

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17496

研究課題名（和文）肝臓における代謝機能のzonationに着目したNASH発症機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of non-alcoholic steatohepatitis focusing on the metabolic zonation in the liver.

研究代表者

田中 正剛（Tanana, Masatake）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20837265

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：NASHマウスモデルの未固定肝臓切片からレーザーマイクロダイセクションにより門脈域、門脈域近傍、中間領域、中心静脈近傍に分けてサンプリングし、抽出した微量RNAからRNA-seqを行う実験系を確立した。また、NASHに特異的なdifferentially-expressed genes (DEGs) を959個同定し、階層的クラスタリングにより10個のクラスターに分け、NASH群の中心静脈近傍でのみ発現が変化するクラスターを同定した。また、エンリッチメント解析により、内皮細胞の遺伝子発現キャラクターが強いクラスターにおいてIL-17シグナル経路に変化を認めることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、生活習慣の欧米化により非アルコール性脂肪肝炎（non-alcoholic steatohepatitis; NASH）患者が増加傾向にあり、本邦においては全人口の約3%に上ると考えられている。NASHは肝硬変、肝細胞癌へと進行性の経過を辿り、5年生存率は約70%と不良であることが知られているが、その発症機序はまだ十分には解明されておらず、有効性の証明された薬物治療も存在しない。肝臓の微小領域に着目した本研究により、新たな治療標的候補が同定することができた。本研究成果はNASHの発症機序解明に寄与し、NASHの治療薬開発に結びつく可能性があるものであり、社会的にも意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We established the experimental protocol for analyzing transcriptome by RNA-seq using the RNA samples of portal tract area, periportal area (zone 1), midzonal area (zone 2), and pericentral area (zone3) individually isolated from unfixed liver sections by a laser microdissection device. And we identified 959 differentially-expressed genes (DEGs) unique for NASH group and 3 clusters whose gene expressions were significantly changed in zone 3 among 10 hierarchical clusters. One of the findings demonstrated by an enrichment analyses is that the IL-17 signaling pathway was associated with the cluster whose gene expression profile is associated with endothelial cells.

研究分野：肝臓病学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 NASH zonation 網羅的遺伝子発現解析 RNA-seq レーザーマイクロダイセクション IL-17 類洞内皮細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

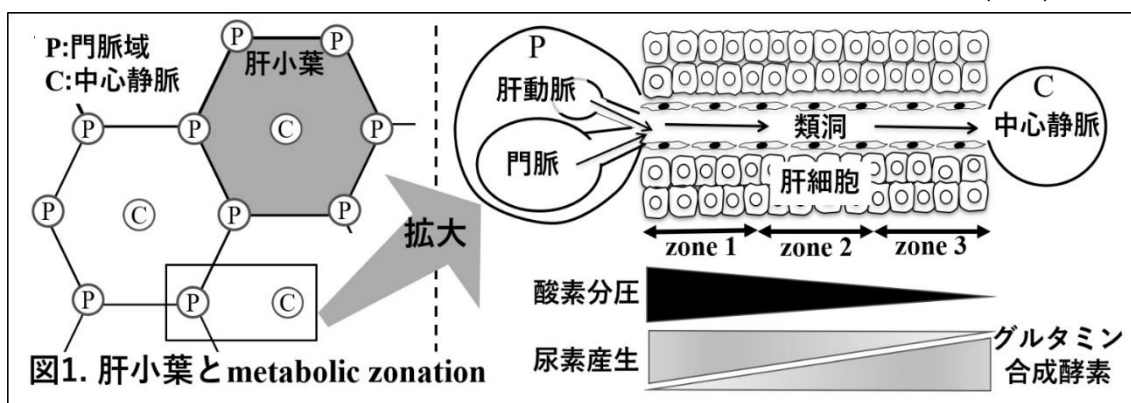
1. 研究開始当初の背景

① NAFLD/NASH について

近年、生活習慣の欧米化によりメタボリック症候群の有病率の増加が大きな問題となっている。非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) はメタボリック症候群の肝臓における一つの表現型と考えられており、健康診断受診者の 20~30% が NAFLD と報告されている。[1] NAFLD の内、10~20% は炎症・線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) という病態で、NASH に該当しないものは非アルコール性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver; NAFL) と呼ばれる。NASH は肝硬変、肝細胞癌へと進行性の経過を辿ることから、5 年生存率は約 70% と不良であることが知られている。しかしながら、NASH の発症機序はまだ十分には解明されておらず、有効性の証明された薬物治療も存在しない。

② 肝小葉における酸素化と代謝機能の zonation

肝臓は肝小葉という直径 1~2mm の六角形の微小単位から構成され、六角形の各頂点には門脈域、肝小葉の中心には中心静脈が存在する (図 1)。更に肝小葉は門脈域周囲 (zone 1)、中間領域 (zone 2)、中心静脈周囲 (zone 3) の 3 領域へと解剖学的に分類される (Rappaport 分類)。肝微小循環は門脈域から始まり類洞を経て中心静脈へと流入するため、類洞血の酸素分圧は zone 1 から zone 3 に向かうに従って減少するという zone による違い (zonation) が存在するため、zone 3 は低酸素に陥り易い。更に肝細胞の代謝機能およびタンパク・酵素発現にも zone 毎に違いがあることが知られている (metabolic zonation)。[2] この典型例としてアンモニア代謝があり、zone 1 ではアンモニアは尿路回路による尿素生成で処理されるのに対し、zone 3 ではグルタミン合成酵素により処理される (図 1)。



③ NASH に特徴的な zone 3 の病理変化

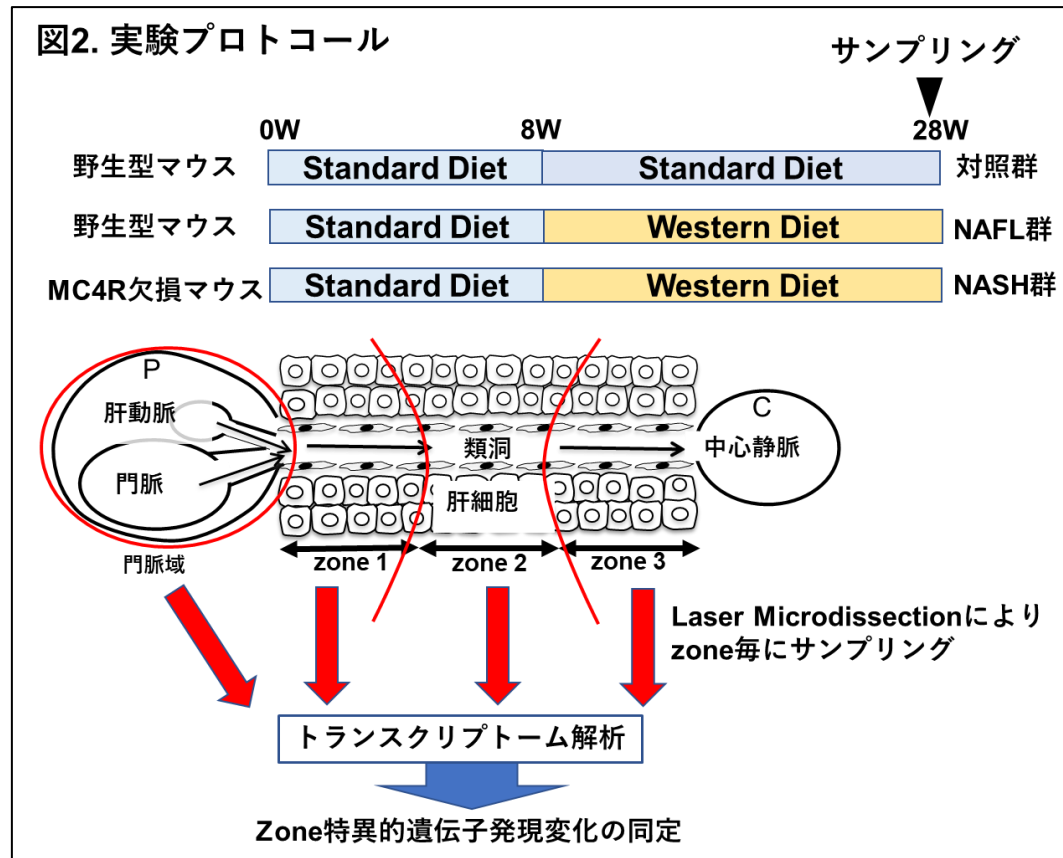
NASH に特徴的な線維化として pericellular fibrosis (肝細胞周囲線維化) と perivenular fibrosis (中心静脈周囲線維化) が挙げられる。この後者の中心静脈周囲 (zone 3) 線維化は、慢性ウイルス性肝炎においてみられる zone 1 を中心とした線維化と対照を成している。NASH における脂肪化は zone 3 を中心に生じることから、NASH における肝脂肪化から炎症・線維化へと進展する根源的な病理変化は zone 3 の生物学的特性に強く関連していると考えられる。[3]

