

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：24402
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790806
 研究課題名（和文） 脂肪肝を基盤とした肝発癌におけるマクロファージスカベンジャー受容体の役割
 研究課題名（英文） The role of macrophage scavenger receptor in hepatocarcinogenesis based on steatohepatitis
 研究代表者
 藤井 英樹 (FUJII HIDEKI)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師
 研究者番号：20382070

研究成果の概要（和文）：生後 2 週齢のマクロファージスカベンジャー受容体 A ノックアウト (MSR-A KO) マウス及びコントロールマウスに N,N'-ジエチルニトロソアミンを腹腔内投与し、4 週後より choline-deficient, L-amino acid-defined (CDAA) 食を 30 週間投与した。肝組織は両群とも脂肪肝炎であった。肝内に腫瘍の形成を認め、MSR-A KO マウス群はコントロール群に比し腫瘍サイズ、個数が小さい傾向であった。

研究成果の概要（英文）：DEN (25 mg/kg) was injected intraperitoneally (i.p.) into 14-day-old male MSR-A knockout (MSR-A^{-/-}) mice and age-matched C57Bl/6J (MSR-A^{+/+}) mice. After 4 weeks, mice fed choline-deficient, L-amino acid-defined (CDAA) diet and sacrificed after 30 weeks. Macroscopically, hepatic tumors were seen in both groups. Microscopically, hepatic steatosis, inflammation, and fibrosis were seen. The numbers and size of hepatic tumors tended to be smaller in MSR-A^{-/-} group than in MSR-A^{+/+} group. These results indicate that MSR-A contributes to hepatocarcinogenesis in the mouse model of steatohepatitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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、発癌、マクロファージ

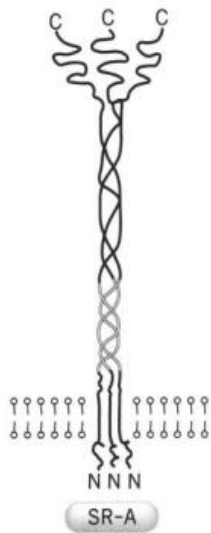
1. 研究開始当初の背景

非飲酒者であるにも関わらずアルコール性肝障害に類似した肝障害を呈する疾患を非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) と呼ぶ。我が

国では、検診受診者の 20～30%が脂肪肝で、約 8%が NAFLD と推測されている。又、NAFLD の進行型で、脂肪化に加え炎症細胞浸潤、線維化を認める疾患を Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) と呼ぶ。日本人の

NASH 人口は約 100 万人と推測されるが、肝硬変、肝癌を合併しうるため、早急な病態の解明と治療法の確立が急務である。しかし、NASH の病態進展のメカニズムは不明であり、NASH の特異的な治療法は全く存在しないのが現状である。

MSR-A(マクロファージスカベンジャー受容体 A、CD204)は分子量 77 kDa のサブユニットのホモ三量体からなる 220-240 kDa の膜蛋白で、粥状硬化におけるマクロファージの泡沫化のみならず、生体防御や種々の炎症におけるマクロファージの機能に深く関与している。MSR-A ノックアウトマウスは、Suzuki らにより 1997 年に初めて報告された。マウスの発育や成長は正常であるが、腹腔マクロファージによる酸化 LDL、アセチル LDL 等の取り込みが低下する (Suzuki H et, al. Nature 1997;386:292)。



マクロファージスカベンジャー受容体 (MSR-A)

申請者は、NASH の病態進展においてマクロファージの機能変化が重要な役割を果たすという仮説を立て、MSR-A ノックアウトマウスおよびコントロールマウスにメチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食を投与し NASH を誘導し、肝

線維化の程度を比較したところ、コントロールマウス群に比し MSR-A ノックアウトマウス群において有意に抑制されることを見出した。更に、MSR-A ノックアウトマウス群はコントロール群に比し肝内に誘導されるマクロファージ数が少なく、肝内の炎症性サイトカインの mRNA レベルも低下していた。また、主な肝線維化関連遺伝子の mRNA レベルは低下し、膠原線維の量も低下していた。以上の結果より、MSR-A は炎症を調節することで肝線維化に関与する可能性が示唆された (脂肪性肝炎の病態形成におけるマクロファージスカベンジャー受容体の役割, 研究課題番号: 21790682, 研究代表者: 藤井英樹)。

2. 研究の目的

今回、申請者らはこれまでの研究を進展させ、MSR-A KO マウス及びコントロールマウスに脂肪肝炎を基盤にした肝細胞癌を誘導し、その差異を検討・解析することで MSR-A の肝発癌における役割を明らかにする研究計画を立案した。現状では食事のみで肝癌を誘導するモデルは確立されていないために、以下の方法を用いた。

3. 研究の方法

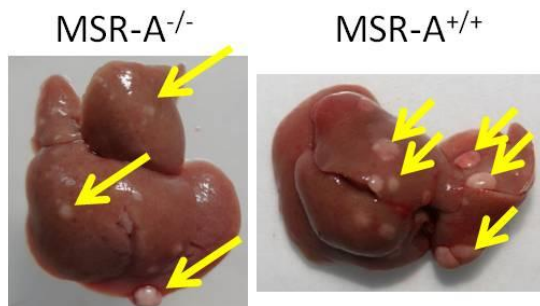
コントロール群 (C57BL/6 マウス、♂, n=7), MSR 群 (MSR-A^{-/-}マウス (C57BL/6 バック)、♂, n=8) に対して生後 15 日の時点で N,N'-ジエチルニトロソアミン (DEN) を腹腔内投与し、生後 6 週より choline-deficient, L-amino acid-defined (CDAA) 食 (Dyets Inc. No. 518753) を 30 週間投与した後解剖に供した。

4. 研究成果

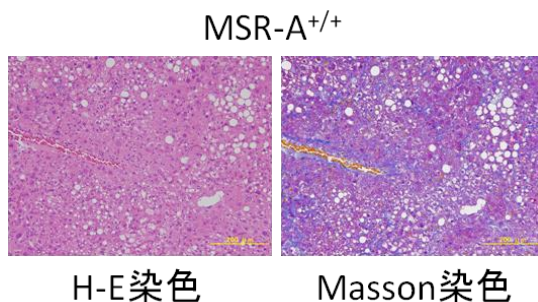
当初予定していたモデルは 8 週齢のマウスに choline-deficient, L-amino acid-defined (CDAA) 食を投与し 2 週後の時点で N,N'-ジエチルニトロソアミン (DEN) を投与し発癌を誘

導するというものであった。しかし、予備検討では肝腫瘍を誘導することはできなかった。DEN の発癌性は生後早期でより強く発現される。腹腔内投与の場合は複数の論文で生後 15 日の時点で 25mg/kg の DEN を腹腔内投与されているため (Cell 2010;140:197, Science 2007;317:121) 本実験でも過去の論文に合わせてモデルの改変を行った。

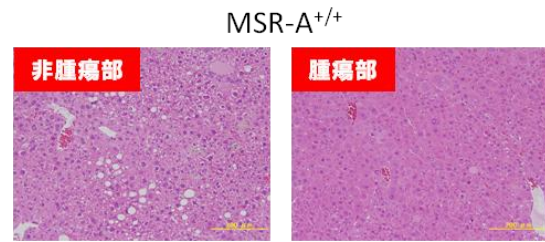
生後 2 週の時点で両群の体重に有意差を認めなかった (コントロール v. s. MSR, 8.3 ± 0.83 v. s. 7.5 ± 0.76 (g))。また、CDAА 食開始時も同様に各群の体重に有意差は認めなかった (コントロール v. s. MSR, 21.9 ± 1.2 v. s. 21.3 ± 1.3 (g))。一方、解剖時には MSR 群で有意に体重が少なかった (コントロール v. s. MSR, 33.2 ± 4.4 v. s. 25.8 ± 1.8 (g))。各群の代表的なマクロ写真を提示する (写真)。



特に腫瘍径の大きな個体は体重増加に乏しい傾向があった。肝組織を検討したところ、肝内には大滴性の脂肪沈着に加え炎症細胞浸潤、及び肝線維化を認め NASH を誘導できたものと思われた (写真)。



以下に非腫瘍部と腫瘍部の H-E 染色の写真を提示する (写真)。



腫瘍のサイズや個数について検討を行ったところ、有意差は認めなかったものの MSR 群で最大腫瘍径、個数はいずれも少ない傾向にあった (最大腫瘍径; コントロール v. s. MSR; 6.1 ± 6.1 v. s. 3.0 ± 2.2 (mm), p=0, 1983, 腫瘍個数; コントロール v. s. MSR; 11.3 ± 9.0 v. s. 6.4 ± 4.8 (個), p=0, 2030)。現在検討中の項目としては CDAА の代わりに Chow を 30 週投与した群を作成中であり、既報通りの発癌率 (80%) であることを確認する。更にこれらの結果を踏まえて①腫瘍が肝細胞癌であることの確認 (AFP, HSP70, Ki-67 免疫染色)、②肝線維化進展度の確認 (Sirius red 染色の定量化) を行う予定としている。

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)

- ① Fujikawa Y, Fujii H, et al. High Prevalence of Gastroesophageal Reflux Symptoms in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Associated with Serum Levels of Triglyceride and Cholesterol but Not Simple Visceral Obesity. *Digestion* 2012;86:228-237.

② Fujii H, Kawada N. Inflammation and fibrogenesis in steatohepatitis. *J Gastroenterol* 2012;47:215-25.

③ Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, et al. MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Gut* 2012 Jan 20.

④ Yoneda M, Fujii H, et al. Platelet count for predicting fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2011;46:1300-6.

⑤ Mori M, Fujii H, et al. Close correlation of liver stiffness with collagen deposition and presence of myofibroblasts in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2011;41:897-903.

[学会発表] (計 4 件)

①□ 藤井英樹、榎本大、河田則文. NAFLD とアルコール性肝障害の鑑別におけるアルコール性肝障害/NAFLD 指数(ANI)の有用性 . 第 16 回日本肝臓学会大会, ワークショップ 16, 2012 年 10 月 11 日, 神戸

② 藤井英樹ら. NAFLD/NASH 患者において糖尿病・高血圧が肝線維化進行度および予後に与える影響. 第 48 回日本肝臓学会総会 オープンワークショップ 31, 2012 年 6 月 8 日, 金沢

③ Fujii H, Kawamura E, Hagihara A, et al. Are the stage of liver fibrosis and mortalities affected by diabetes mellitus

in patients with non alcoholic fatty liver disease? AASLD 63th Annual meeting 2012, 12th Nov, 2012, Boston.

④ 藤井英樹ら. NAFLD 患者における肝弾性度測定成功率を規定する因子. 第 39 回日本肝臓学会西部会, 2011 年 12 月 9 日, 岡山.

5. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 英樹 (FUJII HIDEKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師
研究者番号: 20382070

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし