

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16532

研究課題名(和文) エクソソーム制御による慢性肝疾患関連サルコペニアに対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy for chronic liver disease-related sarcopenia by exosome regulation

研究代表者

中村 昌人 (Nakamura, Masato)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10756703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性肝疾患の重要な合併症の一つであるサルコペニア(骨格筋量減少による身体機能の低下)のマウスモデルを作成し、サルコペニア発症における肝臓-骨格筋間相互作用の重要性、特に細胞外小胞(エクソソーム)の意義を明らかにすることを目的とした。サルコペニア増悪因子である肥満および糖尿病と関連する非アルコール性脂肪性肝疾患に着目した。既存のマウスモデルは発症までに長期間を要するため、短期間で脂肪肝炎や肝線維化を発症するマウスモデルを新たに確立した。本モデルのサルコペニアモデルとしての有用性を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニアモデルを作成する過程で、主要な肝疾患となりつつある非アルコール性脂肪性肝疾患の新規マウスモデルの確立に成功した。本マウスモデルは肥満やインスリン抵抗性等の代謝性疾患を伴い、かつ短期間に肝病態を再現可能である。本モデルは非アルコール性脂肪性肝疾患研究に応用可能であり、また、サルコペニアモデルとして有用な可能性がある。本研究成果が、慢性肝疾患や合併症の病態解明および新規治療法の開発に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We aimed to create a mouse model of sarcopenia (loss of physical function due to reduced skeletal muscle mass), an important complication of chronic liver disease, to clarify the importance of liver-skeletal muscle interactions, especially extracellular vesicles (exosomes), in the development of sarcopenia. We focused on non-alcoholic fatty liver disease associated with obesity and diabetes, which are exacerbating factors of sarcopenia. Since existing mouse models require a long period of time to develop the disease, we established a new mouse model that develops steatohepatitis and liver fibrosis in a short period of time. The usefulness of this model as a sarcopenia model is under investigation.

研究分野：肝臓病

キーワード：サルコペニア 慢性肝疾患 非アルコール性脂肪性肝炎 マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サルコペニア(骨格筋量減少による身体機能の低下)は、慢性肝炎・肝硬変患者の生活の質の低下や予後の悪化を招く重要な合併症であるが、治療法は確立されていない。慢性肝疾患がサルコペニア発症の原因である一方で、サルコペニアが肝関連死のリスクを上昇させることから、肝臓-骨格筋間の相互作用の存在が示唆されていた。また、臓器間相互作用に関与する物質として、直径 50-150nm の細胞外小胞であるエクソソームが注目されていた。

このような背景から、慢性肝疾患関連サルコペニアにおける肝臓-骨格筋間の相互作用の重要性を明らかにすること、相互作用の担い手としてのエクソソームの重要性を解明することを着想し、研究開始に至った。

2. 研究の目的

臓器間情報伝達物質として注目されているエクソソームと特にそれに内包される microRNA に着目し、サルコペニア発症における肝臓-骨格筋間相互作用の重要性を明らかにし、新規治療法を見出すことを目的とした。具体的には、下記の 2 点を目的とした。

(1) 慢性肝疾患関連サルコペニアモデルマウスを確立し、サルコペニア発症に重要なエクソソーム内 microRNA を同定する。また、培養細胞およびモデルマウスを用い、同定した microRNA の作用機序を解明すると共に、エクソソーム制御によるサルコペニア改善効果を明らかにする。

(2) ヒト血中エクソソームでの microRNA 発現変化を検証し、ヒトへの応用の可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス血清から超遠心法やポリマー沈殿法を用いて、エクソソームを含む細胞外小胞を単離し、電子顕微鏡や粒子径・粒子数測定機器(電気抵抗ナノパルス法; qNano)性状を解析した。

(2) 慢性肝疾患・肝硬変マウスモデルである四塩化炭素投与モデルを用いて、サルコペニアモデルとしての有用性を検討した。サルコペニアの評価は、筋重量、筋線維数などの組織学的評価、握力などの生理学的評価によって行った。

