

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861059

研究課題名(和文) S1P, アデノシン, トロンボポエチンを用いたNASHの線維化抑制治療の開発

研究課題名(英文) The development of treatments for suppression of liver fibrosis in the NASH by S1P, adenosine and thrombopoietin

研究代表者

久倉 勝治 (Hisakura, Katsuji)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：60550168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は増加傾向であるが発症機序は不明な点が多く、有効な治療法はない。これは適したNASHモデル動物が乏しいことが一因である。我々はNASH研究の発展のために、新規NASHモデル動物の作成を試みた。肝臓X受容体作動薬と四塩化炭素の併用投与によりヒトNASHに特徴的な病理組織像を呈するモデルの作成が可能となった。本モデルはインスリン抵抗性を有しており、既存の飢餓モデルに比べより優れたモデルと考える。

研究成果の概要(英文)：Recently, non-alcoholic steatohepatitis has been increasingly, however, the pathogenesis remains largely unknown and there is almost no effective treatment. This is contribute to absent of suitable model. We tried to create of novel animal model of NASH for development of basic study of NASH. We established a novel mouse model which reflect hepatic histopathology of human NASH by administration of Liver X receptor activator and carbon tetrachloride. We think that this model is more superior than existing fasting model which used widely for basic study of NASH because this model has insulin resistance.

研究分野：医歯薬学

キーワード：NASH 肝臓X受容体 インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

近年、メタボリックシンドロームの罹患率の増加が社会的問題となっている。メタボリックシンドロームの肝臓での表現型は脂肪肝であり、非飲酒者での脂肪性肝疾患を非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) と呼ぶ。NAFLD には単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) が含まれ、単純性脂肪肝の約 10% が NASH に進行する。NASH が単純性脂肪肝と大きく異なる点は、肝炎や肝の線維化が存在することである。NASH の病理学的特徴は肝細胞の大滴性脂肪沈着 (steatosis)、肝細胞の変性・壊死 (ballooning)、門脈域のリンパ球浸潤 (inflammation) が見られ、その結果として小葉内に線維化 (fibrosis) を呈することである。海外では、重篤な慢性・急性肝疾患に対する有効的な治療として脳死後臓器提供による肝移植療法が一般的であるが、本邦ではドナー不足による困難な状況で、生体部分肝移植が健康なドナーの犠牲の上に行われている現状を鑑みると、NAFLD・NASH に対し容易に享受できる治療法の開発が社会的な急務である。

これまでに NASH の病態機序の解明と薬物治療開発のために、栄養学的知見に基づき開発された病態モデルはいずれも単純性脂肪肝に過ぎない。中でも、汎用されているメチオニン又はコリン欠乏飼料または高脂肪および高糖質成分の飼料を与え開発されたモデル動物の肝臓の病理組織学的特徴はいずれも単純性脂肪肝あるいは肝炎の段階に止まり著しい線維化は認められず、脂肪性肝炎から肝線維化への進行性が高い NASH の病態に近似するものではない。我々はメタボリックシンドロームの病態の基礎には脂肪組織における炎症状態や、それに伴うインスリン抵抗性が関連していることから、インスリン抵抗性を惹起することで NASH モデルの作成が必要であると考え、メタボリックシンドロームの病態に基づき、インスリン抵抗性を有し、病理組織学的にヒト NASH に類似する組織像を呈するモデル動物の作成が必要と考えた。

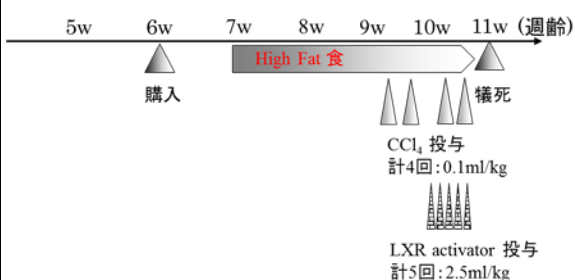
2. 研究の目的

NASH の発症機序は不明な点が多く、現状では有効な治療法はない。これはヒト NASH の病態を反映する動物モデルが乏しく、NASH 研究の障壁となっていることが一要因である。肝臓 X 受容体作動薬 (Liver X Receptor activator : LXRA) はアテローム性動脈硬化症等の治療薬剤であるが、その副作用で脂肪肝を来することが知られている。我々は、LXRA の副作用に着目し、LXRA および四塩化炭素 (CCl₄) を併用投与することでのヒト NASH に類似した新規 NASH モデル動物の作成を試み、さらに NASH に対する新規治療法の開発を目的とし研究を施行した。

3. 研究の方法

本研究ではメタボリックシンドロームの病態の基礎にあるインスリン抵抗性に着目し、高脂肪食 (60kcal%fat) を給餌したマウスに、LXRα である T0901317、及び肝線維化を促進する CCl₄ を投与することで、モデル動物の作成を行う。7 週齢の C57BL/6J 雄性 mice に高脂肪食 (60%kcal%fat) を 4 週間給餌する。最後の 2 週間で CCl₄ 0.1ml/kg/回を計 4 回、T0901317 (LXRα) 2.5ml/kg/回を計 5 回投与する (Figure 1)。実験群を HF 群 (control 群), HF+CCl₄ 群 (CCl₄ 群), HF+LXRα 群 (LXRα 群), HF+CCl₄+LXRα 群 (NASH 群) の 4 群に分け比較検討した (各 n=5)。

Figure 1 新規NASHモデル作成方法



検討項目

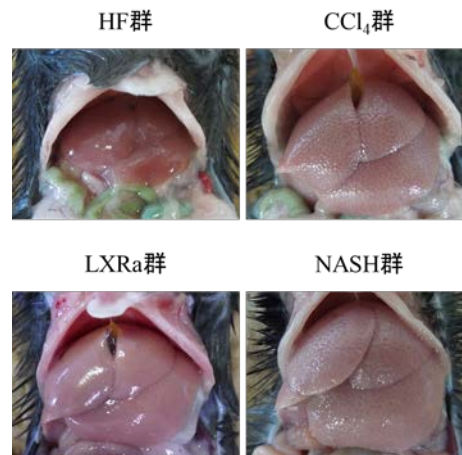
- ・体重変化、肝体重比
- ・血清 AST、ALT、TG
- ・血清 TNF α 、IL-6
- ・肝臓 Real time PCR:srebp-1c、fas、Apo-B
- ・インスリン負荷試験
- ・組織学的検査：Hematoxylin-Eosin 染色、Masson trichrome 染色、Oil red O 染色

4. 研究成果

□肝肉眼所見

NASH 群において表面粗造で白色調の肉眼所見を呈した (Figure 2)。

Figure 2 肝の肉眼所見



□体重および肝体重比

体重増加率は control 群である HF 群に対し全群で増加しており、肝体重比は NASH 群で有意に上昇していた (Figure 3、4)。

Figure 3 体重変化 (g)

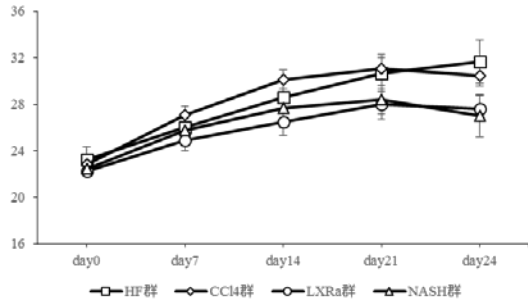
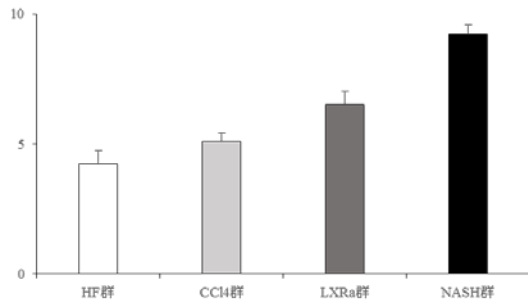


Figure 4 肝体重比 (%)



□生化学検査

生化学検査では CCl4 単剤投与群に対し、CCl4 および T0901317 併用投与群である NASH 群において、AST/ALT/TG が有意に上昇しており NASH 群における肝障害、高脂血症が示された (Figure 5a-c)。

Figure 5a AST

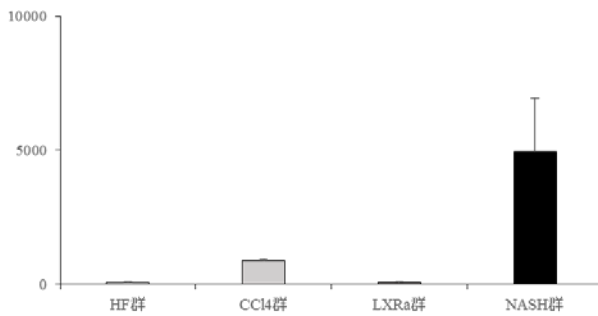


Figure 5b ALT

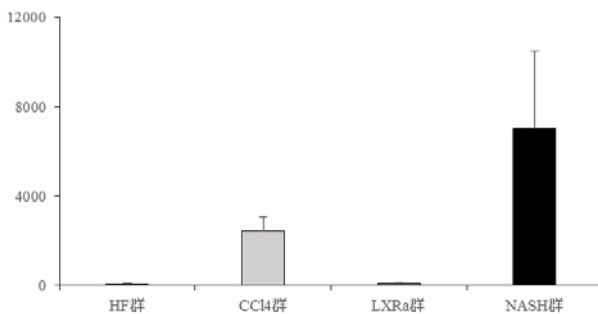
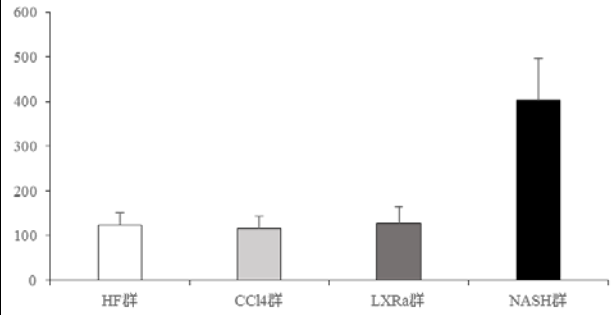


Figure 5c TG



□Real time PCR

Real time PCR では LXRa 群、NASH 群で脂質合成に関与する SREBP-1c、fas の有意な上昇を認めた。また、NASH 群で脂質代謝に関与するアポリポタンパク質である ApoB100 の有意な低下を認めた (Figure 6a-c)。

Figure 6a mRNA expression of srebp-1c/GAPDH

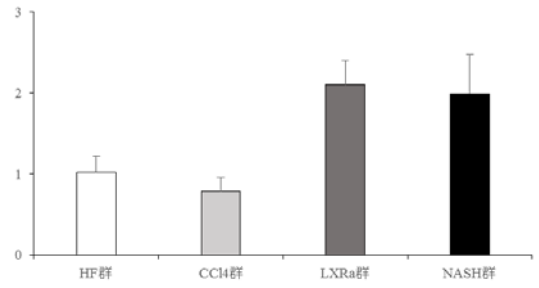


Figure 6b mRNA expression of fas/GAPDH

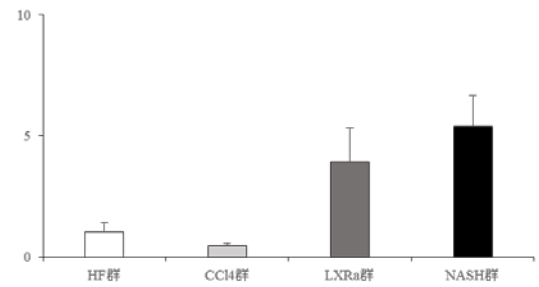
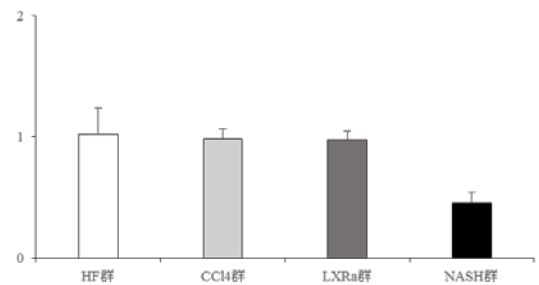
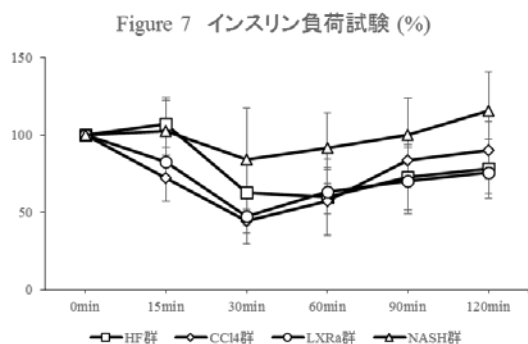


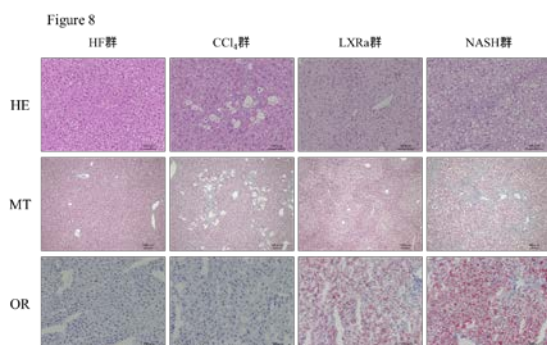
Figure 6c mRNA expression of ApoB/GAPDH



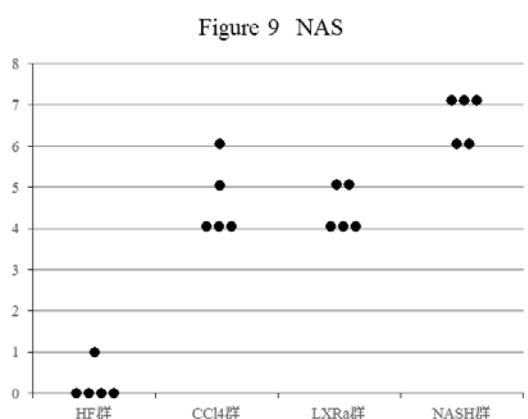
□インスリン抵抗性
 インスリン負荷試験では NASH 群でインスリン抵抗性を認めた (Figure 7)。



□組織学的評価
 組織学的評価では NASH 群においてヒト NASH に特徴的な肝細胞風船化, 大滴性脂肪滴沈着, 炎症細胞浸潤, bridging fibrosis の所見を認めた (Figure 8)。



□NAFLD Activity Score
 NAFLD Activity Score (NAS) による評価では NASH 群は平均 6.6 で 5 匹全てが NASH の診断基準を満たした (Figure 9)。



これまで NASH モデルといわれてきたモデルは、様々なモデルを認めていたが、ヒト NASH の病理組織に類似したモデル報告は少なく、また作成に長期間の時間 (24w-60w 程度) が必要であった。新規 NASH モデルはこれまでの飢餓モデル等とは違い体重減少を認めず、またインスリン抵抗性を認めておりよ

りヒト NASH に近い有効なモデルであると考えられた。

脂肪合成能の上昇および脂質輸送能の低下から著明な脂肪肝を認め、炎症細胞の浸潤も認めることから、ヒト NASH の組織学的特徴を認めており NASH の病態を反映したモデルであると考えられた。

しかし、新規 NASH モデルのみで認められた ApoB100 の有意な低下やインスリン抵抗性など、種々の因子による何らかの相互作用による機序が示唆されるが、現状ではそのメカニズムの解明までには至っていない。

今後、本モデル動物の癌化を含め、NASH 発症機序の解明を施行し、NASH に対する新規治療法の開発を継続していく予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① 大和田洋平, 田村孝史, 田野井智倫, 久倉勝治, 松坂賢, 島野仁, 大河内信弘. 肝臓 X 受容体に着目した新規 NASH モデル動物の開発, 第 102 回日本消化器病学会, 2016 年 4 月 22 日, 京王プラザホテル (東京都新宿区)

② 田村孝史, 大和田洋平, 田野井智倫, 久倉勝治, 大河内信弘. 肝臓 X 受容体に着目した新規 NASH モデル動物の開発, 第 22 回肝細胞研究会, 2015 年 6 月 4 日, 米子コンベンションセンター (鳥取県米子市)

③ 田野井智倫, 田村孝史, 大和田洋平, 久倉勝治, 高野恵輔, 福永潔, 大河内信弘. 肝臓 X 受容体作動薬及び四塩化炭素併用投与による新規 NASH モデル動物の開発, 2015 年 5 月 21 日, ホテル日航熊本 (熊本県熊本市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久倉 勝治 (HISAKURA, Katsuji)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号: 60550168