

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19917

研究課題名(和文)細胞外マトリックスに着目した膵切除後NASH発生機序に関する分子基盤的研究

研究課題名(英文)Molecular basis study for revealing the pathogenesis of NAFLD after pancreatic resection focusing on extracellular matrix

研究代表者

加藤 宏之(Kato, Hiroyuki)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50737004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：PD後に発症する脂肪肝炎の病態を マウスもしくはラットPDモデルを作成し、その原因をMMP-9 に着目し、解明するため本研究を行った。マウスPD後、HE染色で肝細胞の空洞化がみられ脂肪沈着が示唆された。しかし、マウスにPDを施行すると術後から極度の食欲不振に陥り脱水状態となり24h以上の生存が得られないためRatを用いたPDモデルを作成することとした。ラットにおいてもPD群でTNF- α のmRNA発現上昇を認めMMP-9の免疫染色でもPDモデルで肝MMP-9発現上昇を認めた。HE染色では肝細胞の空洞化、脂肪沈着が認められたがラットでも術後極度の食欲不振を認め48h以上の生存が困難であった。

研究成果の概要(英文)：We performed the study to prove the etiology of development of NASH after a pancreaticoduodenectomy (PD) using mice or rat PD models. Even in mice and rat PD model, significant liver injury and fat deposition to the liver parenchyma and sinusoidal injury as evidenced by PECAM-1 depression were seen at the 24 hours after PD. Nevertheless, we observed the phenomenon that mice and rat markedly lost their appetite, resulting in death. However, In rat PD model, the level of TNF- α mRNA, neutrophil infiltration and monocytes infiltration in liver are significantly potentiated, with compared to the SHAM model. In conclusion, MMP-9 upregulation might be associated with the development of NAFLD after PD.

研究分野：肝胆膵移植外科

キーワード：膵頭十二指腸切除 細胞外マトリックス NAFLD

1. 研究開始当初の背景

我々は、2009年、膵頭十二指腸切除後の患者に高率に非アルコール性脂肪肝（NAFLD）が発生し、膵外分泌機能不全や感染性腸炎、栄養傷害を契機に急激にNAFLDから非アルコール性脂肪肝炎（NASH）へ移行し肝不全に至る症例があることを本邦で最初に報告した（Kato H, J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2010. 296-304）それ以降、膵切除後NAFLD/NASHは欧米においても注目されるようになり、近年、盛んに臨床研究が行われるようになった。また、2011年にはPD後NASHを発症し急激な経過をたどり死に至った症例も報告され、当疾患の治療法や原因究明の重要性が示唆された。一方、生活習慣病や肥満などに伴う内科的NAFLDやNASHに関しては以前より活発な議論が学会や臨床現場においてもなされており、したがって内科的NAFLDの予防や進行の阻止を目的とした臨床、基礎研究も盛んに行われているのが現状である。しかし、このような内科的NAFLD/NASHに比べて、PD後に発生するNASHとそれに続発する肝不全の発生機序を分子生物学的に解明することを目的とした基礎的研究は、いまだ皆無であると言わざるを得ない。

研究者は、PD後NAFLDの原因に関して、外分泌機能不全に伴う脂肪吸収障害が誘因で脂肪酸欠乏状態となり、肝において糖質から脂肪への変換が著明となり、肝への脂肪沈着が亢進するという機序を想定している。しかし、NAFLDから不可逆的な肝障害であるNASHさらには致死性肝不全へどのように移行するかに関しては未だ不明のままである。また内科的NAFLD/NASHが10年以上かけて緩徐に進行する

のに対して、膵切除後NASHは急激に肝不全に移行する傾向がある。

したがって、臨床研究のみならず、PD後NAFLD/NASH/不可逆性肝障害に至るまでの病態生理を分子生物学的に解明することが急務であると考えられ、申請者は下記に記すような動物PDモデルを用いた基礎研究をおこなった。

2. 研究の目的

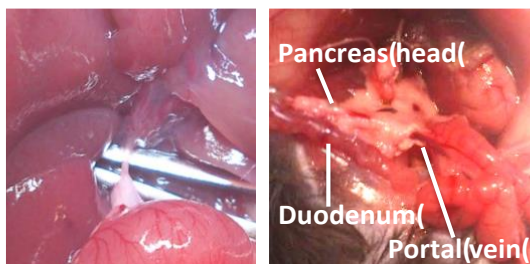
膵頭十二指腸切除後に高率に発症する脂肪肝炎、肝不全の病態をマウスもしくはラットを用いてPDモデルを作成し、その原因を細胞外マトリックス蛋白、特にMMP-9に着目し、解明するため本研究を行った。

