

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04817

研究課題名（和文）ヒト肝細胞キメラマウスモデルとヒト組織学的進展例材料を用いたNASHの研究

研究課題名（英文）Study of NASH using human hepatocyte chimeric mouse and biopsy specimen

研究代表者

茶山 一彰（Chayama, Kazuaki）

広島大学・医系科学研究科（医）・共同研究講座教授

研究者番号：00211376

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 32,700,000円

研究成果の概要（和文）：非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）は、肝硬変および肝細胞癌に進行する可能性のある炎症性疾患であり、肥満の増加に伴いNAFLDの世界的な発生率は急速に増加している。本研究ではヒト肝細胞キメラマウスを用いて脂肪肝マウスモデルを作製した。6匹のマウスに高脂肪食、6匹に通常食を与え、各3匹にGHを投与し、4つのグループに分け、8週間食餌を与えた後、屠殺し、ヒト肝細胞を抽出しRNA-Seq、プロテオミクス、メタボロミクス分析を行った。さらに、マルチオミクスアプローチを用いて各グループ内の代謝状態を調査した。このアプローチは今後NAFLDの治療薬の開発の有力なモデルになる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの肝細胞の代謝が観察できるモデルはなく、これまで薬剤の開発の妨げとなっていた。本研究で開発したモデルはヒト肝細胞の代謝そのものの変化を観察できるうえに、繊維化などのメカニズムの解明、発達防止の治療開発などに有用であり、今後の応用研究が期待される。

研究成果の概要（英文）：Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is an inflammatory condition that can progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The global incidence of NAFLD is rapidly increasing in parallel with rising obesity rates. In this study, a fatty liver mouse model was generated using human hepatocyte chimeric mice. Six mice were fed a high-fat diet, six were fed a normal diet, and three mice from each group received growth hormone (GH), resulting in four distinct groups. After being fed their respective diets for eight weeks, the mice were sacrificed, and human hepatocytes were extracted for RNA-Seq, proteomics, and metabolomics analysis. A multi-omics approach was employed to investigate the metabolic status within each group. This approach offers a powerful model for the future development of therapeutic agents for NAFLD.

研究分野：肝疾患

キーワード：脂肪化 ヒト肝細胞 成長ホルモン 繊維化 治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) は、肝硬変および肝細胞癌に進行する可能性のある炎症性疾患であり、肥満の増加に伴い NAFLD の世界的な発生率は急速に増加している。

脂肪肝の新概念として、2020 年に代謝関連脂肪肝疾患 (MAFLD) が提唱されたものの、病態の解明には至っていない。そのため、脂質代謝を調節する肝臓のメカニズムを研究することにより、将来的に脂肪肝の病態の解明と疾患の予防や治療に繋がる結果が得られる可能性がある。小動物モデルは、新しい治療法の開発と評価に不可欠だが、マウスとヒトでは根本的に代謝が異なる。我々はこれまでに、DNA ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子 (uPA) / 重度複合免疫不全症 (SCID) の肝臓を移植したキメラマウスモデルを確立し、in vivo での肝炎ウイルス研究で病態の解明、治療薬の評価に使用することに成功している。

キメラマウスのヒト肝細胞はマウスの成長ホルモンには反応せず脂肪を蓄積しやすく自然に脂肪化することが報告されている。フルクトース含有高コレステロール食 (GAN 食) を与えた場合でも、ヒト肝細胞キメラマウスにヒト GH (GH) を添加すると、脂質代謝が変化し、肝肥大の程度が異なることが示されている。

### 2. 研究の目的

脂肪肝の遺伝子発現とタンパク質、脂質プロファイルを明らかにすることを目的に、uPA/SCID ヒト肝細胞キメラマウスを用いて脂肪肝マウスモデルを作製した。

### 3. 研究の方法

6 匹のキメラマウスに GAN 食、6 匹に通常食 CRF1 食を与え、各 3 匹に GH を投与し、4 つのグループに分け、8 週間食餌を与えた後、屠殺し、ヒト肝細胞を抽出し RNA-Seq、プロテオミクス、メタボロミクス分析を行った。さらに、マルチオミクスアプローチを用いて各グループ内の代謝状態を調査した。

### 4. 研究成果

#### 腹部心エコー検査

(図 1) では GAN 食を与えたマウスは脂肪肝が有意に進行し ( $p < 0.001$ )、GH を投与したマウスでは有意に減少した ( $P = 0.026$ ) (図 2)。肝臓組織の光学顕微鏡検査で、グループ間の細胞形態の違いを確認した。GAN 食を与えられたマウスと CRF1 食を与えられたマウスで大きな脂肪滴と変位した核を伴う静脈周囲肝細胞の大小胞性脂肪症が観察された (図 3)。

トランスクリプトミクス (RNA-seq) の結果、サンプルあたり約 4,000 万のリードが生成された。リードの約 60% が hg19 ヒト由来の遺伝子配列にマッピングされた。遺伝子発現の変化について、食餌の違い、GH 投与の有無別に調べたところ、重度の脂肪肝を呈する (GAN/GH-) マウスと脂肪肝ではない (CRF1/GH+) マウスの間で、最も著明な差異

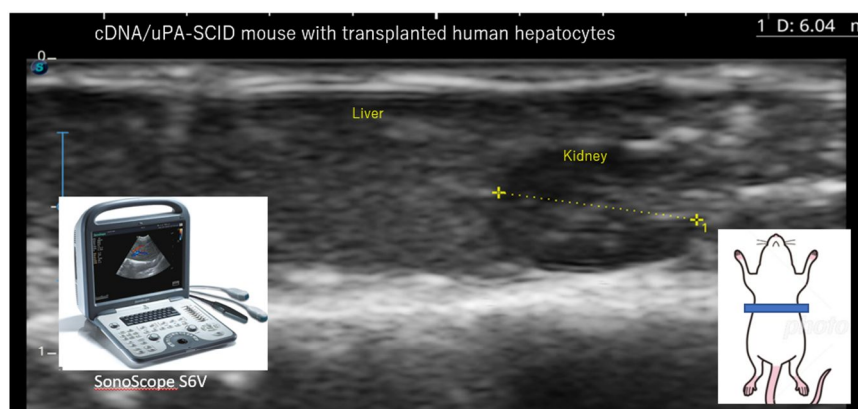


図 1、超音波装置を用いた肝腎コントラストの観察

#### 肝腎コントラスト

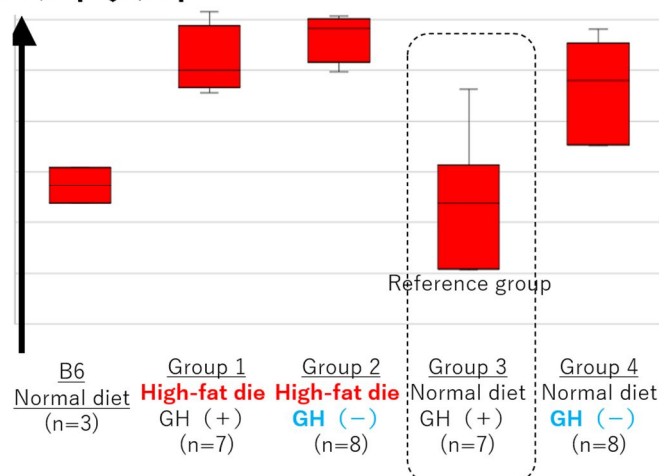


図 2、超音波装置を用いた肝腎コントラストの観察

の950個の遺伝子発現が観察され、その多くは、グルコースと脂質に関連していた(図4)。

加重遺伝子共発現ネットワーク分析の結果、遺伝子は33のモジュールに分類された。GAN食およびGHに関連するモジュールの固有遺伝子としてSEMA7AおよびIGF1が同定された。プロテオミクスの結果は、トランスクリプトミクス解析の結果とほぼ一致していた。DIA分析により、FDR < 1%の3,747個のヒトタンパク質が同定された(図5)。

メタボロミクスの結果は、遺伝子発現の変化と比較すると多様で、約1,300の標準代謝物データベースと照合した結果、437個の代謝物が検出された。肝内トリグリセリドの蓄積が確認されたが、蓄積の程度は、食事よりもGHの影響を強く受けていた。脂肪肝の抑制は、CRF1食にGHを投与したグループで著明で、GHの投与はトリグリセリドレベルを大幅に低下させ、アミノ酸の代謝と強く関連していた(図6)。

Metabodiffの結果、GAN食に対して、アミノ酸、ピリミジン、脂肪酸代謝に関連する代謝相関モジュールが同定され、GH投与に対してアミノ酸代謝に関連する少数の代謝相関モジュールが同定された。

トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスのマルチオミクス解析は、mixOmicsバージョン6.18.125を使用して実行した。GHに関連する遺伝子の

GSEA分析では、IL2/STAT5シグナル伝達経路、GAN食に関連する遺伝子では、コレステロール合成および脂肪酸代謝経路が濃縮されていた。

MiBiOmics分析により、ペリリピン2がドライバー遺伝子に特定された(図7)。

以上の結果から、このモデルにより、脂肪肝により引き起こされる肝内の変化が詳細に観測され

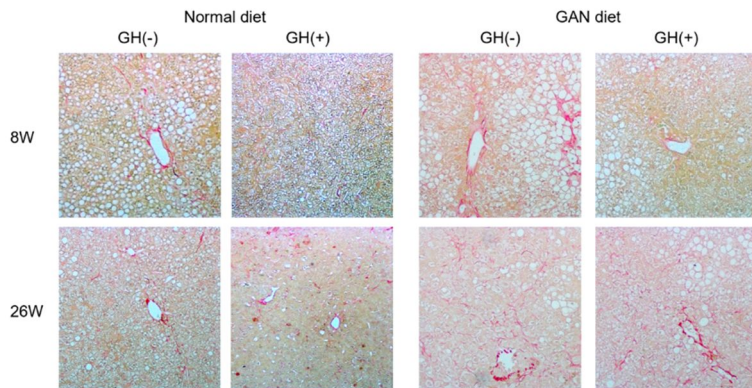


図3、シリウスレッドによる肝線維化の観察

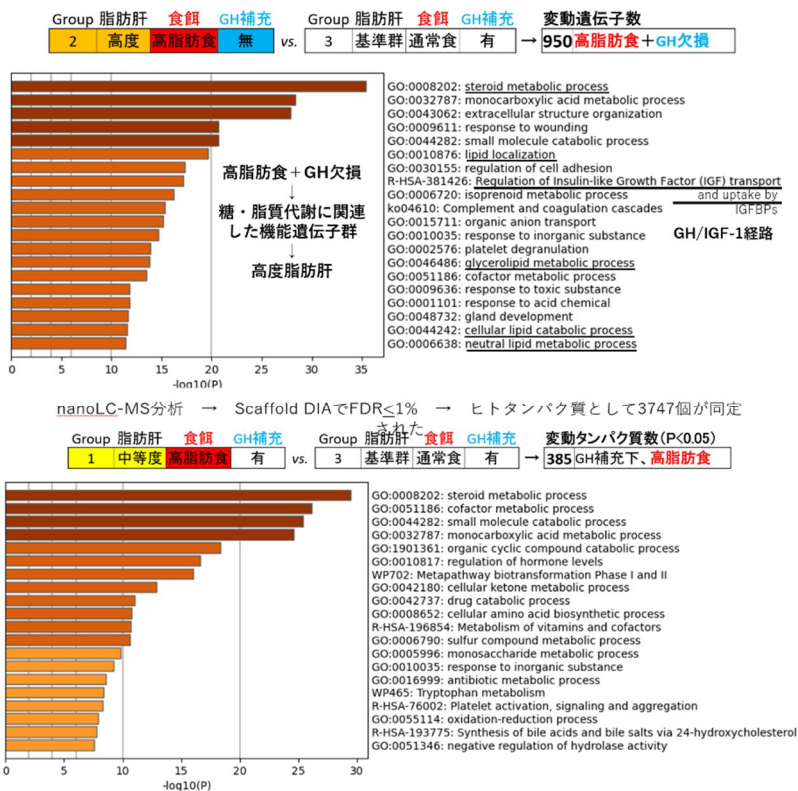


図5、高脂肪食とGH欠損による高度脂肪肝とコントロールのタンパク発現の比較解析

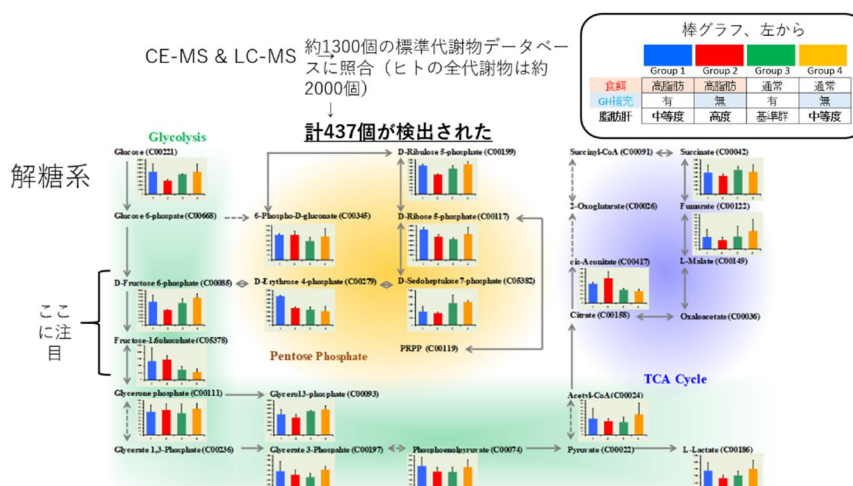


図6、高脂肪食とGH欠損によるメタボローム、リピドーム解析

た。これらの変化をさらに解析し、薬剤投与の影響などを観察することにより、脂肪性肝障害に対する新たな理解や治療開発が進むことが期待される。

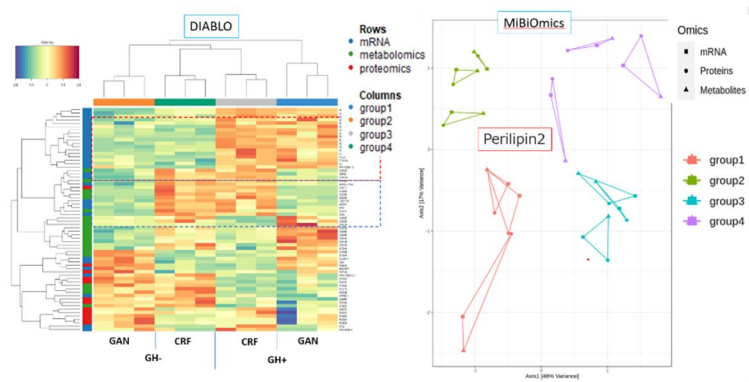


図7、高脂肪食とGH欠損によるメタボローム、リビドーム解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujiwara-N, Chayama-K et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Molecular signatures of long-term hepatocellular carcinoma risk in nonalcoholic fatty liver disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 science translational medicine	6. 最初と最後の頁 1-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scitranslmed.abo4474	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Fujiwara-N, Chayama-K et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Molecular signatures of long-term hepatocellular carcinoma risk in nonalcoholic fatty liver disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 science translational medicine	6. 最初と最後の頁 1-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scitranslmed.abo4474	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 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	茶山 弘美  (Chayama Hiromi)  (70572329)	広島大学・医系科学研究科（医）・准教授   (15401)	
研究分担者	三木 大樹  (Miki Daiki)  (10584592)	広島大学・医系科学研究科（医）・講師   (15401)	

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	Hayes C. Nelson  (Hayes Nelson)  (50572327)	広島大学・医系科学研究科(医)・准教授     (15401)	

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