

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461369

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝(炎)の分子機構の解明と新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文)Molecular mechanism and biomarkers for non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

久米 典昭(Kume, Noriaki)

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号：20252455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)のマウスモデルとして、コリン欠乏高脂肪食(CDAHFD)モデルが開発されているが、血清脂質を含めた他の病態への影響については十分に明らかにされていない。本研究では、CDAHFDモデルでは、有意な体重減少に加え、有意な血清総コレステロール(TCho)とトリグリセリド(TG)レベルの低下が明らかにされた。さらに、これらの低下が、NASHの病態を示す指標である肝TG含量、TNF- α mRNAの発現、血清ALT値と有意に逆相関することが示された。これらは、ヒトNASHでは通常みられないものであり、よりヒトに近いマウスNASHモデルが求められるものと思われた。

研究成果の概要(英文)：As a mouse model for non-alcoholic steatohepatitis (NASH), a choline-deficient amino acid-defined high fat diet (CDAHFD) model has been developed. In this study, we explored the effects of CDAHFD on serum lipid profiles, as well as body weight. We have revealed that CDAHFD diet significantly reduced serum total cholesterol (TCho) and triglyceride (TG) levels, as well as body weight. Furthermore, reductions in serum TCho and TG, as well as body weight, showed significant inverse correlation with elevations in markers for NASH, such as hepatic triglyceride contents, hepatic TNF- α mRNA expression, and serum alanine aminotransferase (ALT) levels. Thus, this CDAHFD model in mice appears to have inconsistent points with NASH in humans. More suitable mouse models for human NASH should be developed in the future.

研究分野：代謝学

キーワード：脂肪肝 炎症 線維化

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、ライフスタイルの欧米化したわが国では発症頻度が急増し、その有効な予防法、治療法の開発は国民的課題といえる。現在のところ、その予防、治療は減量などの生活習慣の改善と、随伴する糖代謝異常、脂質代謝異常に対する薬物治療が行われるのみで、特に肝臓の線維化から肝硬変、肝細胞癌への進展過程を阻止するような特異的な薬剤は存在せず、また、どのような特徴を有する症例が肝硬変、肝細胞癌にまで進展するのかを正確に予測できるバイオマーカーもない。その病態の解明と治療、診断法の開発には、ヒトの NASH の病態と類似した実動物モデル、特に遺伝子改変動物を用いるのに簡便であるマウスでの疾患モデルが重要な役割を担うものと思われる。これまでの研究では、マウスに高脂肪食を与えることにより、脂肪肝は誘発されるものの、顕著な線維化を伴った NASH にまでは進展しないことが知られる。そのため、NASH の研究に使用される最も一般的なモデルは、メチオニン/コリンの両方が欠乏した食餌、あるいはメチオニンが欠乏しコリンを低いレベルに抑えた食餌を与えることにより誘発されるモデルである。しかし、マウスでのメチオニン/コリン欠乏モデルでは、ヒトの NASH にはみられない重度の体重減少を引き起こすことが知られている。これらの欠点を克服した新たなモデルとして、コリン欠乏高脂肪食 (CDAHFD) 負荷マウスモデルが提示されている。しかしながら、この CDAHFD モデルの病態における血清脂質プロファイルを含めた他の特徴は十分に明らかにされてはならず、ヒト NASH の病態と対比した検討が必要と思われる。

2. 研究の目的

本研究では、マウス CDAHFD モデルにおける脂肪肝、NASH の進展と血清脂質、体重などとの関連を検討し、ヒト NASH での病態と比較することを目的とした。

3. 研究の方法

(実験動物)

8 週齢の特定病原体フリーである C57BL/6J 雄マウス 20 匹を SPF 環境下で飼育し、1 週後に 2 群に分け、一方の 10 匹に標準食 (SD) を、他方の 10 匹に CDAHFD を与え、1 週間ごとに体重測定を行い、14 週間後に血液、肝臓を採取した。

(血清脂質、肝機能検査)

エーテル麻酔下で眼球採血を行い、低速遠心で血清を採取し、測定時までは -80 °C で保存した。血清総コレステロール (TChol)、トリグリセリド (TG)、ALT (GPT) のレベルは酵素法による測定キットにて測定した。

(組織病理学検査)

単離された肝臓は、秤量、外観の写真撮影、10% 中性緩衝ホルマリンを用いて、4 °C にて 24

時間固定後に、70% エタノールに置換し、4 °C で保存した。その後、パラフィン包埋し、4 μm の厚さで薄切した後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、およびマッソン・トリクローム染色を施行し、光学顕微鏡下で観察した。

(組織内脂質)

肝臓組織の一部から、Folch の方法で脂質を抽出し、酵素法による測定キットで TG を定量した。

(遺伝子発現の評価)

肝臓組織の一部に TriPure を 1mL を加え、マッシャーを用いてホモゲナイズした後、室温で 5 分間静置してクロロホルムを 200 μL 添加し、15 秒間激しく転倒混和した。その後室温で 2~3 分間静置し、4 °C、12000 回転で 15 分間遠心分離した。遠心分離の後、水層 (上層) を約 500 μL、新しいマイクロチューブに丁寧に移し、2-プロパノールを 500 μL 加えて転倒混和した。その後室温で 2~3 分間静置し、4 °C、12000 回転で 10 分間遠心した。遠心分離の後、上清を除去して沈殿物に DEPC 水で希釈した 70% エタノールを 1mL 加えて転倒混和し、4 °C、7500 回転で 5 分間遠心分離した。遠心分離の後、上清を除去しマイクロチューブの蓋をあけて室温で 5~10 分間静置してエタノールを蒸発させた。乾燥し、沈殿物が透明になったことを確認して DEPC 処理水を 7 μL 加え、4 °C で 5 分間静置した後、ピペティングにて沈殿物を溶解した。

逆転写反応は、Total RNA 7 μL (全量) に 5× RT Buffer を 2 μL、RT Enzyme Mix を 0.5 μL、Prime Mix を 0.5 μL 加え、TaKaRa Thermal Cycler にて PCR を行い、10 μL の cDNA を作製した。その後、90 μL の滅菌水で希釈した。

quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) は、Fast Start Green Master と 7500 リアルタイム PCR システムを用いた。また、得られた TNF-α の値は、β-actin の値で除した。SYBR Green 10 μL、滅菌水 7.2 μL、プライマー-Forward 0.4 μL、プライマー-Reverse 0.4 μL、cDNA 2 μL を懸濁し、95 °C 20sec、95 °C 3 秒、60 °C 30 秒、(40 サイクル) の反応条件で設定した。測定値は β-actin に対する相対値として示した。使用したプライマーを以下に示す。

TNF-α-Forward:

GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTG

TNF-α-Reverse:

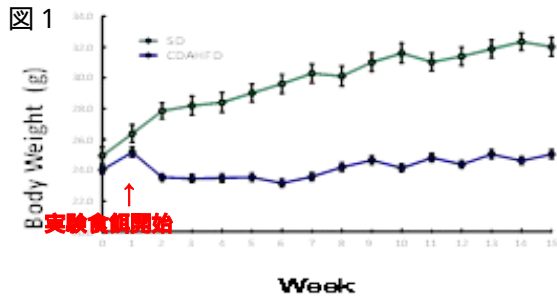
GTTAGAAGGACACAGACTGG

4. 研究成果

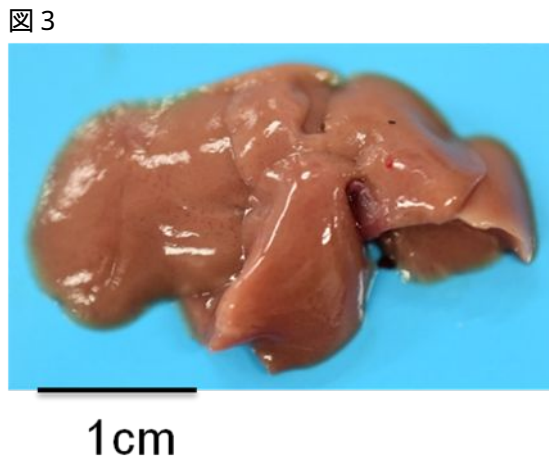
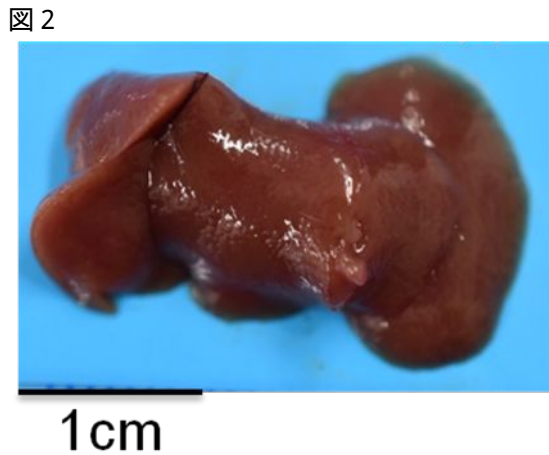
【結果】

図 1 に CDAHFD 食を与えたマウスと標準食 (SD) 食を与えたマウスでの体重変化を示す。CDAHFD では SD 食マウスに比べて体重の増加は著明に少なく、実験食餌開始後 14 週の時点では、SD 群で 32.3 ± 1.82 g であったのに対し、CDAHFD 群では 24.5 ± 0.76

gであった。CDAHFD 群で有意に低体重であった($p<0.0001$)。

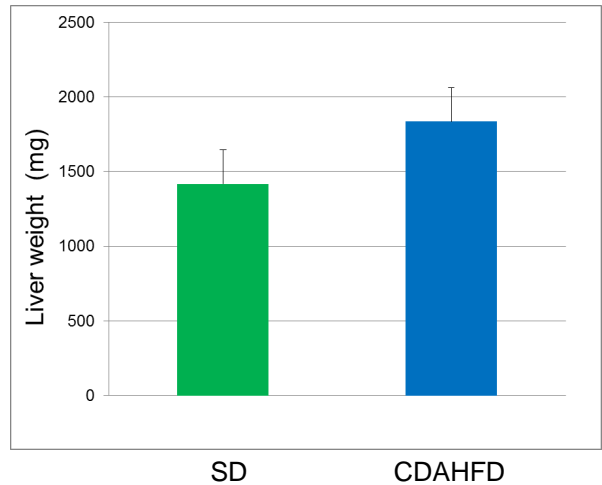


SDおよびCDAHFDを14週の間投与したマウスの肝臓の外観は、図2、図3の通りであった。CDAHFDを投与されたマウスの肝臓の外観の色調は(図3)SDを投与されたマウスの肝臓の外観の色調(図2)と比べて、より白色を帯びた色調を呈していた。



また、肝臓の重量は、SDを投与されたマウスでは 1416.6 ± 229.3 mgであったのに対し、CDAHFDを投与されたマウスでは 1834.6 ± 227.3 mgであり、CDAHFD群で有意($p=0.0007$)に、より高重量であった(図4)。

図 4



肝組織病理所見としては、SD群(図5)ではみられないようなHE染色で白く抜ける脂肪の蓄積と、白血球と思われる炎症細胞浸潤がCDAHFD群(図6)のみでみられた(図3)。また、マッソン・トリクローム染色では、SD群にはみられない(図7)青く染色される顕著な線維化が認められた(図8)。

図 5

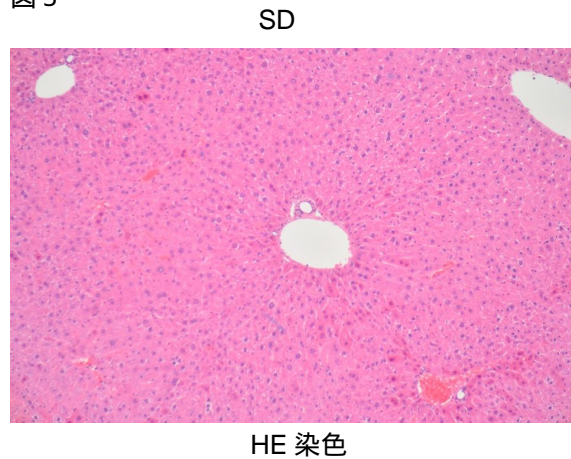


図 6

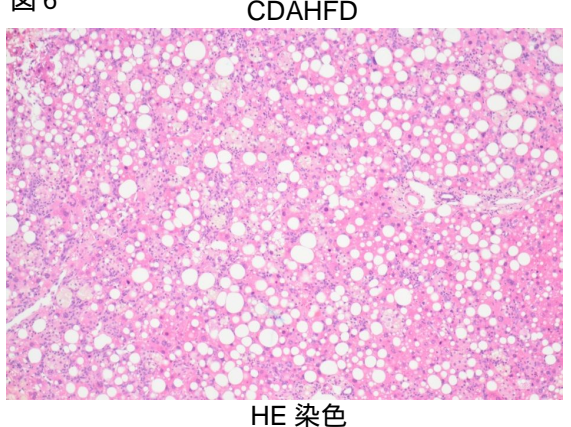
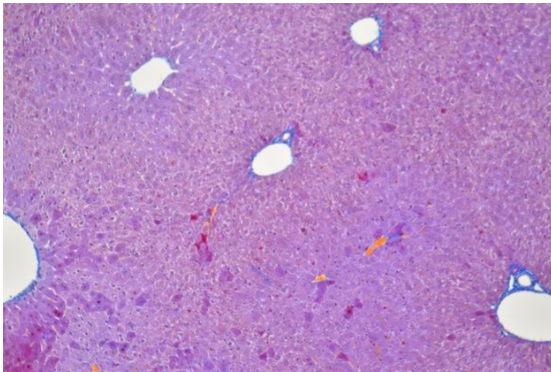
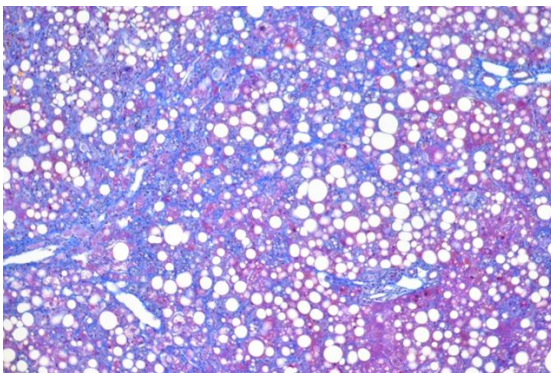


図7 SD



マッソン・トリクローム染色

図8 CDAHFD



マッソン・トリクローム染色

肝組織における TG 含量は、SD 群で 8.7 ± 3.0 mg/g であるのに対し、CDAHFD 群では 214.9 ± 26.3 mg/g であり、有意かつ著明に CDAHFD 群の方で TG 含量が増加していた ($p < 0.0001$)。肝機能障害を示す血清 ALT 値は、CDAHFD 群で 443.6 ± 169.1 IU/L であるのに対し、SD 群では 40.4 ± 17.0 IU/L であり ($p < 0.0001$)、CDAHFD 群のみで顕著な肝機能障害がみられた。

肝臓での TNF- α mRNA の発現量は、beta-actin mRNA の量で補正した値で評価して、CDAHFD 群が 5.66 ± 1.12 であるのに対し、SD 群が 1.89 ± 1.02 であり、CDAHFD 群で有意かつ著明に発現が亢進していた ($p < 0.0001$) (図9)。血清 TCho 値は、CDAHFD 群で 29.3 ± 4.9 mg/dL であるのに対し、SD 群で 67.3 ± 11.0 mg/dL であり ($p < 0.0001$)、血清 TG 値は、CDAHFD 群で 28.0 ± 6.3 mg/dL、SD 群で 55.1 ± 24.1 mg/dL ($p < 0.003$) であり、いずれも CDAHFD 群の方が有意に低い値であった。

図9

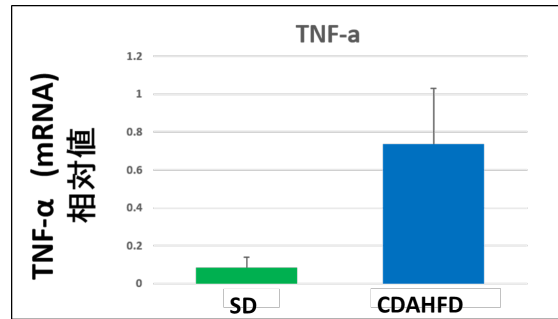


図10に示されるように、肝臓 TG 含量と肝機能障害の指標である血清 ALT (GPT) 値の間には、統計学的に有意な正の相関がみられた (Spearman's rho=0.75, $p=0.0001$)。

図10

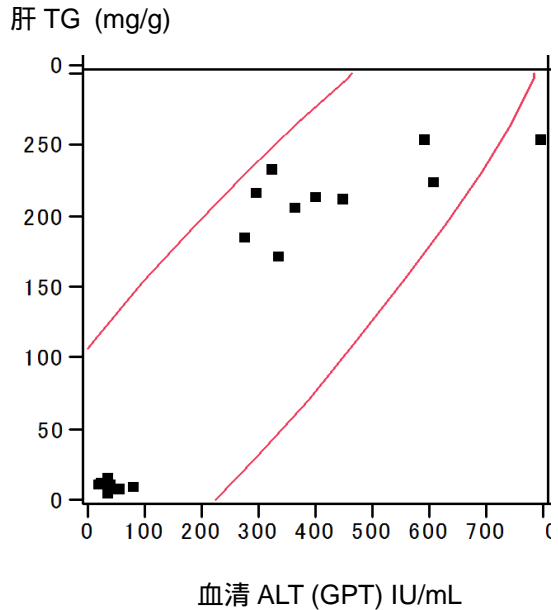
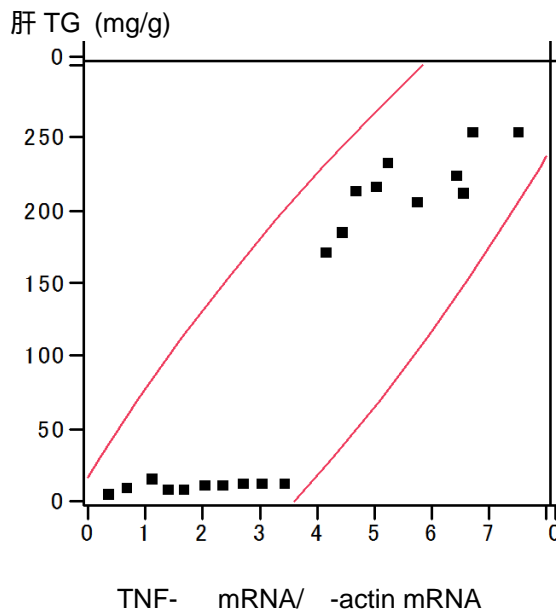


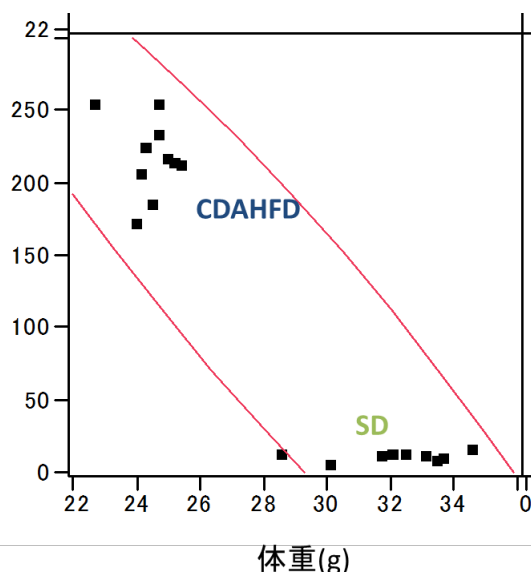
図11



また、肝臓含量と、肝臓 TNF- α mRNA 発現量との間にも、統計学的に有意な正の相関がみられ(Spearman's rho=0.91, p<0.0001)、肝臓での脂質の蓄積と炎症反応の関連が示唆された(図 1 1)。

肝臓 TG 含量と体重(Spearman's rho=-0.74, p=0.0002)の間には、統計学的に有意な逆相関がみられた(図 1 2)。さらに、肝臓 TG 含量と血清 Tcho 値(Spearman's rho=0.83, p<0.0001)の間にも同様に、統計学的に有意な逆相関がみられた(図 1 3)。肝臓 TG 含量と血清 TG 値(Spearman's rho=-0.33, p=0.155)の間にも逆相関の傾向がみられたが、統計学的に有意な逆相関ではなかった(図 1 4)。肝臓 TG 含量と血清 ALT 値(Spearman's rho=0.75, p=0.0001)の間、及び、肝臓 TNF- α mRNA/ β -actin mRNA との間にも有意な正の相関がみられた(Spearman's rho=0.91, p<0.0001, data not shown)。

図 1 2
肝 TG (mg/g)



【考察】

今回のマウス CDAHFD モデルでも、従来のメチオニン/コリン欠乏食モデルと同様に、ヒトの NASH では通常みられない体重減少がみられた。さらに、ヒトでの NASH では通常みられない血清 Tcho 値および血清 TG 値の低下がみられ、その低下と脂肪肝、NASH の病態は逆相関しているように思われた。血清 TG 値と肝臓 TG 含量との間にも、逆相関の傾向がみられたが、統計学的に有意とはならなかった。その理由として SD 群での血清 TG 値のばらつきが、あまりにも大きかったため、と考えられた。このように、新たに開発された CDAHFD 投与のマウスモデルでも、ヒトでの病態とは異なる点が少なからずあるものと考えられた。このような相違が、ヒトでの病態の分子機構の解明や、診

断・治療法の開発において問題となることも推察され、ヒトでの病態を解析する上では、よりヒトの病態に類似した実験動物モデルが必要であろうと推察された。

図 1 3
肝 TG (mg/g)

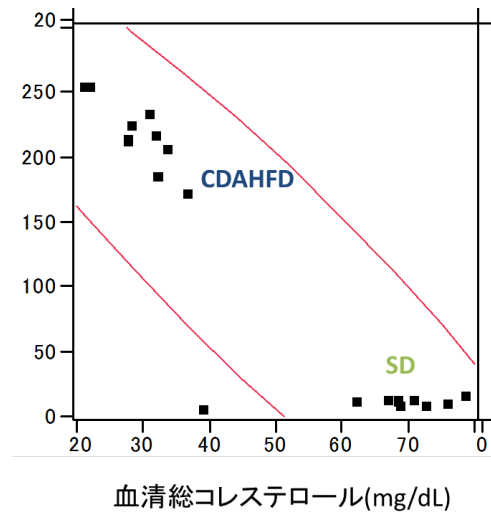
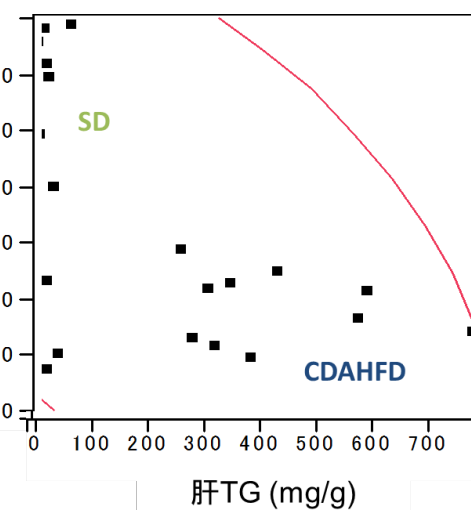


図 1 4
血清 TG (mg/dL)



【参考文献】

Matsumoto M, Hada N, Sakamaki, Uno A, Shiga T, Tanaka C, Ito T, Katsume A, Sudoh M: An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int. J. Exp. Pathol.* 2013; 94(2): 93-103.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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 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

久米 典昭 (KUME, Noriaki)
神戸学院大学・薬学部・教授
研究者番号：20252455

(2)研究分担者

平岡 義範 (HIRAOKA, Yoshinori)
神戸学院大学・薬学部・助教
研究者番号：60397552

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()