厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

血中自己抗体検出と新規炎症マーカーを用いた急性冠症候群予知因子
および治療標的の探索
―メタボリック・シンドロームにおける肝線維化と NRDc の関連―

研究分担者：妹尾　浩（京都大学大学院医学研究科　消化器内科学　講師）

研究要旨

循環器疾患、糖尿病などとリンクしたメタボリック・シンドロームのひとつとして、消化器領域では、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）が注目されている。NASH および続発する肝線維化（肝硬変）に果たす NRDc の意義を明らかにするために、平成２６年度は NRDc ノックアウトマウスを用いて、肝臓の炎症と線維化を検討した。コリン欠乏食および高脂肪食の投与により、野生型マウスでは肝臓の脂肪沈着、炎症と線維化を認めた。しかし NRDc の欠如により、肝臓に脂肪沈着を認めても炎症および線維化は生じなかった。これらの検討から、NRDc が NASH とそれに続発する肝硬変の病態に重要な役割を果たしていることが示唆された。

Ａ．研究目的

循環器疾患、糖尿病等の生活習慣病と密接な関連をもち、その一表現型として注目を集めている消化器疾患が、非アルコール性脂肪性肝炎（Non alcoholic steatohepatitis、以下 NASH）である。近年、Ｂ型肝炎やＣ型肝炎などのウイルス性肝炎は、診断および治療法の進歩により、その患者数は頭打ちになりつつある。ところが、健康診断や人間ドックにおいて指摘される肝機能異常者は増加傾向にあることが問題となっている。これら肝機能異常を示す健康診断、人間ドック受験者数の増加の主因として、NASH が大きな割合を占めると考えられている。実際、肥満のある４０歳以上の男性では約５０％に、女性では約２５％に脂肪肝を合併し、そのうち少なからぬ数が NASH を罹患しているとされる。そして、NASH およびそれに起因する肝硬変、肝細胞癌の発症は近年とくに頻度を増しつつあり、NASH に対する治療介入がない場合、５～１０年という比較的早い経過で５～２０％の患者が肝硬変へと進行し、さらに５年累計肝細胞癌の発症率は１１．３％に及ぶという。これらの疫学的事実に基づいて、NASH およびそれに続発する肝線維化の病態解明と治療、予防法の開発が待ち望まれている。

そこで研究分担者らは、NASH およびその進展状態である肝硬変の病態解明と新規治療、予防標的の探索を課題とした。炎症の制御に重要な役割を果たすナルディライジン（以下 NRDc）に着目し、平成２５年度には NASH 発症に NRDc が必要であることを、主にマウスモデルを用いて明らかにした。平成２６年度には、NASH に続発する肝線維化発症に、NRDc がどのような役割を果たすかを、遺伝子改変マウスを用いた実験を通じて解明することとした。

Ｂ．研究方法

野生型（WT）、および NRDc ノックアウト（KO）マウスに対して、NASH を生じさせるためにコリン欠乏食、高脂肪食、またはコントロール食を経口摂取させた。４、１２、２０週後に、各マウスから肝臓を採取し、組織学的、免疫組織学的検討を行った。また、肝線維化はシリウス・レッド染

色で評価した。さらに、collage I、collagen IV、TIMP、TGF-beta1、alpha-SMA など線維化進展にかかわる因子について、定量的 PCR 法で mRNA の定量を行った。

（倫理面への配慮）

平成２６年度には、遺伝子改変マウスを用いた前臨床研究を中心に行った。それに際して、組換え DNA 実験については、京都大学組換え DNA 実験安全委員会の承認を得たのち、「組換え DNA 実験指針」に基づいて実施した。動物実験に関しては、京都大学動物実験委員会の承認を得たのち、「動物の保護および管理に関する法律」、「実験動物の飼育および保管に関する基準」、「大学等における実験動物の通知」に準拠し、動物実験が適切かつ愛護的に行われるよう配慮した。したがって、本研究遂行にあたり、倫理面での問題はないものと判断した。

Ｃ．研究結果

コリン欠乏食を投与した WT マウスでは投与開始後４週から肝臓に脂肪が沈着し、１２、２０週と徐々に脂肪の沈着は増強した。また高脂肪食を投与した場合も、WT マウスでは経時的に肝臓への脂肪沈着を認め、投与開始後２０週で脂肪沈着は明らかとなった。コントロール食を投与した WT マウスでも同様に、経時的に軽度ながら脂肪沈着が増強したが、コリン欠乏食および高脂肪食に比べて軽度であった。一方、NRDc KO マウスでは、コリン欠乏食、高脂肪食ともに肝臓への脂肪沈着の程度はやや軽微であったが、やはり脂肪肝と判断し得た。肝臓中の中性脂肪を測定したところ、WT マウスでも NRDc KO マウスでも、コリン欠乏食、高脂肪食の投与により、組織像に比例して中性脂肪の増加を認めた。しかし、血清中の肝逸脱酵素（ALT）は、コリン欠乏食または高脂肪食を投与した WT マウスのみで上昇し、NRDc KO マウスでは上昇を認めなかった。なお、コントロール食を投与した群では、経過中 WT マウスでも NRDc KO マウスでも、ALT の上昇は認めなかった。引き続いて、肝線維化をシリウス・レッド染色で検討したところ、WT マウスではコリン欠乏食では投与開始後１２週、２０週と徐々に肝線維化が増強し、高脂肪食では投与開始後２０週目に肝線維化を認めた。なお、コントロール食を投与した群では、とくに肝線維化は認めなかった。さらに、collage I、collagen IV、TIMP、TGF-beta1、alpha-SMA など線維化進展にかかわる因子についても mRNA の定量を行ったところ、WT マウスではコリン欠乏食で経時的に、高脂肪食で投与開始後２０週目にすべての因子の mRNA の上昇を認めた。それに対して NRDc KO マウスでは、シリウス・レッド染色による組織学的な肝線維化、および線維化マーカーmRNA の上昇を全く認めなかった。

Ｄ．考察

NASH モデルとしてよく用いられるコリン欠乏食に加えて高脂肪食の投与によっても、WT マウスおよび NRDc KO マウスの肝臓には脂肪沈着を認め、両食餌負荷はヒトの脂肪肝を良く再現するモデルと考えられた。しかし、NRDc KO マウスでは、コリン欠乏食および高脂肪食の投与によっても、肝組織中に脂肪滴の沈着を認めながら、血清中の肝逸脱酵素が上昇しなかったことから、NRDc の欠如により、単純性脂肪肝は生じても NASH に至らないことが示された。さらに、近年臨床的重要性を増している NASH に続発する肝線維化の進展に関しても、コリン欠乏食および高脂肪食の投与により、NRDc が欠如している場合はまったく線維化が生じないことが明らかとなった。

NASH の臨床上の問題点は、冒頭でも触れたように、今後中長期的にはウイルス性肝炎にかわって、肝硬変、肝細胞癌のもっとも主要な原因になることが予想されることである。このように NRDc が NASH と肝線維化の双方の進展

に決定的な役割を果たし、NRDc の欠損により、ほぼ完全に NASH と肝線維化が抑制されたことは注目に値する。研究分担者らは、NRDc が代表的な炎症性サイトカイン TNF-alpha のシェッディングを介して肝臓の炎症を制御することを平成２５年度の研究によって示した。それに引き続き、平成２６年度には NRDc が肝線維化もきわめて明瞭に制御する因子であることを示すことができた。今後は、これらふたつの知見を統合、展開していくことによって、新たな国民病の治療法を開発し、またその発症、増加を予防する方策作りに貢献すべきと考える。

Ｅ．結論

コリン欠乏食投与、高脂肪食負荷によるマウス実験は、ヒト脂肪肝および NASH を良く再現するモデルであることが確認された。NRDc の欠如によって、単純性脂肪肝は生じても NASH を生じなかったことから、NRDc は NASH の病態に極めて重要な役割を果たすことが示唆された。さらに、NRDc の欠如によって、肝線維化も全く生じなかったことは、NASH に続発する肝線維化（肝硬変）の病態解明の一助となるとともに、新たなメタボリック・シンドロームの治療、予防標的としての NRDc の可能性を示唆すると思われた。

Ｆ．研究発表

１．論文発表

1. Matsumoto Y, Matsukawa H, Seno H, Ono S. Breast cancer metastasis to the esophagus diagnosed using endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration. ***J Gastroenterol Hepatol.*** 2015 Feb;30(2):233.
2. Ikuta K, Umeda M, Seno H. Esophageal ulcer due to lymphoma. ***Intern Med.*** 2014;53(22):2649-50.
3. Kimura Y, Seno H, Matsumoto Y, Yamashita Y. Primary splenic angiosarcoma. ***Intern Med.*** 2014;53(15):1717-9.
4. 4. Ishizu-Higashi S, Seno H, Nishi E, Matsumoto Y, Ikuta K, Tsuda M, Kimura Y, Takada Y, Kimura Y, Nakanishi Y, Kanda K, Komekado H, Chiba T. Deletion of nardilysin prevents the development of steatohepatitis and liver fibrosis. ***PLoS One.*** 2014 May 21;9(5):e98017.
5. Kimura Y, Seno H, Ono S. A case of acute necrotizing esophagitis. ***Gastrointest Endosc.*** 2014 Sep;80(3):525-6.
6. Ikuta K, Seno H, Chiba T. Molecular changes leading to gastric cancer: a suggestion from rare-type gastric tumors with GNAS mutations. ***Gastroenterology.*** 2014 May;146(5):1417-8.
7. 妹尾浩、上尾太郎、中西祐貴、千葉勉. 大腸がん幹細胞に特異的な因子がもつ可能性. がん分子標的治療 12, 52-56, 2014.
8. 妹尾浩．消化管におけるがんの微小環境と幹細胞の研究．最新医学 69, 120-125, 2014.
9. 妹尾浩、千葉勉．癌幹細胞を特定するマーカーの可能性．医学のあゆみ 284, 863-864, 2014.

2．学会発表

1. Seno H, Kanda K, Nishi E, Chiba T. The role of Nardilysin in intestinal tumorigenesis. The 4th symposium on TGF-beta family and cancer, January, 12, 2015, Tsukuba, Japan.
2. Seno H. The role of Dclk1-positive cells in digestive organ tumors. 4th Global Cancer Genomics Consortium, November, 14, 2014, Kyoto, Japan.
3. Seno H. Dclk1, a specific marker for cancer stem cells that does not mark normal stem cells. iPS and Stem Cells in Cancer

Research, April, 17, 2014, Kyoto, Japan.

4. 妹尾浩、丸野貴久、山賀雄一、中西祐貴、福田晃久、千葉勉. 細胞系譜解析を用いた消化器腫瘍幹細胞の検討. 第 14 回日本再生医療学会総会 2015.3. 横浜
5. 妹尾浩. 細胞系譜解析が示す消化器がん幹細胞マーカーの可能性. 愛知県がんセンター特別招聘セミナー 2015.2.6 名古屋
6. 妹尾浩. 消化器腫瘍モデルにおける DCLK1 陽性細胞の意義. 平成 26 年度がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動冬期公開シンポジウム 2015.1.28 東京
7. 妹尾浩. 大腸腫瘍幹細胞を標的とした新規治療法の可能性. がん医療研修機構 第 17 回オンコロジーセミナー 2014.11.15 東京
8. 妹尾浩. 消化器癌モデルマウスにおける癌幹細胞マーカーの意義. 第8回In vivo実験医学シンポジウム 2014.11.13 東京
9. 妹尾浩. 消化器癌モデルマウスにおける Dclk1 陽性細胞の役割. 第 1 回六甲医学研究会 2014.11.8 神戸
10. 妹尾浩、丸野貴久、山賀雄一、吉岡拓人、中西祐貴、千葉勉. Role of Dclk1-expressing cells in digestive organ tumors. 第 73 回日本癌学会学術総会 コアシンポジウム１ Reprograming and transdifferentiation in cancer 2014.9.26 横浜
11. 丸野貴久、福田晃久、妹尾浩、千葉勉. 膵腫瘍幹細胞マーカーの探索. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014.9.26 横浜 パシフィコ横浜
12. 山賀雄一、妹尾浩、千葉勉. Microarray analysis of Dclk1-positive cells in ApcMin mouse polyps. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014.9.25 横浜
13. 妹尾浩、中西祐貴、千葉勉. Dclk1, a specific marker for tumor stem cells in digestive organs. 癌治療の未来 消化器癌幹細胞研究と最新の知見 第 52 回日本癌治療学会学術集会 高松宮妃癌研究基金共催国際シンポジウム 2014.8.28 横浜
14. 妹尾浩. がん幹細胞を標的とした新しいがん治療の可能性. 第２回生命医科学コロキウム 2014.6.27 草津
15. 千葉勉、中西祐貴、妹尾浩. マウスモデルを用いた大腸がん幹細胞マーカーDclk1の同定. 第 100 回日本消化器病学会総会 シンポジウム 2014.4.25 東京

Ｇ．知的所有権の取得状況

１．特許取得

該当なし

２．実用新案登録

該当なし

３．その他

該当なし