

平成30年5月5日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15424

研究課題名（和文）遺伝子改変メダカを用いたNASH環境下での新規肝発癌モデルの開発

研究課題名（英文）Development of Medaka NASH Model and Hepatocarcinogenesis

研究代表者

寺井 崇二 (Terai, Shuji)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00332809

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、メダカを動物モデルとして、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）に伴う肝障害、肝硬変、肝発癌の過程を検証し、その進展制御のための治療法確立を目的として検討を行なった。本研究助成基金によって、以下の研究成果が得られた。drRメダカモデルを用いて、ヒトNASHの病態を再現するNASHメダカモデルの確立し、肝組織、血液生化学の検討による検証の後に、同メダカモデルを対象として、抗糖尿病薬であるSGLT2阻害剤によるインスリン抵抗性の改善、肝組織内の炎症性変化の改善の有無、脂肪変性の改善などの効果を検証した。また、肝癌に対する血管新生阻害剤のメカニズム及び治療方法を検討することが可能であった。

研究成果の概要（英文）：The development of Medaka NASH model was examined. The drR medaka was utilized to develop the model. High fat diet was continuously administered to the model and the liver tissue, blood biochemistry were carefully examined to determine whether the NASH model mimicking the condition in the human. The results showed that the successful development of the model. Following this success, the prevention of the progression of NASH in Medaka liver was assessed using SGLT2 inhibitor. Surprisingly, the SGLT2 inhibitor successfully inhibited the progression of NASH in these model.

研究分野：消化器病学

キーワード：メダカモデル NASH

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に伴う肝癌発生が問題になっている。マウス NASH モデルの確立は長期の飼育が必要であり、さらに発癌機序の詳細な評価は困難である。その理由のひとつは、摂取の個体差がひとつの要因であった。そこで、我々はこれまでに検証を行ってきた水生動物であるメダカモデルを用いて検討を行うこととした。

メダカはヒトと同じ脊椎動物であり、新たなモデル生物として注目されている。我々が世界で初めて確立したメダカ NASH モデルは高脂肪食投与により約 12 週間で NASH を誘導し (DMM 2010)、早期から酸化ストレスが生じ、肝脂肪化、肝細胞の風船様変化の後に肝線維化が誘導される。本モデルを用いて、n3PUFA (n3 系多価不飽和脂肪酸)、Ezetimibe (脂肪吸収阻害剤)、Telmisartan (PPAR 活性化剤) の治療効果が明らかとなり、これらの薬物がヒト NASH においても有効であることから、メダカ NASH モデルの薬物スクリーニング系としての有用性が実証された。更に我々は Diethyl-nitrosamine (DEN) を用い小型魚類動物 (ゼブラフィッシュおよびメダカ) が肝発癌モデルとして有用であること (PLoS One 2015)、宇宙空間に 2 ヶ月間滞在したメダカの網羅的遺伝子発現解析から腸管および肝臓に細胞ストレスが生じていることを明らかにした (JAXA、東京大学との共同プレスリリース 2015 年 10 月 13 日)。このようにメダカモデルを用いた NASH や肝発癌の検証と解析においては十分な実績を有し、また血管系可視化メダカとして Fli-GFP メダカも作成し解析を進めてきた。

## 2. 研究の目的

これらの経験に基づいて、本研究では、メダカモデルを用いた NASH モデルの確立と、

その進展制御、さらには発がん予防の点から検証を行なうこととした。

一方で、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に対して、種々の糖尿病治療薬の有効性が報告されている。SGLT2 阻害薬であるイブラグリフロジンやルセオグリフロジンでは、マウスの NASH モデルにて NASH 進展抑制効果が報告されている。これまで水生動物であるメダカを用いたヒト疾患治療薬の有効性評価が本邦を中心に行われており、我々はメダカに高脂肪食を投与した NASH モデルを作成し、SGLT2 阻害薬であるトログリフロジン (TOFO) の NASH 進展抑制効果を検証した。

