

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月14日現在

機関番号：	15501
研究種目：	挑戦的萌芽研究
研究期間：	2011～2012
課題番号：	23659398
研究課題名（和文）	体内時計による肝再生、脂肪化の制御に対する時間治療法の開発への基盤研究
研究課題名（英文）	Basic research for chronotherapy focused on liver regeneration and liver steatosis by circadian clock
研究代表者	
	寺井 崇二 (TERAI SHUJI)
	山口大学・大学院医学系研究科・准教授
	研究者番号：00332809

研究成果の概要（和文）：高脂肪食投与群ではNASHの誘導が示唆されると共に、高脂肪食投与群においては光刺激により有意なメダカNASの増加が見られた。メダカにおいて光刺激により体内時計遺伝子の変化も明らかになった。また本研究過程においてオクラホマ大学グループとの共同研究によりメダカNASHモデルは、肥満症に伴う糖尿病性腎症を起こしていることが新たに明らかになりメダカモデルはメタボリックシンドロームに関連する糖尿病性腎症のモデルになることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Medaka with HFD showed high NASH activity score (NAS), suggesting that circadian rhythm change is related to NASH progression. The light system is closely related with chronic inflammation by light stimulation. Collaboration with Oklahoma university, we found that NASH medaka developed diabetic nephropathy. These data showed medaka fish model is useful to analyze the mechanism of NASH and nephropathy and to develop a new chronotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：肝臓病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、消化器内科学

キーワード：NASH、肝障害、サーカディアンリズム

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) はアルコール多飲歴がなく生じる脂肪性肝疾患の総称で、メタボリックシンドロームの肝における表現型であり、肥満、糖尿病、脂質異常症と深く関連する。近年、世界規模で NAFLD 患者が

増加しており、アメリカでは肝障害の原因として最も一般的であり、人口の約 30%が罹患していると推定されている。NAFLD は①非進行性の単純性脂肪肝と、②炎症や肝細胞の風船様変性 (ballooning degeneration)、線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) に大

別される。NASH は飲酒歴がほとんどないにもかかわらずアルコール性肝障害に類似した肝組織像を呈し、線維化や肝硬変へと進展する肝疾患である。NASH では肝臓への脂肪沈着が起こると共にマクロファージなどの炎症細胞の浸潤が誘導された結果、線維化が進展していく。さらに肝硬変、肝線維化進行とともに肝発がん率が増加する事も知られている。

2. 研究の目的

NASH はメタボリックシンドロームの一つであるため、活動時間などのライフスタイルとも密接に関連する。実際、マウスの体内時計遺伝子を欠損させるなどしてサーカディアンリズムを変調させることにより、NASH が悪化することが報告されている。これらの報告は NASH とサーカディアンリズムの関連性を理解、解析する上で非常に重要であるが、解析のための有用なモデルはない。メダカなどの小型魚類は、概日リズムの光同調が知られており、光刺激により体内時計を容易に変調させることが可能である。そこで本研究ではメダカ NASH モデルを使って、サーカディアンリズムと NASH の誘導との関係を解析するための新たなモデル系の構築を目標として実験を行った。

3. 研究の方法

メダカ及び飼育方法

メダカは2~3カ月齢の cab メダカを使用し、山口大学の動物使用に関する規則等に則り適正に飼育、繁殖した。メダカは12時間周期の明暗サイクル下、26℃で飼育し、餌としてクレスト社製の配合飼料（1g あたり 3,3kcal、脂質 25,3%、蛋白質 62,5%、炭水化物 13,8%）を投与して飼育した。

光照射及び NASH 誘導食の投与

午前3時から4時の間の1時間光照射を行った。NASH 誘導群では HFD と EPA 欠損食を与えた。HFD のエネルギー含有量は 1g あたり 5,1kcal、脂質 56,7%、蛋白質 20,1%、炭水化物 23,2%である。

肝臓の採取と組織化学染色

光照射及び NASH 誘導食の投与後メダカを犠牲化し、肛門口からえらまで開腹し肝臓を採取した。肝臓を 4%PFA で固定し、パラフィン包埋後に薄切し HE 染色、Diastase periodic acid schiff (D-PAS)染色を行った。また、PFA 固定後の肝臓を OCT コンパウンド (Sakura Tech) で包埋し凍結切片を作成して Oil Red O 染色も行った。

メダカ NASH Activity Acore (NAS)

メダカにおける NASH の定量化のために、桑代らの方法を参考にしてメダカの肝臓における脂肪変性 (Steatosis)、肝細胞の風船用変性 (Ballooning)、炎症 (inflammation) の3つを指標にメダカ N を測定した。

4. 研究成果

短期間モデルにおけるメダカ NASH の解析

当研究室において確立したメダカ NASH モデルは8~12週間程度の長期間にわたり高脂肪食や EPA 欠損食を投与することによりメダカにおいて NASH を誘導するモデルである。サーカディアンリズムの変調は多くの場合、肝臓の脂肪沈着や NAFLD/NASH を増悪化させる方向に働くため、今回行う光刺激でも同様の傾向が期待される。そこで、初めに、脂肪沈着及び肝変性が軽微であることが予測される早い時期において光刺激が NASH に関与するかを解析した。

生体 Cab メダカに高脂肪食あるいは EPA

欠損食を投与し、午前3時から4時にかけて光刺激を行いサーカディアンリズムの変調を誘導した。各実験条件で3日目と7日目に肝臓を採取し、計12群でHE染色及びD-PAS染色を行ってメダカNASを数値化した。3日目、7日目の両日数のすべての実験群において、Steatosisの多少の増加は見られたが、肝実質細胞のBallooningやD-PAS染色陽性で確認される免疫担当細胞の肝臓への浸潤の程度は軽微であった。このことからNASHの発症が軽微であることが示唆された。また、それぞれの群においてメダカNASの平均値を出し、光照射の有無による有意差検定を行ったところ、実験開始3日目においては有意な差は観察されなかったが、実験開始7日目では、通常餌投与群において有意に光刺激によってメダカNASが上昇していた。さらに、EPA欠損食と高脂肪食においても有意ではないがメダカNASの上昇傾向が明らかになった。

各実験群においてOil Red O染色により肝臓の脂肪沈着を解析した。実験開始3日目のメダカにおいて、EPA欠損食及び高脂肪食投与群において脂肪沈着の増加傾向がみられたが、光刺激による影響は確認できなかった。実験開始7日間では、EPA欠損食投与群における脂肪沈着の増加は明確に認められたが、高脂肪食投与群における脂肪沈着は認められず、さらに光刺激による脂肪沈着の変化も確認できなかった。

長期投与モデルにおけるメダカNASHの解析

短期間モデルにおいては光刺激による肝臓への影響が明瞭ではなかったため、次に長期間高脂肪食を投与したモデル系において、光刺激がNASHに関与するかを解析した。12週間の高脂肪食および光刺激の後、短期間

モデルの場合と同様にHE染色及びD-PAS染色を行いメダカNASを計測しグラフ化した。その結果、高脂肪食投与群ではメダカNASが上昇していることからNASHの誘導が示唆されると共に、高脂肪食投与群においては光刺激により有意なメダカNASの増加が見られた。この結果は光刺激による変化に伴う影響は慢性的な炎症刺激としてメダカNASHの病態に影響を与える可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

①Medaka fish, *Oryzias latipes*, as a model for human obesity-related glomerulopathy. Ichimura K, Kawashima Y, Nakamura T, Powell R, Hidoh Y, Terai S, Sakaida I, Kodera Y, Tsuji T, Ma JX, Sakai T, Matsumoto H, Obara T. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Feb 22;431(4):712-7. 査読有

②Ezetimibe reduces fatty acid quantity in liver and decreased inflammatory cell infiltration and improved NASH in medaka model. Oishi T, Terai S, Kuwashiro S, Fujisawa K, Matsumoto T, Nishina H, Sakaida I. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 May 25;422(1):22-7. 査読有

[学会発表] (計1件)

①寺井 崇二. メダカおよびマウスを用いた非アルコール性脂肪肝炎の病態研究および薬物スクリーニング. 第60回日本実験動物学会総会シンポジウム (複数のリソースを効

率的に用いた研究への招待 NBRP 実験動物リソースシンポジウム) .2013 年 05 月 15 日. つくば国際会議場 (茨城)

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺井 崇二 (TERAI SHUJI)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号 : 00332809

(2)研究分担者

山本 直樹 (YAMAMOTO NAOKI)
山口大学・大学教育機構・講師
研究者番号 : 90448283

高見 太郎 (TAKAMI TARO)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号 : 60511251

藤澤 浩一 (FUJISAWA KOICHI)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号 : 00448284

坂井田 功 (SAKAIDA ISAO)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 80263763