

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K18399

研究課題名(和文) レドックスイメージングによる病態解明を目的としたNASH非侵襲的診断法の開発

研究課題名(英文) Development of non-invasive diagnostic method for NASH elucidating the pathological condition by redox imaging

研究代表者

中田 亮輔 (Nakata, Ryosuke)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：70614759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：世界的に非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)患者の加速度的増加が社会的問題となっている一方で、非侵襲的に行える簡便で確実な診断法が存在しないため、非アルコール性脂肪肝炎への進展を早期に発見し、治療に繋げるための新しい診断法として、生体内のミトコンドリアレドックス状態を評価する診断法を開発した。Carbamoyl-PROXYLをラジカルプローブとした生体動的核変極磁気共鳴画像を用いて、生体内でのミトコンドリアレドックス代謝が病態発現の極早期から変化していることを示し、NAFLD/NASHの新しい非侵襲的早期診断開発への可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ミトコンドリアレドックス代謝がNAFLD/NASHの病態発現早期から生じていることが明らかになった。ミトコンドリア内での電子伝達系異常がこれに関与している可能性についても示すことができた。ラジカルプローブを用いた生体動的核変極磁気共鳴画像は非侵襲的な検査法であり、動物実験における創薬・治療法の開発に役立つことが期待され、将来的には臨床応用の可能性も秘められている。

研究成果の概要(英文)：While the accelerating increase in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has become a social problem worldwide, there is no simple and reliable diagnostic method that can be performed non-invasively, leading to non-alcoholic fatty hepatitis. We have developed a diagnostic method to evaluate the mitochondrial redox status in the living body as a new diagnostic method for early detection of the progress of the disease and for the treatment. Using biodynamic nuclear depolarized magnetic resonance images using Carbamoyl-PROXYL as a radical probe, we show that mitochondrial redox metabolism in vivo changes from the very early stage of pathological onset, and a new non-invasive NAFLD / NASH. Clarified the possibility of early diagnosis and development.

研究分野：消化器外科

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 NASH NAFLD 肥満

### 1. 研究開始当初の背景

近年、NAFLD 患者の加速的増加が問題となり欧米諸国においては成人有病率が 20-40%に達し、慢性肝疾患の中で最も多い疾患となっている。このうち約 10%程度に NASH の所見が認められている。我が国でも食生活の欧米化に伴い NAFLD/NASH 患者数の激増が危惧され、NAFLD 患者は約 1,000 万人 NASH 患者は約 200 万人に達すると言われている。さらには成人だけでなく小児科領域でも患児の増加が報告されており、早急な対応を迫られた状況である。一方で、臨床現場で有用かつ簡便に行える診断的バイオマーカーや有用な画像検査がなく、また、病態進行の分子機構も未だ解明されていない点が多く有効な治療法も確立されていない。現時点での確定診断法は肝組織生検であるが、侵襲的検査であり NAFLD 患者すべてに行うことは困難である。さらには、採取された肝臓の組織や病理医間で診断にばらつきが生じるなどの問題点も指摘されている。NAFLD は良性の経過をたどる単純性脂肪肝と NASH に大別され、NASH では小葉性炎症、繊維化を生じ、肝硬変、肝細胞癌へと悪性の経過をたどるため、早期に NASH 進行リスク患者を選別し治療につなげる非侵襲的診断法の構築が必要である。

