

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860525

研究課題名(和文) STAMマウスを用いた腸粘膜バリアー機能改善によるNASH進展阻止の試み

研究課題名(英文) Prevention of NASH progression by improvement of intestinal mucosal barrier function using STAM mice

研究代表者

本田 穰 (Honda, Yutaka)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：20643547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は糖尿病を背景に脂肪肝を発症し、炎症や肝線維化を経て肝硬変に至るとともに肝癌の発症母地となる。我々は糖尿病を背景に高脂肪食投与により脂肪肝からNASH、肝硬変を経て肝癌を発症する新しい動物モデル(STAMマウス)を作成し、腸管粘膜バリアー機能低下がNASH増悪因子となるか解析した。STAMマウスの腸上皮および肝臓における細胞間接着分子の発現は、脂肪肝の状態ではZo-1が有意に低下したが、NASHになるとclaudin1, occludin, connexin43の発現が増加傾向を示し、NASHの進展に腸管連関が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic steatohepatitis(NASH) is associated with diabetes, and progresses from fatty liver to steatohepatitis, liver fibrosis, and finally to liver cirrhosis. It is also related to hepatocellular carcinoma(HCC). Recently, impaired mucosal barrier function is considered as a disease-progression factor for NASH.

We have developed a new animal model of NASH (STAM mouse), in which all the model mice show NASH, and progress to fibrosis, following development of multiple HCC later. Using this STAM mice, we analyzed expression level of several tight junction proteins in both colon and liver. Real time PCR analysis for both colon and liver showed the elevation of mRNA of Zo-1 in the phase of fatty liver, and decrease of mRNAs of claudin 1, occludin, and connexin 43, in the NASH phase, suggesting that impaired mucosal barrier function might contribute to the progression of NASH from fatty liver to NASH, fibrosis, cirrhosis, and finally to HCC.

研究分野：消化器内科学

キーワード：NASH タイトジャンクション 腸粘膜バリアー STAMマウス

### 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease) は単純性脂肪肝と炎症を伴う非アルコール性脂肪肝炎 (NASH: non-alcoholic steatohepatitis) に分類される。肥満やメタボリックシンドローム人口の増加が近年本邦でも社会問題となっており、これに伴い NAFLD、NASH の罹患人口が増加している。ことに NASH が注目されている理由は、NASH が糖尿病を背景に脂肪肝を発症し、炎症や肝線維化を経て肝硬変に至ることと、さらに NASH が肝癌の発症母地となることである。現在 NASH の進展に関しては two hits theory (Day CP, James OFW, Gastroenterol 1998) が有名であるが、NASH の自然史における NASH から潜在性肝硬変、肝細胞癌への移行進展増悪メカニズムはすべて解明されたわけではなく、NASH の進展阻止治療法も確立していない。

#### 【新しい NASH-肝癌動物モデル STAM マウスの開発】

NASH から肝癌への進展機構を解析する方法の有力な武器に動物実験モデルの開発がある。

既存の NASH・肝線維化モデルを見ると NASH モデルには遺伝子変異マウスである ob/ob マウス、db/db マウス、および特殊飼料 (コリン欠乏食、コリン・メチオニン欠乏食) 投与モデルがあるが、前者では肝線維化が発症しないこと、後者では肝線維化の発症にばらつきがみられるという問題点が存在する。肝硬変モデルには薬剤(四塩化炭素、チオアセトアミド)投与モデル、胆管結紮モデルが知られているが、これらのモデルでは NASH をベースとした線維化は生じない。最近報告されたメラノコルチン 4 型受容体欠損マウスに高脂肪食を負荷する NASH モデルは肥満を背景として NASH を発症し肝癌まで発生する点で画期的である。しかし NASH 様肝病変を発症するまでに 20 週、肝癌発生まで 1 年を要する点が NASH 研究のツールとしてネックであった (Ito M et al, Am J Pathol 2011)。以上のように NASH-肝癌進展機構を解析し治療法を開発するためには既存の動物実験モデルには適したものが存在していなかった。

そこで申請者らはステリック再生医科学研究所と共同で 1 型糖尿病を背景に高脂肪食投与により脂肪肝から NASH、肝硬変を経て肝癌を発症する新しい動物モデル (STAM マウス) を作成した。

STAM マウスでは脂肪肝から NASH (脂肪肝炎および線維化)、結節性病変、肝癌へと進行し、ヒト NASH と同じ病態進行を示す。脂肪肝発症率は 6 週で 100% であり、脂肪肝か

ら NASH 進行に 2 週間、NASH から結節性病変まで 2 週間、肝癌発症までに 6 週間、合計 16 週と短期間で病態を形成する (Fujii M et al, Med Mol Morphol 2012 *in press*)。このように STAM マウスは全経過 16 週という短期間で 100% の頻度で NASH 様肝病変から肝細胞癌まで発症する点において、既存の NASH モデルと一線を画し、NASH 病態解明や創薬領域において、研究期間、研究労力・コスト削減に大いに貢献する。

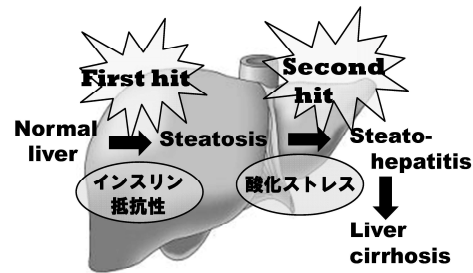


図1. NASHの病因論-Two hits theory

### 2. 研究の目的

#### NASH 進展における腸・肝連関

NASH 進展に関して two hits theory が想定されているように、腸管細菌叢の菌体成分が腸管粘膜バリアーを越え門脈血流を介して肝臓に到達し、肝臓類洞壁細胞のクッパー細胞や星細胞などに作用することが second hits となり肝炎、肝線維化へ進行する重要な因子とみなされている。また、NASH 患者の腸管粘膜バリアー機能の低下、特に細胞間ジャンクション蛋白発現の低下が報告されており、腸管細菌叢の NASH 進展への関連が示されている。最近、低濃度 DSS を高脂肪食誘発 NASH マウスに与え腸管粘膜バリアー機能を低下させると NASH の肝線維化が進行したとの報告があり、NASH における腸・肝連関が注目されている (Gabele et al, J Hepatol 2011)。以上より NASH 進展において腸粘膜バリアー機能低下と NASH 進展が密接に関連していることは明白である。一方、腸粘膜バリアー機能低下が NASH における肝癌発症にも直接影響を及ぼしていることは容易に想像されるが、これまでのところそれを証明した研究はないので、本研究では NASH 進展に腸粘膜バリアー機能の低下が関与しているかを検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

【検討項目: STAM マウスの腸管粘膜バリアー機能の低下を腸上皮の細胞間接着分子 (Tight Junction Proteins) の発現解析から検証する。】

NASH 患者においては Tight Junction

proteins の発現低下がみられ粘膜バリアー機能が低下することで腸粘膜の透過性が亢進することが報告されている(Miele L et al, Hepatology 2009)。

NASH の病因論に Two hits theory があるが、第一段階(first hit)で単純性脂肪肝が成立し、それに種々の要因が加わり(second hit)、炎症性細胞浸潤、肝細胞の変性・壊死が生じ NASH が成立するというものである(Day CP, James OFW. Gastroenterology 1998)(図 1)。First hit としては肥満、2 型糖尿病、高脂血症などのメタボリック症候群が考えられている。Second hit として炎症性サイトカイン、酸化ストレスなどがあるが、これら因子は腸管細菌叢由来の LPS などが門脈血中を介して肝臓に到達することでもたらされる。

すなわち、腸管粘膜バリアー機能が低下することは second hit を増加させることに直結している。したがってヒト NASH の病態において見られたと同様の腸管粘膜バリアー機能低下が STAM マウスでも見られることを確認しておくことは重要である。

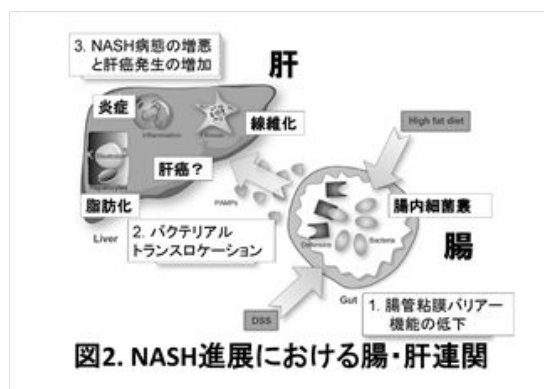
上記検討項目を達成する具体的な解析方法として、

STAM マウスの作成：生後 2 日目の B6 マウスに低濃度 Streptozocin を皮下注射し 1 型糖尿病を惹起し、生後 4 週より高脂肪食を与えることで STAM マウスを作製する。

STAM マウスの肝臓・大腸を経時的に 6 週、8 週、10 週、16 週に取出し、病理組織学的解析を行い NASH の進展と大腸の変化を把握する。肝の線維化面積は画像解析で定量解析する。

上記、大腸標本に PAS 染色を行い、腸管粘膜バリアーの重要な因子である粘液と粘液産生杯細胞の数量的変化を解析する。上記、肝臓、大腸標本に免疫蛍光抗体法にて Tight Junction proteins の発現を経時的に解析する。

上記、肝臓、大腸標本から mRNA を抽出し、定量 PCR にて各種サイトカイン、Tight Junction proteins の発現を mRNA レベルで解析する。また肝臓においては NASH の進行に伴う procollagen, HSP47 など線維化関連マーカー分子の発現も解析する。



#### 4. 研究成果

腸管粘膜バリアー機能の指標として細胞間接着因子の Zo-1、claudin1、occludin、connexin43 の mRNA 発現を、STAM マウスの大腸と肝臓において real time PCR にて解析した。STAM マウスは 6 週齢の脂肪肝状態と、10 週齢の NASH 状態で比較した。結果として脂肪肝状態で Zo-1 の発現の有意低下と、NASH 状態での claudin1、occludin、connexin43 の発現増加を認めた。免疫蛍光法で腸上皮におけるこれら接着分子の発現の解析を試みたが有意差を得られなかった。

#### 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 1 件)

Fujii M, Shibasaki Y, Wakamatsu K, Honda Y, Kawauchi Y, Suzuki K, Arumugam S, Watanabe K, Ichida T, Asakura H, Yoneyama H, A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma, Med Mol Morphol, 査読有, vol 46, 2013, pp 141-152.

[学会発表](計 1 件)

Suzuki K, Yokoyama J, Kawauchi Y, Honda Y, Asakura H, Okazaki K, Suzuki Y, Sameshima Y, Fukushima T, Fujii M, Hashiguchi T, Mizumoto S, Sugahara K, Yoneyama H., Endoscopic submucosal injection of a synthesized anti-CHST15 dsRNA for sulfated glycosaminoglycan is a safe and beneficial treatment for patients with Crohn's disease who do not respond sufficiently to the conventional treatment, 2015 DDW, Chicago, 2014 May 4, Chicago, IL, USA.

[図書](計 2 件)

Suzuki K, Nagata M, Kawase T, Uematsu K, Honda Y, Kawauchi Y, Yokoyama J, Arumugam S, Thandavarayan RA, Yoneyama H, Watanabe K, Asakura H., Nova Science Publishers, Inc., Vimentin: Concepts and molecular mechanisms, 2013, 170. Suzuki K, Nagata M, Kawase T, Uematsu K, Honda Y, Kawauchi Y, Yokoyama J, Arumugam S, Thandavarayan RA, Yoneyama H, Watanabe K, Asakura H., Nova Science Publishers, Inc., Mast cells. Phenotypic features, biological functions and role in immunity, 2013, 301.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

本田 穰 (HONDA YUTAKA )  
新潟大学・医歯学総合病院・医員  
研究者番号：20643547

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：