

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590862

研究課題名（和文） 毒素感受性肝炎モデルマウスとバイオ人工肝臓を用いた肝性脳症惹起蛋白質の同定

研究課題名（英文） Identification of hepatic encephalopathy induced proteins using by a bio-artificial liver and toxin receptor knock out hepatitis model mice

研究代表者 松浦 知和（MATSUURA TOMOKAZU）
 東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：30199749

研究成果の概要（和文）：

劇症肝炎のような急性肝不全における脳症で「急速な脳浮腫」を惹起する未知の肝性脳症起因物質の同定は、肝臓と脳の連関病態解明、致死の肝性脳症の診断と治療法の開発に必要である。本研究の目的は、脳浮腫を惹起する肝性脳症起因蛋白質の同定し、その病理作用、特に脳アストロサイトの障害作用を明らかにすることである。本研究の成果として、プロテオーム解析から致死の肝性脳症蛋白質候補（タンパク A）を同定することができた。タンパク A は、培養アストロサイトへの細胞障害性を示した。また、*in vivo* モデルでの証明のため、TRECK 肝炎モデルマウスにおいて、脳症を伴う急性肝不全を発症させることができた。さらに、肝性脳症時のび漫性細胞浮腫を MRI の DWI で、ADC の低下としてとらえることができた。今後、タンパク A の *in vivo* さらに臨床例における脳症との関連を明らかにし、致死の脳症の治療法の開発を推進する。

研究成果の概要（英文）：

Identification of unknown hepatic encephalopathy induced substances to cause the "rapid cerebral edema" in fulminant hepatitis is required in development of the treatment and diagnosis of fatal hepatic encephalopathy. The main purpose of this study is identification of brain astrocytes damage inducing plasma proteins. A candidate of fatal hepatic encephalopathy inducing proteins, temporary named protein A, was able to identify by proteomic analysis. Protein A induced the cytotoxicity to cultured astrocytes. Hepatic encephalopathy was induced in the TRECK hepatitis model mice. In addition, we could observe diffuse astrocyte swelling in acute hepatic encephalopathy by DWI on MRI, as a decrease in the ADC. We will study whether protein A induce hepatic encephalopathy *in vivo* model and clinical cases in next step, and promote the treatment for fatal encephalopathy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	1,200,000	360,000	1,820,000
平成22年度	1,400,000	420,000	1,560,000
平成23年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学、肝性脳症、バイオ人工肝臓、肝炎モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

劇症肝炎に伴う急性肝不全で発症する脳症は、急速な脳浮腫が惹起され、昏睡から脳死にいたる重篤な病態である。肝性昏睡の原因については、amino acid neurotransmitter のグルタミン（興奮性）とGABA（抑制性）のインバランス、natural benzodiazepineの上昇、アンモニア、TNF- α 、NOなどの肝性昏睡起因物質の上昇が挙げられている（13th International Symposium on Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism, Italy 2008）。肝性脳症の治療には、血液浄化療法が有用であり、大量の透析液を用いた血液ろ過透析（HDF、CHDF）、あるいはアルブミン吸着法（MARS、Prometheus）などの人工肝臓が臨床に導入されている。こうした治療法の発達にも関わらず「急速な脳浮腫を伴う致死性脳症」の加療には限界がある。したがって、特に劇症肝炎のような急性肝不全における脳症で「急速な脳浮腫」を惹起する未知の肝性脳症起因物質の同定は、肝臓と脳の連関病態解明、致死性肝性脳症の診断と治療法の開発に必要である

2. 研究の目的

本研究の目的は、脳浮腫を惹起する肝性脳症起因蛋白の同定し、その病理作用、特に脳アストロサイトの障害作用を明らかにすることである。

3. 研究の方法

【肝性脳症起因蛋白の同定】

ラジアルフロー型バイオリアクターにヒト高機能肝機能発現肝癌細胞 FLC-4 を高密度培養して作製した体外循環型バイオ人工肝臓をブタ急性肝不全モデルに装着し、血液浄化を行った。肝不全モデルを作製するための毒素（ α -アマニチン+LPS）投与前、投与後脳症出現時、体外循環後の3点のブタ血漿を回収し、凍結保存した。

3点のブタ血漿を2次元電気泳動で展開し、プロテオーム解析を行った。具体的には、肝不全の過程で増加し、体外循環で減少するスポットを検出し、ペプチドのアミノ酸シーケンスを質量分析で解析し、同定した。

【TRECK 肝炎モデルマウスでの急性肝不全脳症モデルの作製】

TRECK (toxin receptor-mediated cell knock out) 肝炎モデルマウスを利用して、急速な脳浮腫をとまなう重度肝障害を惹起した。500-1500 ng/kg BW のジフテリア毒素の腹腔内投与後、マウスを犠牲死させ、血液、肝臓を採取し、生化学的検討、病理学的検討を行った。

脳症時の脳浮腫については、小動物用 MRI で観察した。

【肝性脳症起因蛋白候補の培養アストロサイトへの効果】

アストロサイトを培養し、脳症動物の血漿、プロテオーム解析の比較から同定した肝性脳症起因蛋白候補を加えて培養した。培養24時間での細胞数の変化（毒性）を、H33342によるDNA量アッセイ法で測定した。

4. 研究成果

【肝性脳症起因蛋白の同定】

急性肝不全を毒素投与によって惹起したブタ血漿蛋白（毒素投与前、毒素投与後脳症発症時、バイオ人工肝臓での体外循環後）を2次元電気泳動で分離し、脳症発症時に増え、体外循環によって減少する蛋白を同定した（図1）。

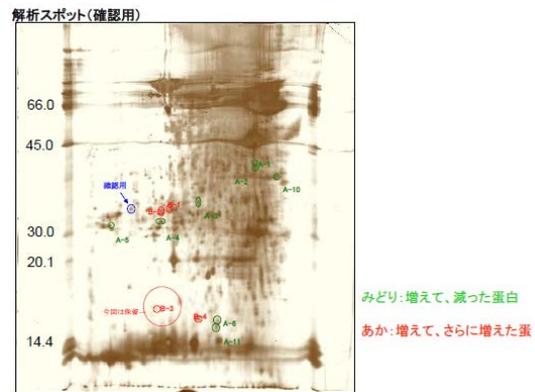


図1 ブタ血漿の2次元電気泳動

条件に合った分離スポット11個のペプチドを質量分析によってアミノ酸シーケンスにより同定したところ、5個で同じ蛋白のペプチドが検出された（研究上の守秘性からここではタンパクAと記載する）。

【TRECK 肝炎モデルマウスでの急性肝不全脳症モデルの作製】

TRECK マウスにジフテリア毒素 500-1500ng/kg BW を腹腔内に投与すると、48時間後に血清トランスアミナーゼは10,000U/L前後まで上昇した（図2）。肝組織には、出血壊死を伴う激しい肝障害が惹起された（図3）。

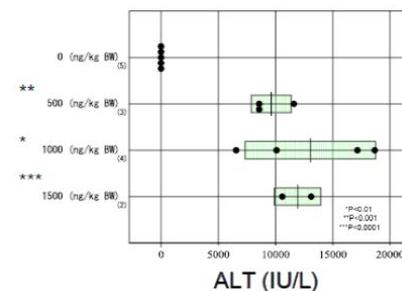


図2

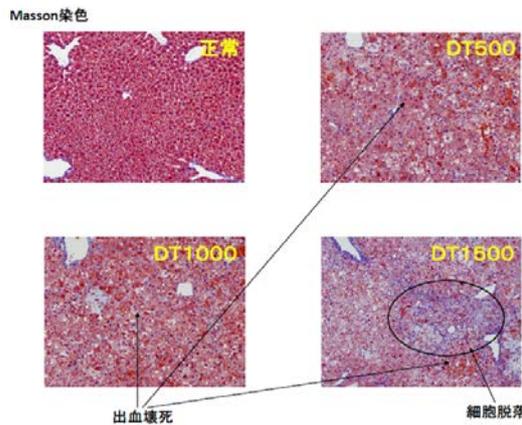


図3 TRECK 肝不全モデル肝組織

また、脳症におけるび慢性のアストロサイト浮腫を観察するため、肝不全惹起 TRECK マウスの脳を MRI で観察した。拡散強調画像 (diffusion weighted image: DWI) 高信号で、apparent diffusion coefficient: ADC、みかけの拡散係数が低下していれば、細胞内浮腫と解釈される。TRECK 肝不全モデルマウスでは、DWI において ADC の低下を認め、マウスモデルにおける脳内のび慢性細胞浮腫の観察に有用であった (図4)。

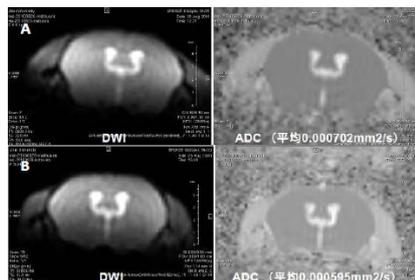


図4
A: 健常
B: 脳症

【肝性脳症起因蛋白質候補の培養アストロサイトへの効果】

ブタ肝不全モデルの毒素投与前、投与後肝性脳症発症時、体外循環後の血漿で、ヒトアストロサイトを培養し、24時間後の DNA 量を蛍光量として比較した。脳症発症時の血清ではアストロサイトは減少したが、体外循環後の浄化血漿では細胞毒性を認めなかった (図5)。

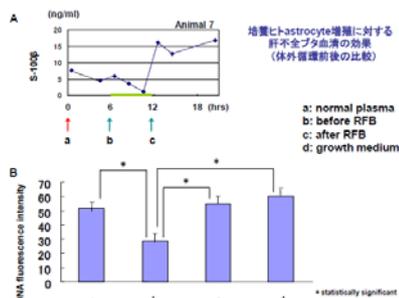


図5

また、肝性脳症起因蛋白質候補タンパク A を培養アストロサイトに添加すると、濃度依存的にアストロサイトの DNA 量は低下した (図6)。

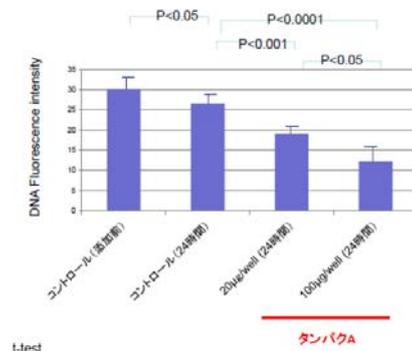


図6

本研究の成果として、プロテオーム解析から致命的肝性脳症蛋白質候補 (タンパク A) を同定することができた。タンパク A は、アストロサイトへの細胞障害性を認めた。in vivo モデルでの証明のため、TRECK 肝炎モデルマウスにおいて、肝性脳症時のび慢性細胞浮腫を MRI の DWI で、ADC の低下としてとらえることができた。今後、タンパク A の in vivo さらに臨床例における脳症との関連を明らかにし、致命的脳症の治療法の開発を推進する。

謝辞：本研究は、奈良先端科学技術大学院大学・斎藤美智子先生、河野憲二先生、および東京慈恵会医科大学・ME 研究室の遠藤玲子先生、古幡博先生との共同研究である。

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 3 件)

- ① Saito R, Ishii Y, Ito R, Nagatsuma K, Tanaka K, Saito M, Maehashi H, Nomoto H, Ohkawa K, Mano H, Aizawa M, Hano H, Yanaga K, Matsuura T, Transplantation of liver organoids in the omentum and kidney, *Artif Organs*, 査読有、Vol.35, No.1, 2011, pp80-83

DOI:10.1111/j.1525-1594.2010.01049.x

- ② 田中 賢、松浦知和、中田浩二、¹³C グルコース呼吸試験を利用した 3 次元還流培養系の活性測定とその応用、*Radioisotope*、査読

無、Vol. 59、No. 7、2010、pp435-440

③ Shibata S、Marushima H、Asakura T、Matsuura T、Eda H、Aoki K、Matsudaira H、Ueda K、Ohkawa K、Three-dimensional culture using a radial flow bioreactor induces matrix metalloprotease 7-mediated EMT-like process in tumor cells via TGF β 1/Smad pathway、Int J Oncol、査読有、Vol.34、No.5、2009、pp1433-1448

〔学会発表〕(計 1 件)

① 松浦知和、石井雄二、相澤 守、(ワークショップ) 肝再生医学 臨床応用を目指した研究の新展開 類洞類似構造を再現した肝臓オルガノイドの作製、第 46 回日本肝臓学会総会、2010 年 5 月 28 日、山形

〔図書〕(計 1 件)

① 松浦知和、他、シーエムシー出版、バイオリアクターシステム、2009、80-89

〔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 2 件)

名称：ガス混合装置及びガス混合方法

発明者：藤原邦彦、松浦知和

権利者：エイブル(株)、松浦知和、大川 清

種類：特許

番号：4868439

取得年月日：2011/11/25

国内外の別：国内

名称：バイオリアクター

発明者：相澤 守、松浦知和

権利者：学校法人明治大学

種類：特許

番号：4631049

取得年月日：2010/11/26

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 知和 (MATSUURA TOMOKAZU)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30199749

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

木村 直史 (KIMURA NAOFUMI)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：80138742