

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16807

研究課題名（和文）ヒト化肝臓マウスにおける肝動態の調査とマイクロイメージングバイオマーカーの確立

研究課題名（英文）Investigation of liver kinetics in humanized liver mice and establishment of microimaging biomarkers

研究代表者

吉丸 大輔 (Yoshimaru, Daisuke)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：10795199

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、野生型とヒト化肝臓マウスを対象とし、7T-MRIを用いて高分解能マルチコントラストイメージを取得した。正確な肝臓機能イメージングを確立するために、肝細胞レベルでの水分子の動きを複数の幅、方向で検出できるようにパラメータを調整し、肝細胞周囲水分子の特異的な方向への異方性を示すことができた。さらに生体の肝組織における水分子の拡散情報から肝機能を予測する際に、灌流の影響を考慮し、十分に高いb値が必要であることがわかった。マウスのヒト化肝臓は、びまん性のT2延長と拡散係数の上昇が見られた。ヒト化肝臓マウスを対象とした初めてのイメージング研究として、ヒト化肝臓の詳細を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床においては評価が難しい、本質的な肝細胞レベルでの水分子の拡散の影響を評価することができた。さらに、肝臓そのものがヒトの肝臓に取って代わるヒト化肝臓マウスにおいて、初めてのイメージング研究として、ヒト化肝臓の詳細を明らかにすることができた。本結果は、肝細胞変性など、肝疾患のイメージング評価の基礎となるデータである。さらに、ヒト化肝臓モデルをイメージングとして、構造、機能を明らかにすることで、創薬などの臨床へのフィードバックへの貢献が十分に期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, high-resolution multi-contrast images were obtained using 7T-MRI in wild-type and humanized liver mice. To establish accurate liver function imaging, parameters were adjusted to detect the movement of water molecules at the hepatocyte level in multiple widths and directions, and specific directional anisotropy of peri-hepatocyte water molecules was demonstrated. Furthermore, we found that a sufficiently high b-value is necessary for predicting liver function from water molecule diffusion information in living liver tissue, taking into account the effect of perfusion. Humanized liver in mice showed diffuse T2 prolongation and increased diffusion coefficient. As the first imaging study in humanized liver mice, we were able to elucidate the details of humanized liver.

研究分野：MRI

キーワード：MRI Liver

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウイルス性肝炎、アルコール性および非アルコール性脂肪性肝炎、および代謝障害(ヘモクロマトーシスやWilson病など)は、最も一般的な慢性肝疾患である。これらの慢性肝疾患は、肝実質の脂肪化、そして線維化をきたし、その後肝硬変や肝細胞癌に発展する可能性がある。肝細胞癌においては、この数年で多くの全身化学療法であるソラフェニブなどの分子標的薬の開発が行われ、腫瘍細胞の増殖の抑制や、腫瘍細胞の進展過程の阻害など、また転移抑制にも期待されている。これら治療を導入するにあたり、肝予備能また肝機能の温存が極めて重要とされる。しかし、その肝細胞の増殖や肝細胞組織の変性、肝予備能変化や治療効果を評価するバイオマーカーは明確化されていない。現在、ヒト由来の肝臓腫瘍細胞を定着させたモデルマウスを対象に、肝細胞や肝細胞癌の評価が報告されている(Chen, S.H, et al., *KJMS*)。しかし、これらは病態、代謝メカニズム、薬効動態がヒトの肝臓内で起こる変化を完全に再現しているとは言えない。そこで我々は、マウスにヒト正常肝臓細胞を脾臓門脈経路で移植することで、ヒト化肝臓が再構築された Hu-liver TK-NOG マウスに着目した(Hasegawa M, et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 2011)。ヒト化肝臓マウスは、アルブミンの他、ヒトの補体 C3 やトランスフェリン、セルロプラスミン等、重要な血清タンパク質についても合成・分泌がヒトと同様に行われていることが確認されている。さらにその肝臓構造もヒトと同様に形成されているため、薬物代謝がよりヒトに近いと言える。薬効動態の評価などに、この Hu-liver TK-NOG マウスの有用性が期待されるが、このヒト化マウスを対象としたイメージングの研究は未だ行われていない。さらに肝臓におけるイメージングでは、多段階発癌の診断や、肝細胞組織構造の変性に伴う水分子の動態変化の評価が可能となる。一般的な肝臓機能を画像化する機能イメージングを確立し、それらを生理データや染色による病理データとの整合性を確認することで、イメージングバイオマーカーとしてより詳細な肝臓機能評価が可能となる。これらは、疾患の病態変化、創薬開発、治療効果判定などに広く役立てられ、さらにヒト疾患との共通の評価系を用いることから、速やかな橋渡し研究になることが期待できる。

2. 研究の目的

マウスを用いた肝臓イメージング研究は行われてきたが、ヒト化肝臓マウスを対象としたイメージング研究は本申請が初めての研究である。これまでのマウス肝臓イメージング研究は、ヒトの癌細胞をマウスの肝臓に定着させ、評価を行った。しかし、マウスとヒトでは、肝細胞の構造や代謝も異なり、ヒトの疾患を正確に再現できているとは言えない。本研究対象であるヒト化肝臓マウスは、肝臓そのものがヒトの肝臓に取って代わるため、より人に近い肝臓機能や疾患の評価が期待できる。

本研究はヒト化肝臓マウスを対象として、7T MRI システムによるマルチコントラストイメージング法を用い、多角的にヒト肝細胞が定着した肝臓の構造、また機能的な評価を行い、野生型マウス、またヒトとの相同性を検証する。さらに臨床では時間的制限や装置性能から得ることが難しい、分子レベルの高分解能マイクロイメージングにより、細胞変性や浸潤、脂肪酸やグリコーゲンの代謝や分布、トランスポーターを介したビリルビンの排泄機能などを評価するために適したイメージングバイオマーカーを確立する。肝臓機能を画像化する機能イメージングを確立することで詳細な肝臓機能評価を可能とすることを旨とする。この指標を使用することで、疾患の病態変化、創薬開発、治療効果判定に役立てることを旨とする。

3. 研究の方法

マウスの肝臓イメージング法の検討を行うために、実験動物中央研究所研究の超高磁場 MRI システム (Bluker 社、Biospec 7.0T)、高感度 MR 信号受信コイル、計測シーケンスプログラム、生体情報モニタリングシステムを使用した。初年度は健常マウスを用いて、MRI 及び CT における撮像条件の検討を行った。具体的には、高磁場 MRI において、T1 強調画像、T2 強調画像、拡散強調画像、Magnetic resonance Spectroscopy (MRS) の画像について検討を行った。MRI は時間分解能が良く無いため、呼吸など制御したシーケンスを構築した。MRS においては、もっとも重要となる信号雑音比との関係から、撮像の関心領域の大きさや位置などの調整を行い、さらに

水抑制法による評価や適正な信号を取得するためのパラメータ設定を行った。さらに小動物用高分解能 CT において、撮像プロトコルの検討、また管電圧・管電流などを変化させた撮像条件を構築した。ヨード造影剤を用いた撮像に関しても、適した条件の検討を行った。

2021 年度は、初年度に構築した MRI での撮像条件をもとに、健常マウスの肝臓から得られる MRI インデックスの評価を行った。具体的には、高磁場 MRI において、T1 強調画像、T2 強調画像、拡散強調画像を取得し、その画像データを用い画像解析を行った。一般に、肝臓から得られる MRI インデックスは、血流による影響が無視できず、正確な肝細胞組織の拡散情報を取得することは難しい。肝臓機能を画像化する正確な機能イメージングを確立するために、肝細胞レベルでの水分子の動きを複数の幅で検出できるようにパラメータを調整した。さらに、サクリファイスを予定していたマウスを対象に死後直後の肝臓に対しても情報を取得し、正常な肝細胞組織が各インデックスに与える影響を評価した。

最終年度は、これまでに確立した撮像シーケンス、またプロトコルを用いて、ヒト化肝臓マウスに対して撮像を行った。具体的には、T1、T2 強調画像により形態の差異や、T2 値の変化に伴う T2 コントラストなどを調査した。続いて拡散強調画像により、肝細胞組織の組成や構造の変化に伴う拡散情報を調査した。最終的には灌流固定を行い、肝臓を標本とし、さらに詳細に高解像度 MRI 撮像を行い、ヒト肝細胞構造を詳細に評価した。これら結果を用い、健常マウスとヒト化肝臓マウスの同姓性を評価した。

4. 研究成果

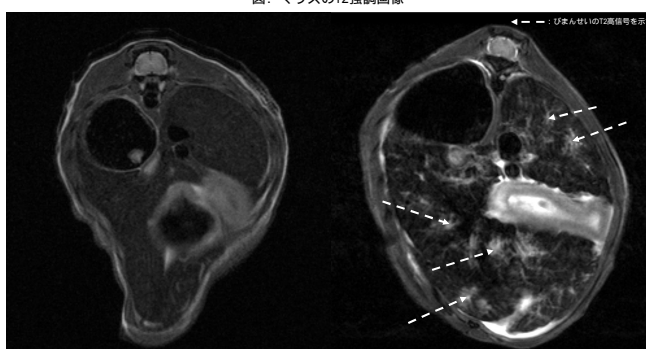
肝臓機能を画像化する正確な機能イメージングを確立するために、肝細胞レベルでの水分子の動きを大きさ、方向で複数検出できるようにパラメータを調整した。その結果、正常肝において水分子拡散の異方性を評価するインデックスである Fractional anisotropy (FA) 値がわずかに高値になり、肝細胞周囲の水分子には特異的な方向への異方性があることがわかった。さらに灌流の有無で、平均拡散係数を評価した際、低い b 値で計算した平均拡散係数は 4.2 倍変化した。このことから、生体の肝組織において、水分子の拡散情報から肝機能を予測する場合には、灌流の影響を考慮し、十分に高い b 値で評価する必要がある。小動物用高分解能 CT での撮像条件はアルミニウム+銅フィルターを用い、管電圧 100kV、管電流 200 μ A、180 度補間法による連続撮影において、十分な画像が得られることがわかった。これらの野生型マウスより得られた撮像条件やプロトコルを用い、ヒト化肝臓マウスに対して撮像を行った。その結果、ヒト化されたマウスの肝臓は、正常マウスの肝臓とは大きく異なり、肝硬変などで見られる不正な形態を呈し、さらにびまん性の炎症様の T2 の延長が見られた。

拡散強調画像においては、ヒト化肝臓で平均拡散係数が上昇しており、炎症などによる水の影響が考えられる。拡散の異方性を示す FA では、正常マウスと大きな差は見られなかった。

さらにその肝臓標本をさらに詳細に高解像度 MRI 撮像を行った結果、より鮮明に肝細胞構造の変化を捉えることができた。

ヒト化肝臓マウスの肝臓は、ヒトそしてマウスの肝臓とも異なっており、ヒトとの同姓性をイメージング研究で明らかにすることは現状では難しい。しかし、ヒト化肝臓マウスを対象とした初めてのイメージング研究として、ヒト化肝臓の詳細を明らかにすることができた。本結果は、肝細胞変性など、肝疾患のイメージング評価の基礎となるデータである。さらに、ヒト化肝臓モデルをイメージングとして、構造、機能を明らか

図. マウスのT2強調画像



野生型マウスの肝臓

ヒト化肝臓マウスの肝臓

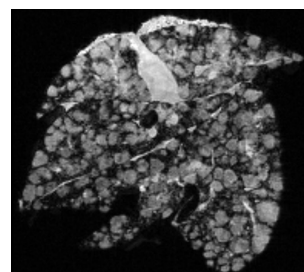


図. ヒト化肝臓マウス標本MRI画像

にすることで、創薬などの臨床へのフィードバックへの貢献が十分に期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------