

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08994

研究課題名(和文) 肝細胞死亢進マウスを用いた非アルコール性脂肪性肝炎のバイオマーカーと治療法の開発

研究課題名(英文) Development of serum biomarkers and therapeutic strategy for non-alcoholic steatohepatitis using liver-specific apoptosis-prone mice

研究代表者

土屋 勇一 (TSUCHIYA, Yuichi)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：10307738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は進行すると肝硬変や肝がんに至るが、発症メカニズムは不明な点が多い。我々は遺伝子改変マウスを用いたNASH病態モデルの解析から、肝細胞のアポトーシスによる細胞死がNASHの増悪に関与することを見出した。さらに肝細胞死に反応して増殖因子の一つであるFGF18が発現し、肝細胞の増殖を誘導して肝臓の恒常性を維持することを明らかにした。またヒトNASH患者においても血清FGF18が増加することを見出し、FGF18がNASHの診断に利用できる新規血清バイオマーカー候補となることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)は、飲酒量が少ないにも関わらず肝臓に脂肪が蓄積する疾患である。患者の一部はNASHに進行するが、発症メカニズムは不明な点が多く、有効な治療法も確立していない。またNASHの確定診断に用いられる肝生検は侵襲性が高いことから、血液を用いた侵襲性の低い診断方法の開発が求められている。本研究成果は血液を用いた新たなNASH診断法の開発に貢献するとともに、発症メカニズムの理解と治療法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) progresses to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, but specific treatment has not been established. Highly invasive liver biopsy is currently required for NASH diagnosis, and less invasive blood test using specific serum biomarkers is awaited. By using pathological NASH model in gene-manipulated mice, we identified that one growth factor, FGF18, was upregulated upon hepatocyte death and induced the proliferation of hepatocytes in NASH liver. Moreover, we also found that serum FGF18 was increased in human NASH patients, suggesting that FGF18 can be used as a new serum biomarker for NASH diagnosis.

研究分野：生化学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎 アポトーシス 増殖因子 肝再生 血清バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) はアルコールをあまり消費しないにも関わらず肝臓に中性脂肪が蓄積することで引き起こされる肝疾患であり、世界的に増加している。NAFLD 患者の大半は単純脂肪肝 (SS) に留まるが、患者の一割程度は進行性の炎症を起こす非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) へ進行する。NAFLD から NASH への増悪には、過酸化脂質による酸化ストレスや炎症反応が関与すると推測されているが、発症メカニズムは解明されておらず、確立した治療法も存在しない。

障害を受けた肝細胞が細胞死により失われると、残存する周囲の肝細胞が増殖して代償するか、微小環境に存在する肝前駆細胞が増殖し、肝細胞に分化することで肝臓を再生すると考えられている。この過程には特定の増殖因子が関与すると予想され NASH 治療の標的となりうるが、詳しいメカニズムは不明である。

SS と NASH の鑑別においては、肝生検による肝組織の病理学的診断が gold standard として行われている。しかし肝生検は侵襲性の高い検査であることから、低侵襲性の鑑別診断法の開発が求められている。特に NAFLD の進行度を反映する血清バイオマーカーを同定できれば、血清 ELISA 法によって簡便かつ低侵襲的に SS と NASH の鑑別診断を行うことが可能となり、医学的に大きな意義を持つ。NASH の血清バイオマーカーについても世界中で探索が行われているが、確立したものはまだない。

2. 研究の目的

これまでに代表者らは、アポトーシス抑制タンパク質 cFLIP を肝細胞特異的に発現低下させた肝細胞死亢進マウスを作製している。今回代表者らは、この肝細胞死亢進マウスにコリン欠乏エチオニン添加 (CDE) 食を 4 週間投与すると、対照マウスに比べて NASH が急速に増悪することを見出した。またこの際に、肝細胞の喪失に伴い CK19 陽性の肝前駆細胞が代償的に増殖することを明らかにした (図 1)。次に代表者らは CDE 食投与後の肝臓における遺伝子発現をマイクロアレイ解析により網羅的に比較し、肝細胞死亢進マウス肝において発現が上昇する増殖因子として、線維芽細胞増殖因子の一種である FGF18 を同定した。

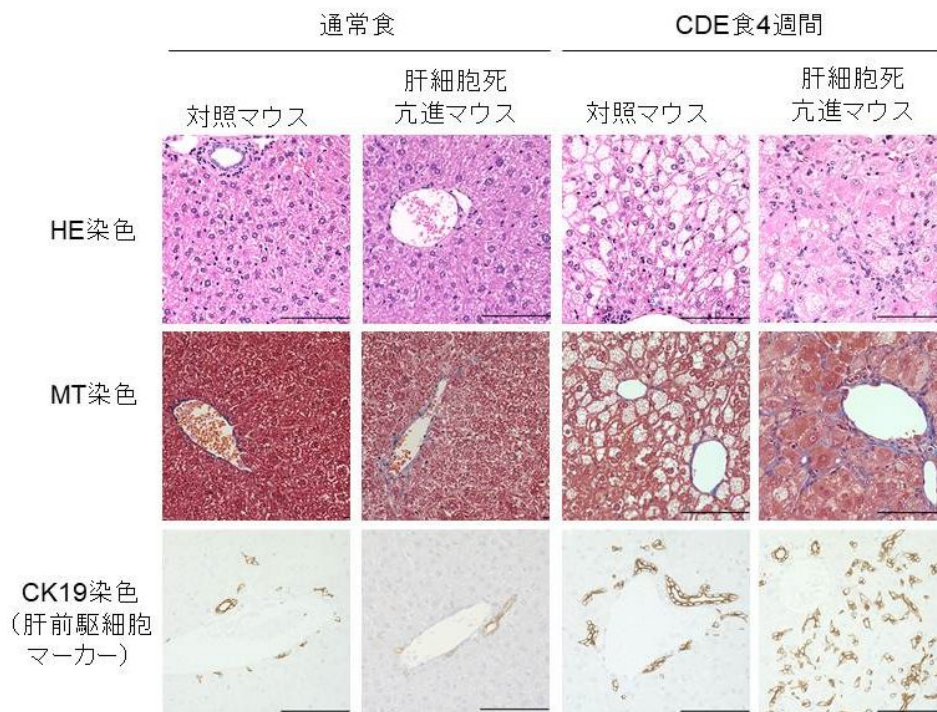


図1.肝細胞特異的なcFLIPの発現低下はNASHを増悪させる

CDE食を4週間投与した肝細胞死亢進マウスでは、肝細胞の減少 (HE染色)、線維化の亢進 (MT染色)、およびCK19陽性の肝前駆細胞の増加がみられる。Bar: 100 μ m。

これらを踏まえて代表者らは、以下の 2 点を明らかにするため研究を開始した。

- (1) FGF18 が NASH において果たす生理的役割の解明
- (2) NASH の血清バイオマーカー候補としての FGF18 の有用性

3. 研究の方法

(1) 野生型マウス肝臓に HTVi 法により FGF18 を一過的に過剰発現させ組織を解析した。また単離肝細胞に *in vitro* で FGF18 組換えタンパク質を添加しシグナル伝達経路の解析を行った。

(2) 東邦大学医療センター大森病院との共同研究として臨床研究を行い、健常者ボランティア、および肝生検により確定診断を受けた NASH 患者の血清 FGF18 濃度を ELISA 法により測定し比較した。

4. 研究成果

(1) FGF18を一過的に過剰発現したマウス肝臓では、細胞増殖マーカーである Ki67 陽性シグナルが増加しており、特に肝細胞の増殖が誘導されていた(図 2)。また *in vitro* において FGF18 を添加した単離肝細胞は ERK のリン酸化が亢進し初期応答遺伝子の発現が一過的に上昇した。したがって FGF18 は肝障害によって発現が誘導され、肝細胞の増殖を誘導して肝臓の恒常性を保つと推測された。現在は *in vivo* における FGF18 の機能を解明するため、肝細胞特異的に FGF18 を欠損したマウス、および肝細胞特異的に cFLIP と FGF18 を二重欠損したマウスを作製し解析を行っている。また兵庫医科大学および熊本大学との共同研究により、肝細胞特異的に FGF18 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し解析を行っている。これらの知見をもとにして、FGF18 を用いた NASH の新たな治療法の可能性を検討している。

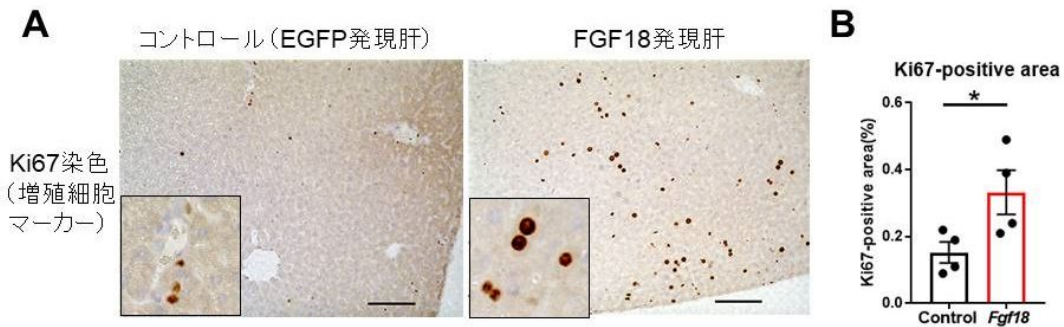


図2.野生型マウス肝臓においてFGF18の過剰発現は細胞増殖を誘導する
FGF18を過剰発現したマウス肝臓ではKi67陽性の増殖細胞が増加している。A, Ki67免疫染色。Bar:100 μm。B, Ki67陽性領域を定量し、t検定を行って比較した。*: $p < 0.05$

(2)市販の ELISA キットを用いた解析では、健常者ボランティアに比べ NASH 患者において血清 FGF18 濃度が有意に高かったことから、(図 3)。FGF18 は NASH の新規血清バイオマーカー候補として有用であると推測された。現在は SS と NASH の鑑別診断が可能かどうかについて、さらに症例を増やして検討を行っている。また市販の ELISA キットはあまり感度が良くないため、東京薬科大学との共同研究によりヒト FGF18 抗体を産生するハイブリドーマ株を複数樹立し、市販品よりも高感度な ELISA キットの構築を行っている。

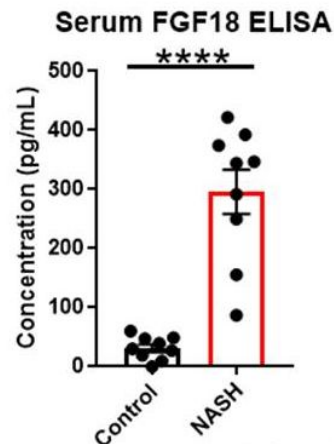


図3.FGF18はNASHの新規血清バイオマーカー候補である
健常ボランティア9名、肝生検により確定診断を受けたNASH患者9名の血清に対して、血清FGF18濃度をELISA法により測定し、t検定を行って比較した。
****: $p < 0.001$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shindo Ryodai, Ohmuraya Masaki, Komazawa-Sakon Sachiko, Miyake Sanae, Deguchi Yutaka, Yamazaki Soh, Nishina Takashi, Yoshimoto Takayuki, Kakuta Soichiro, Koike Masato, Uchiyama Yasuo, Konishi Hiroyuki, Kiyama Hiroshi, Mikami Tetuo, Moriwaki Kenta, Araki Kimi, Nakano Hiroyasu	4. 巻 15
2. 論文標題 Necroptosis of Intestinal Epithelial Cells Induces Type 3 Innate Lymphoid Cell-Dependent Lethal Ileitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 536 ~ 551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.isci.2019.05.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katagiri Takaharu, Yamazaki Soh, Fukui Yuto, Aoki Kotaro, Yagita Hideo, Nishina Takashi, Mikami Tetuo, Katagiri Sayaka, Shiraishi Ayako, Kimura Soichiro, Tateda Kazuhiro, Sumimoto Hideki, Endo Shogo, Kameda Hideto, Nakano Hiroyasu	4. 巻 12
2. 論文標題 JunB plays a crucial role in development of regulatory T cells by promoting IL-2 signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 1104 ~ 1117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41385-019-0182-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shindo Ryodai, Katagiri Takaharu, Komazawa-Sakon Sachiko, Ohmuraya Masaki, Takeda Wakami, Nakagawa Yoshiko, Nakagata Naomi, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Nishiyama Chiharu, Nishina Takashi, Yamazaki Soh, Kameda Hideto, Nakano Hiroyasu.	4. 巻 7
2. 論文標題 Regenerating Islet-Derived Protein (Reg)3 Plays a Crucial Role in Attenuation of Ileitis and Colitis in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep	6. 最初と最後の頁 100738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbrep.2020.10073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsurusaki Shinya, Tsuchiya Yuichi, Koumura Tomoko, Nakasone Misaki, Sakamoto Taro, Matsuoka Masaki, Imai Hirotaka, Yuet-Yin Kok Cindy, Okochi Hitoshi, Nakano Hiroyasu, Miyajima Atsushi, Tanaka Minoru	4. 巻 10
2. 論文標題 Hepatic ferroptosis plays an important role as the trigger for initiating inflammation in nonalcoholic steatohepatitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41419-019-1678-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurosawa Takeyuki, Miyoshi Shion, Yamazaki Soh, Nishina Takashi, Mikami Tetuo, Oikawa Akira, Homma Sakae, Nakano Hiroyasu	4. 巻 24
2. 論文標題 A murine model of acute lung injury identifies growth factors to promote tissue repair and their biomarkers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 112 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12659	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Hiroyasu, Murai Shin, Yamaguchi Yoshifumi, Shirasaki Yoshitaka, Nakabayashi Osamu, Yamazaki Soh	4. 巻 3
2. 論文標題 Development of novel methods that monitor necroptosis and the release of DAMPs at the single cell resolution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Stress	6. 最初と最後の頁 66 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15698/cst2019.02.177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Piao Xuehua, Miura Ryosuke, Miyake Sanae, Komazawa-Sakon Sachiko, Koike Masato, Shindo Ryodai, Takeda Junji, Hasegawa Akito, Abe Riichiro, Nishiyama Chiharu, Mikami Tetsuo, Yagita Hideo, Uchiyama Yasuo, Nakano Hiroyasu	4. 巻 143
2. 論文標題 Blockade of TNF receptor superfamily 1 (TNFR1)-dependent and TNFR1-independent cell death is crucial for normal epidermal differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 213 ~ 228.e10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2018.02.043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Soh, Tanaka Yoshihiko, Araki Hiromitsu, Kohda Akira, Sanematsu Fumiyuki, Arasaki Tomoko, Duan Xuefeng, Miura Fumihito, Katagiri Takaharu, Shindo Ryodai, Nakano Hiroyasu, Ito Takashi, Fukui Yoshinori, Endo Shogo, Sumimoto Hideki	4. 巻 7
2. 論文標題 The AP-1 transcription factor JunB is required for Th17 cell differentiation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-17597-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tsuchiya Y, Komazawa-Sakon S, Oikawa A, Mikami T, Nagai H, Tanaka M, Nakano H
2. 発表標題 cFLIP prevents exacerbation of non-alcoholic steatotic hepatitis by inhibiting apoptosis of hepatocytes
3. 学会等名 17th TNF Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴崎慎也, 土屋勇一, 今井浩孝, 大河内仁志, 中野裕康, 田中稔
2. 発表標題 フェロトーシスによる肝細胞死が非アルコール性脂肪性肝炎の初期炎症の起点として重要である
3. 学会等名 第28回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土屋勇一, 鶴崎慎也, 永井英成, 及川彰, 三上哲夫, 田中稔, 中野裕康
2. 発表標題 cFLIPは肝細胞において非アルコール性脂肪性肝炎の増悪を防ぐ
3. 学会等名 第28回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土屋勇一
2. 発表標題 肝細胞死亢進マウスを用いた非アルコール性脂肪性肝炎のバイオマーカーと治療法の開発
3. 学会等名 Expert seminar of immunology (Vol.8) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土屋勇一, 鶴崎慎也, 永井英成, 及川彰, 三上哲夫, 田中稔, 中野裕康
2. 発表標題 FGF18は非アルコール性脂肪性肝炎において傷害を受けた肝細胞が産生する「ダイニングコード」である
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴崎慎也, 土屋勇一, 今井浩孝, 大河内仁志, 中野裕康, 田中稔
2. 発表標題 フェロトーシスによる肝細胞死が非アルコール性脂肪性肝炎の初期炎症の起点として重要である
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuichi Tsuchiya, Kenta Kobayashi, Shinya Tsurusaki, Sachiko Komazawa-Sakon, Minoru Tanaka, Hiroyasu Nakano.
2. 発表標題 Fibroblast growth factor (FGF)18 is a biomarker of non-alcoholic steatotic hepatitis
3. 学会等名 AMED-CREST/PRIME Joint International Symposium
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片桐翔治, 山崎創, 三上哲夫, 遠藤昌吾, 住本英樹, 亀田秀人, 中野裕康
2. 発表標題 転写因子JunBはIL-2シグナルを介して制御性T細胞の分化を調節する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片桐 翔治, 山崎 創, 三上 哲夫, 遠藤 昌吾, 住本 英樹, 亀田 秀人, 中野 裕康
2. 発表標題 腸管上皮バリアにおける転写因子JunBの役割
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三好 嗣臣, 黒澤 武介, 進藤 綾大, 一色 琢磨, 仁科 隆史, 中林 修, 三宅 早苗, 山崎 創, 本間 栄, 中野 裕康
2. 発表標題 新規ニューモシス肺炎モデルマウスの確立と発症に寄与する免疫不全機構の解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Soh Yamazaki, Takeharu Katagiri, Hideki Sumimoto, Hiroyasu Nakano
2. 発表標題 A crucial role of JunB in attenuating epithelial damage-induced colitis through induction of regulatory T cells.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Soh Yamazaki, Yoshihiko Tanaka, Yoshinori Fukui, Hideki Sumimoto
2. 発表標題 The AP-1 transcription factor JunB is essential for development of Th17 cells
3. 学会等名 第46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryodai Shindo, Soh Yamazaki, Hiroyasu Nakano
2. 発表標題 RORgt-positive cells mediate RIPK3-and MLKL-dependent lethal ileitis in neonatal mice
3. 学会等名 第46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山崎 創, 朴 雪花, 駒澤-左近 幸子, 三宅 早苗, 中林 修, 田中 稔, 大村谷 昌樹, 及川 彰, 角田 宗一郎, 内山 安男, 田中 正人, 中野 裕康
2. 発表標題 肝特異的cFLIP低発現マウスを用いた肝障害モデルの解析
3. 学会等名 第26回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 進藤 綾大, 大村谷 昌樹, 駒澤 幸子, 三宅 早苗, 山崎 創, 仁科 隆史, 小西 博之, 木山 博資, 三上 哲夫, 荒木 喜美, 中野 裕康
2. 発表標題 RORgt陽性細胞はRIPK3およびMLKL依存性に小腸炎を誘導する
3. 学会等名 第26回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三好 嗣臣, 黒澤 武介, 仁科 隆史, 山崎 創, 本間 栄, 中野 裕康
2. 発表標題 II型肺胞上皮細胞の障害と再生に関する解析
3. 学会等名 第26回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の検出方法	発明者 土屋 勇一, 中野, 裕 康, 五十嵐 良典, 永 井 英成	権利者 東邦大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-245036	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山崎 創 (YAMAZAKI Soh) (70315084)	東邦大学・医学部・准教授 (32661)	