## 3. 研究の方法

メダカは drR/Tokyo (近交系) を用いて実験を行った。高脂肪食 (HFD32) を 20 mg/day/body 投与した NASH 群と、HFD に加え TOFO を投与した TOFO 群と比較した。TOFO の分量は、健康成人に通常投与量の 20mg を投与した際の  $C_{max}$  500 ng/mL と、水槽濃度が同じになるように設定した。SGLT2 の効果については、腎臓組織の SGLT2 発現の低下を確認した。投与開始後 4 週、8 週、12 週で体重、肝重量、肝酵素などの血液生化学検査、肝組織内の脂肪量と線維化を HE 染色と Sirius Red 染色により比較検討し、TOFO の NASH に対する治療効果を検証した。

## 4. 研究成果

肝重量体重比は、4 週投与後では有意差を認めなかったが、8 週投与後で NASH 群 5.2 %、TOFO 群 4.7 % であり TOFO 群にて有意に上昇が抑制された ( $P < 0.05$ )。12 週投与後では有意差を認めなかった。血液生化学検査では、8 週投与後で TG は NASH 群 3240 mg/dL、TOFO 群 1960 mg/dL、T-CHO は NASH 群 370 mg/dL、TOFO 群 270 mg/dL となり TOFO 群にて血中脂質の上昇が抑制された。ALT は、4 週投与後で NASH 群 420 IU/L、TOFO 群 190 IU/L と TOFO

群で ALT の上昇が抑制された。肝組織内の脂肪組織量は Image J にて定量化し、8 週投与後で NASH 群 30.7 %、TOFO 群 18.6 %と TOFO 群にて脂肪組織量の上昇が有意に抑制された(P<0.01)。12 週では脂肪組織量および線維化に有意差を認めなかった。

以上より、投与後8週まではTOFOによるNASH進展抑制効果が認められ、SGLT2 阻害薬である TOFO の投与が NASH の進展抑制に有用である可能性が示唆された。

また、本研究の過程で、メダカモデルを用いて肝臓に対する血管新生阻害剤のメカニズム及び治療方法を検討することが可能であった。

#### 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 1 件 )

Shinagawa-Kobayashi Y, Kamimura K, Goto R, Ogawa K, Inoue R, Yokoo T, Sakai N, Nagoya T, Sakamaki A, Abe S, Sugitani S, Yanagi M, Fujisawa K, Nozawa Y, Koyama N, Nishina H, Furutani-Seiki M, Sakaida I, Terai S. Effect of histidine on sorafenib-induced vascular damage: Analysis using novel medaka fish model. Biochem Biophys Res Commun. 2018 Feb 5;496(2):556-561.

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

後藤 諒 ( 新潟大学 大学院消化器内科学 ), 上村 顕也, 小林 陽子, 井上 良介, 小川 光平, 坂牧 僚, 阿部 聡司, 寺井 崇二  
メダカを用いた SGLT2 阻害薬による NASH 進展抑制効果の検証

第 59 回日本消化器病学会大会

[ 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 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

寺井 崇二 ( Shuji Terai )

新潟大学 医歯学系 教授

研究者番号 : 00332809

##### (2) 研究分担者

山際 訓

( Satoshi Yamagiwa )

新潟大学 医歯学総合研究科 特任教授

研究者番号 : 10419327

上村 顕也

( Kenya Kamimura )

新潟大学 医歯学総合病院 講師

研究者番号 : 00579146

川合 弘一

( Hirokazu Kawai )

新潟大学 医歯学系 客員研究員

研究者番号 : 80419291

高村 昌昭

( Masaaki Takamura )

新潟大学 医歯学系 准教授

研究者番号 : 20422602

山際 訓

( Satoshi Yamagiwa )

新潟大学 医歯学総合研究科 特任教授

研究者番号： 10419327

土屋 淳紀

( Atsunori Tsuchiya )

新潟大学 医歯学総合病院 助教

研究者番号： 70464005

(3)連携研究者

なし( )

研究者番号：

(4)研究協力者

なし( )