

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791401

研究課題名(和文)新規NASH動物モデルを用いた肝再生機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of liver regeneration mechanisms using novel NASH animal model

研究代表者

稲垣 奈都子 (INAGAKI, NATSUKO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任研究員

研究者番号：00611419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：日本においても近年、生活様式の欧米化から非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の患者が増加しており、社会的にも問題となっている。本研究では新規のNASH動物モデルを用いて、正常肝とNASH肝の再生メカニズムの違いを明らかにすることを目的とした。二種類の新規NASHモデルマウス候補を長期にわたり検討した結果、野生型マウスへのコリン欠乏アミノ酸制限食食餌モデルがNASHモデルとして妥当であることが示された。このNASHモデルマウスを用いて70%肝切除を施行したところ正常肝と比較しNASH肝では顕著に肝再生が障害され、新たな血球細胞の関与も示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) have been increased because of westernization of lifestyle in Japan, which evokes a serious problem in the society. The goal of the present study is to elucidate the difference in the regeneration mechanisms between NASH and normal livers using NASH animal models. Investigation for a long period observation of two NASH model mouse candidates proved that feeding of choline deficient amino acid diet to wild-type mice is appropriate to evoke NASH. Liver regeneration is significantly impaired in NASH liver compared with normal liver after 70% partial hepatectomy. Additionally the results by FACS analysis suggested the involvement of new blood cells in the delay of liver regeneration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 消化器外科学

キーワード：肝臓学 NASH 肝再生

1. 研究開始当初の背景

母子感染予防事業の普及や献血スクリーニングによる新規感染者の減少、改良型インターフェロンや核酸アナログ製剤・抗ウイルス薬の開発などによる抗ウイルス療法の進歩によって、我が国においてB型・C型ウイルス性肝炎からの肝硬変・肝がんへの進行は抑えられつつある。しかしながら、生活様式の欧米化を背景とするメタボリックシンドローム患者の増加に伴って、飲酒歴のない脂肪化を伴う慢性肝疾患 (NAFLD) が近年注目を浴びるようになってきた。メタボリックシンドローム患者の約半数で認められると云われる NAFLD は、単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の2つに大別されるが、単純性脂肪肝は病態も進行せず予後も良好と言われる。一方、NASH はその組織学的形態も単純性脂肪肝とは大きく異なり最終的に肝硬変や肝がんへと進行する可能性の高い病態である。そのため、今後は NASH 肝を背景肝とする肝がん患者に対する肝切除手術の機会がますます増えていくことが見込まれる。

2. 研究の目的

正常肝と比較して NASH 肝の肝切除後の再生能が劣ることは臨床的な知見から示唆されているが、その原因に関しては不明な点も多い。既報の NASH 動物モデルは、脂肪肝炎から肝線維化・癌化といった組織像の経時的変化を辿らないモデルや MCD 食餌モデルなどのように寧ろ体重減少(るいそう)が目立ちメタボリックシンドロームの一表現型とは考えにくいモデルであった。そこで本研究では NASH の病態をより忠実に再現するようなマウスモデルの新たな確立を目指した。また肝再生においては肝細胞とその他の肝臓構成細胞(血球系細胞や類洞内皮細胞など)との細胞間相互作用が重要であることが様々な先行研究から近年明らかとなっているが、正常肝・単純性脂肪肝と NASH 肝の肝切除後の肝再生の違いを細胞間相互作用の観点からも明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウス NASH モデル候補として、① OSM レセプターノックアウトマウスに対するコリン欠乏食負荷モデルと②野生型マウスへのコリン欠乏アミノ酸制限食食餌モデルの2つのモデルの妥当性をまず検討した。

正常肝・単純性脂肪肝・NASH 肝のモデルとして、それぞれ通常食・高脂肪食 (Quick

Fat®)・CDAA 食を4週間ならびに12週間摂取させた。これら3群に対して古典的肝切除(70%肝切除)を施して経時的に肝再生の差異を検討した。また FACS を用いて肝細胞以外の肝臓構成細胞、特に血球系細胞に着目して、比較検討をおこなった。併せて細胞周期解析や Ploidy 解析などもおこなった。

4. 研究成果

本研究において、最初に NASH モデル候補として検討した OSM レセプターノックアウトマウスに対するコリン欠乏食負荷モデルであるが、脂肪肝炎から線維化という組織学的変化を概ね示すものの、その進行スピードに著しく個体差があり、実験系として安定しないことが明らかとなった。そこで別の NASH モデルとして、野生型マウスにコリン欠乏アミノ酸制限食 (CDAA 食) を摂取させるモデルを検討した。体重変化を経時的に調べたところ CDAA 食群は高脂肪食 (Quick Fat®) を摂取させたマウスと同様に、通常食群に比べて体重は増加傾向にあった。また肝臓の組織学的変化を検討したところ、先行研究で報告のあったラット CDAA 食摂取モデルほど速やかではなかったが、CDAA 食開始4週間の時点で脂肪滴の沈着と肝細胞の一部風船様腫大・炎症性細胞の浸潤を認めるなど脂肪肝炎様の組織像を認めた。さらに CDAA 食を継続したところ肝線維化を経て1年後には肝がんの発生をほぼ全例に認め、NASH モデルとして妥当と考えた。個体差もわずかであったため、このモデルを用いて NASH 肝における肝切除後の肝再生の検討をおこなった。

通常食・高脂肪食 (Quick Fat®)・CDAA 食をそれぞれ摂取させたマウスに対して、古典的肝切除を施行したところ、CDAA 食群では顕著に肝再生が障害されていた。CDAA 食短期摂食群では早期の肝再生過程が障害されるのみであったが、長期摂食群では早期に加えて後期肝再生過程も障害されていた。長期摂食群では血清学的検査でも血清ビリルビン値の一過性上昇が認められるなど術後早期肝不全を呈した。また、血球系細胞の門脈域への浸潤の有無が単純性脂肪肝と NASH 肝の大きな違いであることから、血球系細胞に着目して FACS 解析をおこなったところ、既報の NASH 動物モデルやヒト NASH と同様、CDAA 食群においてのみ Mac1 陽性 F4/80 陽性分画 (クーパー細胞分画) が著しく増加していた。この分画は IL-6 を分泌することで肝再生に寧ろ正に寄与すると考えられる細胞分画であるため、更に詳細な解析をおこなって、分画 X に違いがあることを見出した。現在、分画 X の肝再生への寄与に関して解析をおこなっ

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Takeuchi H, Ishii H, Kuwano T, Inagaki N, Akari H, Matano T. Host cell species-specific effect of cyclosporine A on simian immunodeficiency virus replication. *Retrovirology*, 7: 90, 2010, 査読有

② Honma S, Ono D, Suzuki Y, Inagaki N, Yoshikawa T, Nakamura W, Honma K. Suprachiasmatic nucleus: Cellular clocks and networks. *Prog Brain Res*, 199, 129-141, 2012, 査読有

③ Inagaki FF, Tanaka M, Inagaki NF, Yagai T, Sato Y, Sekiguchi K, Oyaizu N, Kokudo N, Miyajima A. Nephronectin is upregulated in acute and chronic hepatitis and aggravates liver injury by recruiting CD4 positive cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 430, 751-756, 2013, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

① 稲垣冬樹, 田中稔, 稲垣奈都子, 國土典宏, 宮島篤「肝炎におけるネフロネクチンの病態生理的意義」**第 19 回肝細胞研究会** 平成 24 年 6 月 29 日-30 日(札幌)

② 稲垣奈都子, 稲垣冬樹, 國土典宏, 宮島篤「肝中皮細胞シートを用いた肝切除術後の癒着防止および再生促進療法の開発」**第 12 回日本再生医療学会** 平成 25 年 3 月 21 日-23 日(横浜)

③ 稲垣奈都子, 稲垣冬樹, 國土典宏, 宮島篤「肝中皮細胞シートを用いた次世代型再生医療」**第 21 回 JDDW(日本消化器関連学会週間)** 平成 25 年 10 月 9 日-12 日(品川)

④ 稲垣奈都子, 稲垣冬樹, 國土典宏, 宮島篤「他家移植における肝中皮細胞シートの有用性の検討」**第 13 回日本再生医療学会** 平成 26 年 3 月 4 日-6 日(京都)

⑤ 稲垣奈都子, 稲垣冬樹, 國土典宏, 宮島篤「臨床応用に向けた肝中皮細胞シートの有用性の検討」**第 50 回肝臓学会** 平成 26 年 5 月 29 日-30 日(東京)

⑥ 稲垣奈都子, 稲垣冬樹, 國土典宏, 宮島篤「肝中皮細胞を用いた細胞療法の開発」**第 21 回肝細胞研究会** 平成 26 年 6 月 27 日-28 日(東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 癒着防止材
発明者: 稲垣奈都子・稲垣冬樹・國土典宏・宮島篤
権利者: 国立大学法人 東京大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2014/51280
出願年月日: 2014/1/22
国内外の別: 外国

名称: 中皮細胞の製造方法、及び癒着防止用細胞シート
発明者: 稲垣奈都子・稲垣冬樹・國土典宏・宮島篤
権利者: 国立大学法人 東京大学
種類: 特許
番号: 62/002, 448
出願年月日: 2014/5/25
国内外の別: 外国

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者

稲垣奈都子 (NATSUKO INAGAKI)
東京大学・分子細胞生物学研究所・特任研究員
研究者番号: 00611419

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :