. *Food Chem Toxicol* 115, 273-283.

Maiorana A, Tagliaferri F and Dionisi-Vici C (2023) Current understanding on pathogenesis and effective treatment of glycogen storage disease type Ib with empagliflozin: new insights coming from diabetes for its potential implications in other metabolic disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)* 14, 1145111.

Merida I, Arranz-Nicolas J, Rodriguez-Rodriguez C and Avila-Flores A (2019) Diacylglycerol kinase control of protein kinase C. *Biochem J* 476, 1205-1219.

Mérida I, Torres-Ayuso P, Ávila-Flores A, Arranz-Nicolás J, Andrada E, Tello-Lafoz M,

- Liébana R and Arcos R (2017) Diacylglycerol kinases in cancer. *Adv Biol Regul* 63, 22-31.
- Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, Arakawa S, Shimizu S and Miyajima A (2012) Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Curr Biol* 22, 1166-1175.
- Nakatani T, Ozawa K, Asano M, Ukikusa M, Kamiyama Y and Tobe T (1981) Experimental studies on the changes in energy substrate after hepatectomy. *Jpn J Gastroenterol Surg* 14, 1420-1426.
- Oba D, Inoue SI, Miyagawa-Tomita S, Nakashima Y, Niihori T, Yamaguchi S, Matsubara Y and Aoki Y (2018) Mice with an Oncogenic HRAS Mutation are Resistant to High-Fat Diet-Induced Obesity and Exhibit Impaired Hepatic Energy Homeostasis. *Ebio Medicine* 27, 138-150.
- Oh SH, Swiderska-Syn M, Jewell ML, Premont RT and Diehl AM (2018) Liver regeneration requires Yap1-TGFbeta-dependent epithelial-mesenchymal transition in hepatocytes. *J Hepatol* 69, 359-367.
- Okada N, Sugiyama K, Shichi S, Shirai Y, Goto K, Sakane F, Kitamura H and Taketomi A (2022) Combination therapy for hepatocellular carcinoma with diacylglycerol kinase alpha inhibition and anti-programmed cell death-1 ligand blockade. *Cancer Immunol Immunother* 71, 889-903.
- Onoue K (1981) Histological studies of endotoxin-induced rat liver by the two step peritoneal injection and effects of pre-treatment with various immunopotentiators. *Kanzo* 22, 1525-1537.
- Orcutt ST and Anaya DA (2018) Liver Resection and Surgical Strategies for Management of Primary Liver Cancer. *Cancer Control* 25, 1073274817744621.
- Peng C, Li C, Liu C, Wen T, Yang J, Li B and Yan L (2019) The outcome of the HCC patients underwent ALPPS: Retrospective study. *Medicine (Baltimore)* 98, e17182.
- Ren Q, Chen S, Chen X, Niu S, Yue L, Pan X, Li Z and Chen X (2022) An Effective Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists, Semaglutide, Improves Sarcopenic Obesity in Obese Mice by Modulating Skeletal Muscle Metabolism. *Drug Des Devel Ther* 16, 3723-3735.
- Rudnick DA and Davidson NO (2012) Functional Relationships between Lipid Metabolism and Liver Regeneration. *Int J Hepatol* 2012, 549241.
- Sakaguchi M, Miyazaki M, Sonogawa H, Kashiwagi M, Ohba M, Kuroki T, Namba M and Huh

NH (2004) PKC α mediates TGF β -induced growth inhibition of human keratinocytes via phosphorylation of S100C/A11. *J Cell Biol* 164, 979-984.

Sakane F, Hoshino F, Ebina M, Sakai H and Takahashi D (2021) The Roles of Diacylglycerol Kinase α in Cancer Cell Proliferation and Apoptosis. *Cancers (Basel)* 13, 5190.

Sakane F, Hoshino F and Murakami C (2020) New Era of Diacylglycerol Kinase, Phosphatidic Acid and Phosphatidic Acid-Binding Protein. *Int J Mol Sci* 21, 6794

Schlegel A, Lesurtel M, Melloul E, Limani P, Tschuor C, Graf R, Humar B and Clavien PA (2014) ALPPS: from human to mice highlighting accelerated and novel mechanisms of liver regeneration. *Ann Surg* 260, 839-846; discussion 846-837.

Schott MB, Weller SG, Schulze RJ, Krueger EW, Drizyte-Miller K, Casey CA and McNiven MA (2019) Lipid droplet size directs lipolysis and lipophagy catabolism in hepatocytes. *J Cell Biol* 218, 3320-3335.

Sekiya S and Suzuki A (2011) Glycogen synthase kinase 3 β -dependent Snail degradation directs hepatocyte proliferation in normal liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11175-11180.

Shirai M, Shiga J and Mori W (1985) Experimental study on the mechanisms of acute hepatic necrosis after hepatic resection. *Kanzo* 26, 1465-1471.

Shwartzman G (1928) A new phenomenon of local skin reactivity to *B. typhosus* culture filtrate. *Proc. Soc. Biol. Med.* 25, 560.

So J, Kim A, Lee SH and Shin D (2020) Liver progenitor cell-driven liver regeneration. *Exp Mol Med* 52, 1230-1238.

Takashima S, Takenaka H, Izumi Y, Saito S, Sumitani H and Nakamura H (2010) Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Investigation of Impaired Step of Insulin Signaling Pathway in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Jornal of Ningen Dock* 25. 44-49.

Takeishi K, Taketomi A, Shirabe K, Toshima T, Motomura T, Ikegami T, Yoshizumi T, Sakane F and Maehara Y (2012) Diacylglycerol kinase α enhances hepatocellular carcinoma progression by activation of Ras-Raf-MEK-ERK pathway. *J Hepatol* 57, 77-83.

Tanaka H, Hirohashi K, Kubo S, Shuto T, Higaki I and Kinoshita H (2000) Preoperative portal vein embolization improves prognosis after right hepatectomy for hepatocellular carcinoma in patients with impaired hepatic function. *Br J Surg* 87, 879-882.

Tang X, Rong G, Bu Y, Zhang S, Zhang M, Zhang J and Liang X (2015) Advanced oxidation protein products induce hypertrophy and epithelial-to-mesenchymal transition in human proximal tubular cells through induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Physiol Biochem* 35, 816-828.

Xiaopeng C and Jin T (2023) Perfluorooctane sulfonate (PFOS) causes aging damage in the liver through the mt-DNA-mediated NLRP3 signaling pathway. *Ecotoxicol Environ Saf* 262, 115121.

Yagi S, Hirata M, Miyachi Y and Uemoto S (2020) Liver Regeneration after Hepatectomy and Partial Liver Transplantation. *Int J Mol Sci* 21, 8414

Yokota T, Kohno Y, Nara M, Nagamine S, Ozawa K and Tobe T (1980) Reticuloendothelial dysfunction following liver surgery. *Jpn J Gastroenterol Surg* 13, 933-938.

Yoon MS, Sun Y, Arauz E, Jiang Y and Chen J (2011) Phosphatidic acid activates mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) kinase by displacing FK506 binding protein 38 (FKBP38) and exerting an allosteric effect. *J Biol Chem* 286, 29568-29574.

Yu Y, Tamai M and Tagawa Y (2017) Nitric oxide is critical for avoiding hepatic lipid overloading via IL-6 induction during liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Exp Anim* 66, 293-302.

Zhao L, Dai C and Gong Q (2020) Changes of Endocan and its effect on hepatic stem cells during the rapid proliferation process of residual liver after ALPPS procedure. *Cell Biochem Funct* 38, 817-825.

Zhao ZM, Mei S, Zheng QY, Wang J, Yin YR, Zhang JJ and Wang XZ (2023) Melatonin or vitamin C attenuates lead acetate-induced testicular oxidative and inflammatory damage in mice by inhibiting oxidative stress mediated NF-kappaB signaling. *Ecotoxicol Environ Saf* 264, 115481.

プライマー配列list

Target	Forward	Reverse
Cd36	catttgcaggtctatctacgtgtg	atggttgtctggattctggaggg
Cpt1a	ggcacattgtcgtgtaccacag	ctctgaggtgtcatccaggatctg
Hadha	gctttgtggatctgtatggtgctc	tagagtgttagcgtggctcagg
Hadhb	tgcgttctcatagtctggcaa	ggtaactgtgtcctttcctggtact
Scd1	ttccctcctgcaagctctacac	cagccgtgccttgaagtctg
Acaca	tctgtctcacacacttctgaaca	cacttcacacacgagccattc
Fasn	tgtggccttctcctctgtaagc	gcgctgttcacatatacgctcc
Ppargc1a	gacactgctgatgcctgtgtc	aagagagagagagagcttgctgc
Glucokinase	ggccacaatgatctcctgtacta	ctccacattctgcatctcctcca
Glycogen Phosphorylase	gccaaagaatattacgaggcccttc	tgaagaggtctggctgattggg
phosphoglucomutase-1	cggtgccaagatcaaccaggac	ttctaggtgatgacagtgggcg
Phosphofructokinase-1	agccaccatcagcaacaatgtg	ctacaatgaacacacgccgctt
phosphoglyceratekinase-1	ctgttctcctcttctcatctccg	tgaagtccaccctcatcacgac
pyruvate kinase	agagtcggaggtggaaattgtgaa	gcaacgacctgggtgatattgtg
p21	ttctcagtgttgaataccgtgggt	cagtccagaccaggatgttacagaa
cyclinD	gccgagaagttgtgcatctacac	tccacttgagcttgttcaccaga
cyclinE	gactcttcacacagatgacacaagc	tctgcatcccacacttgctca
cyclinA	gccttcacttggctctctaca	cgctttgaggtaggtctggtga
cyclinB	gacatctaccagtacctcaggcag	gaaacttggaatggacttgaccag
β -actin	ttgggtatggaatcctgtggcat	tgtcagcaatgcctgggtaca
DGK α	ccagaagacaagctagagttcacct	acacatcccagcttagatattcggc
TNF α	aaagacaccatgagcacagaaagc	gcaggaatgagaagaggctgaga
HGF	ttgcagtagccctcacagca	agcagtagccaactcggatgtt
TGF β	cagagaagaactgctgtgtgcg	tgtgtccaggctccaaatataggg
C/EBP	aacctggagacgcgacacaa	cttgaacaagttccgcagggtg
CHOP	aggtcacacgcacatcccaa	ttcttccttgctcttctcctcttc
ATF4	aagcctgactctgctgttaca	aggtaggactctgggtcataca
ATF6	gctatggctgtgaacatggcttt	gcttagctgtcctgtcctgga
NRF2	tcagattcacaccagctctttgga	cctcggtgtcctctaagcaaa
PCNA	cgagaccttagccacattggaga	ccgcctcctcttcttattccaca
PLD1	cccagagaatcctgaaagccca	tggaaatgtctccctcgaatccc
AGPAT1	ctcatctcaagtggctcatccgata	agtccattgtccagtgtagggc
ACSL	caagtctttgccacatccgacc	tcaataacacacgcactgtcacac
ACSS	cgacgggatcaggatggctatt	cgattccacctctgctgtactca
CACT	acgtgctcaagtctcgattcca	ctcggatcagctctctcaacaca
ACAD	ctgcatctcttctgacctcagct	tcggcacatgaccacatagatgt
MCAD	gcagccaatgatgtgtgcttact	acccttctctctgctttggtctt
SCAD	gtgctgtgaagtatgccgagaac	ccatgtctgccagcttgaactg
ACSM	agtgccctcatagaacatccttcc	gcctttactacctctcctctgatgg
nNOS	tgctcgggttcagtgtggtt	gcttgggagctttgcttgatcat
iNOS	cagatcccgaacgcttcacttc	tgttgaggtctaaaggctccgg
eNOS	gccctcttcatatgctttgatggac	gtaactcacaaggttgggttggg