

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15328

研究課題名(和文) 2光子励起顕微鏡を用いたNASH進行早期診断における客観的指標の確立

研究課題名(英文) Establish objective indicators of early diagnosis of NASH progression by two photon excitation microscope

研究代表者

山本 晋 (Yamamoto, Shin)

愛媛大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：70646992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の発生率は増加している。NASH確定診断は、肝組織病理学的検査が必要である。光学イメージングは、生体内細胞レベルで構造、形態および分布を視覚化できる。線維化は、第2高調波発生(SHG)と呼ばれる非線形光学現象で、無染色で直接観察することができる。本研究では、NASHモデルマウスの肝組織のSHGと自己蛍光(AF)イメージングを行った。3次元SHGとAFイメージング、最大強度投影法(MIP)での画像処理、統計解析で、肝表面や肝実質での線維化と形態学的変化を観察した。この研究で行った定量的SHG、AFイメージング法は、NASHの診断に適用することができた。

研究成果の概要(英文)： The non-alcoholic steatohepatitis (NASH) has been increasing. The definitive diagnosis of NASH requires histopathological examination of liver biopsy samples. Optical imaging techniques make it possible to visualize structure, morphology, and molecular distribution in vivo at the cellular level. Fibrosis can be observed directly without staining due to a nonlinear optical phenomenon called second harmonic generation (SHG). Here we demonstrate SHG and auto-fluorescence (AF) imaging targeting ex vivo liver tissues in NASH model mice. Using three-dimensional (3D) SHG and AF imaging, image processing by maximum intensity projection (MIP), and statistical analyses, we successfully characterized the fibrotic and morphological changes in hepatic capsule and hepatic parenchyma. The direct and quantitative SHG and AF imaging method presented in this study could be applied to diagnosis of NASH.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 第二次高調波発生 自家蛍光

1. 研究開始当初の背景

近年、肝炎ウイルスによる肝硬変、肝細胞がんの発症が減少している一方で、NAFLD から NASH による肝硬変、肝細胞がんが増えてきている。NAFLD から NASH への診断に関しては、肝の線維化を反映する各種線維化マーカーの測定や血小板数、超音波エラストグラフィでの肝硬度などを参考にしているが、NASH の確定診断は、組織生検での肝の脂肪化や線維化、炎症性細胞浸潤の程度によって行われている。NAFLD 症例から NASH へ進行する症例の早期の見極めが、NASH 肝硬変、肝細胞がんの発症を抑制するために必要である。

2. 研究の目的

(1) 近年、肝炎ウイルスによる肝硬変、肝細胞がんの発症が減少している一方で、NAFLD から NASH による肝硬変、肝細胞がんが増えてきている。NAFLD から NASH への診断に関しては、肝の線維化を反映する各種線維化マーカーの測定や血小板数、超音波エラストグラフィでの肝硬度などを参考にしているが、NASH の確定診断は、組織生検での肝の脂肪化や線維化、炎症性細胞浸潤の程度によって行われている。NAFLD 症例から NASH へ進行する症例の早期の見極めが、NASH 肝硬変、肝細胞がんの発症を抑制するために必要である。

(2) 非アルコール性脂肪肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) から非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) への病期進行における肝線維化の変化を、NASH モデルマウス(ストレプトゾシン投与 + 高脂肪食飼育)を用いて最新鋭の 2 光子励起顕微鏡で、無染色かつ経時的に in vivo において観察し、定量的評価を行う。病理組織標本との比較、炎症性マーカーや線維化マーカー、肝星細胞の活性化の mRNA レベルでの変化を、高脂肪食飼育の wild type マウスと継続的に in vivo で比較することで、NASH への進行を早期に診断可能にする新たな客観的指標を確立する。早期診断につながる変化を客観的に捉えることで NASH に対する新たな創薬や治療法確立につながる基礎的知見を得る。

3. 研究の方法

(1) NASH モデルマウスを用いて、NASH の病期進行における肝線維化の変化を、最新鋭の 2 光子励起顕微鏡を用いて in vivo 観察をおこなう。具体的に、線維化に関しては SHG イメージングにより無染色かつ経時的に観察を行い、定量的な評価を行う。また線維化に伴う組織学的・形態学的な変化を自家蛍光で捉えるとともに、炎症マーカーの発現、組織切片の線維化のスコア化による評価を同時に行う。また、NASH モデルマウスに治療介入を行い、改善への変化を 2 光子顕微鏡で in

vivo で継続的に観察し、NASH への病態にまつわる早期の変化を NASH 進行の新たな客観的指標として確立する。この客観的指標を用いて高脂肪食飼育の wild type マウスを分類飼育し、2 光子励起顕微鏡により in vivo で継続的に観察を行い、NASH 進行への変化を評価し、確立した指標の妥当性を明らかにする。(2) NASH モデルマウスは、ステリック再生医科学研究所から購入する。5 週齢以降で愛媛大学へ搬入し、高脂肪食を給餌しながら炎症、脂肪の蓄積を経て線維化を起こす過程を 2 光子顕微鏡により、解析する。2 光子顕微鏡による肝線維化の評価と平行して、炎症マーカーの発現を生化学的・分子生物学的な方法でおこない、炎症・脂肪肝・線維化の各ステージを顕微鏡画像において同定する。また、2 光子顕微鏡で観察したサンプルは、病理組織標本を作成し、染色法により線維化のスコア化をおこない、各病態のステージにおいて、顕微鏡画像の組織学的な変化や特徴を抽出し、定量化する。

(3) NASH モデルマウスを用いた肝線維化の 2 光子励起顕微鏡による継続的 in vivo 観察

前年度同様ステリック再生医科学研究所から 5 週齢で搬入し、肝臓の観察には吸引固定装置を用いて 2 光子励起顕微鏡で継続的に in vivo 観察をおこない、肝細胞やビタミン A の TPEF を観察する。また SHG シグナルを用いて線維化を観察定量化する。

肝線維化マーカー、肝炎症性マーカー、NAS スコア、免疫組織化学染色での検討 NASH モデルマウスの肝片より mRNA を採取して、肝線維化マーカーや肝炎症性マーカーの評価を行う。また、病理組織染色にて線維化や炎症性細胞の浸潤、脂肪化などを評価し、NAS スコアの評価を行い、2 光子励起顕微鏡画像の定量データを統合的に解析する。

NASH モデルマウスに対する治療介入(高脂肪食飼育 通常食飼育)で見られる変化を in vivo で継続的に観察する。

、の分析により NASH に関わる早期の変化を客観的に数値化して新たな指標を確立する。

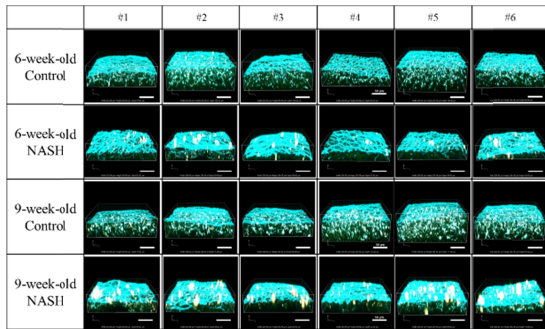
(4) 高脂肪食飼育 Wild type マウスの継続的 in vivo 観察

NASH モデルマウスと同様の戦略で、高脂肪食飼育 Wild type マウスにおける変化を 2 光子励起顕微鏡で継続的に in vivo で観察する。具体的には、NASH モデルマウスを使用した実験で確立する NASH への進行予測を示す客観的指標をもとに、高脂肪食飼育 Wild type マウスを 2 光子励起顕微鏡の観察により分類し、さらにそれぞれを 2 光子励起顕微鏡で in vivo で継続的に観察し、確立した客観的指標の妥当性を確認する。

4. 研究成果

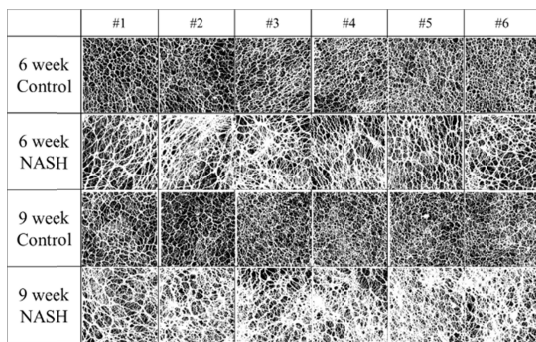
(1) 平成 28 年度は、肝線維化への過程を、NASH モデルマウスを用いて 2 光子励起顕微

鏡で無染色、in vivo 観察し、定量的評価を行った。NASH への進行とともに肝表面の SHG で示されるコラーゲン線維の構造変化が確認された。肝表面のコラーゲン線維構造は病理組織検査で評価することが出来ない。肝表面コラーゲンの構造変化を画像解析することで、有意な変化としてとらえられた。肝表面の肝被膜に注目するとコントロールと比べ、NASH モデルでは、SHG シグナル強度の変化や配向変化が見られた。(図 1)

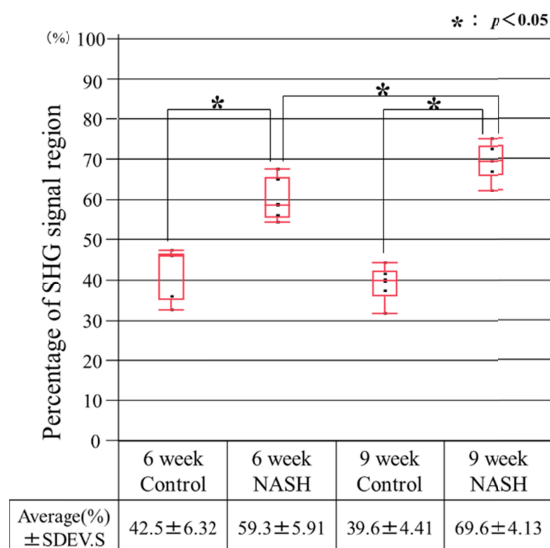


(図 1) Three-dimensional reconstructed images of the liver tissues.

この結果を 2 値化 (図 2) することで線維化の変化を定量的に評価した。(図 3)



(図 2) The binarized images of the maximum intensity projection of SHG.



(図 3) Boxplots of the percentage of SHG

signal region in binarized image of the MIP.

コントロールと NASH モデルマウス間だけでなく NASH モデルマウスの 6 週齢と 9 週齢の間でも有意な変化が見られた。この結果により 2 光子励起顕微鏡を用いた低侵襲的にかつ無染色での NASH 進行例のふるい分けが可能となり、腹腔鏡と融合した新規デバイスとしての臨床応用が期待される。肝被膜コラーゲン線維の SHG シグナルによる無染色での定量的評価法が、NASH に至る前の早期の病期における変化を捉えることに有用であった。この方法は、より進行した NASH ステージでの変化も定量的な分析を可能にし、2 光子励起顕微鏡による肝被膜の観察と分析方法が、客観的な診断、評価法として有用なツールとなりうると考えられた。この成果は Quantitative imaging of fibrotic and morphological changes in liver of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model mice by second harmonic generation (SHG) and auto-fluorescence (AF) imaging using two-photon excitation microscopy (TPEM): Biochemistry and Biophysics Reports Volume 8, December 2016, Pages 277-283 に投稿した。

(2) 平成 29 年度の研究として、28 年度で得られた新たな評価ポイントを指標に、治療介入後の NASH の改善過程において新たな評価ポイントに可逆的な改善が認められるかを確認するために、引き続き NASH モデルマウスを用いて、治療(栄養療法)介入を行った。9 週齢の NASH モデルマウスに対して High fat diet (HFD) を standard diet (SD) に変更し 3 週間後の肝表面を 2 光子励起顕微鏡を用いて SHG シグナルおよび、他のバイオマーカーとの比較を行った。平成 28 年度で診られた肝表面の SHG シグナル変化の著明な改善(正常化)が認められた。3 週間という期間では肝表面コラーゲン線維の構築の正常化が診られ、3 週間以内での経時的な観察が必要であると思われた。この SHG シグナルによる評価方法が、NASH の進行および改善を予測しうる新たな客観的指標となると考えられた。また、薬剤の使用による肝線維化の改善度を評価しうる新たな指標になると考えられた。

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 2 件)

今村健志、山本晋(9 番目)、日浅陽一(他 7 名)

医療応用を目指した愛媛大学医学部発の蛍光イメージング技術開発

愛媛医学 査読あり。36 巻 123-127 2017

Shin Yamamoto、Yusuke Oshima、Bunzo

Matsuura, Yoichi Hiasa, Takeshi Imamura
(他6名)

Quantitative imaging of fibrotic and morphological changes in liver of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) model mice by second harmonic generation (SHG) and auto-fluorescence (AF) imaging using two-photon excitation microscopy (TPEM)
Biochemistry and Biophysics Reports 査読あり。25;8:277-283 2016
DOI : 10.1016/j.bbrep.2016.09.010

〔学会発表〕(計1件)

山本 晋

2光子励起顕微鏡を用いたNASH進行早期診断における客観的指標の確立
第20回日本病態栄養学会年次学術集会
2017年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 晋 (Yamamoto, Shin)

愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座
助教

研究者番号：70646992