

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670370

研究課題名(和文)肝クッパー細胞、新生血管リアルタイム観察モデルの開発

研究課題名(英文)Development of Medaka Model for Analysis of Angiogenesis and Kupffer cell

研究代表者

寺井 崇二(Terai, Shuji)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00332809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：メダカをモデル動物として、血管新生阻害により肝細胞癌に対する治療効果を有するソラフェニブの効果を検証した。さらに本モデルを用いて、ソラフェニブによる手足症候群に關与する血管障害の評価を開始している。さらに、メダカモデルを用いた、HHMのトランスジェニック動物の解析から、本遺伝子が老化促進に機能していることを解明してきた。さらに、メダカが動物モデルとして、生活の日内周期、体内時計の解析に有用であることを報告した。本研究成果により、メダカモデルを用いた疾患、薬剤の副作用の検証モデルの確立、さらには老化に關連する分子の機能解析のシステムを確立することができた。

研究成果の概要(英文)：Development of animal model for angiogenesis has been examined. Using Medaka as an animal model, we have successfully established the animal model which can be used for the study of angiogenesis and to analyze the vascular injury caused by the anti-tumor agents, such as Sorafenib. In addition, the Medaka model was used to examine the relationship between animal circadian rhythm and metabolism. Our results indicate that the Medaka can be used as a promising animal model.

研究分野：消化器病学

キーワード：血管新生 メダカ 動物モデル 分子標的薬

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肝臓の“慢性炎症”の制御において、クッパー細胞、血管の制御は重要である。我々は高脂肪食投与によるメダカ非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルを世界で初めて開発し、薬物スクリーニングにて、n3PUFA (Dis Model Mech. 2007), Telmisartan (PPAR 活性化剤)(Cell and Tissue Research 2009), Ezetimibe(BBRC 2012)が効果のあることを発表してきた。

小型魚類であるメダカは日本発のモデル生物であり成熟が早く多産であり、皮下脂肪組織を欠如するために過栄養により内臓脂肪蓄積を効率良く誘導できるという利点がある。メダカ NASH モデルで有用な薬物は、アメリカ肝臓学会のヒト NASH 治療剤のガイドラインでも有効であり、メダカモデルはヒトの病態モデルの解明に有効である。メダカの NASH はサーカディアンリズムの変化により強く誘導されること、時計遺伝子 (Period, BMAL などの変化) の関与が明らかになりつつあり、本研究ではサーカディアンリズムの変化による肝クッパー細胞の動態変化も解析した。

また、一方、我々は Fli-GFP TG メダカ (全身血管が GFP 陽性になる血管観察モデル) を用いた“尾ひれ”切断による新生血管評価系を開発し、血管新生阻害剤ソラフェニブの副作用 (手足症候群) の評価に有用であることを見いだしていた。

## 2. 研究の目的

以上の基盤に基づき、

1) メダカ生体におけるサーカディアンリズムの変化の検証

2) ソラフェニブ使用時の副作用の動物モデルとしてメダカを用いて検証すること、  
ことを目的として本研究を開始した。

1) については申請者の前任地である山口大学にて行い、2) については現任地である、新潟大学にてこれを行った。

## 3. 研究の方法

(1) サーカディアンリズムの変化における肝クッパー細胞の動態変化を評価する目的で、まず、メダカの生体内の代謝における日内周期の解析を行なった。なお、肝臓における代謝産物の昼夜の違いを網羅的に解析するため、ZT4 と ZT16 で肝臓を単離し Capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS) analysis を行いメタボライトの変化を評価した。

(2) ソラフェニブ投与時の血管系の変化の検証: Fli-GFP TG メダカを用い、ソラフェニブなどの血管新生阻害剤が、新生血管に有効なのか、通常血管にも影響を与えるか評価した。具体的には、Fli-GFP TG メダカにソラフェニブを投与下で、尾ひれの部分切除を行ない、ソラフェニブの濃度と、血管新生、尾ひれの再生の検討を時系列で、GFP 発現を解析することによりこれを行った。

## 4. 研究成果

本研究助成基金助成金による助成によって、以下の研究成果が得られた。

(1) メダカサーカディアンリズムの評価

24 時間のメダカの運動量を観察し、アクトグラムで表したところ、昼では活発に動き、夜では動きが著明に減少した。さらに、昼と夜の 2 点を比較したメタボローム解析を行なったところ、PCA 解析では昼群と夜群が X 軸上で明確に分離された。また階層的クラスタリングを行い昼群と夜群で代謝物の存在比が逆転していた。さらに、本研究では夜間に IMP と UMP の有意な増加が認められ、夜間にヌクレオチド合成が盛んになることが考えられた。IPA による Canonical pathway

解析でも、Adenine and adenosine salvage、Guanine and guanosine salvage、Salvage pathways of pyrimidine ribonucleotides、Purine nucleotides de novo biosynthesisなどが有意な差を持つ canonical pathway であった。

さらに詳細な検討を継続している。

(2) ソラフェニブの血管新生に与える影響についての懸賞では、ソラフェニブの濃度依存的に、尾ひれ部分切除メダカの血管新生はその回復が遅延し、尾ひれの再生が有意に遷延した。

本研究結果に基づき、ソラフェニブの副作用である、手足症候群の動物モデルとしての Fli-GFP TG メダカの有効性が示唆された。今後、さらなる解析を継続し、申請者らが注目している鰹だしによる血管拡張、血管血流維持作用の検証実験に応用している。

以上のプロジェクトの推進により、日本からメダカを用いて、新たな血管系、体内時計のリアルタイムの観察モデルの開発につながった。この結果は NASH、肝再生をあわせて病態誘導することで応用範囲の広い、ヒト病態解析、創薬研究に寄与する日本発の世界的独創的なモデルになることが期待されている。

特にヌクレオチド代謝はがんの化学療法と関係が深く、ヌクレオチド代謝を考慮したクロノセラピーなど新しいがんの化学療法につながる可能性も考えられる。今後も本研究成果に基づき、研究を継続、発展させていく予定である。

#### 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) Fujisawa K, Takami T, Kimoto Y, Matsumoto T, Yamamoto N, Terai S, Sakaida I. (2016) Circadian variations in the liver metabolites of medaka (*Oryzias latipes*). *Sci Rep* 10: 20916. doi: 10.1038/srep20916. (査読あり)

(2) Murata Y, Yasuda T, Watanabe-Asaka T, Oda S, Mantoku A, Takeyama K, Chatani M, Kudo A, Uchida S, Suzuki H, Tanigaki F, Shirakawa M, Fujisawa K, Hamamoto Y, Terai S, Mitani H. (2015) *PLoS One* 10: e0138799. doi: 10.1371/journal.pone.0138799. eCollection 2015. (査読あり)

(3) Fujisawa K, Terai S, Matsumoto T, Takami T, Yamamoto N, Nishina H, Furutani-Seiki M, Sakaida I (2015) Evidence for a Role of the Transcriptional Regulator Maid in Tumorigenesis and Aging. *PLoS One* 10: e0129950. doi: 10.1371/journal.pone.0129950. eCollection 2015. (査読あり)

[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

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/in3/index.html>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

寺井 崇二 (Terai, Shuji)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00332809

### (2)研究分担者

上村 顕也 (Kamimura, Kenya)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00579146

藤澤 浩一 (Fujisawa, Koichi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00448284

高見 太郎 (Takami, Taro)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60511251

山本 直樹 (Yamamoto, Naoki)

山口大学・大学教育機構・講師

研究者番号：90448283