

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04788

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎の新たな予防戦略：血圧と栄養管理の重要性に関する研究

研究課題名(英文)New prevention strategies for non-alcoholic steatohepatitis - a study on the importance of blood pressure and nutritional management

研究代表者

那須 民江 (NASU, Tamie)

中部大学・生命健康科学部・特任教授

研究者番号：10020794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：血圧正常(WKY)と高血圧ラット(SHRとSHRSP5/Dmcr)にHFC食を与え、NASH発症の違いを比較した。高血圧ラットには重度のNASHが観察されたが、血圧正常ラットは軽度の変化であった。高血圧動物ではHFC食摂取によりTGF β /MAPKのシグナルの上昇がみられたが、Nrf2系のシグナルは抑制され、HO-1の発現上昇も抑えられた。

SHRラットにHFCと降圧剤を併用し、NASH進展抑制効果を観察した。降圧剤介入はHFC食によるNASHを有意に低下させた。降圧剤はHFC誘導性の肝炎や線維化に関連した分子シグナルの上昇を抑制した。NASHの予防には脂質と血圧コントロールが必要である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism that underlies the progression of hypertension-associated NASH by comparing differences in HFC diet-induced NASH among hypertensive SHR and SHRSP5/Dmcr, and normotensive WKY. The diet induced severe NASH in the hypertensive rats, whereas it only caused mild NASH in the normotensive rats. Increased activation of TGF β /MAPK pathway was observed in the hypertensive rats; it suppressed nrf2 pathway in the hypertensive rats and led to lower increases in the hepatic level of HO-1. These signaling pathways might play crucial roles in the development of hypertension-associated NASH.

We also investigated whether antihypertensive drug suppress HFC-induced NASH in hypertensive SHR rats. It suppressed HFC-induced NASH in the liver of SHR rats. It significantly suppressed HFC-induced increases of inflammation- and fibrosis-related molecular markers. Thus, intervention of antihypertensive drug might be important in the prevention of NASH.

研究分野：環境毒性学・健康科学

キーワード：NASH コレステロール 高血圧 降圧剤 線維症 CD68 SHR TNF

1. 研究開始当初の背景

我が国では食生活の欧米化と運動不足に伴いメタボリックシンドロームの肝臓表現型の NASH/NAFLD が増加し、懸念されている。検診では男性約 32%、女性約 9%が NAFLD であり、これらのうち NASH は 20~30% を占める。肥満者に多いが、わが国では非肥満 NASH が多い。疫学的には高コレステロール摂取や高血圧等がリスクとされている。肥満、糖尿病、高脂血症に関連する研究は多いが、高血圧の関与の疫学研究は少なく、分子基盤に関するメカニズム研究は殆どない。通常のラットやマウスで高脂肪食により線維症まで進展させることは難しい。一方、遺伝子操作(癌抑制遺伝子 PTEN ノックアウト)による NAFLD モデル動物(線維症の発生)は報告されている(Peyrou et al, 2010)しかし、このマウスでは、遺伝子の影響は観察できるが、高血圧の関与は観察できない。化学物質(四塩化炭素)による NAFLD モデルがあるが、高脂肪食による生活習慣病としての病態を反映するか疑問である。加えて、高血圧の影響は観察できない。即ち従来開発されたモデルでは高血圧の関与は観察できない。

我々は、経時的に脂肪肝、炎症、線維化を観察できる NASH モデルラットを開発した。即ち、SHRSP5/Dmcr ラットに高脂肪 高コレステロール(HFC)食を与えることにより、2 週間で肝臓の脂肪蓄積・炎症、8 週間で線維症、14 週間で架橋形成した線維症を引き起こすこと、これらの病理像はヒトの NASH と酷似していることを明らかにした。この系統は高血圧である。従って正常血圧の Wistar Kyoto (WKY) との比較により、血圧の NASH/NAFLD 発症への影響が観察できる。

一方、我々は NAFLD 進展における胆汁酸蓄積の重要性を明らかにした。UHPLC で 21 種の胆汁酸濃度を測定した。HFC 食を摂取した SHRSP5/Dmcr ラットの肝臓では毒性の強いケノデオキシコール酸(CDCA)が蓄積したが、毒性の弱いコール酸(CA)の蓄積は軽度であった。CDCA/CA 比と胆汁酸のグリシン抱合体/タウリン抱合体比の著しい上昇が、炎症・脂肪化・線維症発症に関係していることが明らかとなった。

