

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12119

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎の超音波による定量診断と超微量質量分析による発生機序の解明

研究課題名(英文)Quantitative diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis by ultrasound and elucidation of the mechanism of occurrence by ultratrace mass spectrometry

研究代表者

渡辺 好章(WATANABE, Yoshiaki)

同志社大学・研究開発推進機構・嘱託研究員

研究者番号：60148377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性肝炎の代謝的側面からみた発症基盤をメダカのモデルを用いて詳細に解明する新たなシステムを開発した。具体的には、魚類としては珍しくメダカの主な胆汁酸はC24(TCA)とC27(THCA)であることが見出され、さらに、この二つの胆汁酸のメダカ一個体内での分布を可視化することに成功した。また、主成分分析により各消化器官の部位と代謝の関連についてこの二つの胆汁酸が機能していることが示唆された。今回の研究手法を用いると、胆汁酸を始めとする胆汁の腸肝循環の網羅的解析が可能となり、メダカ一個体のモデルにおいて、脂肪肝から発がんに向けての分子基盤の解明につながると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝がん(HCC)への進行性が注目されている非アルコール性脂肪性肝(NASH)の発生機序の解明を胆汁酸の分布に着目し、メダカを対象種として実験的な検討を行った。メダカ成魚の一個体全体に対して12μm厚の全身凍結切片を作製し、消化器系における顕微質量計を用いてイメージング質量分析を行い、肝臓・胆嚢・上部～下部腸官領域で得られたスペクトラムの特徴を多変量解析や機械学習法を応用した画像統計ソフトを用いて特定した。この結果、胆汁酸の腸肝循環の解明がNASHの発生機序解明に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A new system to elucidate the pathogenic basis of non-alcoholic hepatitis from the metabolic aspect in detail using a medaka model is developed. Specifically, the main bile acid of medaka, which is rare for fish, is C24 (TCA) and C27 (THCA), and succeeded in visualizing the distribution of these two bile acids within one medaka individual. In addition, the main component analysis revealed the site and metabolism of each digestive organ. Regarding the relationship it was suggested that these two bile acids are functioning. Using this research method, it will be possible to comprehensively analyze the enterohepatic circulation of bile including bile acids, which will lead to the elucidation of the molecular basis from fatty liver to carcinogenesis in the model of one individual medaka.

研究分野：超音波エレクトロニクス

キーワード：NASH 胆汁酸 メダカ 腸肝循環 イメージング質量分析 超音波

1. 研究開始当初の背景

肝がん (HCC) への進行性が注目されている非アルコール性脂肪性肝 (NASH) の患者数は増加傾向にあるが、その診断手法は、肝臓の組織を直接調べる生検に頼っている。そのため、非侵襲での検査手法の確立が望まれている。また、NASH 発症への経緯についても未解明な部分も多く、その解明には消化器系全体を対象にした発症因子の解明が必要とされている。このような消化器系全体の機能を観察する動物実験種としては、通常用いられるマウスよりもメダカが注目されている。メダカは、腸管構造が他の脊椎動物のモデルに比べ単純で HE 染色等の解剖学的処理を行った場合でもその確認が容易であり、飼料に対し純粋に腸管内での消化を検討することが可能である。

2. 研究の目的

本課題では、NASH 部位が特徴的に示す生体組織音速の温度依存特性に着目して超音波計測を主体とする in vivo 診断システムの構築を当初の目的とした。しかしながら、初年度の検討結果から、NASH 発生機序の詳細な検討を行うには、超音波を用いた間接的な生体上の取得よりも、まずはメダカ成魚の一個体全体を対象とした消化器系全体の直接観察によってヌクレオチドや胆汁酸の腸肝循環に着目した検討が有効であることが分かった。メダカは丈夫で環境変化に強い小型淡水魚であり、胚が透明、多産、世代交代サイクルが短いといった観測対象としての特長を持っている。これらを活かしてサンプル数を容易に確保でき、さらに世代をまたいだ影響が検討できる等、発生生物学および遺伝学に適した脊椎動物モデルとしても注目されている。そこで、本課題では、メダカの腸肝循環の詳細観察を主たる目的とした。

3. 研究の方法

メダカ成魚の 12 μ m 厚の全身凍結切片を作製し、顕微質量計 iMScope (島津製作所) にてイメージング質量分析を行った。また、同一組織上で比較可能な肝臓・胆嚢・上部～下部腸管領域で得られたスペクトラムの特徴を多変量解析や機械学習法を応用した画像統計ソフトを用いて特定した。さらに、階層的クラスタリング法を用いて、胆汁酸の網羅的な探索を胆汁酸の特徴的な局在を元に行った。

4. 研究成果

イメージング質量分析の結果から、メダカの主な胆汁酸は C24 (TCA) と C27 (THCA) であることを見出し、この二つの胆汁酸のメダカ一個体内での分布を可視化することに成功した。またこれらの分布は、おおむね一致して胆汁の腸肝循環を示し、主成分分析により各消化器の部位の鑑別を可能とする重要なパラメーターとしてこの二つの胆汁酸が機能していることが示唆された。さらに、メダカ全身イメージング質量分析法のプロトコルを確立し、メダカの胆汁酸を指標としたメダカ胆汁の腸肝循環の可視化に成功した。また、胆汁酸と同時にヌクレオチドやリン脂質などの局在についても観察し、メダカ生体内における胆汁酸の合成・分泌・消化・吸収のプロセスの理解への寄与を目指した。さらに、メダカの生体の構造と胆汁酸の特徴を活かし多変量解析を用いて網羅的に解析した。主成分分析において腸管の元の三次元構造を推定するには、胆汁酸量に関わる主成分を選択することでその機序を判断することが可能であることを示し、これによって、胆汁酸に関わる消化器全体で主成分分析を行うと、腸管を軸に肝臓と胆嚢の胆汁酸量に関する相対的な位置づけが可能となった。

次に、階層的クラスタリング法を用いると、胆汁酸量が多いものに関して一度の測定でラベルなしに収集が可能となった。なお、このプロセスで胆汁酸を探索する方法は初めての試みであり、メダカだけでなく他の動物種についても応用が期待される。メダカ体内において胆汁酸をイメージング質量分析法により測定することができるという事実は、これまでマウス等を対象としていたイメージング質量分析法の小型生物への応用という観点からも非常に重要な結果であった。また、ヒト疾患モデルとしてメダカを対象とすることの有用性を強く後押しするものとなった。これにより、多産であることや世代交代サイクルが短い等のメダカの利点をいかした代謝疾患研究が行われることが期待できる。

具体的成果について以下に述べる。

解析は IMAGEREVEAL MS (Shimadzu, Japan) を用いて行った。主成分分析では測定範囲全体から ROI (Region of Interest) を指定し領域内のマススペクトル同士を比較した。Fig. 1 に光学画像上に ROI を設定した状態を示す。今回は腸肝循環に関りのある腸管内腔、肝臓、胆嚢を対象にした。測定で得られたマススペクトルを Fig. 2 に示す、まず 7 か所ある腸管の順番を判定させるために腸管のみの検討を行った。この検討により腸管の順番を判明させることが出来れば将来的に消化のプロセスに関する研究をメダカで行うことが可能である。元の腸管の構造は断面からでは判断が不可能なので、図のように便宜上ナンバ

リングした．主成分分析の結果のグラフはスコアプロットとローディングプロットの二つで表される．スコアプロットは対象とする点の主成分軸上での得点(重心からの距離)を示し，ローディングプロットはそのスコアを計算するのに必要な係数で絶対値が大きいほどスコアプロットに影響を及ぼしている．今回の計測ではROIを設定しそれぞれの腸管マスペクトルのピーク強度に係数をかけた合計値がスコアプロット，係数がローディングプロットに表される．二つグラフはそれぞれのグラフの縦軸同士，横軸同士を観察する．すべての主成分を検討したところ，Fig. 3の第一主成分において2種類の胆汁酸のシグナルがスコアプロットに影響していることが判明した．胆汁酸は腸管の入口から胆道を通して流入し腸に存在する門脈を介して回収され肝臓に還る腸肝循環という性質を持つ代謝物である．この性質より口側に近い腸管は胆汁酸量が多く，肛門側であるほど少なくなるという性質を持つ．この結果から第一主成分のスコアプロットの左から順に口側の腸管の位置を示していると考えられる．しかしこの分析で対象にした代謝物はマスペクトルのピーク強度の高いものから3000種を対象にしたものである．そこでローディングの絶対値の小さい代謝物を除き2種の胆汁酸とそのプロトン付加体のみを抽出し主成分分析を行った．その結果がFig. 4である．この結果では第一主成分の寄与率が非常に高く，第一主成分が胆汁酸量の大小関係に大きく関わっていると示唆された．Fig. 4の結果もFig. 3と同様な順番を得た．このことから三次元の立体構造を持った腸管の断面の経時変化は主成分分析の胆汁酸シグナルを検討することで決定が可能であることが分かった．

次に，腸管の他に胆嚢と肝臓のデータを加えた結果においても主成分をすべて検討すると，第一主成分のスコアプロットでは腸管の順番を保持した状態が確認された．この結果から横軸は胆汁酸量が主成分を構成することが示唆され，腸管に対して肝臓や胆嚢の胆汁酸量がおおよそその相対値として表されることが分かった．胆嚢は主に胆汁酸の貯蓄を担う器官であるため強度が高いため，口側の消化管に近い量であると考えられ，逆に肝臓は胆汁酸の回収が進んだ肛門側に近い量であると考えられた．この結果から将来的には胆汁酸の代謝経路に関わり，特に遺伝が要因である疾患(胆汁鬱滞など)を検討する際に，スクリーニングによる遺伝子の検討で特徴を発揮するメダカで有用であると考えた．

以下 図

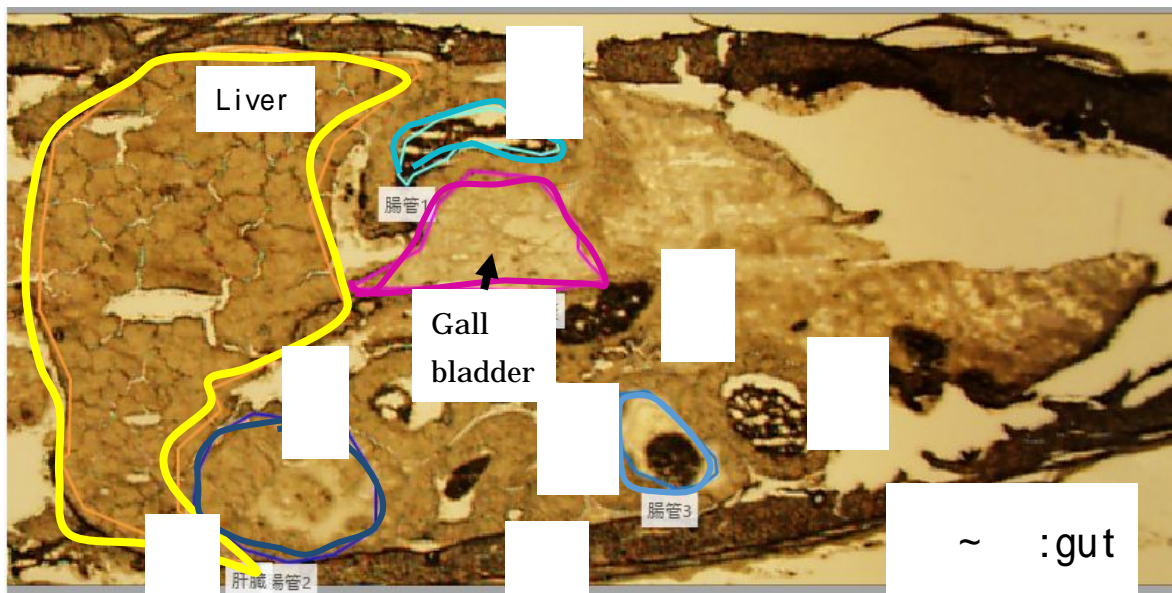


Fig. 1 Optic density to set ROI.

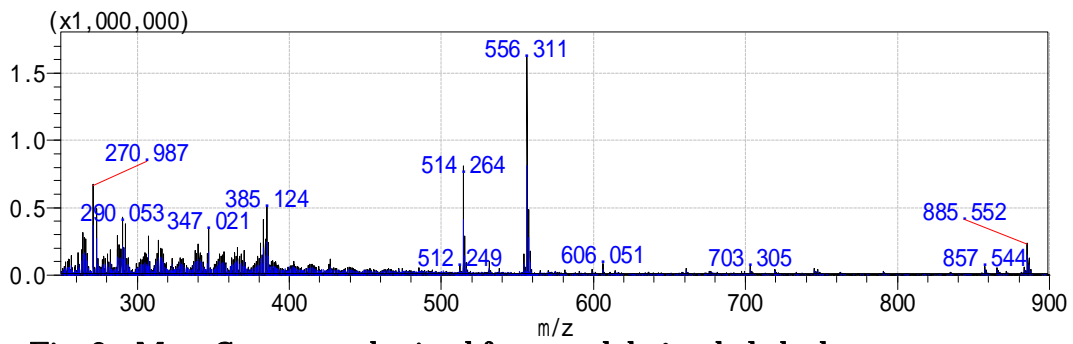


Fig. 2 Mass Spectrum obtained from medaka's whole body.

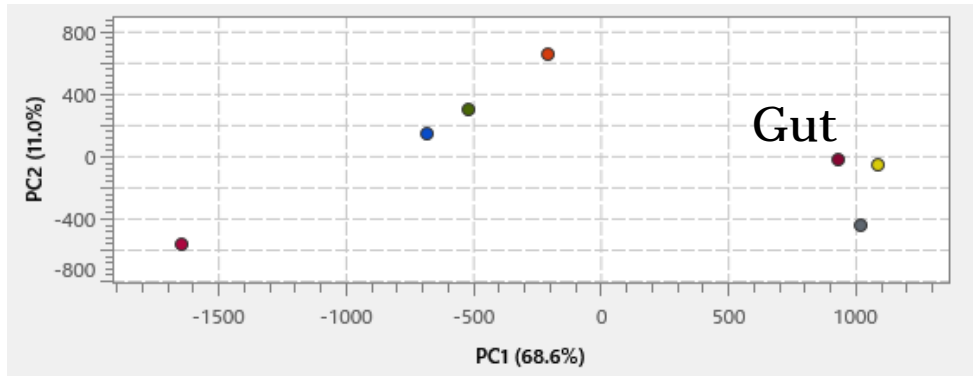


Fig. 3(a) Results of Principal Component Analysis (PCA) , Score plots.

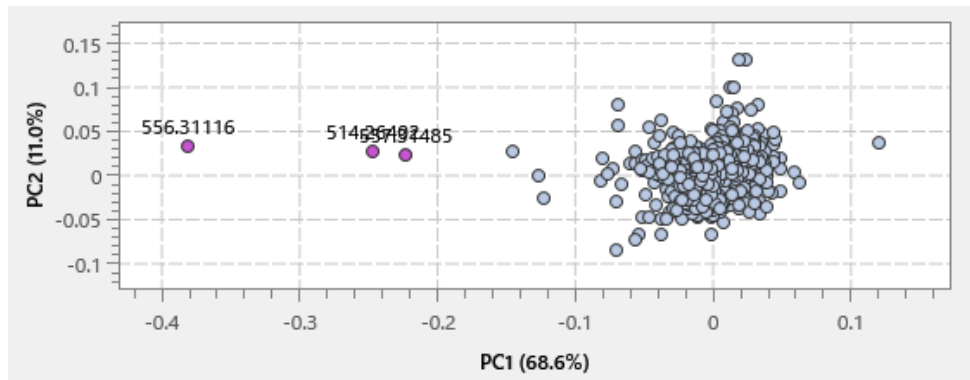
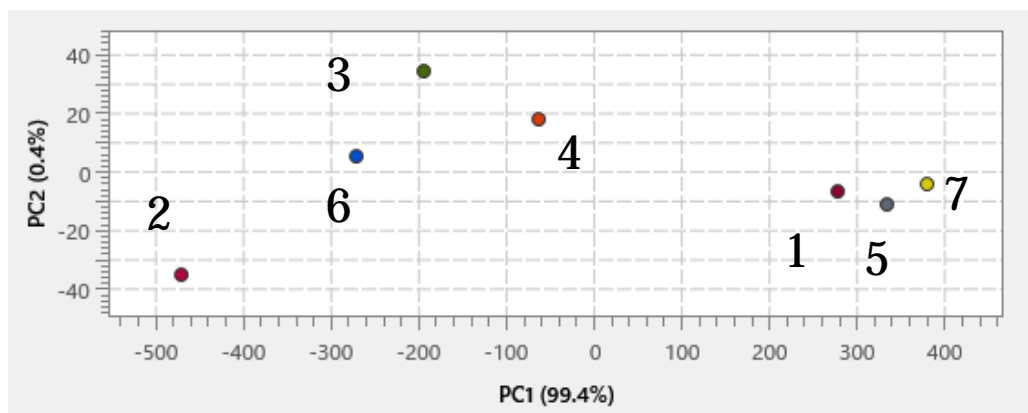
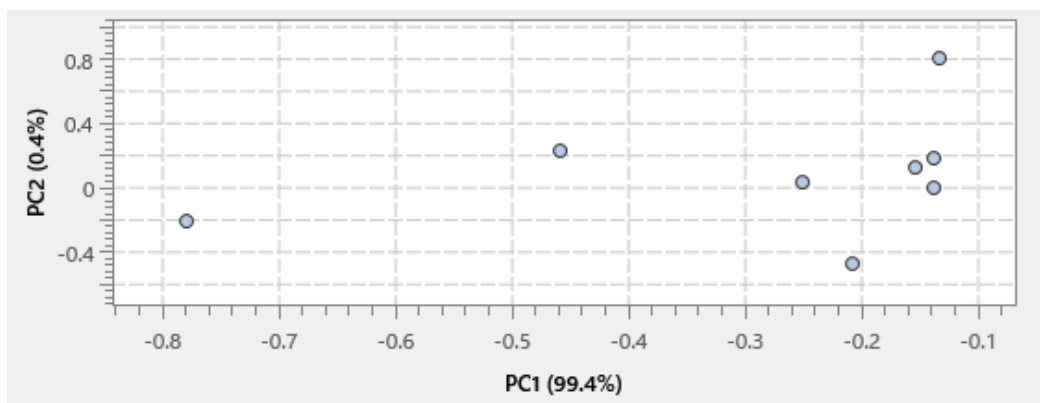


Fig. 3(b) Results of Principal Component Analysis (PCA) , Loading plots.



(a) Score plots.



(b) Score plots.

Fig. 4 Results of Principal Component Analysis (PCA) only bile acid.

m/z=514 & proton adduct

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Tada T, Iijima H, Kobayashi N, Yoshida M, Nishimura T, Kumada T, Kondo R, Yano H, Kage M, Nakano C, Aoki T, Aizawa N, Ikeda N, Takashima T, Yuri Y, Ishii N, Hasegawa K, Takata R, Yoh K, Sakai Y, Nishikawa H, Iwata Y, Enomoto H, Hirota S, Fujimoto J, Nishiguchi S.	4. 巻 3
2. 論文標題 Usefulness of Attenuation Imaging with an Ultrasound Scanner for the Evaluation of Hepatic Steatosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ultrasound Med Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ultrasmedbio.2019.05.033.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yukako Tsujimoto Mai Morimoto Naotaka Nitta Iwaki Akiyama	4. 巻 46
2. 論文標題 Ultrasonic measurement of sound velocity fluctuations in biological tissue due to ultrasonic heating and estimation of thermo-physical properties	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medical Ultrasonics	6. 最初と最後の頁 35-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10396-018-0916-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tada Toshifumi, Nishimura Takashi, Yoshida Masahiro, Iijima Hiroko	4. 巻 47
2. 論文標題 Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: new trends and role of ultrasonography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medical Ultrasonics	6. 最初と最後の頁 511-520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10396-020-01058-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 野島嵩文, 辻 雄大, 上野智弘, 山口真一, 中邨智之, 池川雅哉, 森脇弘規, 渡辺好章
2. 発表標題 イメージング質量分析法を用いたメダカ消化器官の胆汁酸の網羅的解析
3. 学会等名 第25回 Hindgut Club Japanシンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野島嵩文、辻 雄大、西野嘉晃、上野智弘、廣瀬まゆみ、吉田憲司、中邨智之、秋山いわき、池川雅哉、渡辺好章
2. 発表標題 イメージング質量分析法を用いたメダカ胆汁酸の可視化
3. 学会等名 第3回 京都生体質量分析研究会シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野島嵩文、辻 雄大、上野智弘、山口真一、中邨智之、池川雅哉、森脇弘規、渡辺好章
2. 発表標題 イメージング質量分析法を用いたメダカ胆汁酸の網羅的解析
3. 学会等名 第44回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukako Tsujimoto , Iwaki Akiyama
2. 発表標題 Estimation of the thermo-physical property of biological tissues from temperature rise due to ultrasound exposure
3. 学会等名 176th Meeting Acoustical Society of America (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田憲司、石原和也、秋山いわき、吉川研一、渡辺好章
2. 発表標題 高周波超音波の照射に伴う DNA 分子の二重鎖切断
3. 学会等名 日本超音波医学会第91回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池川雅哉, 松本恵李那, 吉田憲司, 秋山いわき, 廣瀬まゆみ, 渡辺好章
2. 発表標題 超音波照射によるメダカ胚のプロテオーム解析
3. 学会等名 日本超音波医学会第91回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野島高文、辻 雄大、西野嘉晃、上野智弘、廣瀬まゆみ、吉田憲司、中邨智之、秋山いわき、池川雅哉、渡辺好章
2. 発表標題 イメージング質量分析法を用いたメダカ胆汁酸の可視化
3. 学会等名 京都生体質量分析研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wakana Saito, Masaaki Omura, Shinsuke Akita, Kenji Yoshida, Tadashi Yamaguchi
2. 発表標題 Backscattering Analysis for Characterization of Lymphedema Dermis and Hypodermis
3. 学会等名 IEEE International, Ultrasonics Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1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	秋山 いわき (AKIYAMA IWAKI) (80192912)	同志社大学・生命医科学部・教授 (34310)	

6. 研究組織（つづき）

	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	池川 雅哉 (IKEGAWA MASAYA) (60381943)	同志社大学・生命医科学部・教授 (34310)	
研究分担者	飯島 尋子 (IIJIMA HIROKO) (80289066)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究分担者	吉田 憲司 (YOSHIDA KENJI) (10572985)	千葉大学・フロンティア医工学センター・准教授 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関