(3) 糖尿病・肥満モデルである KK-Ay マウスに高脂肪・高コレステロール・高果糖・コール酸添加食を与えた非アルコール性脂肪性肝炎マウスモデルを新規に作成した。非アルコール性脂肪性肝炎の病態は、血清生化学検査や肝組織中脂質定量、リアルタイム PCR 法による肝組織中遺伝子発現定量、病理標本でのスコアリングなどを用いて評価した。本マウスモデルのサルコペニアモデルとしての有用性を(2)と同様の手法で検討した。

(3) ヒト血中エクソソームの解析を行うべく、当施設へ通院している肝硬変患者の握力測定、血清の収集を行った。

4. 研究成果

(1) 超遠心法、ポリマー沈殿法のいずれを用いても、マウス血清から細胞外小胞を単離することが可能であった。電子顕微鏡による観察や粒子径測定を行い、単離した細胞外小胞にエクソソームが多く含まれることを確認した。粒子数測定の結果から、収率はポリマー沈殿法が良好であった(図1)。操作の簡便性や作業時間も踏まえ、ポリマー沈殿法を採用した。

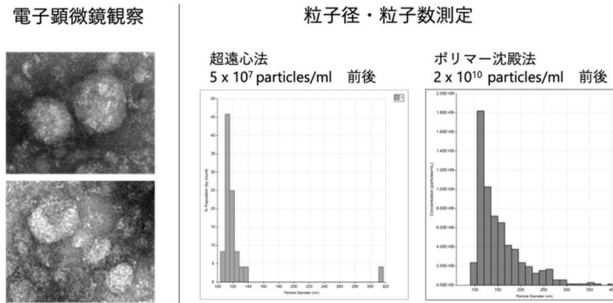


図1 マウス血清から抽出したエクソソームの解析

(2) 6週齢の雄 C57B/L6 マウスに四塩化炭素を週2回、10週間腹腔内投与した後、握力測定や筋重量(前脛骨筋、腓腹筋、ヒラメ筋)の測定を行った。肝組織の病理標本で肝硬変の発症を確認した。コントロール群と比較して握力低下は有意に低下していた。体重当たりの筋重量は、腓腹筋で有意に低下していたが、前脛骨筋では有意差を認めなかった。加齢がサルコペニアの増悪因子であることから、78週齢の雄 C57B/L6 マウスを用いて同様の検討を行なったが、有意な握力低下や筋重量低下は確認できなかった(図2)。

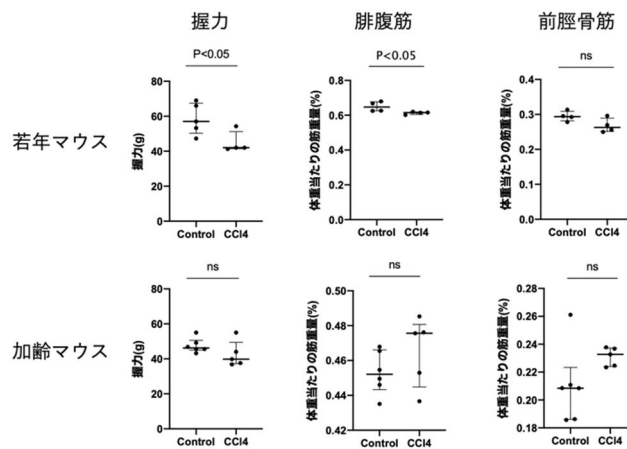


図2 四塩化炭素投与モデルにおける握力及び筋重量

(3) 糖尿病、肥満がサルコペニアのリスク因子であることから、糖尿病や肥満に合併する慢性肝疾患である非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) に着目し、NAFLD マウスで検討を行うこととした。しかし、既存の NAFLD マウスモデルは発症までに長期間を要し、また肝病態が軽微であることから、より早期に明らかな肝病態を発症するマウスモデルの作成を試みた。2型糖尿病・肥満モデルである KK-Ay マウスに、高脂肪(40kcal%)・高果糖(20kcal%)・高コレステロール(2%)・コール酸(0.5%)添加食を与えたところ、4週で著明な脂肪肝炎、12週で肝線維化を発症した。また、高度肥満、インスリン抵抗性、脂質異常症を伴っており、肥満 NAFLD に類似した病態を呈しており、NAFLD マウスモデルとして有用と考えられた。

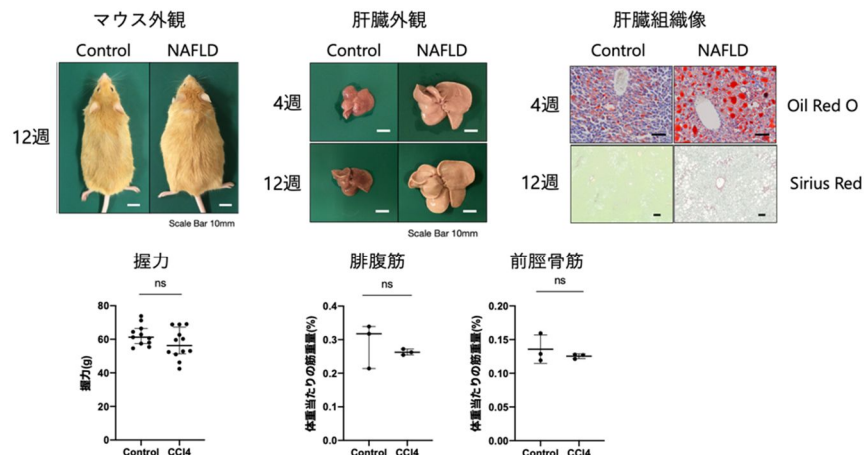


図3 新規非アルコール性脂肪性肝疾患モデルの病態と握力及び筋重量

本マウスでは、通常食を与えたコントロール群と比較して、握力低下は認めなかった。体重当たりの筋重量も両群で有意差を認めなかった(図3)。しかし、高度の肝肥大を呈し、体重の多くを肝重量が占めることから、適正な筋重量の比較については更に検討が必要である。

(4) 当院に通院している肝硬変患者を対象に、握力測定、血清の収集を行った。多数の検体を収集したが本研究期間内でエクソソームの解析に至らなかった。マウスモデル確立後に、保存血清を用いた解析を進める予定である。

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 0件）

1. 著者名 Takafumi Sakuma, Masato Nakamura, Naoya Kato et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 A diet-induced murine model for non-alcoholic fatty liver disease with obesity and insulin resistance, rapidly developing steatohepatitis and fibrosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	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） なし	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masato Nakamura, Tetsuhiro Chiba, Naoya Kato et al.
2. 発表標題 An improved diet-induced murine model for nonalcoholic fatty liver disease with rapid progression of steatohepatitis and fibrosis.
3. 学会等名 AASLD2020 The Liver Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村昌人, 千葉哲博, 加藤直也.
2. 発表標題 新規食餌誘導性非アルコール性脂肪性肝疾患マウスモデルの構築と病態解析
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村昌人, 千葉哲博, 佐久間崇文, 岩永光巨, 管元泰, 宇野澤秀美, 藤田尚人, 敖俊杰, 馬瑤佳, 金山健剛, 神崎洋彰, 興裕慧輔, 小林和史, 中川良, 叶川直哉, 清野宗一郎, 近藤孝行, 斎藤朋子, 小笠原定久, 中本晋吾, 室山良介, 岸本充, 加藤直也
2. 発表標題 高度肥満及びインスリン抵抗性を有する食餌誘導性非アルコール性脂肪性肝疾患マウスモデルの確立
3. 学会等名 第17回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム
4. 発表年 2021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
---------	---------