また、脂肪化・炎症・線維症の分子メカニズムを明らかにした。SHRSP5/Dmcr ラットに HFC 食を与えると、コレステロール・胆汁酸が蓄積し、炎症性サイトカイン(TNF α 、IL6) および NF κ B が上昇し炎症が起こる。また、コレステロールの蓄積は胆汁酸合成酵素(CYP7A1 や CYP8B1)を上昇させ、肝臓内の胆汁酸が蓄積し、この蓄積が、炎症・大脂肪滴蓄積・壊死・線維症進展と関連することを明らかにした。加えて、HFC 食はカスパーゼの活性を低下させ、アポトーシスではなくネクローシスを引き起こし、線維症に進展させることを解明した。

このような先行研究により、次の疑問点に達した。SHRSP5/Dmcr は、WKY を系統元

とし、SHR-SHRSP-SHRSP5/Dmcr と系統分離されてきた。SHR 以降の高血圧ラットでは、簡単に HFC 食による線維症が発生し、系統元の血圧正常の WKY ラットでは発生しないとの仮説を持った。即ち、WKY-SHR 以降の系統間の表現型の違い、「高血圧」が NASH 発生に重要なカギを握るといふ説である。今まで検討されなかった「高血圧」と「高脂肪食」による NASH/NAFLD 進展の分子機構を明らかにすることを計画した。

2. 研究の目的

この研究では、まず正常血圧ラット(WKY)と高血圧ラット(SHR,SHRSP5/Dmcr)に 8 週間 HFC 食を投与し、肝障害(NASH)の程度の差異を形態的、生化学的および分子生物学的側面から明らかにする。

第二には高血圧ラット SHR に降圧剤(ヒドララジン)介入を行い、HFC によって誘導される NASH の進展が抑制される分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

実験 1. 10 週齢の雄正常血圧の WKY、高血圧の SHR と SHRSP5/Dmcr ラットに HFC 食を 8 週間曝露し、肝臓の炎症・線維症の進展を病理学的、生化学的、分子生物学的(TNF 系、NF κ B 系、MAPK 系、TGF 系、Keap1-Nrf2 系)に検討した。

実験 2. WKY に一番近い系統の SHR を実験に用いた。HFC 食に降圧剤(ヒドララジン)を併用し、肝炎・線維症進展抑制効果を観察した。また炎症・線維症ラットに普通食・降圧剤を介入し、治療効果を検討した。具体的には、血清の肝機能値、CD68 免疫染色、TGF、PDGF R、SMA、TIMP1 および MMPs を測定した。

4. 研究成果

実験 1.

(1)病理学的解析: 3 系統肝に明らかな肝障害の程度の差が認められ、炎症・線維症共に SHRSP5/Dmcr > SHR > WKY であった。WKY では他の 2 系統に見られたバルーニングや大脂肪滴および線維症の発現は軽度かほとんど観察されなかった。

(2)生化学的解析: HFC は血清の TG や TC を上昇させた。TC の上昇は SHRSP5/Dmcr がもっとも大きく、次いで SHR, WKY の順であった。HFC は肝臓のこれらの脂質も上昇させたが、特に高血圧ラット(SHR, SHRSP5/Dmcr)の上昇率が高かった。HFC は血清 AST, ALT, GGT を上昇させた。上昇の程度は高血圧ラットの方が大きかった。

(3)分子生物学的解析: HFC 食による 3 系統ラット肝臓の炎症シグナリングの影響は、差異が認められるものと認められないものに大別された。WKY, SHR, SHRSP5/Dmcr 3 系統に差が認められないが上昇したのは血清の TNF

、肝臓の MAPK 系の炎症関連因子であった、WKY に軽度か全く影響がみられないが、しかし SHR と SHRSP5/Dmcr に影響が認められたのは NF- κ B 系と Keap1-Nrf2 系の炎症シグナリング系であった。前者は古典的な炎症系であり、後者は第 II 相の薬物代謝酵素の HO-1 を介してビリルビンの生成に関連するものである。また炎症にかかわる TGF- β 1 は線維症発症にも関連しており、その発現が WKY では全く増えないが、SHR と SHRSP5/Dmcr では明らかに上昇していた。これらの炎症シグナリングへの影響の系統差が炎症や線維症、肝細胞のバルーニング変化等の病理的变化に関連していると解された。SHR や SHRSP5/Dmcr の胆汁酸合成の律速酵素 CYP7A1 の発現は WKY より 300 倍高いことを発見した。この発現の違いが、SHR 以降の系の線維症に対する高感受性要因であることが判明した。高血圧が CYP7A1 発現を介して線維症進展に関わっている可能性がある。以上の成果を図 1 に示す。

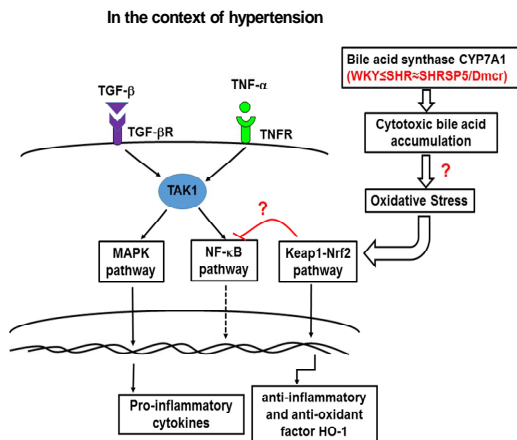


図 1. 高血圧と HFC 食による肝炎の分子機構

実験 2 .

- (1)HFC 食による SHR ラット肝臓の腫大は降圧剤同時投与により軽減された。
- (2)生化学的解析:HFC 食による肝臓逸脱酵素 AST、ALT、GGT の上昇は降圧剤同時投与によって軽減した。
- (3)HFC 食によって肝臓の重度線維化が発症するが、降圧剤同時投与によって線維化面積は半減した。
- (4)分子生物学的解析:HFC 食による線維化合成に関わる COL1A1、血小板由来成長因子 (PDGF R)mRNA 量の上昇は降圧剤によって抑制された。平滑筋アクチン (SMA) の上昇も抑制傾向であった。HFC 食は細胞外マトリックスである血清のメタロプロテアーゼインヒビター (TIMP1) マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP8 や 9) のレベルを上昇させた。降圧剤は TIMP-1 の上昇を抑制したが、MMPs には影響を与えなかった。
- (5)免疫学的解析: CD68 による免疫染色の結果、降圧剤は HFC 食による陽性細胞の増加を明らかに抑制した。

(6)サイトカインへの影響:HFC 食は血清の TNF を上昇するが、降圧剤はその上昇を明らかに抑制した。しかし HFC 食による TGF の上昇には影響を与えなかった。以上の成果を図 2 に示す。

(7)結論:降圧剤のヒドララジンは HFC 誘導性の肝炎・線維化を抑制する(論文執筆中、7 月に投稿予定)。従って、NASH の予防に血圧管理は有効と考える。ヒトでも降圧剤が NASH 病態を改善することが報告されており、アンジオテンシン拮抗薬(ARE/ACE 阻害薬)降圧剤が高血圧を併発した NASH 患者の線維化マーカーを低下させ、線維化も改善させた (Yokohama et al, 2004)。

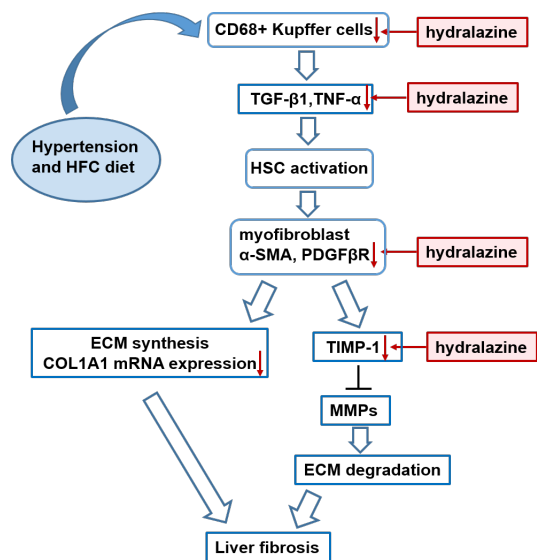


図 2. 降圧剤ヒドララジンによる高血圧/HFC 食による肝臓線維化抑制の分子機構

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 6 件)

(英語論文は旧姓 Nakajima を使用)

- Yuan Y, Naito H, Nakajima T, The role of cholesterol in the pathogenesis of hypertension-associated nonalcoholic Steatohepatitis, InTechOpen, 査読有、2018、in press、
<https://mts.intechopen.com/myprofile/index/dashboard>
 Yetti H, Naito H, Yuan Y, Jia X, Hayashi Y, Tamada H, Kitamori K, Ikeda K, Yamori Y, Nakajima T, Bile acid detoxifying enzymes limit susceptibility to liver fibrosis in female SHRSP5/Dmcr rats fed with a high-fat-cholesterol diet, PLOS ONE, 査読有、2018、13:e0192863、DOI:10.1371/journal.pone.0192863.
 Yuan Y, Naito H, Jia X, Kitamori K, Nakajima T, Combination of Hypertension Along with a High Fat and

Cholesterol Diet Induces Severe Hepatic Inflammation in Rats via a Signaling Network Comprising NF- B, MAPK, and Nrf2 Pathways, *Nutrients*, 査読有、2017、9:1018-1018、DOI:10.3390/nu9091018.

Naito H, Jia X, Husna Y, Yanagiba Y, Tamada H, Kitamori K, Hayashi Y, Dong W, Kato M, Ishii A, Nakajima T, Importance of detoxifying enzymes in differentiating fibrotic development between SHRSP5/Dmcr and SHRSP rats, *Environ health Prev Med*, 査読有、2016、21:368-381、DOI:10.1007/s12199-016-0539-x.

Tamada H, Naito H, Kitamori K, Hayashi Y, Yamagishi N, Kato M, Nakajima T, Efficacy of dietary lipid control in healing high-fat and high-cholesterol diet-induced fibrotic steatohepatitis in rats, *PLoS One*, 査読有、2016、11(1):e0145939、DOI:10.1371/journal.pone.0145939.

那須民江、内藤久雄、非アルコール性脂肪性肝炎発症・進展の機序解明と予防 - 新しいNASHモデル動物からのアプローチ -、*日本衛生学雑誌*、査読有、2015、70(3):197-204、DOI:10.1265/jjh.70197.Japanese.

〔学会発表〕(計 8 件)

内藤久雄、高血圧及び高脂肪食摂取はラット肝臓 Cyp7a1 プロモーターのメチル化頻度を増加させる、第 88 回日本衛生学会学術総会、2018

袁媛、降圧剤による高脂肪・高コレステロール食由来肝線維化シグナル系の抑制、第 88 回日本衛生学会学術総会、2018
袁媛、降圧剤は高脂肪・高コレステロール食で誘導される脂肪性肝炎の進行を抑える、第 87 回日本衛生学会学術総会、2017

内藤久雄、解毒酵素の発現抑制が食餌性由来肝線維化進展に重要である、第 87 回日本衛生学会学術総会、2017

内藤久雄、高脂肪食摂取による肝線維化進展とオートファジー・小胞体ストレス、第 86 回日本衛生学会学術総会、2016

袁媛、Hypertension may influence high-fat and cholesterol-induced hepatitis in rats、第 86 回日本衛生学会学術総会、2016

内藤久雄、高脂肪食摂取による肝炎・線維症進展におけるオートファジーの関与、第 51 回高血圧関連疾患モデル学会、2015

北森一哉、非アルコール性脂肪性肝疾患におけるコレステロール摂取の影響と肝臓脂肪酸組成の変化、第 51 回高血圧関連疾患モデル学会、2015

6 . 研究組織

(1)研究代表者

那須 民江 (NASU, Tamie)
中部大学・生命健康科学部・特任教授
研究者番号：1 0 0 2 0 7 9 4

(2)研究分担者

石井 晃 (ISHII, Akira)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：3 0 2 5 2 1 7 5

内藤 久雄 (NAITO, Hisao)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号：9 0 5 4 7 5 5 6