

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10308

研究課題名(和文) NASHモデルマウスのMRI、光イメージングによる自然史および肝細胞癌の研究

研究課題名(英文) Research of Natural History and Hepatocellular Carcinoma in NASH Model Mice by MRI and Optical Imaging

研究代表者

桐生 茂 (Kiryu, Shigeru)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：20313124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではNASH研究および肝細胞癌研究のためのプラットフォームとしてのNASHモデルマウスのGd-EOB-DTPA造影MRIとICGを用いた蛍光イメージングにおける自然史を明らかにした。肝細胞癌が10週までに画像において観察され、病理学的に肝細胞癌であることが判明した。これをもとにMRI・蛍光イメージングを用いてNASHモデルマウスの肝細胞癌の観察を行い、免疫染色によるトランスポーターの検討と対比を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではマウスを用いて安定したNASHモデルを作成、さらにMRIおよび蛍光イメージングにより観察が行えることを示した。画像による研究はマウスをsacrificeすることなく、同一個体で繰り返し観察を行うことが可能であり、今後のNASHの研究に貢献すると考えられる。また、NASHモデルマウスに発生する肝細胞癌はGd-EOB-DTPAやICGを取り込む頻度がヒトよりも高いことが判明した。今後詳細なトランスポーターの研究を進行させることにより、ヒトにおけるGd-EOB-DTPAやICG、さらに胆汁酸の肝細胞における取り込みのメカニズムの解明につながる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study clarified the natural history of NASH model mice in Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI and fluorescence imaging using ICG as a platform for NASH research and hepatocellular carcinoma research. Hepatocellular carcinoma was observed on imaging by 10 weeks and was pathologically proven to be hepatocellular carcinoma. Based on these findings, we examined hepatocellular carcinoma in NASH model mice by MRI and fluorescence imaging, and compared the results with those obtained by immunostaining.

研究分野：放射線診断学

キーワード：NASH 肝細胞癌 MRI 光イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH)は非アルコール性脂肪肝を背景に、炎症や線維化が生じて肝細胞癌にいたる疾患で、近年のメタボリックシンドロームの急増に伴い本邦において増加している。NASHの原因解明、治療法の開発が臨床において望まれている。小動物実験はNASHの原因の解明や治療法の探求に用いられており、特にマウスはヒトと遺伝子の類似度が高く、広く用いられている。Streptozotocin (STZ)投与と高脂肪食負荷によるNASHモデルマウスが開発され、その評価および基礎研究が行われている。NASHモデルマウスのように生体内で脂肪肝から肝炎、肝硬変とダイナミックに変化が生じる疾患では画像による観察で有用な情報が得られることが期待されるが、NASHモデルマウスについての画像研究はほとんど行われていない。

MRI、光イメージングは小動物の画像研究で広く用いられている手法であり、それぞれの画像化する対象が異なる。MRIは核磁気共鳴現象を、光イメージングでは生体発光現象や蛍光を画像化する。ヒト臨床の肝細胞癌の画像検討においてMRIでは肝特異性造影剤であるGd-EOB-DTPAが利用されており、肝細胞癌の検索、診断、治療方針の決定に用いられている。光イメージングはindocyanine green (ICG)による蛍光画像を用いた術中の病変の検索に用いられ、微小病変の描出等に用いられる。Gd-EOB-DTPAとICGはいずれも胆汁酸と同様の動態が期待されているが、分化度におけるそれぞれの肝細胞癌への取り込みは異なる傾向があることが臨床において知られている。NASHモデルマウスを用いることにより肝細胞癌においてそれぞれのモダリティによる検討が可能になり、肝細胞癌へのGd-EOB-DTPAおよびICGの取り込みについての詳細な比較検討が可能になる。

2. 研究の目的

本研究ではNASH研究および肝細胞癌研究のためのプラットフォームとしてのNASHモデルマウスの画像における自然史を明らかにする。これをもとに、NASHモデルを用いて肝細胞癌を作成、Gd-EOB-DTPAを用いたMRI、ICGによる蛍光光イメージングで観察を行い、免疫染色によるトランスポーターの検討と対比を目指した。

3. 研究の方法

・NASHモデルマウスの画像的自然史の解明

C57/BL6マウスを用いた。出産40時間後の雌を選択して皮下にSTZ 200ugを投与、4週齢より高脂肪食で維持してNASHモデルマウスを作成した(図1)。コントロールとしてSTZ非投与で他の条件を同一として作成した非肝炎脂肪肝マウスを用いた。MRIは永久磁石1.0テスラ低磁場MRI (ICON; Bruker Biospin GmbH, Ettlingen, Germany)を用いた。低磁場であるためMRI造影剤のT1緩和能を示すR1値は高磁場装置よりも高く、高い濃染効果が期待された。撮影は2ポイントDIXON法 (repetition time (TR) 110ms, echo time (TE) 3.15, 6.3ms, flip angle 80°, matrix 128 × 192, bandwidth 130Hz/pixel, number of excitations (NEX) 6, slice thickness 1.25mm, 6 slices) と3DグラディエントエコーT1強調画像 (TR 40ms, TE 2.15ms, flip angle 45°, matrix 128 × 256, bandwidth 195Hz/pixel, NEX 1, slice thickness 0.468mm, 42 slices)で行った。T2強調画像、拡散強調画像も検討したが画質に難があったため採用にいたらなかった。眼窩内静脈叢にGd-EOB-DTPA (0.025 mmol Gd/kg)を静注、10分後に3DグラディエントエコーT1強調画像を撮影した。眼窩内静脈叢への造影剤静注は尾静脈からの静脈注と同等であることを我々は過去に報告している(Wang F, et al. PLoS One. 2015;10:1-10.)。ICGによる蛍光光イメージングの撮影を冷却CCDカメラシステム (IVIS Imaging System 100; Xenogen, Alameda, CA)で行った。蛍光画像と写真画像を融合して肝細胞癌の位置を確認して評価した。

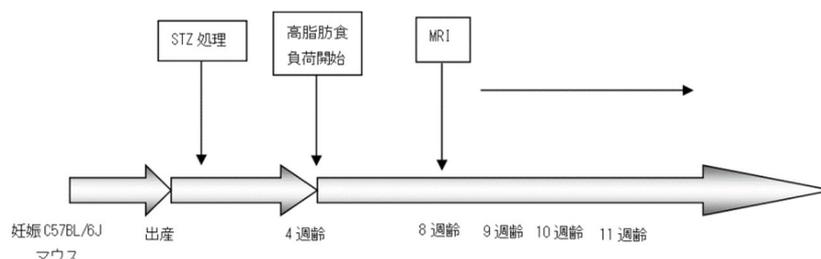


図1 NASHモデルマウス作成スケジュール

・肝細胞癌の Gd-EOB-DTPA、ICG の取り込みに関わるトランスポーターの検討

上記で確立した NASH モデルマウスを用いて肝細胞癌を作成、免疫組織染色にてトランスポーターの解析を行い、MRI および光イメージングの対比を試みた。

MRI、光イメージングは上記の撮影条件おこなった。MRI で肝細胞癌の発育を確認、sacrifice を行い、肝臓を摘出、ex vivo にて光イメージングを行った。免疫染色は OATP について SLC01C1 antibody orb158414、MRP は MRP2 monoclonal antibody (M2111-5) を用いて行った。

4 . 研究成果

・ NASH モデルマウスの画像的自然史の解明

MRI による解析において肝内脂肪含有率は生後 8 週では NASH マウスで有意に高くその後緩徐に低下したのに対し、非肝炎脂肪肝マウスでは上昇傾向がみられた。肝実質造影効果は生後 8 週では NASH マウスで有意に低く、その後 NASH マウスではほぼ一定であったのに対して、非肝炎脂肪肝マウスでは経時的に低下した。NASH マウスはいずれも 10 週までの MRI 撮影時に肝細胞癌と考えられる腫瘤の出現が認められた(図 2)。

光イメージングでは生後 8 週より緩徐に ICG 投与後の肝実質集積が低下、10 週目には肝細胞に対する集積と思われる限局的高集積が出現、肝表面の肝細胞癌の描出が得られた。投与する ICG の量の変更などや体外からの圧迫なども試みたが in vivo において深部病変の描出は困難であった。マウスの sacrifice を行い、ex vivo 撮影で一部の肝細胞癌に ICG 集積が観察された。病理的検索ですべて中分化型肝細胞癌であることが確認された。

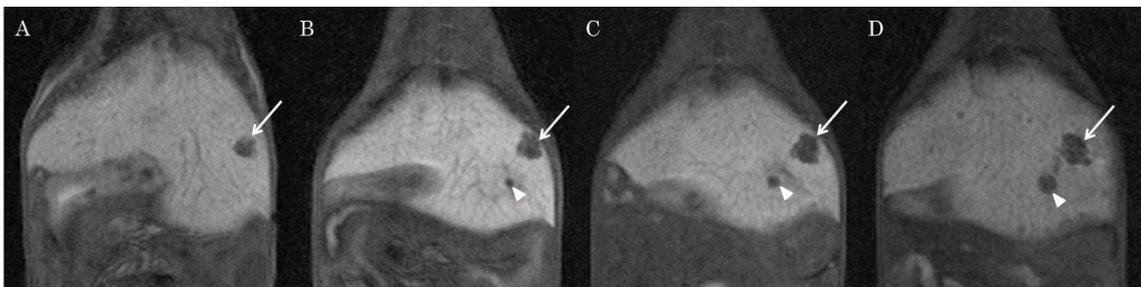


図 2 NASH モデルマウスの Gd-EOB-DTPA 造影 MRI 画像。8 週齢(A)に肝細胞癌が観察され、10 週齢(B)、12 週齢(C)、14 週齢(D)になるにしたがい増大している(矢印)。10 週齢から別の肝細胞癌が観察されている(矢頭)。

・肝細胞癌の Gd-EOB-DTPA、ICG の取り込みに関わるトランスポーターの検討

Gd-EOB-DTPA の取り込みがある肝細胞癌が一定の頻度で観察された。Gd-EOB-DTPA は胆汁酸と同等のトランスポーターを介して肝細胞への取込みおよび排泄が考えられており、肝細胞癌では正常肝細胞が欠如しているため通常は取り込まれない。臨床では Gd-EOB-DTPA の取込みのある肝細胞癌は胆汁排泄型肝細胞癌としてまれにみられることがあるが、NASH モデルマウスでは高い頻度で観察された。MRI で Gd-EOB-DTPA の取り込みが欠如している肝細胞癌に ICG が取り込まれる傾向があった(図 3)。肝細胞への Gd-EOB-DTPA 造影剤もしくは ICG の取り込みに関わる OATP および MRP2 の免疫組織染色による検討が行い、画像と対比した。免疫染色によるトランスポーターの検討はコントロールを含めて困難があり、OATP については染色が難しい症例があったが MRP2 については評価が可能であった。

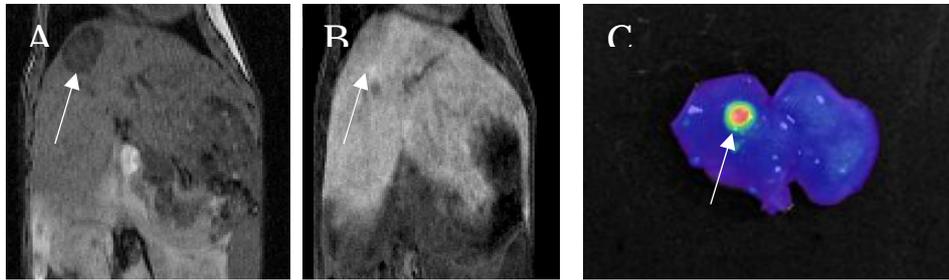


図3 NASHモデルマウスのMRI画像とex-vivo蛍光イメージング。DIXON法にて肝細胞癌が描出(A矢印)、Gd-EOB-DTPAが周囲の肝実質と同等に取り込まれている(B矢印)。蛍光イメージングではICGの取り込みが観察される(C矢印)。

総括

本研究ではマウスを用いて安定したNASHモデルを作成、MRIおよび光イメージングによる観察が行えることを示した。画像による研究はマウスをsacrificeすることなく、同一個体を繰り返し観察することが可能であり、今後のNASH研究に貢献すると考えられる。また、NASHモデルマウスにおける肝細胞癌はGd-EOB-DTPAやICGを取り込む頻度がヒトよりも高いことが判明した。今後詳細なトランスポーターの研究を進行させることにより、ヒトにおけるGd-EOB-DTPAやICG、さらに胆汁酸の肝細胞における取り込みのメカニズムの解明につながる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Naganawa S, Enooku K, Tateishi R, Akai H, Yasaka K, Shibahara J, Ushiku T, Abe O, Ohtomo K, Kiryu S	4. 巻 28
2. 論文標題 Imaging Prediction of Nonalcoholic Steatohepatitis Using Computed Tomography Texture Analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Eur Radiol.	6. 最初と最後の頁 3050-3058
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00330-017-5270-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Numata T, Kiryu S, Maeda T, Egusa C, Tsuboi R, Harada K.	4. 巻 26
2. 論文標題 A pulmonary metastatic model of murine melanoma assessed by magnetic resonance imaging.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Exp Dermatol.	6. 最初と最後の頁 619-621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/exd.13327	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Akai H, Yasaka K, Nojima M, Inoue Y, Ohtomo K, Kiryu S.	4. 巻 52
2. 論文標題 Influence of Indocyanine Green on Hepatic Gd-EOB-DTPA Uptake: A Proof-of-Concept Study in Mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Invest Radiol.	6. 最初と最後の頁 441-445
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/RLI.0000000000000359	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Akai H, Kiryu S, Ohta Y, Yasaka K, Nakano Y, Inoue Y, Ohtomo K.	4. 巻 38
2. 論文標題 The natural history of streptozotocin-stimulated non-alcoholic steatohepatitis mice followed by Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI: Comparison with simple steatosis mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Magn Reson Imaging.	6. 最初と最後の頁 123-128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mri.2016.12.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	赤井 宏行 (Akai Hiroyuki) (80770437)	東京大学・医科学研究所・講師 (12601)	
研究分担者	潮見 隆之 (Shiomi Takayuki) (80348797)	国際医療福祉大学・医学部・教授 (32206)	
研究分担者	大田 泰徳 (Ota Yasunori) (60376431)	(財) 冲中記念成人病研究所・その他部局等・研究員 (72696)	