

総説（教授就任記念講演）

メタボリックシンドローム関連肝疾患モデル動物の開発と応用 ～ヒト病態解析への疾患病理学的アプローチ～

常山 幸一

徳島大学大学院医歯薬学研究部疾患病理学分野

（平成27年10月9日受付）（平成27年11月18日受理）

はじめに

わが国を含む先進諸国では、メタボリックシンドローム（MS）は最も重大な健康課題の1つである。緩やかに、かつ確実にわれわれの身体を蝕み、年余を経て全身のさまざまな臓器に障害が及ぶが、その肝臓での表現型が非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）である。NASHは進行性難治性疾患で、肝硬変～肝細胞癌（HCC）に進展することが知られている。また、最近ではMSの病態自体が発癌に関与するとの報告もある。わが国でもMS、あるいはNASHを背景とするMS関連肝癌が確実に増加しているが、これまで主流であったウイルス肝炎やアルコール多飲を背景とするHCCとの臨床病理学的な異同については未だ明らかではない。また、MSやNASHから肝発癌に至るメカニズムについても十分な解析がなされていない。

本稿では、われわれが新たに開発した、ヒトにトランスレーション可能なMS関連肝疾患モデル動物の詳細な臨床病理学的特徴を紹介するとともに、これらの新規モデル動物をヒト病態解析に応用するための、疾患病理学的なアプローチ法を提案する。

1. 2種類のMS-NASH-HCCモデルマウス

① 自然発症モデル：TSOD（Tsumura-Suzuki Obese Diabetes）マウス

TSODマウスは、ddY系マウスから、尿糖と肥満を呈する異常個体を抽出し、系統作出された日本オリジナルの多因子性遺伝の内臓脂肪肥満・2型糖尿病モデルマ

ウス（近交系）である。同様の手法で、糖尿病・肥満体を呈さない対照マウス、TSNO（Tsumura, Suzuki, Non Obesity）マウスも同時に作出されている。TSODマウスは、なんら特別の処置をすることなく、通常の飼育環境下で、3ヵ月齢以降、肥満、高血糖、高脂血症、高インスリン血症を順次自然発症する。これらの病態は雄により強く発現する。肝臓においては4ヵ月～5ヵ月齢より中心静脈周囲の肝細胞に微小脂肪滴が出現し、次第に範囲が広がるとともに肝細胞の風船様腫大（ballooning）、マロリー体、好中球浸潤など壊死、炎症性変化が出現する。また、軽度ではあるが中心静脈周囲～肝細胞を縫うような繊細な線維化が出現し、ヒトのNASHに類似する組織像を呈する¹⁾。このマウスをさらに飼育すると、10ヵ月齢以降、肝腫瘍が出現する。出現頻度は次第に増加し、15ヵ月齢では90%以上の個体で肝腫瘍が認められる（図1）。病理組織学的には、これら肝腫瘍のうち、約3割は異型に乏しい肝細胞からなり、脂肪変性を高率に伴い、liver fatty acid binding protein（LFABP）の発現減弱を呈していた。これらの特徴は、ヒトの肝細胞腺腫の一亜型（HNF-1 α inactivated HCA）と極めて類似するものであった。一方、残りの7割は細胞異型、構造異型を示す肝細胞からなり、ヒトHCCの診断マーカーとして頻用される、Glutamine synthetase（GS）やAFP、Glypican-3等を発現していた。これらは、病理形態的にも、機能的にも、ヒトのHCCに類似する腫瘍であった。ヒトのNASH発癌では、高齢の男性MS患者に肝硬変を合併せずにHCCが出現するのが特徴的との報告もあり、TSODマウスとの高い類似性が指摘される。TSODマウスでは、10%程度と頻度は低いものの、肺腺癌が自

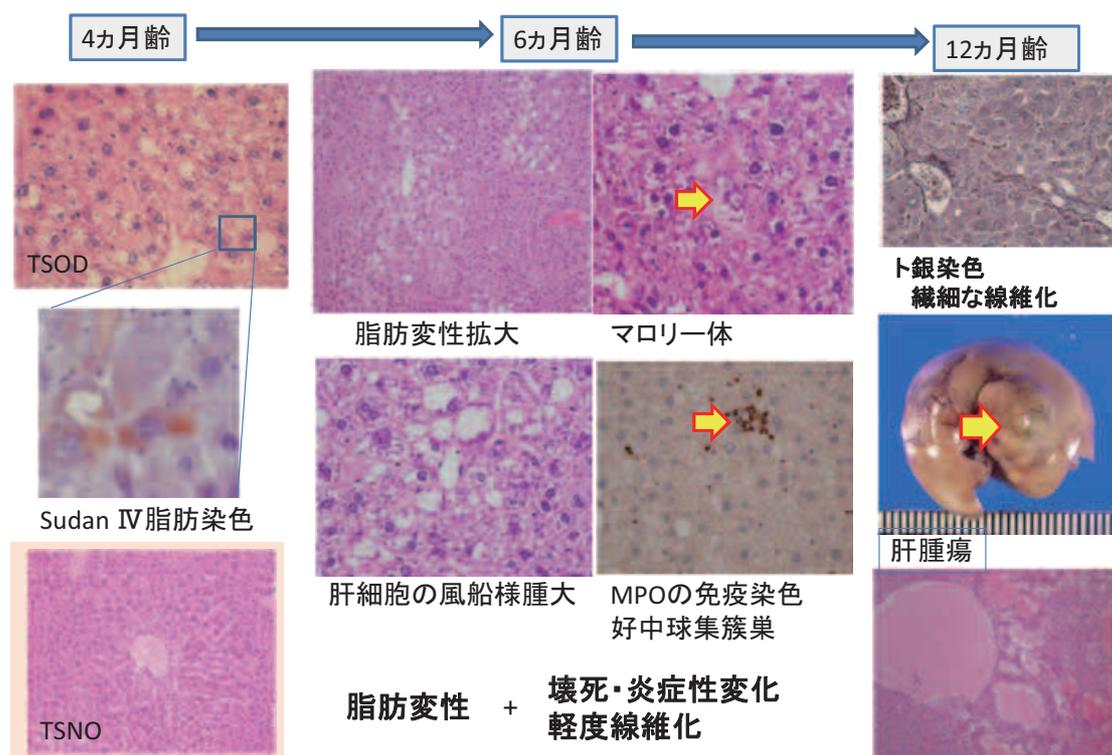


図1：TSOD マウス（♂）の肝臓の特徴

TSOD マウスの、4 ヶ月齢以降の代表的な肝病理所見を示す。脂肪染色（Sudan IV 染色）では、肝細胞内に橙色を示す脂肪沈着が認められる。ト銀染色では、中心静脈周囲から肝細胞を縫う様に、茶褐色を示す膠原線維の伸び出し（繊細な線維化）が出現する。一方、対照マウスである TSNO マウスでは、生涯を通じて脂肪変性や壊死・炎症性変化、線維化、肝腫瘍の出現は認められない。

然発症する。さらに、脾臓に特異的に鉄が沈着し、血清フェリチン値やヘプシジン値が上昇するなど、MS に起因する発癌モデルや鉄代謝異常解析モデルとしての有用性も期待される。

② 獲得型モデル：DIAR-MSG マウス

MSG マウスは1960年代に開発された肥満誘導モデルであり、生後4日以内に体重（g）あたり4 mg のグルタミン酸ナトリウム（MSG）を皮下注射して作成する獲得型モデルである。オリジナルではICR系のマウスを用いて作成され（ICR-MSG）、通常の飼育環境下で、肥満に引き続き高血糖、高脂血症、高インスリン血症を順次発症することが報告されている。われわれはICR-MSG マウスの肝病変を詳細に検討し、5 ヶ月齢以降、重篤な脂肪性肝炎を惹起し、10 ヶ月齢以降、高頻度に肝腫瘍を発症することを報告したが、肝細胞に蓄積する脂肪はいわゆる小滴性であり、大滴性脂肪肝を示すヒトとは病理形態学的な差異が認められた²⁾。MSG マウスは

獲得型モデルであり、遺伝子改変動物をはじめとするさまざまな系統で作成が可能である。われわれは、いくつかの異なる系統でMSG マウスを作成し、DIAR 系統で作成したMSG マウス（DIAR-MSG）が、ヒトのNASHと極めて類似する病理形態像（大滴性脂肪肝、風船様腫大（ballooning）、マロリー体、好中球浸潤）を示すことを明らかにした。次に、このマウスの肝臓に遊離型コレステロールが蓄積しているかどうかを解析するために、凍結肝標本を用いてイメージング質量分析（MS）を行った。この方法は標本上の各スポットで質量分析を行い、標的とする質量の物質の存在部位を再構成して二次元で可視化する方法である。今回、遊離型コレステロール（分子量386）の同定に、脱水型（M+H-H₂O）⁺を標的として *m/z* 値369で質量分析を施行した。その結果、対照マウスでは遊離コレステロールの蓄積はほとんど見られないのに対し、DIAR-MSG マウスでは肝細胞に領域をもって遊離コレステロールが分布していることがわかった（図2）³⁾。われわれは、高脂肪+高コレステロー

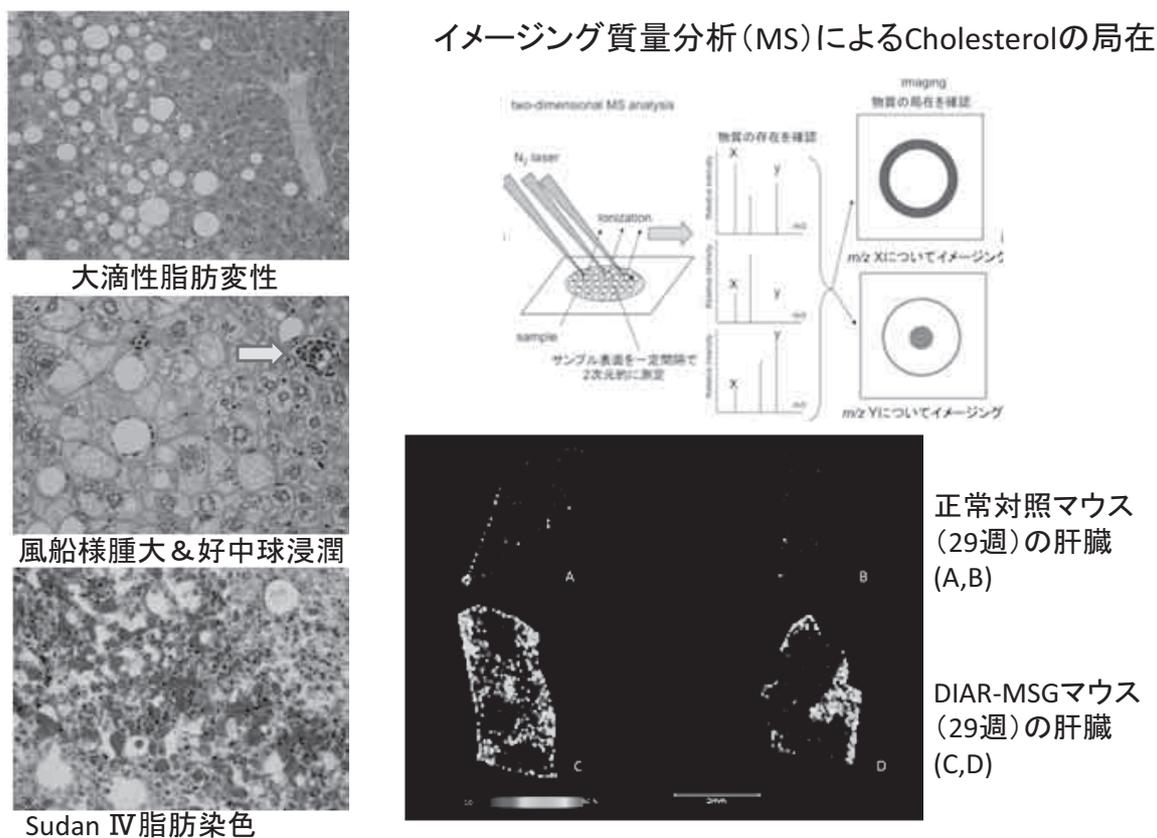


図2：DIAR-MSGの肝病変

DIAR-MSG マウスでは、中心静脈周囲の肝細胞に、小滴性脂肪変性に加えて大滴性脂肪変性が出現し、凍結標本の Sudan IV 染色によってびまん性に脂肪蓄積が確認される。DIAR-MSG マウスの肝臓に蓄積する遊離型コレステロール（分子量 386）の局在をイメージング質量分析（MS）を用いて可視化すると、DIAR-MSG マウスでは肝細胞に領域をもって遊離コレステロールが分布しているが、対照マウスでは遊離コレステロールの蓄積はほとんど見られない。

ル食により、ラットに NASH 肝硬変を作成することに成功しており⁴⁾、NASH の発症進展におけるコレステロールの関与が注目される。DIAR-MSG マウスには10 ヶ月齢以降、高率に肝腫瘍が出現するが、これらの腫瘍も、TSOD マウスの肝腫瘍と同様に肝細胞腺腫と HCC が混在していることから、NASH 発症の特徴として腺腫と腺癌に共通する機序が関与している可能性が推測される。

③ TSOD マウスや DIAR-MSG のヒト病態解析への有用性

TSOD マウスも DIAR-MSG マウスも、高脂肪食などの特別な食餌を用いることなく、通常の飼育環境下で内臓脂肪型肥満を契機として発症し、経時的に2型糖尿病や高脂血症を発症し、5 ヶ月～6 ヶ月齢で NASH を、10 ヶ月齢以降 HCC を発症する。この病態発症進展過程は、

ヒトの MS～NASH、さらに HCC 発症をよく反映するものである。また、内臓脂肪、膵臓（ランゲルハンス島）、肝臓といった罹患臓器の病理組織形態が、ヒト疾患に極めてよく類似しており、それぞれの疾患の重篤度を病理形態学的な側面からも検討することが可能である。われわれは、これらの疾患モデル動物を用いてさまざまな薬剤の有効性を検討してきた⁵⁻¹³⁾。例えば、肥満が発症する3 ヶ月齢から、NASH が発症する6 ヶ月齢までを投薬期間とすると、その間に発症する肥満、高脂血症、2型糖尿病、NASH に対する薬効を一度に解析することができる。われわれはこの系を用いて、紅麹という生薬が、モナコリン K というスタチンの含有量に関わらず、高脂血症や糖尿病、NASH のいずれにも有効性を示すことや、スピルリナという天然物質が有する内臓脂肪の炎症の軽減効果と NASH の病態改善効果の中で、NASH への有効性はフィコシアニンという成分が担い、

内臓脂肪の炎症軽減効果はフィコシアニン以外の成分が担うことなどを明らかにしてきた^{7,9,10)}。これらのモデル動物を用いて多系統にわたる疾患を総合的に解析することは、薬剤の有効性のみならず、その作用機序を解明する上でも大きなアドバンテージとなると考えられる(図3)。

2. MS(DM)-HCC モデルマウス：DIAR-nSTZ マウス

1型糖尿病モデルの作製法として、新生児期にストレプトゾトシン(STZ)を投与してランゲルハンス島を選択的に破壊する方法はよく知られている。最近、STZで誘導した1型糖尿病マウスを高脂肪食で飼育すると、NASHを経てHCCに至るとの報告がなされた。STAMマウスと名付けられたこのモデルは、NASH-HCCモデルとして広く使われている。われわれは、高脂肪食では

なく、普通食による飼育でHCCの誘導が可能かどうかをさまざまな系のマウスで検討した。その結果、DIAR系のマウスで新生児期にSTZ処置を施行すると(DIAR-STZマウス)、普通食による飼育でも、NASHを介さずに極めて早期(8週齢)から異型肝細胞性腫瘍が出現することを見出した¹⁴⁾。これらの腫瘍は小さいうちから細胞異型、構造異型を示し、GSが陽性で、ヒトの異型結節(dysplastic nodule)~HCCへのsequenceを反映していた。腫瘍は次第に数と大きさを増し、12~16週齢で全例が1個以上のHCCを発症し、組織型はヒトの中分化型HCCに相当していた(図4)。DIAR-STZマウスはNASHを介さずにHCCを発症するモデル動物であり、NASHを介するHCC発症モデル動物と比較検討することで、MS関連肝発癌の発症機序により深く切り込むことが可能となる(図5)。

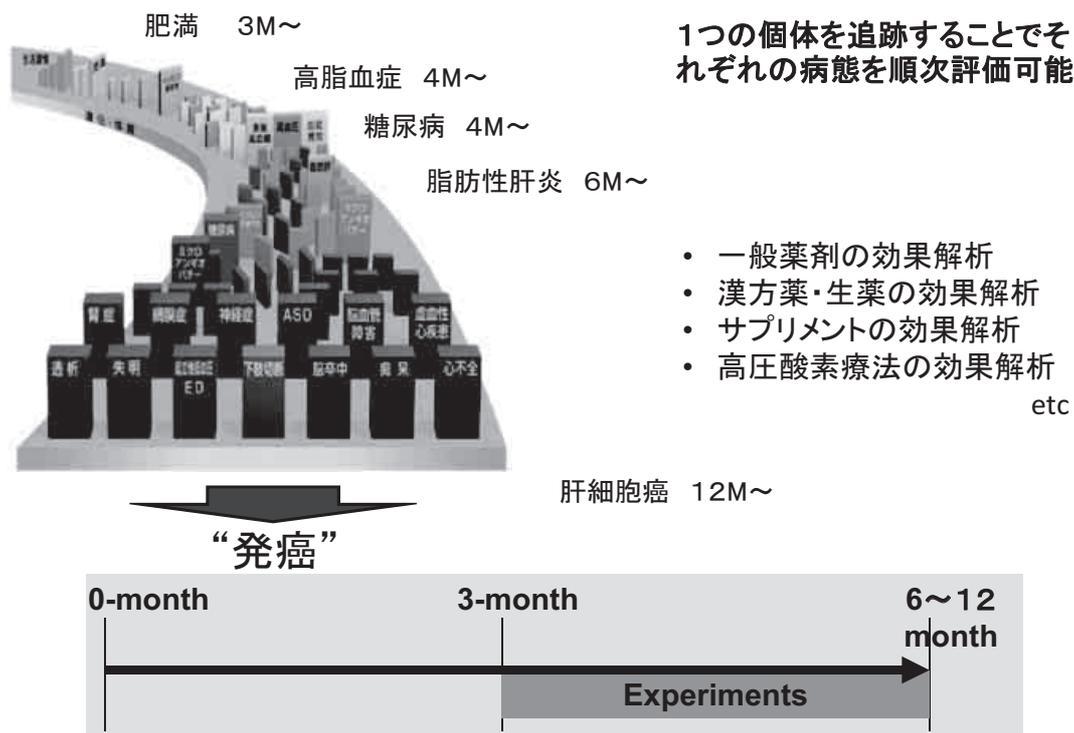


図3：TSOD マウスや DIAR-MSG マウスの有用性

メタボリックシンドロームでは、肥満を契機に高脂血症や糖尿病などが順次発症し、種々の疾患がドミノ倒しの様に複雑に進展することが知られている。TSOD マウスや DIAR-MSG マウスはヒトのメタボリックシンドロームの病態進展をよく模倣しており、3ヵ月齢から肥満を、4ヵ月齢で高脂血症や糖尿病を、6ヵ月齢で脂肪性肝炎を順次発症し、12ヵ月齢では高率に肝細胞癌を発症することから、1つの個体を追跡することで複数の病態を評価することが可能である。メタボリックシンドロームの諸症状を標的にして治療効果を観察する場合は肥満が生じる3ヵ月~6ヵ月齢までを実験期間にあて、発癌に対する効果を観察する場合は発癌が認められる12ヵ月齢までを観察期間にあてる、など目的に応じた実験の設定が可能である。

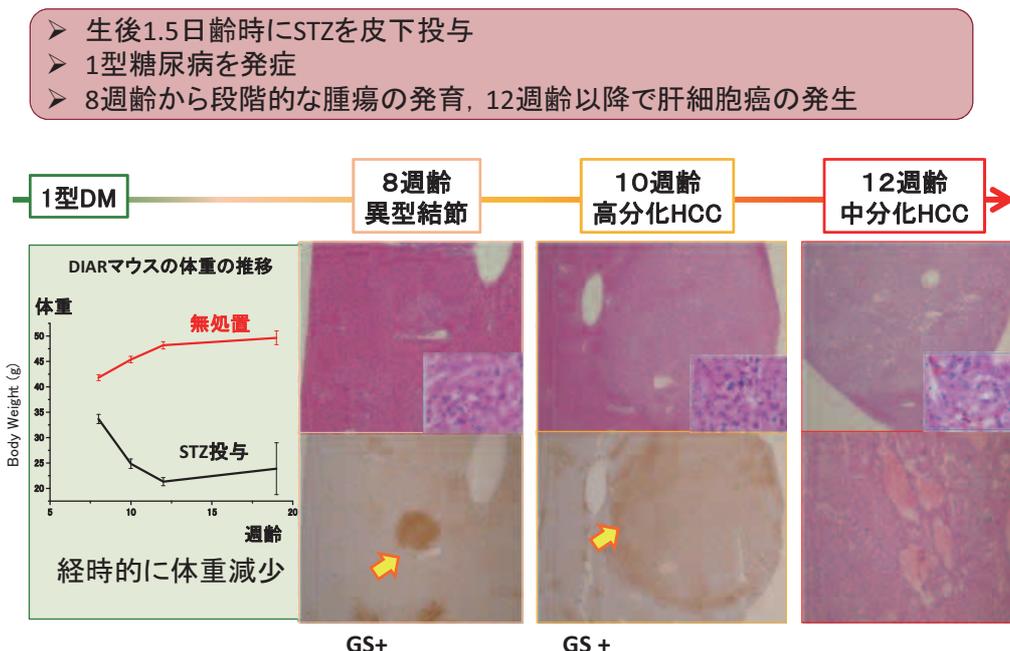
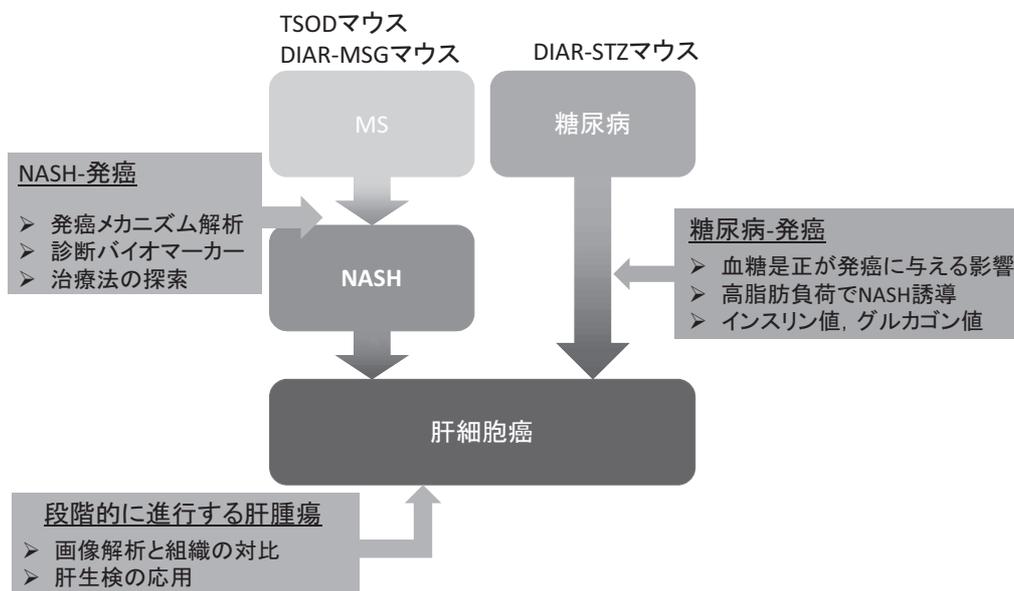


図4：DIAR-STZ マウスの肝病変
 DIAR-STZ マウスの肝腫瘍の経時的進展を示す。1型糖尿病を発症し、経過中高血糖が持続し、体重は減少する。肝腫瘍は出現期よりGSが陽性である。なお、普通食による飼育のため、背景肝にNASHを示唆する病変は経過を認められない。



肝での発癌を多面的に解析することが可能

図5：異なる経路での発癌モデルが広げる可能性
 メタボリックシンドロームからNASHを介して肝細胞癌を発症するモデル動物（TSOD マウス, DIAR-MSG マウス）や、糖尿病からNASHを介さずに肝細胞癌を発症するモデル動物（DIAR-STZ マウス）を比較検討したり、目的に応じてモデル動物を使い分けることで、肝での発癌機序を多面的に解析することが可能となる。

3. MS 関連肝発癌モデルマウスをヒトの病態解析に応用するための新しい提案

肝硬変・肝癌患者の管理・治療において、早期病変の発見は重要な課題であり、CT や MRI を用いたさまざまな画像所見が蓄積されつつある。しかしながら、実際の患者で画像情報と病理組織標像をリアルタイムで比較することは容易ではない。DIAR-nSTZ マウスは非常に短期間に高頻度で HCC を発症することから、同一個体で腫瘍の大きさや性状の変化を画像で追跡することが可能である¹⁵⁾。さらに、われわれは画像所見に応じた病理組織形態を経時的に解析するために、マウス肝生検法を確立した。同一個体から4回までの組織採取が可能であり、画像所見との対比を経時的に施行できることから、病理組織変化を機能的に評価しうる新しい画像解析法の確立に有用と期待される。

おわりに

メタボリックシンドロームを背景として、ヒトに近い経過で発症進展する新しい肝疾患モデルマウスを紹介した。これらのマウスは血液生化学的にも、病理組織形態学的にもヒトの病態に類似した点が多く、さまざまな視点からヒトの病態解析へのトランスレーションが期待される。

文 献

- 1) Nishida, T., Tsuneyama, K., Fujimoto, M., Nomoto, K., *et al.*: Spontaneous onset of nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in a mouse model of metabolic syndrome. *Lab. Invest.*, 93(2) : 230-41, 2013
- 2) Nakanishi, Y., Tsuneyama, K., Fujimoto, M., Salunga, T. L., *et al.*: Monosodium glutamate (MSG) : a villain and promoter of liver inflammation and dysplasia. *J. Autoimmun.*, 30(1-2) : 42-50, 2008
- 3) Tsuneyama, K., Nishida, T., Baba, H., Taira, S., *et al.*: Neonatal monosodium glutamate treatment causes obesity, diabetes, and macrovesicular steatohepatitis with liver nodules in DIAR mice. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 29(9) : 1736-43, 2014
- 4) Ichimura, M., Kawase, M., Masuzumi, M., Sakaki, M., *et al.*: High-fat and high-cholesterol diet rapidly induces non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis in Sprague-Dawley rats. *Hepato. Res.*, 45(4) : 458-69, 2015
- 5) Fujimoto, M., Tsuneyama, K., Nakanishi, Y., Salunga, T. L., *et al.*: A dietary restriction influences the progression but not the initiation of MSG-Induced non-alcoholic steatohepatitis. *J. Med. Food*, 17(3) : 374-83, 2014
- 6) Tsuneyama, K., Baba, H., Kikuchi, K., Nishida, T., *et al.*: Autoimmune features in metabolic liver disease: a single-center experience and review of the literature. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 45(1) : 143-8, 2013
- 7) Ichimura, M., Kato, S., Tsuneyama, K., Matsutake, S., *et al.*: Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome. *Nutr. Res.*, 33(5) : 397-405, 2013
- 8) Watanabe, S., Tsuneyama, K.: Eicosapentaenoic acid attenuates hepatic accumulation of cholesterol esters but aggravates liver injury and inflammation in mice fed a cholate-supplemented high-fat diet. *J. Toxicol. Sci.* 2013 ; 38(3) : 379-90. *Semin. Liver Dis.*, 32(1) : 30-38, 2012
- 9) Fujimoto, M., Tsuneyama, K., Chen, S. Y., Nishida, T., *et al.*: Study of the effects of monacolin k and other constituents of red yeast rice on obesity, insulin-resistance, hyperlipidemia, and nonalcoholic steatohepatitis using a mouse model of metabolic syndrome. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2012 : 892697, 2012
- 10) Fujimoto, M., Tsuneyama, K., Fujimoto, T., Selmi, C., *et al.*: Spirulina improves non-alcoholic steatohepatitis, visceral fat macrophage aggregation, and serum leptin in a mouse model of metabolic syndrome. *Dig. Liver Dis.*, 44(9) : 767-74, 2012
- 11) Tsuneyama, K., Chen, Y. C., Fujimoto, M., Sasaki, Y., *et al.*: Advantages and disadvantages of hyperbaric oxygen treatment in mice with obesity hyperlipidemia and steatohepatitis. *Scientific World Journal*, 11 : 2124-35, 2011
- 12) Fujimoto, M., Tsuneyama, K., Kinoshita, H., Goto, H.,

- et al.* : The traditional Japanese formula keishibukuryogan reduces liver injury and inflammation in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1190 : 151-8, 2010
- 13) Fujimoto, M., Tsuneyama, K., Kainuma, M., Sekiya, N., *et al.* : Evidence-based efficacy of Kampo formulas in a model of non alcoholic fatty liver. *Exp. Biol. Med (Maywood)*., 233(3) : 328-37, 2008
- 14) Baba, H., Tsuneyama, K., Nishida, T., Hatta, H., *et al.* : Neonatal streptozotocin treatment causes type 1 diabetes and subsequent hepatocellular carcinoma in DIAR mice fed a normal diet. *Hepatol. Int.*, 8(3) : 415-24, 2014
- 15) Nakanishi, Y., Tsuneyama, K., Nomoto, K., Fujimoto, M., *et al.* : Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in galectin-3 knockout mice. *Hepatol. Res.*, 238(12) : 1241-51, 2008

New animal models for the translational study of metabolic syndrome-associated liver diseases

Koichi Tsuneyama

Department of Pathology and Laboratory Medicine, Tokushima University Graduate School, Tokushima, Japan

SUMMARY

Metabolic syndrome (MS) is a worldwide healthcare issue and a dominant risk factor for the development of incurable diseases that affect the entire body. The hepatic manifestations of MS include nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its progressive variant nonalcoholic steatohepatitis (NASH). NASH is known to extend into liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). To determine the pathogenesis and effective treatment, an excellent animal model of NASH/HCC is required. We recently succeeded to develop two MS associated NASH mice model (TSOD mice and DIAR-MSG mice). Their clinical course and pathological characters were quite similar to those of human MS-NASH patients. Interestingly, most of them developed HCC in aged, which pathological and functional characters were identical to those of human HCC. In addition, we established a novel mouse model of HCC based on type 1 diabetes (DIAR-nSTZ mice) and reported its histopathological features. To compare these mice models from various aspects, we can highlight specific and useful characters of MS associated liver diseases including hepatocarcinogenesis.

Key words : animal model, metabolic syndrome, nonalcoholic steatohepatitis, hepatocellular carcinoma