

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06001

研究課題名(和文)チミジンホスホリラーゼ画像化による非アルコール性脂肪肝炎診断法の開発研究

研究課題名(英文)Development of a diagnostic method for nonalcoholic steatohepatitis by visualization of thymidine phosphorylase

研究代表者

東川 桂(Higashikawa, Kei)

北海道大学・アイソトープ総合センター・助教

研究者番号：10756878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究により、(1)コントロールマウスの肝臓と比較して、NASHモデルマウスの肝臓では、TPの遺伝子およびタンパク質の発現量が有意に減少すること、さらには(2)コントロールマウスと比較して、NASHモデルマウスでは $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$ の肝集積量が有意に減少することを見出した。すなわち、 $[^{123}\text{I}]\text{IIMU}$ によるTPの核医学イメージングにより、NASHの診断を行える可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Our studies indicated that (1) the expression levels of TP gene and protein were significantly reduced in the liver of NASH model mice compared with that of control mice, and (2) the accumulation of  $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  was significantly decreased in the liver of NASH model mice compared with control mice. Therefore, the nuclear medical imaging of TP by  $[^{123}\text{I}]\text{IIMU}$  has the potential to be able to diagnose NASH.

研究分野：分析化学、分子イメージング、核医学

キーワード：チミジンホスホリラーゼ  $[^{123}/^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  非アルコール性脂肪肝炎

## 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis : NASH) は、脂肪が沈着することにより肝臓に炎症が生じる疾患である。NASH は、炎症に伴って肝臓の線維化や肝機能の低下が進行し、肝硬変、更には肝がんへと進展する。したがって、NASH では、病態の進行度を評価して適切な処置を行い、肝硬変や肝がんへの移行を防ぐことが重要である。現在、NASH の診断や病態の進行度の判定法としては、肝生検が gold standard である。しかしながら、生検による手法は、侵襲性が高くリスクや苦痛を伴うこと、組織の採取部位によって組織学的な所見が異なること、さらには診断医により病態の評価結果がばらつくことなどの問題がある。

一方、近年、血管新生は、NASH の予後を規定する肝線維化の進行に深く関与することが明らかとなり、肝線維化を治療するための選択肢として、抗血管新生治療が注目を浴びている (World J Hepatol, 2015)。特に、血管新生因子である チミジンホスホリラーゼ (TP) は、近年の臨床研究によって、①肝臓の線維化の進行度と TP 活性に相関があること、②多中心性肝細胞がんを発症した患者では、肝臓中の TP 活性が高まっていることが明らかになっているが (Cancer letters, 2000)、上記の研究はウイルス性肝炎の患者のデータを多く含むものであり、NASH 患者あるいは NASH モデル単独での TP の発現解析は実施されていない。TP が NASH の肝臓病変において発現量が変動していれば、体外から肝臓の TP を非侵襲的に検出する診断法を開発することで、生検の問題点 (侵襲性、サンプリングエラー、診断医間の診断結果ばらつき) を克服し、かつ NASH の進行度の評価や肝硬変や肝がんへ移行する危険性が高い患者を選別できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

TP が NASH 診断のためのイメージングバ

イオマーカとなりうるか、および TP を可視化できる核医学イメージング剤が NASH の診断に応用できるかどうかを検証することを目的とし下記の研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) NASH モデルマウスの作製、および NASH の病態評価

NASH モデルマウスは、雄性の C57BL/6 マウスにメチオニン・コリン欠乏食 (MCDD) を2週間与えることで作製した。また NASH を誘発していないコントロールマウスとして、メチオニン・コリン添加コントロール食を与えたマウスを使用した。NASH 症状を呈するモデルマウスが作製できているかどうかを確認するため、血液生化学的検査 (アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 値測定)、および定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (定量 RT-PCR) 法により肝臓中の炎症関連遺伝子 (Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 、Interleukin (IL)-1 $\beta$ )、および線維化関連遺伝子 (collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), Collagen, type I, alpha 2 (COL1A2)) の発現解析を実施した。また、内因性コントロールとして、TATA-binding protein (TBP) を使用した。

### (2) NASH モデルマウスの肝臓における TP の発現解析

NASH モデルマウスの肝臓における TP の遺伝子およびタンパク質の発現を、それぞれ定量 RT-PCR 法および Western blot 法により調べ、コントロールマウスの場合と比較した。

### (3) NASH モデルマウスにおける 5-[<sup>125</sup>I]-6-(2-imino-imidazolidinyl)methyluracil hydrochloride ([<sup>125</sup>I]IIMU) の肝集積量の解析

申請者のグループが開発した TP イメージング剤の I-125 標識体 ([<sup>125</sup>I]IIMU) (約 50-100 kBq) を、イソフルラン麻酔下で NASH モデ

ルマウスおよびコントロールマウスに投与した。 $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$ の投与30分後にインフルラン麻酔下で心採血して安楽死させ、臓器を摘出してその放射能をガンマカウンターで測定し、 $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$ の生体内分布を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) NASH モデルマウスの作製、および NASH の病態評価

メチオニン・コリン欠乏食を2週間与えたマウスの血清では、コントロールマウスと比較してALT値が有意に増加していた(図1)。さらに、定量RT-PCR解析の結果、MCDDを2週間与えたマウスの肝臓では、コントロールマウスと比較して、炎症関連遺伝子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )、および線維化関連遺伝子(COL1A1、COL1A2)の発現量が有意に増加していた(図2A、図2B)。これらの結果から、メチオニン・コリン欠乏食を2週間与えたことによりNASHモデルが作製に成功したと考えられる。

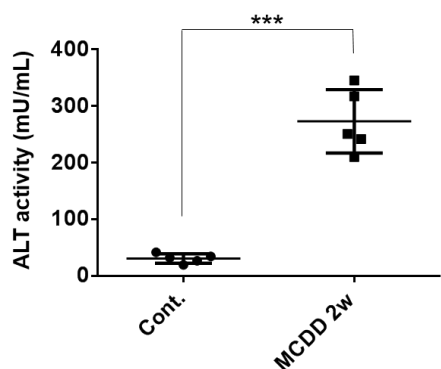


図1 MCDD誘発NASHモデルにおける血清ALT値測定。Unpaired t test with welch's correction、\*\*\* $P < 0.001$ 。

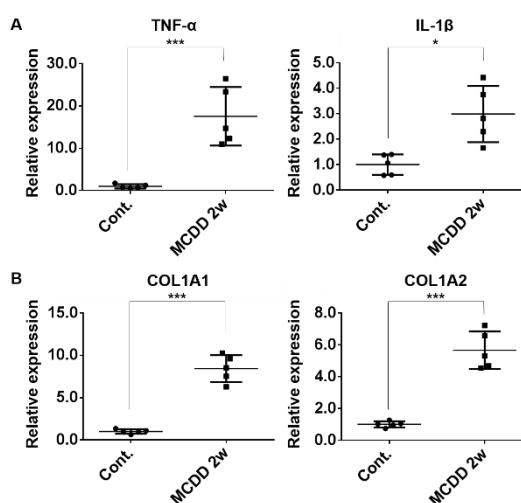


図2 MCDD誘発NASHモデルの肝臓における炎症関連遺伝子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )(図2A)、および線維化関連遺伝子(COL1A1、COL1A2)(図2B)の発現解析。Unpaired t test with welch's correction、\* $P < 0.05$ 、\*\*\* $P < 0.001$ 。

##### (2) NASH モデルマウスの肝臓における TP の発現解析

定量RT-PCR法およびWestern blot法による解析の結果、NASHモデルの肝臓では、TPの遺伝子およびタンパク質のどちらにおいても発現量が減少することを見出した(図3A、図3B)。これらの結果から、肝臓中のTPが、NASHのイメージングバイオマーカーとなりうることが示唆された。

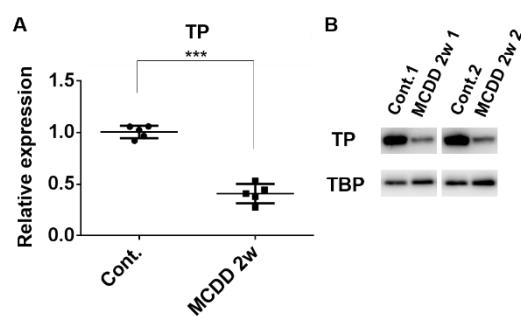


図3 MCDD誘発NASHモデルの肝臓におけるTPの遺伝子(図3A)、およびタンパク質(図3B)発現解析。Unpaired t test with welch's correction、\*\*\* $P < 0.001$ 。

(3) NASH モデルマウスにおける<sup>125</sup>I IIMU の肝集積量の解析

NASH モデルマウスにおける<sup>125</sup>I IIMU の肝集積量 (standardized uptake value, SUV) は、正常マウスに比べ有意に減少することを見出した (図4)。これらの結果から、肝臓中の TP の発現量減少を、<sup>123</sup>I IIMU を用いた核医学診断により捉えることで、NASH の診断を行える可能性を示した。

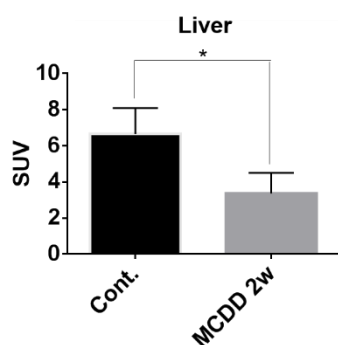


図4 メチオニン・コリン欠乏食誘発 NASH モデルの肝臓における<sup>125</sup>I IIMU の肝集積量の解析。Unpaired t test with welch's correction, \* $P < 0.05$ 。

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)

該当なし

〔学会発表〕 (計0件)

該当なし

〔図書〕 (計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

該当なし

○取得状況 (計0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hokudai.ac.jp/radiois/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東川 桂 (HIGASHIKAWA Kei)

北海道大学・アイソトープ総合センター・

助教

研究者番号：10756878

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし