

新しい NASH 動物モデル

SATテクノロジー・ショーケース2016

■ はじめに

非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は、肝細胞の脂肪化から始まり、肝組織の壊死、炎症、線維化、そして最も進行した病態として発癌へと続く予後不良な疾患である。人間ドック検診結果をもとにした調査によると、現在本邦には200万人以上ものNASH患者が存在するものと推定され、患者数は肥満者の増加とともにさらに増加傾向にありその対策は急務である。しかし、食生活の改善や運動療法以外に根本的な薬物治療法は開発されておらず大きな社会的課題となっている。

ヒトNASHに対する治療法開発を困難にしている背景には、それに相同した動物モデルが存在しないことが大きな要因として挙げられる。それに対し本研究では、*p62*ならびに*Nrf2*遺伝子を二重欠損させたマウス(*p62:Nrf2*-DKOマウス)を作製し、これがヒトNASH病態と非常に類似した表現型を示す優れたNASHモデル動物であることを見出した。このマウスは通常の飼育環境下でメタボリックシンドロームを発症し、壮年期以降に肝臓組織に炎症、線維化をきたし、加齢とともにその病態が悪化するNASH自然発症マウスである。さらに、このマウスは50週齢以降の高齢期に約10%の確率で肝腫瘍を発生する、ヒトNASHの転帰と極めて類似したこれまでのモデルにはない特徴を持っている。

■ 方法

1. *p62:Nrf2*ダブルノックアウトマウス(DKOマウス)の作製
ジーンターゲティング法により*p62*、*Nrf2*遺伝子単独欠損マウスをそれぞれ作製し、それを交配することでダブルノックアウトマウスを作製した。
2. 肝所見の評価
各週齢におけるマウスから肝臓を摘出し、脂肪化、炎症性細胞浸潤、線維化について病理組織学的な解析を行った。
3. 腸管の組織学的評価
各週齢におけるマウスから回腸、空腸を摘出し、病理学的な評価を行った。
4. 腸内細菌叢の解析
糞便中より16sRNAを抽出し、T-RFLP法により腸内細菌叢を測定した。
5. 血中LPS量の測定
末梢血を用いて、LPS含有量を高感度リムルス反応法により測定した。

6. 腸管透過性の評価

FITCデキストランを経口投与し、経時的に採血して血中のFITC蛍光強度を測定することで腸管透過性の評価を行った。

7. 肝クッパー細胞食食能の評価

動物用小型MRIを用いて、造影剤SPIO投与による造影パターンを比較することにより、Kupffer細胞の食食能を評価した。

■ 結果

1. *p62:Nrf2*ダブルノックアウトマウスの作製(DKOマウス)

DKOマウスは正常に生まれ、性別比率も変化がなかった。体重増加は野生型と比べ増加速度早く、20週までに肥満症を呈した。*p62*単独欠損マウスは過食による肥満を呈することから、DKOマウスにおけるこの形質は、*p62*の欠損によるものと考えられた。

2. 肝所見の評価(下図)

2.1 8週齢

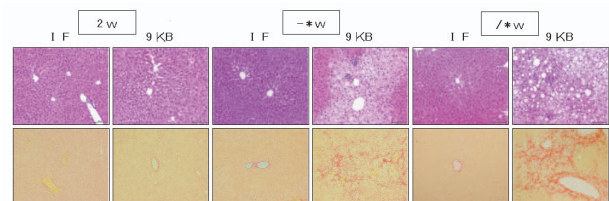
HE染色像では肝臓の脂肪の沈着と炎症性細胞の浸潤が観察できるが、WT、*Nrf2*-null、*p62*-null、DKOの4系統のマウスでは観られなかった。またSirius red染色では、肝臓の線維化が観察できるが、HE染色同様に4系統のマウスに線維化は観られなかった。

2.2 30週齢

HE染色にて*p62*-null、DKOマウスにおいて顕著な脂肪沈着が観察された。また、DKOマウスにおいて炎症細胞浸潤が観察された。さらに、Sirius red染色でDKOマウスにおいて線維化が観られた。

2.3 50週齢

DKOマウスにおける脂肪化、線維化は著しく進行した。50週齢以降の約10%のマウスに腫瘍の出現を認めた。腫瘍の病理学的な解析から、腺腫であることが示された。



3. 腸管の組織学的評価(下図)

DKOマウスの腸管上皮には、絨毛の萎縮や脱落を認め、

代表発表者 藤 栄治 (わらび えいじ)

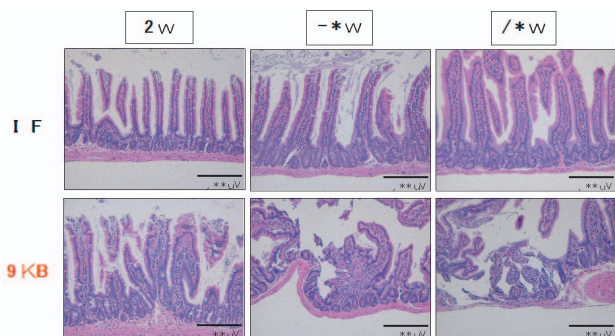
所属 筑波大学
医学医療系

問合せ先 〒305-8575 茨城県つくば市天王台1-1-1
TEL/FAX: 029-853-3291

■キーワード: (1)非アルコール性脂肪性肝炎
(2)NASH
(3)動物モデル

■共同研究者: 正田 純一
筑波大学
医学医療系

脆弱化していることが示された。これらの変化は8週齢の若齢時から認めた。

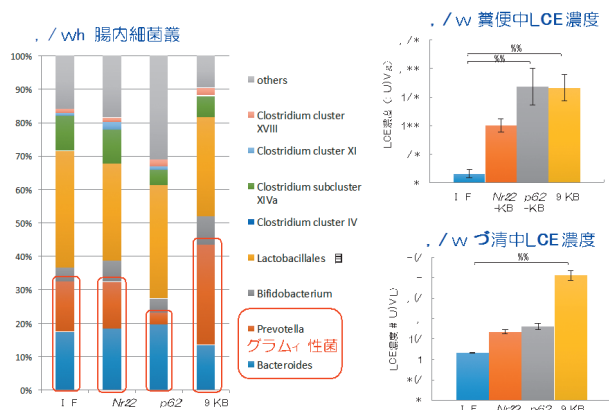


4. 腸内細菌叢の解析 (下図)

8, 25週齢のマウス糞便中の腸内細菌叢の割合を解析した。DKOマウスにおいては8週齢時には他群との差は認められなかったが、25週齢時にはPrevotella属に代表されるグラム陰性細菌の割合が著明に増加しており、加齢とともに腸内細菌叢が変容することが明らかとなった。

5. 血中LPS量の測定 (下図)

DKOマウスでは有意に高いLPSが血中から検出された。DKOマウスでは、グラム陰性菌が増加し、糞便中のLPSの増加、および透過性の亢進により血中のLPSが増加するものと考えられた。



6. 腸管透過性の評価

DKOマウスでは、血中FITC含量が有意に高く、8週齢の若齢時から、腸管透過性が亢進していることが明らかとなった。

7. 肝クッパー細胞貪食能の評価

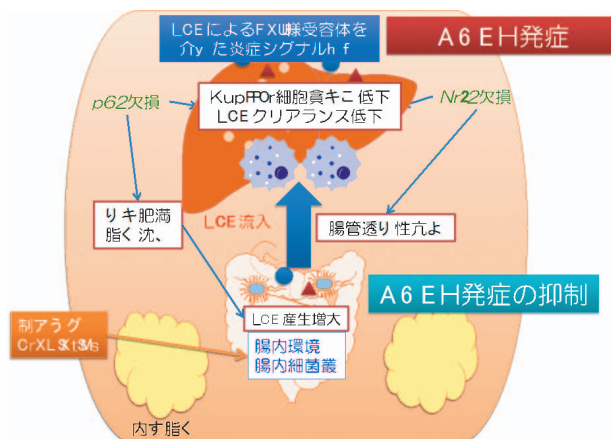
LPSを含む体内異物のクリアランスに重要なクッパー細胞の貪食能は、DKOマウスで低下していることが示された。

■ 考察

本研究により、p62:Nrf2二重欠損マウスは新たなNASHモデル動物であることが明らかとなった。その発症機序は以下のようにまとめられる(下図)。

まず、p62の欠損に起因する過食により、脂肪沈着が起き、腸管では腸内細菌叢の変化によりLPSの産生が増大する。腸管上皮は透過性が亢進するため、結果的に肝臓に流入するLPSが増大し、さらに肝臓ではLPSのクリアランスに重要なクッパー細胞の貪食能が低下しているため、炎症反応が惹起されやすくなる。これらにより、肝臓ではLPSによる炎症シグナルが亢進し、NASH発症へと繋がるものと考えられる。

以上の機序は、現在ヒトNASHの病態として提唱されている多重並行ヒット仮説とよく合致しており、本DKOマウスはNASH治療薬の開発に非常に有用なモデルであると考えられる。



■ 関連情報等(特許関係、施設)

◆ 公開特許

出願日:平成 25 年 10 月 10 日

出願(公開)番号:特開 2013-208062

出願の名称:非アルコール性脂肪性肝炎および肝腫瘍自然発症モデルとしての p62:Nrf2 遺伝子二重欠損マウスおよび該マウスを用いた方法