

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09031

研究課題名(和文)遊離コレステロール由来シグナル制御に基づいた、脂肪肝・肝臓癌新規治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel therapies for steatohepatitis and liver cancer, by targeting the free cholesterol-mediated signaling pathway.

研究代表者

富田 謙吾 (Tomita, Kengo)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・病院 内科・准教授)

研究者番号：50317129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：高コレステロール摂食は、TLR9/インフラマソーム経路の活性化を介して、アセトアミノフェン肝障害を増悪させた。その病態機序に類洞内皮細胞が主要な役割を果たしていた。類洞内皮細胞のエンドリソソームでの遊離コレステロール蓄積はTLR9シグナルを増強させた。その結果TLR9/インフラマソーム経路活性化を介して、アセトアミノフェン肝障害を増悪させた。類洞内皮細胞のエンドリソソームでの遊離コレステロール蓄積は、Rab7膜輸送機能障害を介し、後期エンドソームからリソソームへのTLR9輸送障害を惹起した。その結果後期エンドソームでの活性化TLR9レベルが増加し、類洞内皮細胞でのTLR9シグナルを増強させた。

研究成果の概要(英文)：The HC diet exacerbated acetaminophen-induced acute liver injury in a TLR9/inflammasome pathway-dependent manner. LSECs played a major role in the cholesterol loading-induced exacerbation. The accumulation of free cholesterol in the endolysosomes in LSECs enhanced TLR9-mediated signaling, thereby exacerbating the pathology of acetaminophen-induced liver injury through the activation of the TLR9/inflammasome pathway. The accumulation of free cholesterol in LSEC endolysosomes induced a dysfunction of the Rab7 membrane trafficking recycling mechanism, thus disrupting the transport of TLR9 from late endosomes to the lysosomes. Consequently, the level of active TLR9 in the late endosomes increased, thereby enhancing TLR9 signaling in LSECs.

研究分野：脂肪肝

キーワード：非アルコール性脂肪肝 遊離コレステロール TLR9 アセトアミノフェン肝障害 類洞内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis: NASH) はメタボリックシンドロームの肝臓での表現形と考えられている。肥満人口の増加に伴い増加の一途にある NASH は、一部が肝硬変まで進展する進行性の疾患であり肝臓も引き起こすため、治療法の確立は緊急課題である。NASH はその多くが肥満・インスリン抵抗性・高血圧・脂質異常症を背景因子に有し、また加齢により増悪する。我々はそれらの背景因子を切り口に、発症メカニズムの解明および治療法の確立にいち早く取り組み、NASH 病態機序のいくつかを解明してきた。

まず我々はインスリン抵抗性に着目し、インスリン抵抗性改善作用を有する PPAR γ アゴニストの Pioglitazone や、AMP kinase activator が脂肪肝炎の病態を改善することを報告した (*Gastroenterology* 2004; 126: 873-885. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 240S-245S.). また adipocytokine であるレプチンや TNF α の脂肪肝炎発症・進展への関与も明らかとした (*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G1078-1085. *Gut* 2006; 55: 415-424.). 一方でインスリン抵抗性改善作用を有する主要な adipocytokine である Adiponectin の肝臓シグナルが、NASH 病態を改善させる病態機序についても明らかとした (*Hepatology* 2008; 48: 458-473.). さらにユビキチンリガーゼ構成因子の F-box タンパク質 Fbxw7 が、肝臓局所での SREBP-1c の分解に関与し、NASH 発症に関わる病態機序の詳細を明らかにしてきた (*J Clin Invest* 2011; 121: 342-354.).

一方で、近年の大規模臨床研究により、コレステロール多量摂取は、肝臓線維化進展・肝臓発症のリスクを高めることが明らかとなった。我々は NASH 背景因子の 1 つとしてその点に着目し、食事由来のコレステロールが

肝臓構成細胞の 1 つである肝星細胞に遊離コレステロールとして蓄積し、TLR4 シグナルの増強を介して肝星細胞の TGF β 感受性を増強し、肝臓線維化を増悪させることを明らかにした (*Gastroenterology* 2012; 142: 152-164.). 細胞内でコレステロールは、遊離コレステロールまたはコレステロールエステル₂の形で存在するが、我々は細胞内のコレステロールエステル蓄積ではなく、遊離コレステロール蓄積が肝星細胞の TGF β に対する感受性の規定因子の 1 つであることを明らかにした。通常、細胞内のコレステロール量は転写因子 SREBP2 による feedback 機構により厳密に調節されている。しかしながら、肝星細胞が活性化される過程でそれらの調節機構が破綻し、さらに SREBP2 及び miR-33a 発現の増強が起こり、細胞内の遊離コレステロール蓄積は肝星細胞活性化に伴い増加した。遊離コレステロール蓄積増加は、肝星細胞の TGF β 感受性増強を介して肝星細胞を活性化させ、更に遊離コレステロール蓄積が増強するという肝星細胞活性化の vicious cycle を形成することが明らかとなった (*Hepatology* 2014; 59: 154-169.). このように細胞内遊離コレステロール蓄積は、細胞外コレステロールレベルとは独立した形で、肝星細胞活性化の調節因子としての側面を有する。実際に、肝星細胞における主要な遊離コレステロール代謝酵素である ACAT1 が、肝臓線維化進展の重要な規定因子であることを我々は近年明らかにした (*J Hepatol* 2014; 61: 98-106.).

肝星細胞を含む肝類洞壁細胞は、肝臓病進展のみならず肝発症微少環境形成に重要な役割を果たすが、上記の通り細胞内遊離コレステロール蓄積は、細胞外コレステロールレベルとは独立した形で、肝類洞壁細胞性状変化を引き起こしそれらの病態を修飾する。血清コレステロールレベルは、NASH 進展・肝発症と相関を呈するものの、虚血性心疾患等に比

べるとその相関は弱い。我々の検討も含むこれまでの報告により、血清でなく細胞内コレステロール蓄積が肝臓病・肝臓癌進展に影響を及ぼす事が解明されておりその理由と考えられる。肝類洞壁細胞中遊離コレステロール蓄積は、肝細胞中のそれに比して血清コレステロール値との相関が少なく、それらを取り巻く微少環境や細胞自体の状態に大きく影響を受ける。

2. 研究の目的

コレステロール多量摂取は肝臓病の線維化進展・発癌リスクを高めるが、我々は肝類洞壁細胞内遊離コレステロール蓄積が細胞外コレステロールレベルと独立に細胞性状変化を引き起こし、その変化がまた遊離コレステロール蓄積に影響を与え、肝臓病病態が修飾される機序を想定した。

各肝類洞壁細胞内遊離コレステロール蓄積とそれに伴う類洞壁細胞の性状変化が、急性肝炎、NASH・肝線維化進展・肝臓癌の病態機序に果たす役割を解明し、新たな治療法を開発する事を目的とした。

3. 研究の方法

まず、我々は、類洞壁細胞の一種である類洞内皮細胞の、遊離コレステロール蓄積と病態との相関の解析を施行した。高コレステロール食摂取マウスおよび、通常食摂取コントロールマウスを、急性アセトアミノフェン肝障害モデルに供し、その病態を解析した。TLR9欠損マウスおよび野生型マウスにも同様に高コレステロール食摂取または通常食摂取を施行し、その後急性アセトアミノフェン肝障害モデルに供した。類洞内皮細胞を含む各肝類洞壁細胞を分離し、類洞壁細胞における遊離コレステロール蓄積が、病態機序に及ぼす影響について解析した。

ACAT1 は肝星細胞における主要な遊離コレステロール代謝酵素であり、ACAT1 欠損マウスでは、肝星細胞に遊離コレステロールが蓄積

することを我々は確認した。そこで我々は、野生型マウスと ACAT1 欠損マウスとに、24 週間高脂肪食を摂取させることにより、非アルコール性脂肪肝炎モデルを作成した。また、野生型マウスと ACAT1 欠損マウスとを、12 週間のメチオニン・コリン欠損食摂取モデルや、22 週間のコリン欠乏食摂取モデルに供することによっても、非アルコール性脂肪肝炎モデルを作成した。これらの非アルコール性脂肪肝炎モデルで、ACAT1 欠損による肝星細胞の遊離コレステロール蓄積が、脂肪肝・肝障害・肝臓線維化を含む肝臓病態に及ぼす影響について、組織学的・血清学的に評価検討する。さらに、野生型マウスと ACAT1 欠損マウスとを肝臓癌モデルに供することにより（生後 15 日で DEN を投与。その後生後 6 週目より CCL₄ を週に一度投与にて 28 週齢まで）、肝臓癌病態機序における、肝星細胞の遊離コレステロールの影響について検討する。

4. 研究成果

高コレステロール食摂取により、急性アセトアミノフェン肝障害が増悪した。高コレステロール摂取は、類洞内皮細胞での遊離コレステロール蓄積を増強させた。その結果、膜輸送タンパク質 Rab7 の機能障害が惹起され、活性化 TLR9 タンパク質の蓄積を介して、類洞内皮細胞での TLR9 シグナルが増強した。そして引き続き増強する類洞内皮細胞での TLR9/インフラマソームシグナル活性化により、アセトアミノフェン肝障害が増悪するという新たな病態機序が明らかとなった。

