

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00874

研究課題名(和文)食餌中脂肪酸組成により誘導されたNASHと肝癌の発生機序の解明と制御法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the pathogenesis of NASH and hepatocellular carcinoma induced by dietary fatty acid, and development of therapeutic strategies based on its pathogenesis

研究代表者

三宅 映己(Teruki, Miyake)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80573659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪酸食摂取により発症するNASHと肝発癌のメカニズム解明のために、トランス脂肪酸、オレイン酸、パルミチン酸高含有高脂肪食を用いてマウスを飼育し、酸化ストレスの発症機序の検討を行った。高トランス脂肪酸食群は、他の脂肪酸食群に比べ酸化ストレスの亢進が見られ、その機序として肝内への炎症性マクロファージの浸潤とNOX2の発現亢進がみられた。また、肝内の脂肪沈着に関連した因子を肝臓特異的に抑制することにより、炎症性マクロファージの浸潤の低下がみられた。これらの結果はNASHの肝発癌を抑制する可能性が示唆された。

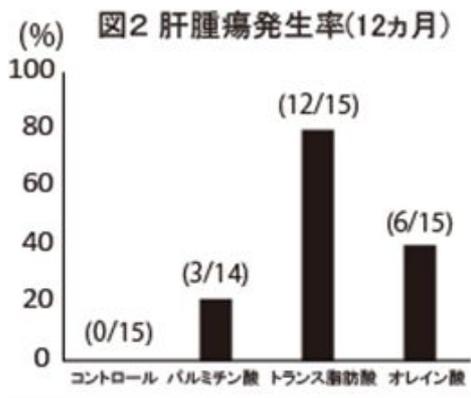
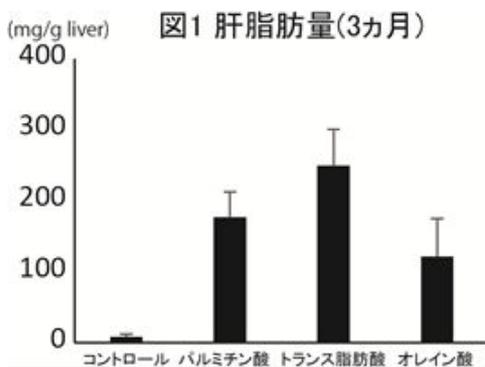
研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma (HCC) caused by excessive intake of fatty acid, we analyzed the mechanism of generation of oxidative stress in obese mice induced by three different types of high fat diet, 1) high trans fatty acid, 2) high oleic acid, or 3) high palmitic acid. A number of HCC was significantly increased in high trans fatty acid fed group compared with other two groups. Further, expression of a factor which related to lipid deposition was significantly higher in the high trans fatty acid diet fed mice. The over expression of the factor by excess trans acid facilitated the accumulation of inflammatory macrophage which express NOX2 and resulted in excessive oxidative stress. On the other hand, liver specific suppression of the factor related to lipid deposition in high trans fatty acid fed mice reduced the number of inflammatory macrophages and the expression of oxidative stress in the liver.

研究分野：Metabology

キーワード：NASH hepatocellular carcinoma High fat diet NOX2 trans fatty acid

1. 研究開始当初の背景

脂肪の過剰摂取による脂肪毒性は、膵臓でのインスリン分泌の低下や、肝臓、骨格筋、脂肪組織での脂肪蓄積やインスリン抵抗性を誘導し、生活習慣病の発症に関与する。高脂肪食誘導非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) マウスでは、長期間高脂肪食で飼育することより肝臓で発癌することを確認した。次に、この結果をもとに高脂肪食の脂肪酸組成に注目し、トランス脂肪酸、パルミチン酸、オレイン酸高含有高脂肪食をそれぞれマウスに給餌し、肝臓に及ぼす影響について検討した。その結果トランス脂肪酸高含有高脂肪食群では、体重増加は他群とほぼ同等であるが、肝臓内の脂肪蓄積量の増加(図1)と肝炎・肝線維化の増悪がみられ、さらに肝発癌率の増加が確認された(図2)。



その機序として、肝臓での脂肪酸合成と脂肪酸蓄積に関与する因子を増加させ、脂肪肝を悪化させることを見出した。さらに、肝臓内の脂肪蓄積は酸化ストレスを亢進させ発癌に寄与していた。しかしながら、食事の脂肪酸による酸化ストレス産生機序や肝炎・肝線維化への関与、肝炎、肝発癌抑制方法については明らかではない。

2. 研究の目的

本研究ではトランス脂肪酸高含有高脂肪食が肝臓内の NADPH oxidase (NOX) を介した酸化ストレス産生に及ぼす影響と肝炎と肝線維化への関与、3系脂肪酸摂取による肝炎、肝発癌抑制効果について検討し、NAFLD から非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、肝硬変、

肝発癌へ進行するメカニズムを、食餌中の脂肪酸の種類に注目し解明する。

3. 研究の方法

- (1) 各種脂肪酸高含有高脂肪食と通常食でマウスを飼育し、各群のマウスの肝臓を経時的に採取する。
- (2) 各群の肝臓を用いて、NOX1~5 について RT-PCR を用いて測定する。NOX1~5 の発現量の結果を確認後、発現量の上昇していた NOX に関連した因子を RT-PCR を用いて測定し、そのメカニズムを検討する。肝組織の確認を行う。
- (3) マウスの肝臓で行った実験で得られた結果が脂肪酸の直接的な影響であるかどうかを検証するため、肝細胞株もしくはマクロファージ細胞株を用いて実験を行う。トランス脂肪酸 (エライジン酸)、パルミチン酸、オレイン酸を肝癌細胞株とマクロファージ細胞株に添加し、肝臓を用いて得られた結果をもとに、トランス脂肪酸食が影響を及ぼした可能性のある因子を RT-PCR を用いて測定する。
- (4) 肝内脂肪蓄積に関与する因子を、siRNA を用いて発現を低下させ、肝内脂肪蓄積量、酸化ストレス、炎症細胞、線維化関連因子を RT-PCR を用いて測定する。
- (5) 3系脂肪酸高含有高脂肪食でマウスを飼育し、肝臓を経時的に採取し、発癌について確認する。
- (6) 肝臓を用いて肝内脂肪蓄積量、酸化ストレス、炎症細胞、線維化関連因子について RT-PCR を用いて測定をする。

4. 研究成果

- (1) 肝内の NOX1~5 までの発現は、食餌開始後 6 カ月までは各群で有意な変化は見られなかったが、その後トランス脂肪酸群で、NOX2 の発現が有意な上昇がみられた。
- (2) NOX2 の発現に関与するマクロファージについて検討を行った。RT-PCR を用いて、CD11b、CD11c、F4/80 の検討を行ったところ、食餌開始後 6 カ月以降にトランス脂肪酸群において炎症性マクロファージの表面マーカーである CD11c、F4/80 の発現の亢進がみられた。また、炎症性サイトカインの発現増加も確認された。
- (3) 肝内の chemokine の発現について検討を行った。MCP-1 などのケモカインはトランス脂肪酸群が他の群と比較して、食餌開始後 6 カ月以降に有意な上昇がみられた。しかし、肝内の脂肪量の有意な増加がみられた 3 カ月の時点では有意な差はなかった。
- (4) 肝癌細胞株をトランス脂肪酸、パルミチン酸、オレイン酸で刺激し、ケモカイン

の発現について検討したが、有意な差は見られなかった。

- (5) マクロファージ細胞株をトランス脂肪酸、パルミチン酸、オレイン酸で刺激し、炎症性サイトカインの産生や NOX 2 の発現について検討したが、有意な差は見られなかった。
- (6) 肝炎の組織学的な検討では、食餌開始後 3 ヶ月、6 ヶ月の時点で炎症の程度に有意な差は見られなかったが、食餌開始後 12 ヶ月でトランス脂肪酸群の有意な炎症の増悪がみられた。
- (7) siRNA を用いて GPAT-1 を肝臓特異的に低下させ、トランス脂肪酸を 3 ヶ月間給餌したマウスの肝臓では、肝内脂肪沈着の有意な低下が確認された。
- (8) 肝臓の組織学的な検討では、炎症細胞浸潤や線維化の程度には、差は見られなかった。
- (9) また、酸化ストレスは GPAT-1 の発現低下により改善傾向がみられ、マクロファージの表面マーカーの発現は低下がみられた。
- (10) 3 系脂肪酸の肝炎、肝発癌に及ぼす影響を検討するため、3 系脂肪酸高含有高脂肪食でマウスを飼育しているが、結果が得られる段階までは、たどり着けていない。

4 . 今後の展望

トランス脂肪酸摂取により、肝内脂肪沈着が増加し、脂肪肝が悪化した。さらにその後、肝臓内での発癌がみられた。その機序として、炎症性マクロファージの増加による NOX2 の増加とそれに伴う酸化ストレスの増加が確認された。また、肝内脂肪蓄積に關与する因子の発現を低下させることにより、脂肪肝の改善がみられ、肝内の炎症性マクロファージの浸潤が低下した。しかしながら依然解決されていない疑問点が残っている。まず、脂肪肝が悪化した時点で、炎症性マクロファージを誘導する chemokine の増加がみられなかった。また、肝細胞をトランス脂肪酸で刺激を行っても、chemokine の増加がみられなかった。これらのことから、マクロファージの浸潤増加が、肝臓の脂肪沈着悪化によるものか、トランス脂肪酸の直接的な作用によるものか不明である。今後は肝臓内のマクロファージの活性化機序について明らかにし、脂肪肝から、肝炎、肝臓癌への進展を抑制する方法を明らかにしたい。また、現在進行中である 3 系脂肪酸を用いた肝炎、発癌に対する影響を検討し、NAFLD 進展抑制の可能性について研究を行っていききたい。

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 8 件)

Low Urine pH is Associated with Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Community-based Cross-sectional Study. Miyake T, Yoshida S, Yamamoto S, Furukawa S, Yoshida O, Kanzaki S, Senba H, Ishihara T, Koizumi M, Tokumoto Y, Hirooka M, Kumagi T, Abe M, Kitai K, Matsuura B, Hiasa Y. Intern Med. 2018 (in press) doi: 10.2169/internalmedicine.0167-17. 査読あり

Cigarette smoking is a risk factor for the onset of fatty liver disease in nondrinkers: A longitudinal cohort study. Okamoto M, Miyake T, Kitai K, Furukawa S, Yamamoto S, Senba H, Kanzaki S, Deguchi A, Koizumi M, Ishihara T, Miyaoka H, Yoshida O, Hirooka M, Kumagi T, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y. PLoS One. 2018;13:e0195147. doi: 10.1371/journal.pone.0195147. 査読あり

Upregulated absorption of dietary palmitic acids with changes in intestinal transporters in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Utsunomiya H, Yamamoto Y, Takeshita E, Tokumoto Y, Tada F, Miyake T, Hirooka M, Abe M, Kumagi T, Matsuura B, Ikeda Y, Hiasa Y: J Gastroenterol. 2017; 52: 940-954. doi: 10.1007/s00535-016-1298-6. 査読あり

Differences in the risk of fatty liver for onset of impaired fasting glucose according to baseline plasma glucose levels. Miyake T, Hirooka M, Yoshida O, Furukawa S, Kumagi T, Koizumi M, Yamamoto S, Kuroda T, Arimitsu E, Takeshita E, Abe M, Kitai K, Matsuura B, Hiasa Y: J Gastroenterol. 2017; 52: 237-244. doi: 10.1007/s00535-016-1234-9. 査読あり

Quantitative imaging of fibrotic and morphological changes in liver of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model mice by second harmonic generation (SHG) and auto-fluorescence (AF) imaging using two-photon excitation microscopy (TPEM). Yamamoto S, Oshima Y, Saitou T, Watanabe T, Miyake T, Yoshida O, Tokumoto Y, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y, Imamura T. Biochem Biophys Rep. 2016 Sep 25;8:277-283. doi: 10.1016/j.bbrep.2016.09.010. 査読あり

Free testosterone concentration is inversely associated with markers of liver fibrosis in men with type 2 diabetes mellitus. Miyauchi S, Miyake T, Miyazaki

M, Eguchi T, Niiya T, Yamamoto S, Senba H, Furukawa S, Matsuura B, Hiasa Y: Endocr J. 2017;64:1137-1142. doi: 10.1507/endocrj.EJ17-0225. 査読あり

Low alcohol consumption increases the risk of impaired glucose tolerance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Miyake T, Kumagi T, Hirooka M, Furukawa S, Yoshida O, Koizumi M, Yamamoto S, Watanabe T, Yamamoto Y, Tokumoto Y, Takeshita E, Abe M, Kitai K, Matsuura B, Hiasa Y. J Gastroenterol. 2016;51:1090-1100. 査読あり

Hyperthyroidism Improves the Pathological Condition of Nonalcoholic Steatohepatitis: A Case of Nonalcoholic Steatohepatitis with Graves' Disease. Miyake T, Matsuura B, Furukawa S, Todo Y, Yamamoto S, Yoshida O, Imai Y, Watanabe T, Yamamoto Y, Hirooka M, Tokumoto Y, Kumagi T, Abe M, Seike H, Miyauchi S, Hiasa Y. Intern Med. 2016;55:2019-23. doi: 10.2169/internalmedicine.55.6640. 査読あり

〔学会発表〕(計7件)

Utsunomiya H, Hanayama M, Yamamoto Y, Takeshita E, Tokumoto Y, Miyake T, Masashi Hirooka, Kumagi T, Matsuura B, Abe M, Ikeda Y, Hiasa Y. Increase of serum chylomicron triglyceride concentration associated with intestinal overproduction of chylomicron triglyceride in nonobese, nondiabetic and normolipidemic NASH patients. The 68th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. (2017.10.21-24., Washington DC)

有光英治, 三宅映己, 廣岡昌史, 日浅陽一, 吉田沙希子, 山本晋, 松浦文三, 古川慎哉, 酒井武則, 多田藤政. 非アルコール性脂肪性肝疾患合併2型糖尿病患者に対するイブラグリフロジンの有効性の検討. 第116回日本内科学会四国地方会. (2017.5.21., 高知県立県民文化ホール (高知県高知市))

三宅映己, 仙波英徳, 山本晋, 徳本良雄, 古川慎哉, 竹島美香, 清家祐子, 永井祥子, 山田佐奈江, 利光久美子, 松浦文三, 日浅陽一. 尿 pH を用いた非アルコール性脂肪肝疾患患者の困り込みの有用性の検討. (2017.1.13-15., 国立京都国際会館 (京都府京都市))

山本晋, 仙波英徳, 三宅映己, 徳本良雄, 古川慎哉, 竹島美香, 清家祐子, 永井祥子, 山田佐奈江, 利光久美子, 日浅陽一, 松浦文三. 2光子励起顕微鏡を用いた NASH 進行早期

診断における客観的指標の確立. 第20回日本病態栄養学会年次学術集会. (2017.1.13-15., 国立京都国際会館 (京都府京都市))

松浦文三, 山本晋, 神崎さやか, 仙波英徳, 三宅映己, 古川慎哉, 日浅陽一. 非アルコール性脂肪性肝障害の進展における -クリプトキサンチンの役割. 第20回日本病態栄養学会年次学術集会. (2017.1.13-15., 国立京都国際会館 (京都府京都市))

Miyake T, Yoshida S, Yamamoto S, Kanzaki S, Senba H, Furukawa S, Yoshida O, Hirooka M, Kumagi T, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y. Low alcohol consumption increases the risk of impaired glucose tolerance in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A community-based, large, cross-sectional study. 76th Scientific Sessions American Diabetes Association. (2016.6.10-14., New Orleans)

三宅映己, 吉田理, 徳本良雄, 廣岡昌史, 阿部雅則, 松浦文三, 日浅陽一. 食事中脂肪酸分画が NAFLD 発症に及ぼす影響. 第102回日本消化器病学会総会. (2016.4.21-23., 京王プラザホテル (東京都))

〔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〕

ホームページ等: 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅映己 (Miyake, Teruki)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 80573659

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし