

平成30年6月28日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16409

研究課題名(和文) レドックスモレキュラーイメージングによる非侵襲的NASH画像診断法の開発

研究課題名(英文) Development of noninvasive diagnostic imaging for NASH using redox molecular imaging

研究代表者

中田 亮輔 (Nakata, Ryosuke)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：70614759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：成人疾患として、また小児疾患においても非アルコール性脂肪肝疾患(NAFD)の罹患率が上昇しており、非侵襲的に非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)への病態進行を評価するため、新規診断法の開発が重要な研究目的となっている。NASHの標準的な診断技術である肝生検には、侵襲的手技に伴う合併症のリスクが生じるなど、いくつかの欠点がある。今回我々は、carbamoyl-PROXYLを分子イメージングプローブとした生体動的核偏極磁気共鳴画像により、生体内のミトコンドリアレドックス代謝が組織病理学的変化の前の初期段階で劇的に変化していることを示し、NASH早期の病態変化を検出できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is rising as not only an adult disease but also pediatric disease. In order to evaluate the progress of the disease non-invasively to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), a new Development of diagnostic methods is an important research objective. Liver biopsy, which is a standard diagnostic technique of NASH, has several drawbacks, including the risk of complications associated with invasive procedures. Here we demonstrate that biomedical nuclear polarized magnetic resonance imaging using carbamoyl-PROXYL as a molecular imaging probe can detect dramatic change of mitochondrial redox metabolism in vivo in the early stages before histopathological change, and clarified that early pathology of NASH can be detected.

研究分野：消化器外科

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 DNP-MRI レドックス ミトコンドリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、NAFLD 患者の加速的増加が問題となり欧米諸国においては成人有病率が 20-40% に達し、慢性肝疾患の中で最も多い疾患となっている。このうち約 10% 程度に NASH の所見が認められている。我が国でも食生活の欧米化に伴い NAFLD/NASH 患者数の激増が危惧され、NAFLD 患者は約 1,000 万人 NASH 患者は約 200 万人に達すると言われている。さらには成人だけでなく小児科領域でも患児の増加が報告されており、早急な対応を迫られた状況である。一方で、臨床現場で有用かつ簡便に行える診断的バイオマーカーや有用な画像検査がなく、また、病態進行の分子機構も未だ解明されていない点が多く有効な治療法も確立されていない。現時点での確定診断法は肝組織生検であるが、侵襲的検査であり NAFLD 患者すべてに行うことは困難である。さらには、採取された肝臓の組織や病理医間で診断にばらつきが生じるなどの問題点も指摘されている。NAFLD は良性の経過をたどる単純性脂肪肝と NASH に大別され、NASH では小葉性炎症、繊維化を生じ、肝硬変、肝細胞癌へと悪性の経過をたどるため、早期に NASH 進行リスク患者を選別し治療につなげる非侵襲的診断法の構築が必要である。

2. 研究の目的

慢性肝疾患の中でも非アルコール性脂肪肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) の患者数急増が世界的な問題となっている。一方で、病態の進行機序に不明な点が多く、簡便で有用な診断法もなく、治療法も定まっていない。NAFLD は良性の経過をたどる単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis: NASH) に大別され、NASH は肝硬変、肝細胞癌へと進展し悪性の経過をたどる。そのため、病態進行リスクを正確に評価することが極めて重要である。NAFLD/NASH の病態進行過程は two hit theory が提唱されており、肝細胞への脂肪沈着を first hit として、何らかの second hit が加わって壊死性炎症変化をきたし、NASH へと進行すると考えられている。second hit としては (1) 酸化ストレス、(2) TNF- α などのサイトカイン (3) インスリン抵抗性 (4) CYP 2E1 の異常など様々な要因が指摘されているが、最も重要な原因の一つとして酸化ストレスが挙げられる。NASH 患者での臨床報告や動物実験の報告も多くみられ個々の酸化ストレスマーカー (Reactive oxygen species: ROS、8-OHdG、4-HNE など) の上昇や抗酸化ストレス能 (SOD、グルタチオン、カタラーゼなど) 低下を示す報告がみられる。このように、過剰な ROS 生成や抗酸化分子の減衰による酸化ストレス障害が原因となって NAFLD から NASH へ病態が進行すると考えられている。これまで報告されている NAFLD/NASH に

ついての酸化ストレスに関する研究の多くは、酸化ストレスを評価するのに反応の結果生じる代謝産物を *ex vivo* や *in vitro* の系で測定し評価している場合が多い。活性酸素・窒素種が極めて反応性に富み、半減期が短いという化学的特性を考慮すると、実際の生体内との整合性の問題が常に生じ、*in vivo* での非侵襲的検査法の必要性が求められる。生体内での様々な代謝機構で起こる酸化還元反応をレドックス反応と呼ぶが、このレドックス動態を生体内で非侵襲的に可視化し、動的変化 (ニトロキシラジカルプローブ (図 1) の消失速度) を定量的に評価する手法として電子スピン共鳴画像法が知られている。我々はこの現象を応用した ReMI 装置の共同開発を行っており、これを用いて NAFLD/NASH のレドックス状態の変化を評価するとともに、分子レベルにおける病態進行機序を解明し、さらに実臨床において多くの NAFLD 患者を対象とする非侵襲的 NAFLD/NASH 診断法開発の先駆けとなることを目的とした。

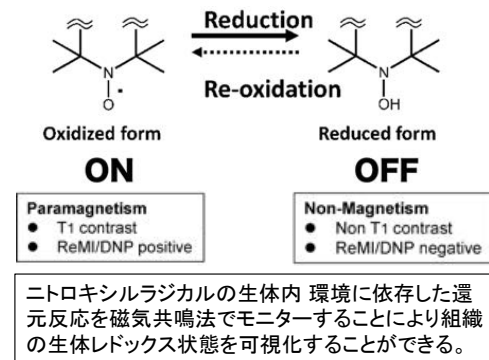


図 1 レドックス状態検出造影剤の仕組み

3. 研究の方法

我々は NASH モデルマウスのレドックス状態を定量的に可視化し、その変動が病態の進行と相関することを示してきた。本申請研究では薬剤投与群や他の方法で作成した NASH モデルマウスを同様に測定し、既存のデータと比較・検討することで非侵襲的診断法としての有用性を確認し、さらに NASH の詳細な病態解明、効果的な治療薬開発を試みる。

(1) レドックス動態と病態評価法

我々はすでに ReMI 装置を用いた NASH モデルマウスの病態進行を評価する実験系を確立している (図 2)。これを応用し病態モデルマウスに対する治療薬投与によるレドックス動態変化の評価を行う。

① NAFLD/NASH モデルマウス
 C57/BL6 マウスの 6 週齢に対しメチオニン・コリン欠乏食を餌に飼育した病態モデルマウスを作成し、1 週、2 週、4 週、6 週、8 週目に ReMI 測定、解剖、組織採取を行う。治療薬投与群には、ビタミン E (0.4 IU/day)

投与群と Piogritazone (15 μ g/day) 投与群を作成し同様の実験系で評価を行う。

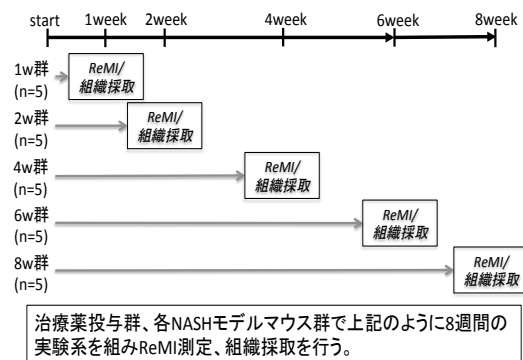


図 2 ReMI 測定、組織採取のスケジュール

② ReMI 用いたレドックス状態の評価

1日絶食したマウスに対し、イソフルランで麻酔後、尾静脈よりニトロキシラジカルプローブ溶液を投与する。マウスをReMI装置内に固定し、1分後より90秒毎に13分までESR ON画像を撮像した。経時的に撮られた画像の肝臓にROIを設定し、プローブの消失速度を算出することでレドックス状態を評価する。(図3)



図 3 レドックス状態を測定する ReMI

③ 採血・バイオマーカー検査

ReMI 測定後、麻酔投与下に心臓採血を行う。測定項目として GOT、GPT、LDH、T-Cho、HDL、Glu、Insulin など NASH 病態に関するバイオマーカーを設定し、経時変化で病態進行度を評価する。病理組織学的評価 (NAS、繊維化スコアなど) 心臓採血後、門脈還流にて肝臓の脱血後、肝臓を摘出する。ホルマリン固定し、翌日に組織標本スライド作成の行う。HE 染色、masson trichroem 染色、sudan III 染色にて肝組織への脂肪沈着、線維化を評価し、臨

床でも用いられる NAFLD activity score (NAS) を算定し客観的に病態進行度を評価する。

④ *ex vivo*での酸化ストレスマーカー (8OHdG, 4HNE など) 測定、抗酸化ストレス酵素・物質 (Mn-SOD, GSH, フラベーゼなど) 測定と ReMI 測定結果の相関性を評価
摘出した肝臓の一部組織に対してホモジナイズ処理を行い、遠心後、上清を測定試料として酸化ストレスマーカー、抗酸化ストレス酵素・物質の測定を行う。

⑤ 統計的解析にて結果の有意差、相関性を客観的に評価
各測定項目についてコントロール群と有意差検定を行い統計学的解析を行う。各項目の相関性についても客観的に評価を行い、ReMI 検査の有用性、再現性を評価する。

4. 研究成果

メチオニン-コリン欠乏餌で飼育した NAFLD/NASH モデルマウスを作成し、病態の進行に伴ったレドックス状態の変化を ReMI で非侵襲的に測定をした (図 4)。これにより画像的な可視化及び、ニトロキシラジカルの消失速度の算出による数値での客観的評価が可能となった。病態進行に伴った、ラジカルプローブの消失速度低下が観測され、実際の病理組織像、酸化ストレスを反映する免疫染色 (8OHdG, 4HNE)、血液生化学検査 (GOT, GPT)、酸化ストレスマーカーの増加、抗酸化ストレス 酵素 (total antioxidant capacity) の減少など病態進行を反映するバイオマーカーとの強い相関性も示し、臨床応用が可能となった場合の有用性が示唆された (図 5)。

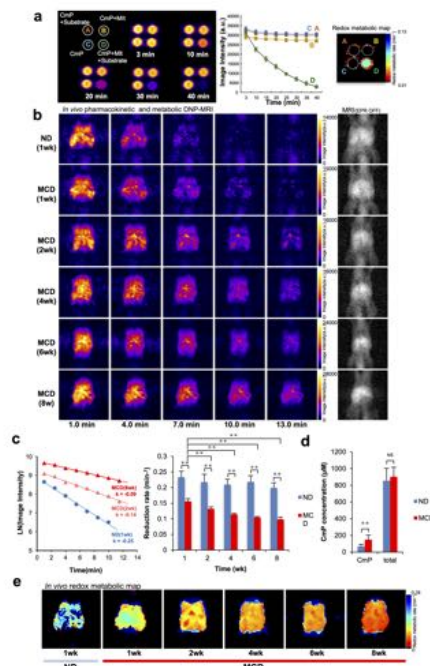


図 4 生体内 DNP-MRI によるレドックス代謝イメージング

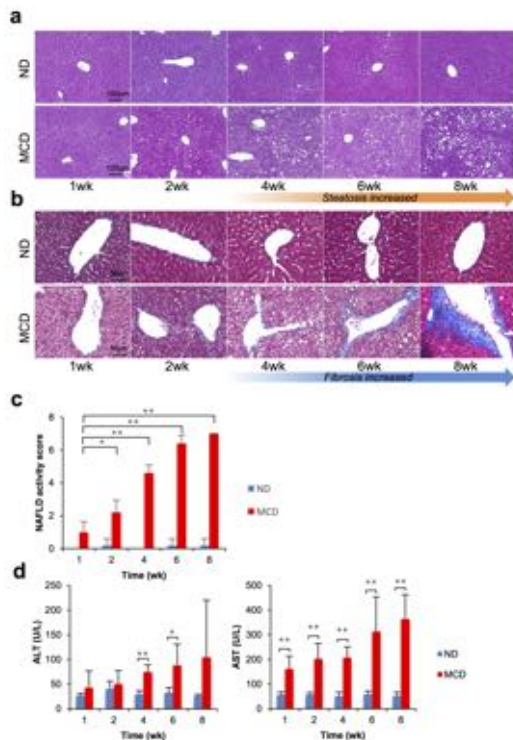


図5. 食餌処理後のマウス肝組織の病理学的解析および評価

さらに、過去の報告を参考にこのレドックス状態の変化がミトコンドリア内で起こっているとの仮説を立て、病態モデルマウスの肝臓組織より分離した単離ミトコンドリアを用い X-band EPR でのレドックス状態を計測し、in vivo での結果を同じ変化が生じている事を証明し、ニトロキシラジカル消失のメカニズムについても示すことができた。また、メチオニン-コリン 欠乏餌から通常食に戻した際の病態の回復状況に関しても同様にレドックス状態の変化として観察可能であり、創薬における病態評価での有用性についても示すことができた。また、病態モデル作成用の餌の組成を変更させることで、レドックス状態に与える影響が異なることも示すことができた。

一方で、メカニズム解明を試みるために詳細な検討も行った。その結果、in vivo DNP-MRI で検出されたレドックス状態の変化が肝細胞レベルでも同様の変化が生じていることが確認され、統計解析の結果、病態モデルマウスの病態進行ならびに in vivo DNP-MRI で得られた結果と相関性が認められることを示すことができた(図6)。さらには、NAFLD/NASH の病態発現の原因として細胞内のミトコンドリアに機能異常が生じていることが示唆されているが、ミトコンドリア自体のレドックス状態についても肝細胞から単離したミトコンドリアを用いて評価を行った。電子伝達系に関連した基質の有無や KCN 存在下でのミトコンドリアレドックス代謝に関する評価をおこない、電子伝達系の活性とレドックス代謝

の相関性がしめされ、病態発現時にはミトコンドリア電子伝達系に機能異常が起こりレドックス代謝に影響を与えていることが示唆された。

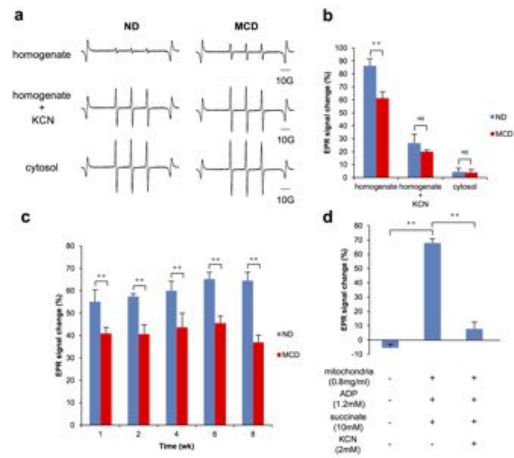


図6 肝臓組織における CmP 動態の評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Nakata, R., Hyodo, F., Murata, M., Eto, H., Nakaji, T., Kawano, T., ... & Hashizume, M. (2017). In vivo redox metabolic imaging of mitochondria assesses disease progression in non-alcoholic steatohepatitis. *Scientific reports*, 7(1), 17170.

Nakata, R., Hyodo, F., Murata, M., Akahoshi, T., & Hashizume, M. (2017). The Assessment of Mitochondrial Redox Metabolism by in vivo Dynamic Nuclear Polarization-Magnetic Resonance Imaging for Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*, 152 (5), S1116.

〔学会発表〕 (計 1 件)

Ryosuke Nakata, Fuminori Hyodo, Masaharu Murata, Tomohiko Akahoshi, Makoto Hashizume 「The Assessment of Mitochondrial Redox Metabolism by in vivo Dynamic Nuclear Polarization-Magnetic Resonance Imaging for Non-Alcoholic Steatohepatitis.」 Digestive disease week 2017, Chicago, 2017年 5月

〔図書〕 (計 1 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：フリーラジカルの消費速度情報の
取得方法およびNASHの判定方法
発明者：村田正治、兵藤文紀、橋爪 誠、中
田亮輔、赤星朋比古
権利者：同上
種類：特許
番号：217340
出願年月日：2016/06/13
国内外の別： 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田亮輔 (RYOSUKE NAKATA)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号：70614759