### 2. 研究の目的

慢性肝疾患の中でも非アルコール性脂肪肝疾患(Non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD)の患者数急増が世界的な問題となっている。一方で、病態の進行機序に不明な点が多く、簡便で有用な診断法もなく、治療法も定まっていない。NAFLD は良性の経過をたどる単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis; NASH)に大別され、NASH は肝硬変、肝細胞癌へと進展し悪性の経過をたどる。そのため、病態進行リスクを正確に評価することが極めて重要である。NAFLD/NASH の病態進行過程は two hit theory が提唱されており、肝細胞への脂肪沈着を first hit として、何らかの second hit が加わって壊死性炎症変化をきたし、NASH へと進行すると考えられている。second hit としては(1)酸化ストレス、(2)TNF- $\alpha$ などのサイトカイン(3)インスリン抵抗性(4)CYP 2E1 の異常など様々な要因が指摘されているが、最も重要な原因の一つとして酸化ストレスが挙げられる。NASH 患者での臨床報告や動物実験の報告も多くみられ個々の酸化ストレスマーカー(Reactive oxygen species: ROS、8-OHdG、4-HNE など)の上昇や抗酸化ストレス能(SOD、グルタチオン、カタラーゼなど)低下を示す報告がみられる。このように、過剰な ROS 生成や抗酸化分子の減衰による酸化ストレス障害が原因となって NAFLD から NASH へ病態が進行すると考えられている。これまで報告されている NAFLD/NASH についての酸化ストレスに関する研究の多くは、酸化ストレスを評価するのに反応の結果生じる代謝産物を *ex vivo* や *in vitro* の系で測定し評価している場合が多い。活性酸素・窒素種が極めて反応性に富み、半減期が短いという化学的特性を考慮すると、実際の生体内との整合性の問題が常に生じ、*in vivo*での非侵襲的検査法の必要性が求められる。生体内での様々な代謝機構で起こる酸化還元反応をレドックス反応と呼ぶが、このレドックス動態を生体内で非侵襲的に可視化し、動的変化(ニトロキシラジカルプローブ(図 1)の消失速度)を定量的に評価する手法として電子スピン共鳴画像法が知られている。我々はこの現象を応用した ReMI 装置の共同開発を行っており、これを用いて NAFLD/NASH のレドックス状態の変化を評価するとともに、分子レベルにおける病態進行機序を解明し、さらに実臨床において多くの NAFLD 患者を対象とする非侵襲的 NAFLD/NASH 診断法開発の先駆けとなることを目的とした。

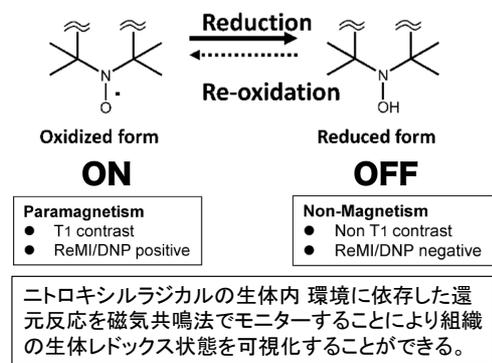


図 1 レドックス状態検出造影剤の仕組み

### 3. 研究の方法

我々は NASH モデルマウスのレドックス状態を定量的に可視化し、その変動が病態の進行と相関することを示してきた。本申請研究では薬剤投与群や他の方法で作成した NASH モデルマウスを同様に測定し、既存のデータと比較・検討することで非侵襲的診断法としての有用性を確認し、さらに NASH の詳細な病態解明、効果的な治療薬開発を試みた。

#### (1) レドックス動態と病態評価法

我々は以前に行った ReMI 装置を用いた NASH モデルマウスの病態進行を評価する実験系を応用し病態モデルマウスに対する治療薬投与によるレドックス動態変化の評価を行った。

##### ① NAFLD/NASH モデルマウス

C57/BL6 マウスの 6 週齢に対しメチオニン-コリン欠乏食を餌に飼育した病態モデルマウスを作成し、1 週、2 週、4 週、6 週、8 週目に ReMI 測定、解剖、組織採取を行う。治療薬投与群には、

ビタミンE (0.4 IU/day) 投与群と Pioglitazone (15  $\mu$ g/day) 投与群を作成し同様の実験系で評価を行った。

② ReMI 用いたレドックス状態の評価

1日絶食したマウスに対し、イソフルランで麻酔後、尾静脈よりニトロキシラジカルプローブ溶液を投与する。マウスを ReMI 装置内に固定し、1分後より90秒毎に13分まで ESR ON 画像を撮像した。経時的に撮られた画像の肝臓に ROI を設定し、プローブの消失速度を算出することでレドックス状態を評価した。(図2)



図2 レドックス状態を測定する ReMI

③ 採血・バイオマーカー検査

ReMI 測定後、麻酔投与下に心臓採血を行う。測定項目として GOT、GPT、LDH、T-Cho、HDL、Glu、Insulin など NASH 病態に関与するバイオマーカーを設定し、経時変化で病態進行度を評価した。病理組織学的評価 (NAS、繊維化スコアなど) 心臓採血後、門脈還流にて肝臓の脱血後、肝臓を摘出する。ホルマリン固定し、翌日に組織標本スライド作成した。HE 染色、masson trichroem 染色、sudan III 染色にて肝組織への脂肪沈着、線維化を評価し、臨床でも用いられる NAFLD activity score (NAS) を算出し客観的に病態進行度を評価した。

④ *ex vivo*での酸化ストレスマーカー

(8OHdG, 4HNE など)測定、抗酸化ストレス酵素・物質 (Mn-SOD, GSH, フラバーゼなど) 測定と ReMI 測定結果の相関性を評価

摘出した肝臓の一部組織に対してホモジナイズ処理を行い、遠心後、上清を測定試料として酸化ストレスマーカー、抗酸化ストレス酵素・物質の測定した。

⑤ 統計的解析にて結果の有意差、相関性を客観的に評価

各測定項目についてコントロール群と有意差検定を行い統計学的解析を行う。各項目の相関性についても客観的に評価を行い、ReMI 検査の有用性、再現性を評価した。

4. 研究成果

メチオニン-コリン欠乏餌で飼育した NAFLD/NASH モデルマウスを作成し、病態の進行に伴ったレドックス状態の変化を ReMI で非侵襲的に測定をした(図3)。これにより画像的な可視化及び、ニトロキシラジカル消失速度の算出による数値での客観的評価が可能となった。病態進行に伴った、ラジカルプローブの消失速度低下が観測され、実際の病理組織像、酸化ストレスを反映する免疫染色 (8OHdG, 4HNE)、血液生化学検査 (GOT, GPT)、酸化ストレスマーカーの増加、抗酸化ストレス酵素 (total antioxidant capacity) の減少など病態進行を反映するバイオマーカーとの強い相関性も示し、臨床応用が可能となった場合の有用性が示唆された。

さらに、過去の報告を参考にこのレドックス状態の変化がミトコンドリア内で起こっているとの仮説を立て、病態モデルマウスの肝臓組織より分離した単離ミトコンドリアを用い X-band EPR でのレドックス状態を計測し、*in vivo*での結果と同じ変化が生じている事を証明し、ニトロキシラジカル消失のメカニズムについても示すことができた。また、メチオニン-コリン欠乏餌から通常食に戻した際の病態の回復状況に関しても同様にレドックス状態の変化として観察可能であり、創薬における病態評価での有用性についても示すことができた。

一方で、メカニズム解明を試みるために詳細な検討も行った。その結果、*in vivo* DNP-MRI で

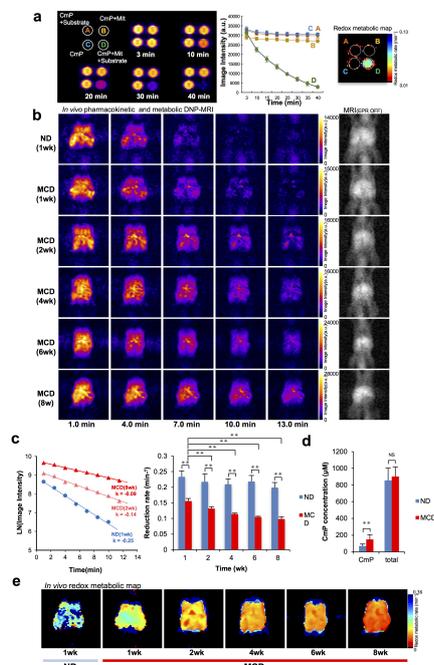


図3 生体内 DNP-MRI によるレドックス代謝イメージング

また、病態モデル作成用の餌の組成を変更させることで、レドックス状態に与える影響が異なることも示すことができた。

検出されたレドックス状態の変化が肝細胞レベルでも同様の変化が生じていることが確認され、統計解析の結果、病態モデルマウスの病態進行ならびに *in vivo* DNP-MRI で得られた結果と相関性が認められることを示すことができた。さらには、NAFLD/NASH の病態発現の原因として細胞内のミトコンドリアに機能異常が生じていることが示唆されているが、ミトコンドリア自体のレドックス 状態についても肝細胞から単離したミトコンドリアを用いて評価を行った。電子伝達系に関連した基質の有無や KCN 存在下でのミトコンドリアレドックス代謝に 関する評価をおこない、電子伝達系の活性とレドックス代謝の相関性がしめされ、病態発現時にはミトコンドリア電子伝達系に機能異常がおこりレドックス代謝に影響を与えていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakata Ryosuke, Taniai Nobuhiko, Chihara Naoto, Suzuki Hideyuki, Yoshida Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Relationship between recovery from stigma and achieving re-employment after bariatric and metabolic surgery: A case report and reviews	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1272/jnms.JNMS.2023_90-303	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中田亮輔
2. 発表標題 肥満外科治療の導入プロジェクトと初期症例の治療効果の検討
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中田亮輔
2. 発表標題 生体レドックス評価による 非アルコール性脂肪肝炎の早期病態評価
3. 学会等名 第74回消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中田亮輔
2. 発表標題 DNP-MRIを用いたレドックス状態評価による非アルコール性脂肪肝炎の診断法の開発
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------