慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	実験用途に応じたNASH肝癌メダカ・マウス・ブタモデルの作成と予防・治療法の開発
Sub Title	Development of a novel animal model of hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis
Author	相浦, 浩一(Aiura, Koichi) 板野, 理(Itano, Osamu) 北郷, 実(Kitagō, Minoru) 松田, 祐子(Matsuda, Sachiko) 大西, 彰(Onishi, Akira) 小島, 美咲(Kojima, Misaki) 谷口, 善仁(Taniguchi, Yoshihito) 吉浦, 康寿(Yoshiura, Yasutoshi)
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では, 非アルコール性脂肪肝炎(NASH)による障害肝からの発癌動物モデルを新規作製した。3週齢のC57BLマウスにHFCD(低コリン脂肪食)を与えると共に, 開始時にper kg 25mgのDENを腹腔内投与した。HFCD群では12週以降でほぼ100%インスリン抵抗性を獲得した。HFCD + DENは脂肪沈着の他に肝細胞の風船様変性マロリー体などの所見があり, よりNASHに近い組織像が観察され, 腫瘍形成も20週目から確認された。 The aim of this study was to develop a mouse model of hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis that develops quickly and reflects all clinically relevant features. Three-week-old C57BL/6J male mice were fed either a standard diet (MF) or a choline-deficient, high-fat diet (HFCD). The mice in the MF+diethylnitrosamine (DEN) and HFCD+DEN groups received a one-time intraperitoneal injection of DEN at the start of the respective feeding protocols. The mice in the HFCD and HFCD+DEN groups developed obesity early in the experiment and insulin resistance after 12 weeks. The HFCD+DEN group presented the highest incidence of nonalcoholic steatohepatitis. The levels of fibrosis and steatosis varied, but they tended to increase every 4 weeks in the HFCD and HFCD+DEN groups. Computed tomography scans indicated that all the HFCD+DEN mice developed hepatic tumors from 20 weeks, some of which were glutamine synthetase-positive.
Notes	研究種目：基盤研究(C)(一般) 研究期間：2013～2015 課題番号：25430093 研究分野：外科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25430093seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月　 ２ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５４３００９３

研究課題名（和文）実験用途に応じたNASH肝癌メダカ・マウス・ブタモデルの作成と予防・治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel animal model of hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者
相浦　浩一（Aiura, Koichi）

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：００１８４０１０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）による障害肝からの発癌動物モデルを新規作製した。3週齢のC57BLマウスにHFCD（低コリン脂肪食）を与えると共に、開始時にper kg 25mgの DENを腹腔内投与した。HFCD群では12週以降でほぼ100%インスリン抵抗性を獲得した。HFCD＋DENは脂肪沈着の他に肝細胞の風船様変性マロリー体などの所見があり、よりNASHに近い組織像が観察され、腫瘍形成も20週目から確認された。

研究成果の概要（英文）： The aim of this study was to develop a mouse model of hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis that develops quickly and reflects all clinically relevant features. Three-week-old C57BL/6J male mice were fed either a standard diet (MF) or a choline-deficient, high-fat diet (HFCD). The mice in the MF+diethylnitrosamine (DEN) and HFCD+DEN groups received a one-time intraperitoneal injection of DEN at the start of the respective feeding protocols. The mice in the HFCD and HFCD+DEN groups developed obesity early in the experiment and insulin resistance after 12 weeks. The HFCD+DEN group presented the highest incidence of nonalcoholic steatohepatitis. The levels of fibrosis and steatosis varied, but they tended to increase every 4 weeks in the HFCD and HFCD+DEN groups. Computed tomography scans indicated that all the HFCD+DEN mice developed hepatic tumors from 20 weeks, some of which were glutamine synthetase-positive.

研究分野：外科学

キーワード：NASHモデル　動物モデル

１．研究開始当初の背景

肝細胞癌は今まではＢ型およびＣ型ウイルス肝炎を背景とする発癌がほとんどであり、ハイリスク群の囲い込み、発癌、再発予防はウイルス肝炎の治療を中心に行われてきた。しかし近年非ウイルス性肝障害、特に食の欧米化を背景とした metabolic syndrome の肝の表現型と言われる非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）/NASH からの肝細胞癌が年々増加しており、治療戦略に大きな転換が求められている。①肝炎ウイルス感染が発癌リスクの主役であった今までと違い、NASH 肝癌は metabolic syndrome、環境発癌因子、欧米化食、加齢など様々な因子の積み重なりによる発癌であり（図１）、その発癌機構は明らかになっていないと同時に、各患者の発癌経路は異なる。その腫瘍の臨床特性も様々なパターンが考えられ、各々の背景因子に合わせた網羅的実験系がテーラーメイドの治療計画立案のために必要である。

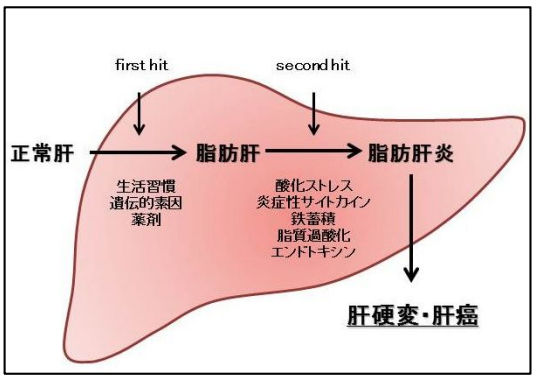

図１

②生活習慣病の週末像ともいえる NASH 肝癌は、リスクファクターと言われる肥満、糖尿病、高血圧などを全身疾患として総合的に診断・治療する必要があり、欧米で既に国家プロジェクトとして行われている大腸癌、乳癌などと同様に発癌予防（cancer chemoprevention）戦略が重要な位置を占める。

ブタは生理学的、解剖学的、遺伝的にヒトに近く、手術実験などで以前より用いられている。しかし、遺伝子組み換えブタの開発は安定して信頼性の高い ES 細胞の欠如が大きな障害になってきた。分担研究者の大西は、体細胞クローンブタの作出に成功し（Science 2000）、その後も免疫不全ブタ（Cell stem cell 2012）など 10 種類に上る伝子組み換えブタを樹立してきた。高コレステロール血症ブタ（LDLR-KO ブタ）の開発にも成功しており（図２）、既に国内特許も出願している（特願 2011-269414）。このブタは NASH 発癌ブタの作出には最適のプラットフォームとなると思われる。

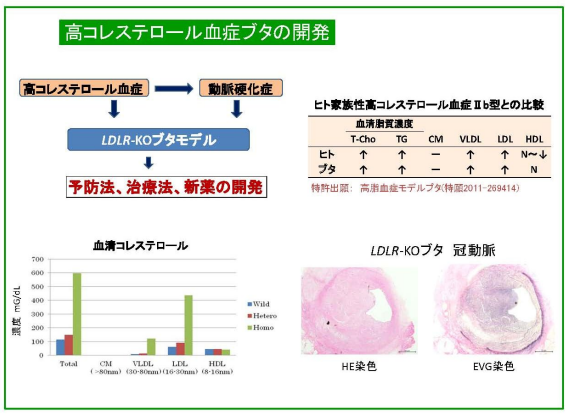

図２

メダカ、ゼブラフィッシュなど小型魚類が近年積極的にドラッグスクリーニングに使用されるようになり、具体的な成果が出始めている（Molina G, et al. Nat Chem Biol 2009, Yu PB, et al. Nat Med 2008）。魚類は脊椎動物であり、ヒトとの相同性がある程度担保される上に、１）whole organism のコンテキストで毒性、活性を評価可能、２）体外発生する上に胚が透明であり観察が容易、３）産卵数が多く、胚発生が速いので試料の調達が容易、４）ハイスループット化できる、５）倫理的な問題が少ない、といった利点がある。疾患モデルの作成もミュータジェネシスと高速変異同定法を組み合わせる TILLING 法により遺伝子改変メダカモデルを作成することに連携研究者の谷口が初めて成功し（Genome Biol. 2006）、p53-KO メダカを樹立している。連携研究者の吉浦はマ

ウスの NASH モデルの一つである肥満原因遺伝子 MC4R-KO のメダカモデルを作製した。

NASH 発癌マウスモデルは、1.遺伝子改変、2.carcinogen 投与、3. 低コリン脂肪食投与、そしてその組み合わせなど様々なモデルが作成されている。しかし、その遺伝子変化は Myc network と NFκB network（Hill-Baskin AE, et al. Human Molecular Genetics, 2009）、Wnt signaling（Katzenellenbogen K, Mol Cancer Res 2007）、CyclinD1（Katzenellenbogen, M Cancer Res 2006）など様々であり、上記①に記した背景因子の違う NASH 肝癌のモデルであるといえる。したがって複数のモデルで治療効果の検討をすることにより、臨床の状況に則した結果を導くことができると思われる。

２．研究の目的

本研究では、あらゆる研究ニーズに対応する非アルコール性脂肪肝炎（NASH）による障害肝からの発癌動物モデルを新規作製し、治療薬の選定、投与法、投与経路から集学的治療として付加する外科的治療までの一連の臨床に必要な検討を全て網羅する実験系を完成させ、それを用いて予防・治療法を確立することにある。無数にある候補化合物を大量飼育の可能な発癌メダカモデルにてスクリーニングし、投与法の検討には遺伝子改変、carcinogen 投与、低コリン脂肪食投与など様々な組み合わせにより作製したマウスモデルを用い、ブタモデルではいままで不可能であった IVR 治療実験（薬物量や投与時間の条件検討など）や、肝切除・ラジオ波焼灼術などの外科手技の検討が可能となる。これらモデルは一つ一つを取っても今後重要な実験モデルとなる。

３．研究の方法

（１）低コリン脂肪食＋DEN 投与による短期 NASH 発癌モデルの作製

3 週齢の C57BL マウスの雄を使用し、MF（コントロール食）, HFCD（低コリン脂肪食）, MF+DEN, HFCD+DEN の 4 群とし、DEN を加えるものは開始時に per kg 25mg を腹腔内投与した。それぞれ 4 週毎に各群 5 匹ずつ sacrifice を行った。評価項目は、体重、肝重量、血液検査で ALT、TG、Glucose、Insulin、IL-6 や TNF-α、Leptin、Adiponectine、CRP。組織は HE、線維化評価のためシリウスレッド染色、炎症評価のため F4/80、脂肪沈着評価のため、SudanIII 染色を行った。遺伝子発現解析用に一部の肝臓を凍結保存した。また CT を撮影し、肝内の腫瘍の評価を行った。

（２）高脂肪食による NASH メダカに対する低濃度 DEN の暴露による発癌の誘導

Matsumoto らはヒト患者の病態を再現したメダカ NASH モデルの開発に成功している。（Disease Models & Mechanisms 2010）これらのメダカの組み合わせにより発癌モデルの開発を試みた。評価系確立のため、まずメダカの造影 CT の技術の確立を行った。メダカを氷上で麻酔し、尾の血管より造影剤（ミルテニーExtron nano 6000 を約 10μl 投与、翌日 CT 撮像を行った。また、WT のメダカと p53-KO メダカを用いて NASH 発癌モデルの検討を行った。1000ppm の DEN に 4 時間、1 か月に 1 回または 2 か月に 1 回の暴露を行った。観察は 5 か月間行った。

（３）DLR-KO ブタにおける高脂肪食の NASH 発症との関連の検討

DLR-KO ブタに牛脂とコレステロールを 3 か月与え、肝臓を摘出し、HE にて観察した。

４．研究成果

（１）低コリン脂肪食＋DEN 投与による短期 NASH 発癌モデルの作製

体重は HFCD 群で徐々に増加傾向となり、control に比べてほぼ倍近くの体重になっており（図３A)、肝重量も HCDF 群の方が重たくなる傾向にあった（図３B)。ALT は HCDF 群､HFCD＋DEN 群で 16 週目から高くなる傾向にあり（図３C)、TG はいずれの群でも 8 週目にピークを迎え、徐々に減少していく傾向がみられた（図３D)。Leptin は HFCD 群､HFCD＋DEN 群で 20 週目から高くなった（図３E)。Adiponectin は HFCD 群、HFCD＋DEN 群で 20 週目から低下した（図３F)。空腹時血統に関しては、HFCD 食の 2 群で高い傾向があった。

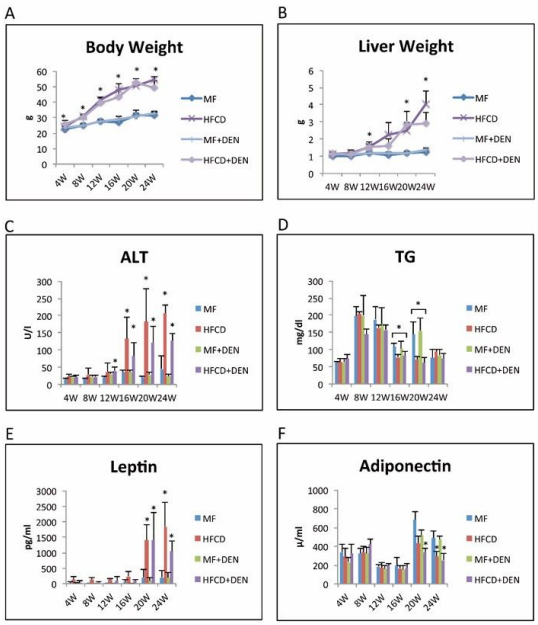

図３

インスリン抵抗性は QUICK1 という指標を用いた。HFCD 食の 2 群で 12 週以降でほぼ 100%インスリン抵抗性を獲得した(表１)。

	4W	8W	12W	16W	20W	24W
MF	N.D.	0.227	0.139	N.D.	N.D.	0.413
	0.064	N.D.	0.348	N.D.	0.445	0.12
	N.D.	0.381	0.193	N.D.	N.D.	0.249
	N.D.	N.D.	0.416	0.315	N.D.	0.777
		N.D.	0.672	N.D.	N.D.	0.083
HF	N.D.	0.22	0.089	0.058	0.026	0.045
	0.2002	0.206	0.047	0.034	0.026	0.025
	0.3954	0.168	0.067	0.034	0.057	0.025
	0.0705	N.D.	0.081	0.027	0.034	0.018
	0.1384	N.D.	0.046	0.079	0.037	0.030
MF+DEN	1.047	N.D.	0.579	N.D.	N.D.	0.2916
	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.116
	N.D.	0.916	N.D.	0.642	N.D.	0.131
	N.D.	0.916	N.D.	N.D.	N.D.	0.153
	N.D.	0.159	N.D.	9.101	0.245	N.D.
HF+DEN	1.047	0.0808	0.016	0.072	0.033	0.026
	N.D.	0.1167	0.031	0.054	0.063	0.020
	0.1026	0.377	0.030	0.025	0.069	0.034
	0.0826	0.315	0.048	0.314	0.201	0.031
	0.172	0.173	0.036	0.022	0.055	0.037

表１

脂肪沈着は、HFCD 食でより多く見られた（図４AB)。HE 像を解析したところ、DEN を加えたものは核異型が強い結果が得られた。HFCD＋DEN のものでは脂肪沈着の他に肝細胞の風船様変性マロリー体などの所見があり（図４CDE)、より NASH に近い組織像が観察された。

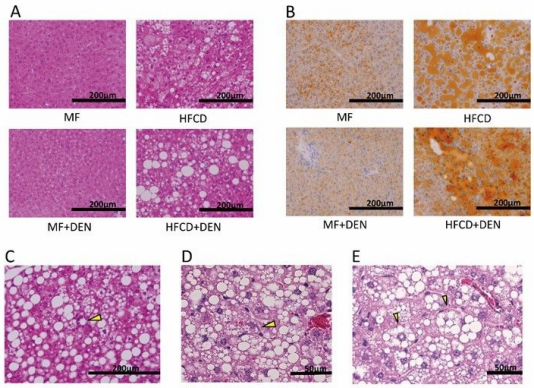

図４

CT での解析では HFCD+DEN の群で腫瘍形成が 20 週目から確認された（表２)。

	Week	MF	HFCD	MF+DEN	HFCD+DEN
Mouse with positive finding (%)	12	0	0	0	0
	16	0	0	0	1/5 (20%)
	20	0	1/5 (20%)	0	5/5 (100%)
	24	0	0	1/5 (20%)	5/5 (100%)
Tumor number	12	0	0	0	0
	16	0	0	0	5
	20	0	6	0	10.0±5.4
	24	0	0	1	8.8±5.4
Tumor size (mm)	12				
	16				0.6±0.4
	20		0.8±0.2		1.6±0.8
	24			2.2	2.9±2.8

表２

（２）高脂肪食による NASH メダカに対する低濃度 DEN の暴露による発癌の誘導

早期に肉芽腫の発生は見られたが、発癌は確認されなかった。

（３）DLR-KO ブタにおける高脂肪食の NASH 発症との関連の検討

DLR-KO ブタでは肝臓に脂肪沈着が見られなかった。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　　0 件）

〔学会発表〕（計　　4 件）

1. 松田祐子、相浦浩一、高脂肪コリン欠乏食とジエチルニトロサミン投与による

NASH 肝癌モデルの開発、肝細胞研究会、2015.6.4、米子コンベンションセンター（鳥取県米子市）

2. 岸田憲弘、松田祐子、相浦浩一、Five-month observation of NASH medaka model with diethylnitrosamine exposure and development of contrast-enhanced computed tomography method for medaka、小型魚類研究会 2014.9.20、慶應義塾大学薬学部芝共立キャンパス記念講堂（東京都港区）

3. 岸田憲弘、松田祐子、相浦浩一、Development of a novel 6-month experimental mouse model of hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis、AACR 2014 、2014.4.6、San Diego（アメリカ）

4. 松田祐子、実験と動物モデル・その応用 Science Live Ticket - MNNS seminar（2014.3.18）甲南大学ポートアイランドキャンパス（兵庫県神戸市）

〔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〕
なし

６．研究組織

(1)研究代表者
相浦　浩一（Koichi　Aiura）
慶應義塾大学・医学部・講師（非常勤）
研究者番号：00184810

(2)研究分担者
板野　理（Osamu　Itano）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：90265827

北郷　実（Minoru　Kitago）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：70296599

松田　祐子（Sachiko Matsuda）
慶應義塾大学・医学部・特任講師
研究者番号：90534537

大西　彰（Akira Onishi）
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：80355742

(3)連携研究者
小島　美咲（Misaki　Kojima）
独立行政法人農業生物資源研究所・家畜ゲノム研究ユニット・上級研究員
研究者番号：80355742

谷口　善仁（Yoshihito Tanigichi ）
杏林大学・医学部・教授
研究者番号：00324616

吉浦　康寿（Yasushi　Yoshiura）
独立行政法人水産総合研究センター・増養殖研究所・研究員
研究者番号：90372052