2. 研究の目的

本研究の目的は NASH において zone3 に生じる肝脂肪化から炎症・線維化へと進展する病理変化の機序を解明することである。また、この目的を達成するために zone ごとにサンプリングを行い、抽出した微量 RNA から RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行う実験系を確立する。

3. 研究の方法

メラノコルチン 4 型受容体 (MC4R) は中枢神経、特に視床下部室傍核に発現し、食欲抑制に関与することが知られており、MC4R 欠損マウスに高脂肪高カロリー食を給餌することにより NASH が発症することが知られている。[4] 雄性 MC4R 欠損マウスに 8 週齢から高脂肪高カロリー食を 20 週間給餌し NASH モデルを作製する (NASH 群)。野生型 C57BL/6J マウスに普通食を 20 週給餌する群 (対照群)、野生型 C57BL/6J マウスに高脂肪高カロリー食を 20 週給餌する群 (NAFL 群) も設定する。マウスから肝臓を摘出し、未固定凍結ブロックを作製し、クライオスタットで薄切する。レーザーマイクロダイセクションにより肝実質を門脈域、門脈域近傍 (zone 1)、中間領域 (zone 2)、中心静脈近傍 (zone 3) に分けてサンプリングし、抽出した total RNA を用いて RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行う。Gene Ontology 解析、パスウェイ解析、Gene Set Enrichment 解析等により、NASH 群の zone 3 において発現が変化している遺伝子群を同定する。



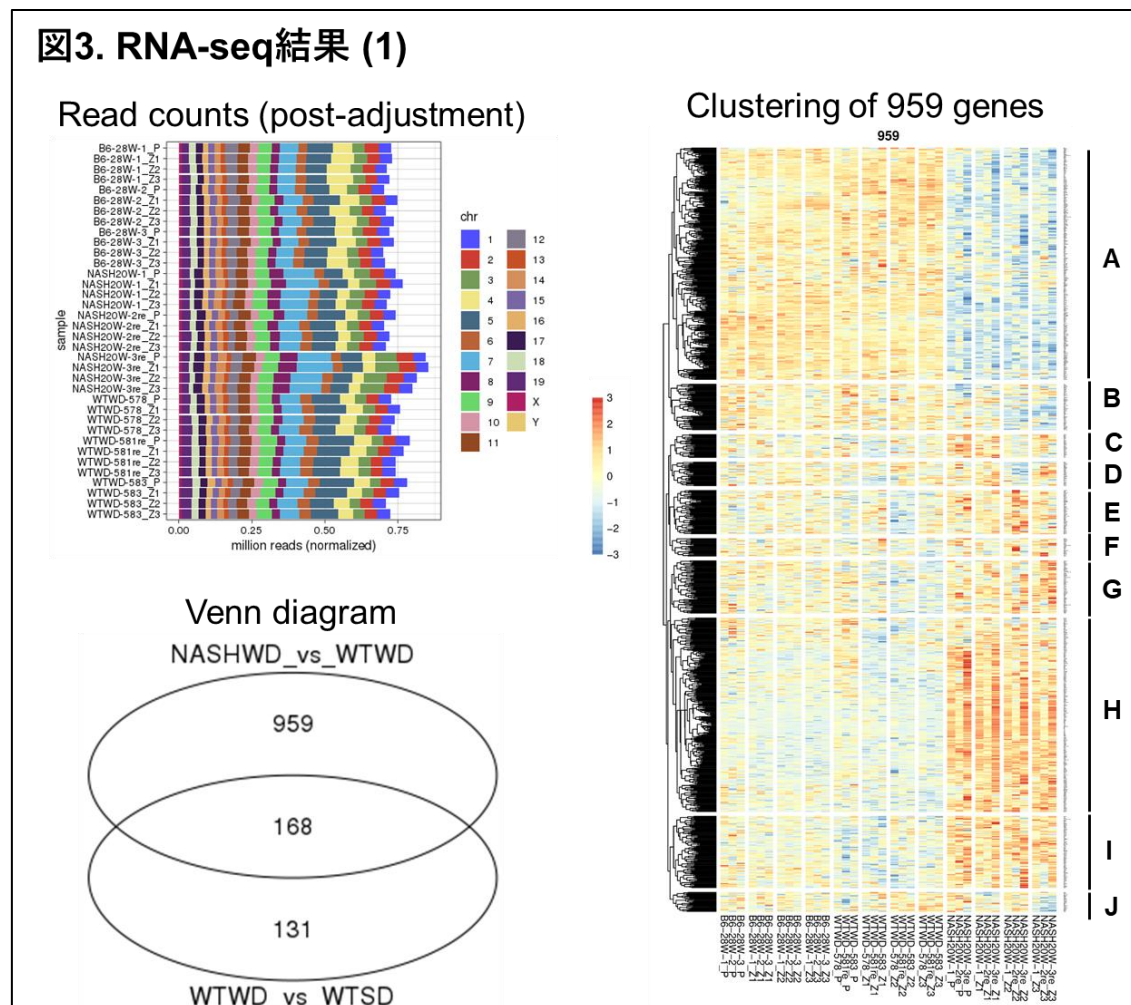
4. 研究成果

(1) zone ごとに RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行う実験系の確立

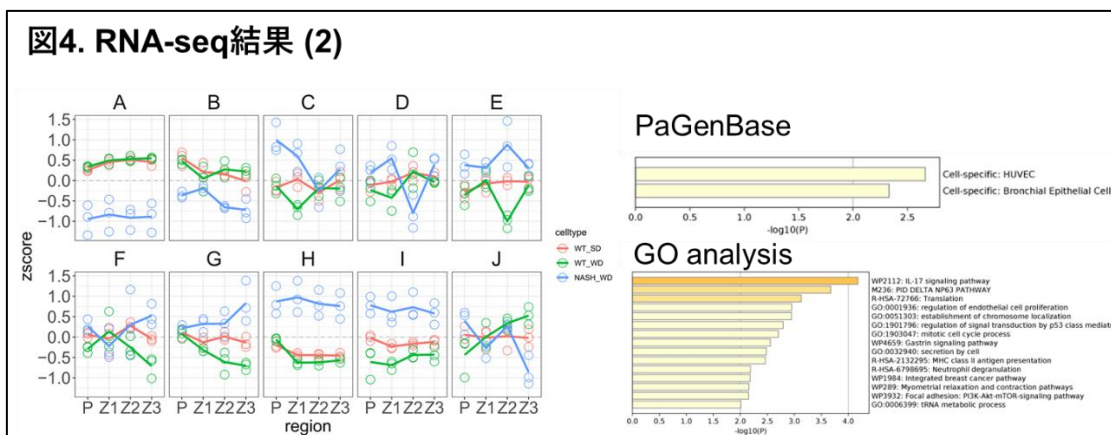
当初、レーザーマイクロダイセクションにより肝実質を門脈域、門脈域近傍 (zone 1)、中間領域 (zone 2)、中心静脈近傍 (zone3) に分けてサンプリングし、抽出した RNA の品質を評価する指標である RIN が 3 前後と不十分な結果であり、肝臓に内在する豊富な RNase が原因と考えられた。薄切後の切片に RNeasyLater®を滴下することにより、RNase 活性を抑制し、氷上で染色するプロトコルを考案し、RNA-seq に要求される品質の RNA を得ることができた。得られた RNA は微量であったが、RNA-seq のライブラリ作製方法を修正することにより、RNA-seq を行うことが可能となった。

(2) NASH において zone 3 に生じている遺伝子発現変化の同定

対照群、NAFL 群、NASH 群の遺伝子発現を比較し、NASH 群のみに認める differentially-expressed genes (DEGs) を 959 個同定し、階層的クラスタリングにより 10 個のクラスターに分けられた (図 3)。



各クラスターにおいて zone ごとの DEGs 発現量をプロットすることにより、NASH 群の zone 3 でのみ発現が増加あるいは減少するクラスターを同定した。エンリッチメント解析により得られた所見の一つとして、内皮細胞の遺伝子発現キャラクターが強いクラスターにおいて IL-17 シグナル経路に変化を認めることが明らかとなった。IL-17 は主に T 細胞により分泌されることから、NASH 発症機序において T 細胞と類洞内皮細胞の相互作用が病態に関与している可能性が示唆され、今後その点を明らかにする実験を行う予定である。



<引用文献>

- [1] Eguchi Y, Wong G, Lee EI, Akhtar O, Lopes R, Sumida Y. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in Japan: A focused literature review. JGH open : an open access journal of gastroenterology and hepatology 2020;4:808-817.
- [2] Kietzmann T. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. Redox biology 2017;11:622-630.
- [3] Chalasani N, Wilson L, Kleiner DE, Cummings OW, Brunt EM, Unalp A. Relationship of steatosis grade and zonal location to histological features of steatohepatitis in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease. Journal of hepatology 2008;48:829-834.
- [4] Itoh M, Suganami T, Nakagawa N, Tanaka M, Yamamoto Y, Kamei Y, et al. Melanocortin 4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. The American journal of pathology 2011;179:2454-2463.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hata Kojiro, Suetsugu Kimitaka, Egashira Nobuaki, Makihara Yoko, Itoh Shinji, Yoshizumi Tomoharu, Tanaka Masatake, Kohjima Motoyuki, Watanabe Hiroyuki, Masuda Satohiro, Ieiri Ichiro	4. 巻 86
2. 論文標題 Association of lenvatinib plasma concentration with clinical efficacy and adverse events in patients with hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Chemotherapy and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 803～813
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00280-020-04178-x	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 Okuno Hiroaki, Ogino Haruei, Ihara Eikichi, Nishioka Kei, Tanaka Yoshimasa, Chinen Takatoshi, Kohjima Motoyuki, Oono Takamasa, Tanaka Masatake, Goya Takeshi, Fujimori Nao, Iboshi Yoichiro, Gotoda Takuji, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Discriminant equation using mucosally expressed cytokines and transcription factor for making definite diagnosis of inflammatory bowel disease unclassified	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12876-021-01656-1	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 Suzuki Hideo, Kohjima Motoyuki, Tanaka Masatake, Goya Takeshi, Itoh Shinji, Yoshizumi Tomoharu, Mori Masaki, Tsuda Mariko, Takahashi Motoi, Kurokawa Miho, Imoto Koji, Tashiro Shigeki, Kuwano Akifumi, Kato Masaki, Okada Seiji, Nakamuta Makoto, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 2021
2. 論文標題 Metabolic Alteration in Hepatocellular Carcinoma: Mechanism of Lipid Accumulation in Well-Differentiated Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1～13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2021/8813410	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 Yoshizaki Shingo, Kijima Ken, Hara Masamitsu, Saito Takeyuki, Tamaru Tetsuya, Tanaka Masatake, Konno Dai-jiro, Nakashima Yasuharu, Okada Seiji	4. 巻 16
2. 論文標題 Tranexamic acid reduces heme cytotoxicity via the TLR4/TNF axis and ameliorates functional recovery after spinal cord injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	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） 10.1186/s12974-019-1536-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 Yoshizaki Shingo, Yokota Kazuya, Kubota Kensuke, Saito Takeyuki, Tanaka Masatake, Konno Dai-jiro, Maeda Takeshi, Matsumoto Yoshihiro, Nakashima Yasuharu, Okada Seiji	4. 巻 -
2. 論文標題 The beneficial aspects of spasticity in relation to ambulatory ability in mice with spinal cord injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Spinal Cord	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) 10.1038/s41393-019-0395-9	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 Imoto Koji, Kohjima Motoyuki, Hioki Tomonobu, Kurashige Tomoyuki, Kurokawa Miho, Tashiro Shigeki, Suzuki Hideo, Kuwano Akifumi, Tanaka Masatake, Okada Seiji, Kato Masaki, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 2019
2. 論文標題 Clinical Features of Liver Injury Induced by Immune Checkpoint Inhibitors in Japanese Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/6391712	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 田中 正剛、岩切 泰子	4. 巻 26
2. 論文標題 肝内リンパ管新生とその機序	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本門脈圧亢進症学会雑誌	6. 最初と最後の頁 5~8
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 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 黒川美穂、倉重智之、日置智惟、井本効志、田代茂樹、鈴木秀生、衆野哲史、田中正剛、国府島庸之、加藤正樹
2. 発表標題 鉄中毒による急性肝不全に対し集学的治療を行い救命した一例
3. 学会等名 第46回日本急性肝不全研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木秀生、黒川美穂、井本効志、田代茂樹、合谷孟、柴野哲史、田中正剛、国府島庸之、加藤正樹、小川佳宏
2. 発表標題 MC4R欠損マウスを用いた閉経後女性におけるNASH発症メカニズムの解析
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日置智惟、豊田優貴、倉重智之、井本効志、黒川美穂、鈴木秀生、田代茂樹、柴野哲史、田中正剛、国府島庸之、加藤正樹、小川佳宏
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害剤による肝障害の臨床的特徴
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井本効志、国府島庸之、日置智惟、倉重智之、黒川美穂、田代茂樹、鈴木秀生、柴野哲史、田中正剛、加藤正樹、小川佳宏
2. 発表標題 好中球リンパ球比を用いた非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）患者における発癌高リスク群の囲い込み
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田代茂樹、国府島庸之、本村健太、中牟田誠、佐藤丈顕、多田靖哉、杉本理恵、大穂有恒、古藤和浩、徳松誠、横田昌樹、小柳年正、鶴田悟、國吉政実、森園周祐、内村浩太郎、本田正直、田畑伸司、田中正剛、加藤正樹
2. 発表標題 Glecaprevir+Pibrentasvir併用療法の糖質・脂質代謝、体組成分布に対する影響
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中正剛、国府島庸之、黒川美穂、井本効志、田代茂樹、鈴木秀生、柴野哲史、豊田優貴、日置智惟、倉重智之、加藤正樹、小川佳宏
2. 発表標題 NAFLDにおける組織学的肝内微小構造形成に関わる臨床的特徴と遺伝子発現変化
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本理恵、佐藤丈顕、田中紘介、千住猛士、矢田雅佳、吉本剛志、山下尚毅、荒武良総、國吉政美、田中正剛、上田哲弘、多田靖哉、高尾信一郎、大穂有恒、内村浩太郎、中牟田誠、田中ゆき、大江真里、国府島庸之、加藤正樹
2. 発表標題 進行肝細胞がんに対する分子標的薬治療における最適な薬剤選択順及び他治療との組み合わせ
3. 学会等名 第24回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木英生、倉重智之、正月泰士、井本効志、黒川美穂、田代茂樹、柴野哲史、田中正剛、国府島庸之、加藤正樹、小川佳宏
2. 発表標題 閉経後女性における脂肪肝発症メカニズムの解析とその臨床的特徴の検討
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 正剛、国府島 庸之、加藤 正樹、岡田 誠司、小川 佳宏、岩切 泰子
2. 発表標題 門脈圧亢進症モデルラットにおける交感神経誘導性リンパ管新生という新規機序の発見
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 国府島庸之、田代茂樹、鈴木秀生、栗野哲史、倉重智之、井本効志、正月泰士、田中正剛、加藤正樹、小川佳宏
2. 発表標題 NAFLDにおけるSteatosis, Inflammation, Ballooning, Mallory-Denk body, Fibrosisの各因子と関連する臨床的特徴と遺伝子発現変化
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideo Suzuki, Motoyuki Kohjima, Koji Imoto, Miho Kurokawa, Shigeki Tashiro, Akifumi Kuwano, Masatake Tanaka, Masaki Kato and Yoshihiro Ogawa
2. 発表標題 The Effects of Menopause and Fructose Intake On NAFLD/NASH Development
3. 学会等名 The Liver Meeting (The annual meeting of American Association for Studying Liver Diseases) (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------