

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07860

研究課題名（和文）抗酸化nano-medicineは腸肝軸のルートよりNASH発症と進展を抑止する

研究課題名（英文）Administration of antioxidative nanoparticles attenuate NASH onset and development through the gut&amp;#8211;liver axis

研究代表者

菅野 直美（石橋直美）（Kano, Naomi）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30738539

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：抗酸化nanoparticle (RNPO)の経口投与は、悪玉活性酸素種を選択的に消去して顕著な抗酸化作用を発揮し、NASHモデルのSqstm1:Nrf2遺伝子二重欠失(DKO)マウスにおける肝線維化と肝発癌を抑止した。腸内細菌叢ゲノム解析より、RNPOは種多様性を回復させ、腸内環境の改善は肝へのLPS流入の減少につながり、線維化進展と肝発癌を抑止した。RNPOはNrf2の発現低下により生体の抗酸化作用が低下した個体において、慢性肝疾患における肝病態の増悪を抑止する生体材料である可能性が示唆された。また、Nrf2の脆弱化は酸化ストレスを増悪させ、肝炎症・線維化を促進させるものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗酸化nanoparticle (RNPO)は、高分子ポリマーに抗酸化剤を結合させたレドックス粒子である。RNPOは腸管から吸収され肝に滞留し、抗炎症・酸化ストレス作用を発揮する。本研究の結果からRNPOは肝における酸化ストレス、ERストレスの発生を軽減し、肝線維化を抑止し、さらに、肝発癌を抑止するものと考えられた。また、RNPOは腸内細菌叢の種多様性を改善し、腸から流入するLPSを減少させることにより、「腸-肝連関」の観点から、NASHだけでなく肝発癌に対しても予防効果があることを示したことは意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：Oral administration of antioxidative nanoparticles (RNPO) inhibited liver fibrosis and prevented HCC development in p62/Sqstm1 and Nrf2 double knockout (DKO) mice through exerting potent anti-oxidative actions and suppressing inflammation by scavenging ROS. In the microbiome analysis, RNPO treatment improved the alpha-diversity of gut microbiota and changed the microbiota composition, which in turn lipopolysaccharide levels and liver lipopolysaccharide-binding protein expression were significantly lower compared with those in the nontreatment group. In the clinical study, a decreased Nrf2 expression aggravated oxidative stress in the livers leading to inflammation and fibrosis. Taken together, RNPO may be a potent biomaterial which attenuates aggravation of chronic liver diseases in the individuals associated with decreased antioxidative defense action.

研究分野：健康応用科学

キーワード：NASH RNP ナノ粒子 抗酸化剤 Nrf2 遺伝子改変マウス

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦では肥満小児の増加に伴い、脂肪肝、血清脂質異常症、糖尿病など様々な合併症への対応が重要な医療課題になっている。肥満小児では nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) の有病率が高い。米国の長期予後調査では、NAFLD の一部は予後不良の nonalcoholic steatohepatitis (NASH) へ進展することが報告されている (Gut 2009)。

(2) 肥満者における腸内細菌叢の乱れ(dysbiosis)は NASH 発症に深く関与する。Dysbiosis は、腸管上皮の透過性の亢進と合間って、高 LPS 血症を引き起こす (Diabetes 2008)。肥満者では高 LPS 血症がしばしば認められる (J Gastroenterol 2018)。肥満では高 leptin 血症の病態下に LPS が異物として過剰に認識され、炎症シグナル伝達経路の増大により肝臓の炎症病態が増幅される (Cell Meta 2012)。

(3) LPS に対する生体側の抑止因子には抗酸化ストレス応答を制御する Keap1-Nrf2 システムがある。Nrf2 は LPS による自然免疫系の活性化を抑止する因子であるが (J Clin Invest 2006)、活性化剤による Nrf2 の長期間に及ぶ活性化には限界がある (J Gastroenterol 2012)。肥満 NAFLD に対して、potent な抗酸化剤による LPS に関連した酸化ストレス障害の軽減が必要となる。

(4) 研究協力者の長崎は高分子ポリマーに抗酸化剤を共有結合させた抗酸化 nano-medicine (RNP<sup>o</sup>) を開発した。RNP<sup>o</sup> は消化管内で崩壊せず腸管に高濃度に集積し、腸管内で LPS と会合して MΦ、好中球が過剰に産生する ROSs の選択的除去に役割を演じる (図 1)。

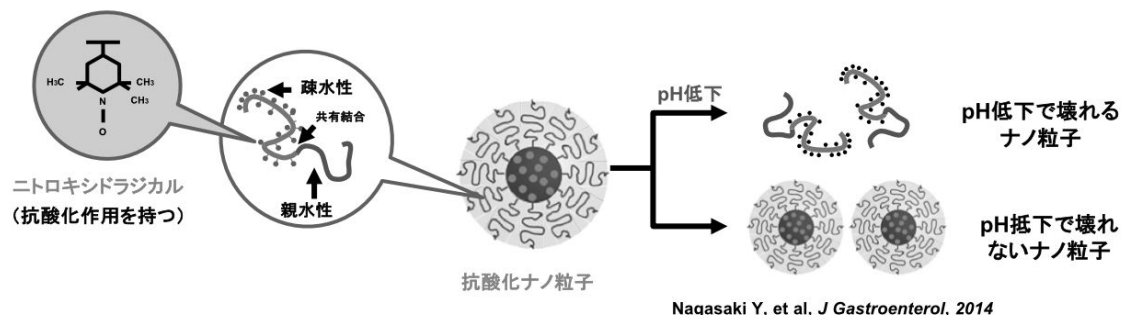


図 1 : 抗酸化ナノ粒子 (RNP<sup>o</sup>)

### 2. 研究の目的

生体の抗酸化ストレス応答機能の減衰した *Sqstm1:Nrf2* 遺伝子二重欠失(DKO)マウス(特許第 6020791 号)(図 2)に対して、高脂肪/シヨ糖食による代謝性高 LPS 血症の病態を増悪させ、NASH 発症と肝発癌の促進状態を誘導する。そして、本 DKO マウスに対して RNP<sup>o</sup> を長期間経口投与し、RNP<sup>o</sup> が Gut-Liver axis を介して LPS による肝の炎症性障害を軽減し、NASH 発症と肝発癌に対する抑止効果を発揮することが可能であるかを検証する。

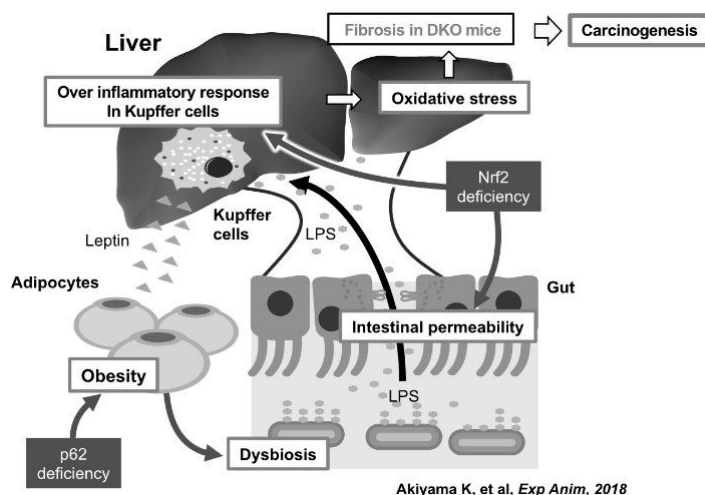


図 2 : DKO マウスの NASH, HCC 発症進展機序には「腸-肝連関」の病態が関連する

### 3. 研究の方法

通常食(NASH モデル)、または、60%高脂肪食(HCC モデル)を摂餌させた雄性の DKO マウスに

対して, RNP<sup>0</sup> を 26 週間, 自由飲水投与した(約 10 mg/日). 32 週齢でと殺し, 体組成, 血液生化学検査, 肝病理解析(steatosis activity fibrosis score; SAF score), 肝組織の炎症線維化因子の qPCR 解析, 肝組織の酸化ストレスおよび RNA シークエンスの解析, 更に, 糞便中の腸内細菌叢解析により, NASH 肝病態を比較解析した.

#### 4. 研究成果

(1) 通常食摂餌 DKO マウスの対照群(C)と RNP<sup>0</sup> 投与群(R)では, mortality や体重変化, 解剖時の肝重量, 白色脂肪組織重量に差を認めなかった. 肝病理評価(SAF score) (図3)では, 脂肪化は S 群で高値である一方(C:  $0.9 \pm 0.1$ , S:  $1.4 \pm 0.2$ ), 炎症には差はなく(C:  $1.2 \pm 0.1$ , S:  $1.0 \pm 0.0$ ), 線維化は S 群で有意に抑制されていた(C:  $1.1 \pm 0.1$ , S:  $0.2 \pm 0.1$ ). 血液生化学による肝障害は, 両群間で有意な差を認めなかった. S 群では, *Tnf- $\alpha$* , *Il-6*, *Trl4*, *Tlr9* などの肝炎シグナルに関わる因子, *Tgf- $\beta$ 1*, *Colla1*,  *$\alpha$ -Sma* などの肝線維化に関わる因子が抑制されていた. また, 酸化ストレスマーカーである Malondialdehyde, Hexanoyl-lysine が S 群で有意に抑制されていた.

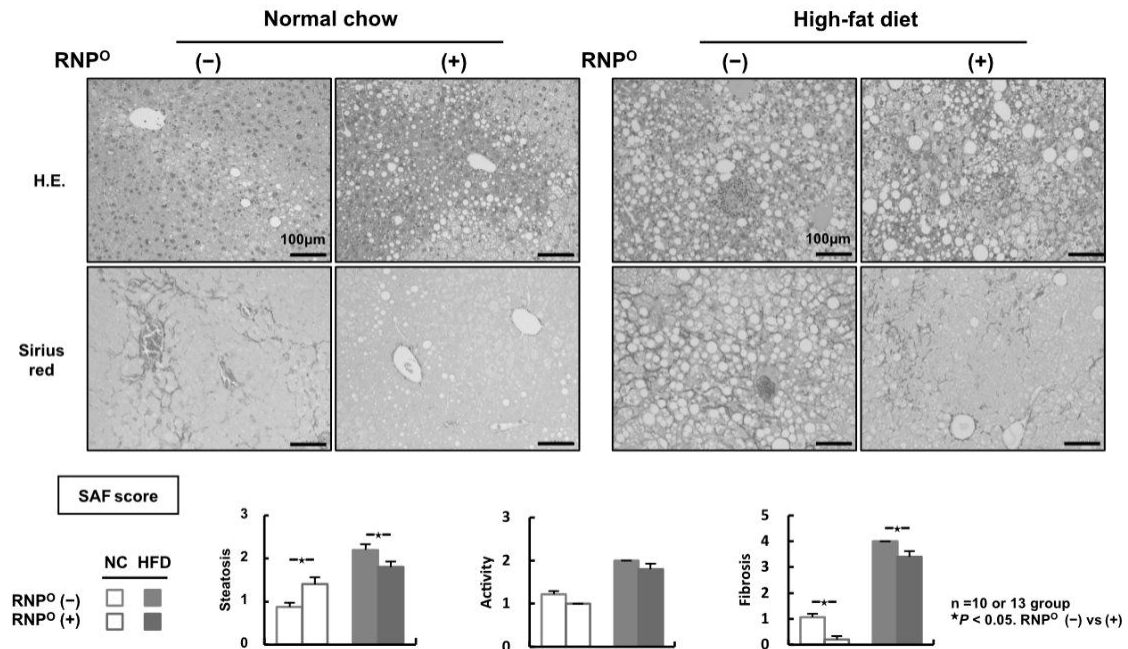


図3 : RNP<sup>0</sup> 投与は肝線維化を抑制する

(2) 高脂肪食摂餌 DKO マウスでは, 対照群(HC)で 17 /52 例(33%)に肝癌が認められたのに対し, RNP<sup>0</sup> 投与群(HR)では明らかな肝癌発生は認められなかった(0 /10 例) (図4). また, HR 群の線維化は有意に抑制されていた(HC :  $4.0 \pm 0.0$ , HS :  $3.4 \pm 0.2$ ). HR 群では, 肝臓における血清リポ多糖(LPS)濃度とLPS 結合タンパク質(LBP)の発現は, HC 群と比較して有意に低値であった(図5). また, 腸内細菌叢のゲノム解析では, HC 群と比較して HR 群の腸内細菌の種多様性(diversity)が増大しており, LPS 産生菌やプロバイオティクス関連菌を含む腸内細菌叢の組成に変化が見られた(図6).

さらに, RNP<sup>0</sup> は, 通常食群および高脂肪食群の両群で ER ストレスシグナル伝達遺伝子, HCC driver gene, および cancer pathway gene の発現を抑制した. 特に高脂肪食群において, PI3K-Akt シグナル伝達遺伝子の発現を減少させた.

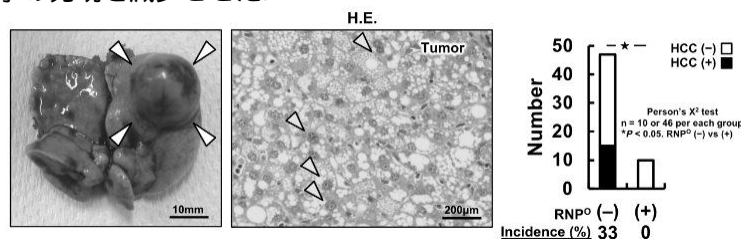


図4 : RNP<sup>0</sup> 投与は肝癌発生を抑制する

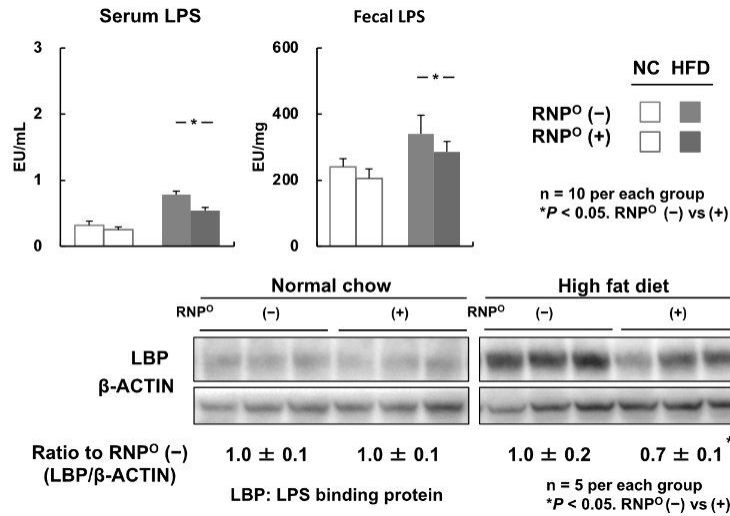


図5：RNP<sup>0</sup>投与はLPSを抑制する

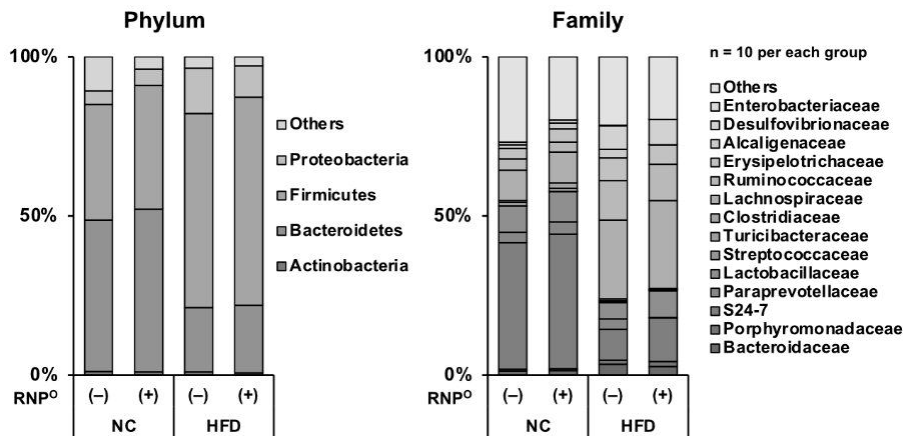


図6：腸内細菌叢の群間比較

### (3) 考察

本研究の結果より、RNP<sup>0</sup>は肝における酸化ストレス、ERストレスの発生を軽減し、肝線維化を抑止することより肝発癌を抑止するものと考えられた。また、RNP<sup>0</sup>が腸内細菌叢の種多様性を改善し、腸から流入するLPSを減少させることにより、「腸-肝連関」の観点から、NASHのみならず肝癌に対しても予防効果があることを示した。

ヒト慢性肝疾患におけるNRF2の発現と細胞内局在を解析した結果、NRF2の肝細胞における染色強度は、肝炎症、線維化と有意に関連し、それらの高度な症例ではNRF2の染色強度が低下していた。また、核局在・濃染が高度の症例では、炎症・線維化が高度であった。RNP<sup>0</sup>はNRF2の発現低下により生体の抗酸化作用が低下した個体において、肝炎症・線維化の進展を抑止する生体材料として有用であると考えられた。

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 Watahiki Takahisa, Okada Kosuke, Miura Ikuru, To Keii, Tanaka Seiya, Warabi Eiji, Kanno Naomi, Yamagata Kenji, Gotoh Naohiro, Suzuki Hideo, Ariizumi Shunichi, Tsuchiya Kiichiro, Nagasaki Yukio, Shoda Junichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Antioxidative Self-Assembling Nanoparticles Attenuate the Development of Steatohepatitis and Inhibit Hepatocarcinogenesis in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1939 ~ 1939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox11101939	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 Terada Kazuhiro, Yamagata Kenji, Uchida Fumihiko, Fukuzawa Satoshi, Ishibashi-Kanno Naomi, Bukawa Hiroki	4. 巻 2022
2. 論文標題 Accidental Insertion of a Broken Needle into the Pterygoid Mandibular Space during Inferior Alveolar Nerve Block: A Case Report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Case Reports in Dentistry	6. 最初と最後の頁 1 ~ 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2022/9626612	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 Takaoka Shohei, Yamagata Kenji, Okubo-Sato Makiko, Fukuzawa Satoshi, Uchida Fumihiko, Ishibashi-Kanno Naomi, Bukawa Hiroki	4. 巻 2022
2. 論文標題 Anatomical Variant of Spinal Accessory Nerve Passing through Fenestrated Internal Jugular Vein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Case Reports in Dentistry	6. 最初と最後の頁 1 ~ 3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2022/7087970	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 Yanamoto Souichi, Michi Yasuyuki, Otsuru Mitsunobu, Ishibashi-Kanno Naomi, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Protocol for a multicentre, prospective observational study of elective neck dissection for clinically node-negative oral tongue squamous cell carcinoma (END-TC study)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMJ Open	6. 最初と最後の頁 e059615 ~ e059615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjopen-2021-059615	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 Shohei Takaoka, Fumihiko Uchida, Hiroshi Ishikawa, Junko Toyomura, Akihiro Ohya, Miho Watanabe, Hideki Matsumura, Aiki Marushima, Seiichiro Iizumi, Satoshi Fukuzawa, Naomi Ishibashi-Kanno, Kenji Yamagata, Toru Yanagawa, Yuji Matsumura, Hiroki Bukawa	4. 巻 35
2. 論文標題 Transplanted neural lineage cells derived from dental pulp stem cells promote peripheral nerve regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hum Cell	6. 最初と最後の頁 462-471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-021-00634-9	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 Seiichiro Iizumi, Fumihiko Uchida, Hiroki Nagai, Shohei Takaoka, Satoshi Fukuzawa, Naomi Ishibashi-Kanno, Kenji Yamagata, Katsuhiko Tabuchi Toru Yanagawa, Hiroki Bukawa	4. 巻 7
2. 論文標題 MicroRNA 142-5p promotes tumor growth in oral squamous cell carcinoma via the PI3K/AKT pathway by regulating PTEN	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e08086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2021.e08086	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 Kenji Yamagata, Satoshi Fukuzawa, Fumihiko Uchida, Kazuhiro Terada, Naomi Ishibashi-Kanno, Hiroki Bukawa	4. 巻 21
2. 論文標題 Does the geriatric nutrition risk index predict prognosis of patients with oral squamous cell carcinoma?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Br J Oral Maxillofac Surg	6. 最初と最後の頁 338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bjoms.2021.09.008	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 Satoshi Fukuzawa, Kenji Yamagata, Makiko Okubo-Sato, Kazuhiro Terada, Fumihiko Uchida, Naomi Ishibashi-Kanno, Hiroki Bukawa	4. 巻 9
2. 論文標題 Therapeutic Effect of Polidocanol Sclerotherapy on Oral Vascular Malformations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dentistry Journal	6. 最初と最後の頁 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/di9100119	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 Miura I, Komine S, Okada K, Wada S, Warabi E, Uchida F, Oh S, Suzuki H, Mizokami Y, Shoda J	4. 巻 9
2. 論文標題 Prevention of non-alcoholic steatohepatitis by long-term exercise via the induction of phenotypic changes in Kupffer cells of hyperphagic obese mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiol Reps	6. 最初と最後の頁 e14859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14859	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14件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 千原佳菜子、福澤 智、菅野 直美、柳川 徹
2. 発表標題 歯周病の病態が非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の肝線維化進展に与える影響
3. 学会等名 第32回日本有病者歯科医療学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 持田 雄子、松金 奈緒、水野 孝子、萩原 敏之、千原佳菜子、福澤 智、菅野 直美、柳川 徹
2. 発表標題 歯科口腔外科疾患入院患者における併存症・既往歴の解析
3. 学会等名 第32回日本有病者歯科医療学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山縣 憲司、内田 文彦、福澤 智、武川 萌香、飯坂 慶人、菅野 直美、武川 寛樹
2. 発表標題 唇顎口蓋裂術後の上顎劣成長に対する前方上顎歯槽骨か骨延長術の有用性
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 犬井 高人、内田 文彦、武川幸太郎、武内 保敏、福澤 智、菅野 直美、山縣 憲司、武川 寛樹
2. 発表標題 経時的なパノラマX線写真撮影で多発性集合性歯牙腫の発生時期が推定できた1例
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高岡 昇平、福澤 智、内田 文彦、菅野 直美、生井 友農、山縣 憲司、柳川 徹、武川 寛樹
2. 発表標題 血管網内在末梢神経オルガノイドの構築と新規末梢神経再生治療
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤 傑、菅野 直美、福澤 智、内田 文彦、米本 芽衣、山縣 憲司、武川 寛樹
2. 発表標題 下顎にMRONJとEBV陽性皮膚粘膜潰瘍を併発した関節リウマチ患者の1例
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内田 文彦、菅野 直美、佐藤 牧子、飯泉成一郎、長井 宏樹、福澤 智、山縣 憲司、武川 寛樹
2. 発表標題 口腔がんの局所再発に対してホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) を施行した4例
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 澤田石玲衣、山縣 憲司、福澤 智、内田 文彦、菅野 直美、武川 寛樹、廣昌 広実
2. 発表標題 舌がん切除再建術後の気管切開部位に再発した1例
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 根本 雅子、野口 篤郎、大木 宏介、福澤 智、内田 文彦、菅野 直美、山縣 憲司、武川 寛樹、柳川 徹
2. 発表標題 口腔領域に転移した悪性腫瘍の3例
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山縣憲司、福澤智、内田文彦、佐藤牧子、寺田和浩、菅野直美、生井友農、廣昌広実、武川寛樹
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌患者の予後予測におけるweighted lymph node ratioの有用性
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福澤智、山縣憲司、高崎稜、武川幸太郎、飯坂慶人、寺田和浩、佐藤牧子、内田文彦、菅野直美、武川寛樹
2. 発表標題 口腔血管奇形に対するポリドカノール硬化療法の有効性と安全性について
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤石田玲衣, 山縣憲司, 佐藤智恵子, 寺田和浩, 飯坂慶人, 福澤智, 内田文彦, 菅野直美, 生井友農, 武川寛樹
2. 発表標題 薬剤関連性顎骨壊死stage2以上の患者における治療法選択に関する検討
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 綿引隆久, 岡田浩介, 正田純一
2. 発表標題 レドックスナノ粒子 (RNP) はp62およびNrf2遺伝子二重欠失マウス脂肪性肝炎の線維化を抑制する
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 綿引 隆久, 岡田 浩介, 正田 純一
2. 発表標題 レドックスナノ粒子 (RNP) は脂肪性肝炎モデルにおける肝線維化と発癌を抑制する
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

〔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	鈴木 英雄  (Suzuki Hideo)  (00400672)	筑波大学・医学医療系・准教授    (12102)	

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	磯辺 智範  (Isobe Tomonori)  (70383643)	筑波大学・医学医療系・教授    (12102)	
研究分担者	内田 文彦  (Uchida Fumihiko)  (70736008)	筑波大学・医学医療系・講師    (12102)	
研究分担者	岡田 浩介  (Okada Kosuke)  (80757526)	筑波大学・附属病院・病院講師    (12102)	
研究分担者	正田 純一  (Shoda Junichi)  (90241827)	筑波大学・医学医療系・客員教授    (12102)	

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