3. 研究の方法

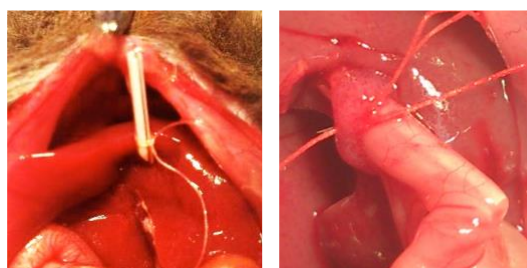
まずマウスPDモデルを作成しPD後NASHと続発する肝不全の発症にMMP-9やPECAM-1などの細胞外マトリックス蛋白の発現亢進もしくは低下が密接に関係しているのではないかと仮説をたてマウスPDモデルを作成し術後24h後に肝臓を採取しH&E染色、Ly6G染色（好中球染色）PECAM-1染色（類洞内皮染色）を用いて病理学的な評価をおこない正常肝組織と比較した。

【手術の実際】

胆管空腸吻合と胃空腸吻合を含むPDモデルをマイクロスコープを使用して作成した。まず開腹しマイクログ顕微鏡下に総胆管を同定し結紮切離する。（事項 左）



十二指腸と膵頭部を門脈から剥離し切離する。
(写真上右)



総胆管へのチューブカニュレーションは困難なため結紮により腫大した胆嚢に 26G サーフロを挿入し (写真上左)、ついでサーフロを切離した空腸に挿入し吻合する (写真上右)。



最後に胃空腸吻合を手縫い吻合で行い膵頭十二指腸切除を終了する (写真上)。

手術時間はだいたい 1 時間から 1 時間 30 分くらいである。

【Assay と免疫染色の評価】

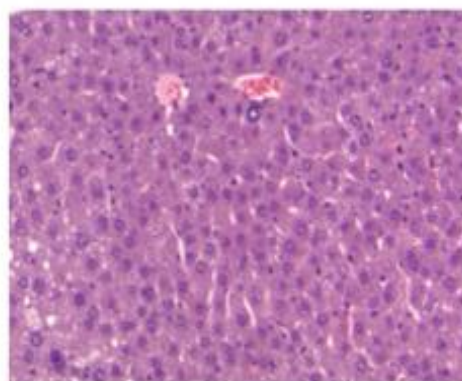
術後 24h 後に肝臓を採取し H&E 染色、Ly6G 染色 (好中球染色) PECAM-1 染色 (類洞内皮染

色) を用いて病理学的な評価をおこない SHAM operation group と比較した。

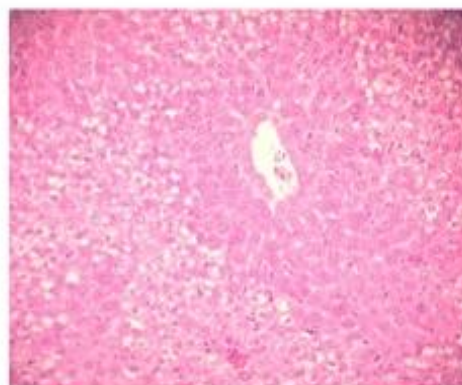
4. 研究成果

正常肝組織では肝実質に好中球浸潤は見られず、類洞内皮からの PECAM-1 発現は保たれていた。しかし PD 後傷害肝では肝実質に著明な好中球浸潤と類洞内皮傷害による PECAM-1 の発現低下が認められた。HE 染色をみると肝細胞の空洞化がみられ脂肪沈着が示唆されたが Oil-red-O 染色では明らかな脂肪沈着が確認できなかった。

正常肝組織

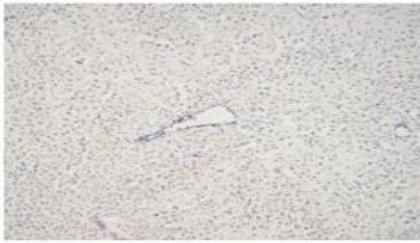


PD後の傷害肝組織

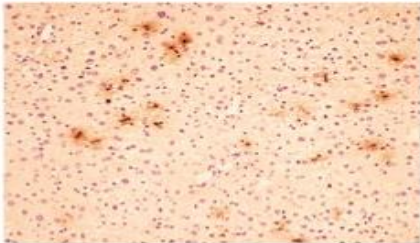


H and E staining

正常肝組織



PD 後

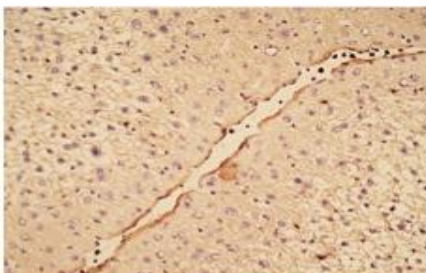


Neutrophil staining

正常管組織



PD 後



PECAM-1 staining

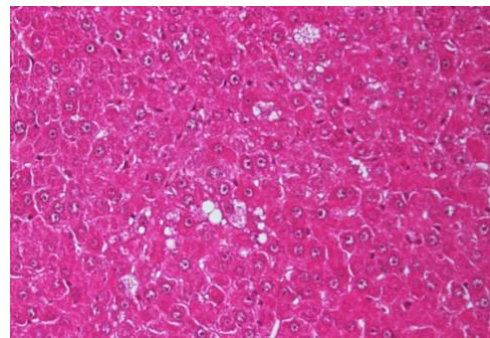
【ラット PD をモデルの作成】

その後、マウスを用いた PD モデル作成を継続したがマウスに PD を施行すると術後から極度の食欲不振に陥り脱水状態となり長期生

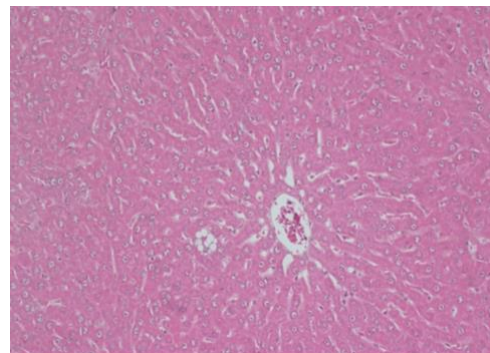
存が得られないため Mice より大動物である Rat を用いた PD モデルを作成することとした。ラットにおいても同様に PD を施行すると肝に炎症がみられ術後 24h で

GOT 469 ± 275 、GPT $:136 \pm 96$ と肝機能異常を認めた。

また HE 染色では中心静脈域周囲に脂肪沈着と考えられる空洞化を認め（写真上）、さらに類洞の全体的な拡張を認めた（写真下）。

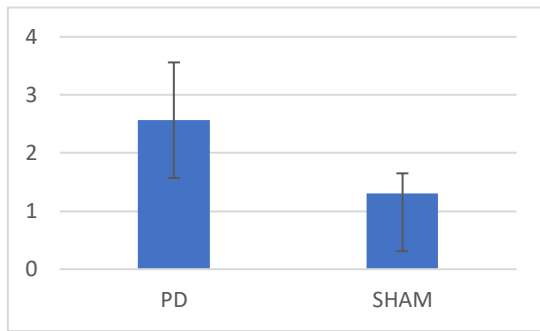


肝実質に脂肪沈着を認める（上）

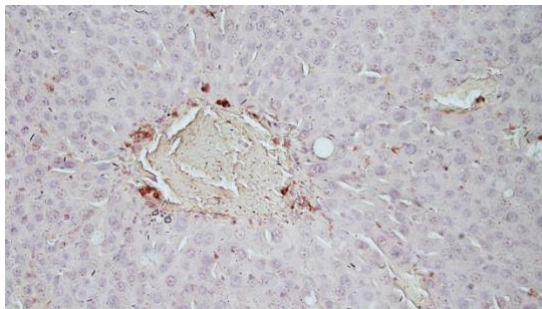


リアルタイム PCR では PD 群で TNF- α の mRNA 発現上昇を認めた。

(PD: 2.57 ± 1.31 vs. SHAM: 0.99 ± 0.34 TNF- α /B-actin)。

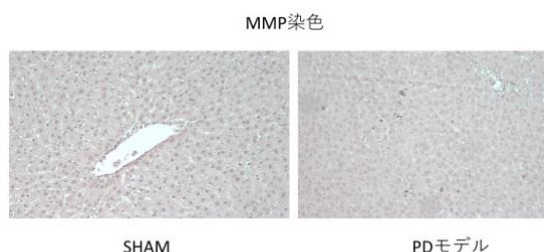


ナフトール ASD、ED1 を用いた白血球染色においても試験開腹群に比して優位な白血球浸潤増加を認めた。



ED1 染色（上）

MMP-9 を用いた免疫染色でも PD モデルで肝内に MMP-9 染色の発現上昇を認めた。一方、SHAM グループでは MMP-9 の肝内での発現はほとんど認めなかった。



【結論】

- ① マウスもしくはラットを用いて PD を施行すると術直後より極度の食欲不振を認め、飢餓により長期生存を得る

ことが困難であった。

- ② PD を施行すると肝臓を直接操作していないにもかかわらず、肝機能障害が出現した。
- ③ マウス、ラットに PD を施行すると著明な好中球、マクロファージを中心とした白血球の肝臓への浸潤が認められることになり類洞内皮障害も惹起されていた。
- ④ PD 後、肝臓に MMP 9 陽性細胞が確認されるようになり PD 後肝障害の原因の一つとして考えられた

これらの結果を総合すると、PD 後の消化管再建が原因となり、マウス、ラットでは極度の食欲不振が起こり、手術侵襲によるエネルギーの枯渇が相まって何らかの肝障害が起これと考えられた。白血球浸潤、内皮障害は確認できるもののヒトで発症するような顕著な脂肪肝までは動物実験モデルでは確認できないため、今後さらなる動物実験モデルの開発や現行モデルの改善を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

坂口充弘、飯澤祐介、藤井武宏、加藤宏之、伊佐地秀司 膵頭十二指腸切除後の脂肪肝 胆と膵 Vol39 2018 5 月号

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 宏之 (Kato, Hiroyuki)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：5 0 7 3 7 0 0 4

(2) 研究分担者

()