さらに脂肪肝マウスモデルでも、類洞内皮細胞の遊離コレステロール蓄積は、同様の機序でアセトアミノフェン肝障害を増悪させていた。

このような、遊離コレステロール蓄積による、類洞内皮細胞での TLR9 シグナル増強の病態機序は、他の肝臓疾患も含めた肝臓病の有望な治療ターゲットと想定され、今後のさらな

る検討が期待されるものである。

NASH モデル、肝がんモデルを用いて、その病態での役割の詳細の解析を進めている。

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 15 件)

Teratani T, Tomita K (Teratani T and Tomita K share first authorship), Suzuki T, Furuhashi H, Irie R, Nishikawa M, Yamamoto J, Hibi T, Miura S, Minamino T, Oike Y, Hokari R, Kanai T.

Aortic carboxypeptidase-like protein, a WNT ligand, exacerbates nonalcoholic steatohepatitis.

J Clin Invest. 査読有 2018; 128: 1581-1596. doi: 10.1172/JCI92863.

Furuhashi H, Tomita K (Furuhashi H and Tomita K share first authorship), Teratani T, Shimizu M, Nishikawa M, Higashiyama M, Takajo T, Shirakabe K, Maruta K, Okada Y, Kurihara C, Watanabe C, Komoto S, Aosasa S, Nagao S, Yamamoto J, Miura S, Hokari R. Vitamin A-coupled liposome system targeting free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells offers a beneficial therapeutic strategy for liver fibrosis.

Hepatol Res. 査読有 2018; 48: 397-407. doi: 10.1111/hepr.13040.

Okada Y, Tsuzuki Y, Takeshi T, Furuhashi H, Higashiyama M, Watanabe C, Shirakabe K, Kurihara C, Komoto S, Tomita K, Nagao S, Miura S, Hokari R.

Novel probiotics isolated from a Japanese traditional fermented food, Funazushi, attenuates DSS-induced colitis by increasing the induction of high integrin α 8-expressing dendritic cells.

J Gastroenterol. 査読有 2018; 53: 407-418.

doi: 10.1007/s00535-017-1362-x.

Teratani T, Tomita K, Suzuki T, Furuhashi H, Irie R, Hida S, Okada Y, Kurihara C, Ebinuma H, Nakamoto N, Saito H, Hibi T, Miura S, Hokari R, Kanai T. Free cholesterol accumulation in liver sinusoidal endothelial cells exacerbates acetaminophen hepatotoxicity via TLR9 signaling.

J Hepatol. 査読有 2017; 67: 780-790. doi: 10.1016/j.jhep.2017.05.020.

Yasutake Y, Tomita K, Higashiyama M, Furuhashi H, Shirakabe K, Takajo T, Maruta K, Sato H, Narimatsu K, Yoshikawa K, Okada Y, Kurihara C, Watanabe C, Komoto S, Nagao S, Matsuo H, Miura S, Hokari R.

Uric acid ameliorates indomethacin-induced enteropathy in mice through its antioxidant activity.

J Gastroenterol Hepatol. 査読有 2017; 32: 1839-1845. doi: 10.1111/jgh.13785.

Yoshikawa K, Kurihara C, Furuhashi H, Takajo T, Maruta K, Yasutake Y, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Higashiyama M, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Nagao S, Miura S, Tajiri H, Hokari R.

Psychological stress exacerbates NSAID-induced small bowel injury by inducing changes in intestinal microbiota and permeability via glucocorticoid receptor signaling.

J Gastroenterol. 査読有 2017; 52: 61-71. doi: 10.1007/s00535-016-1205-1.

Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Hokari R, Tanaka M, Hirata I, Hibi T, Kaunitz JD, Miura S.

Endoscopic and clinical evaluation of treatment and prognosis of Cronkhite-Canada syndrome: a Japanese nationwide survey.

J Gastroenterol. 查曉有 2016; 51: 327-336.
doi: 10.1007/s00535-015-1107-7.

Morinaga J, Kadomatsu T, Miyata K, Endo M, Terada K, Tian Z, Sugizaki T, Tanigawa H, Zhao J, Zhu S, Sato M, Araki K, Iyama K, Tomita K, Mukoyama M, Tomita K, Kitamura K, Oike Y.

ANGPTL2 increases renal fibrosis by accelerating TGF-beta signaling in chronic kidney disease.

Kidney Int. 查曉有 2016; 89: 327-341. doi: 10.1016/j.kint.2015.12.021.

Sato H, Higashiyama M, Hozumi H, Sato S, Furuhashi H, Takajo T, Maruta K, Yasutake Y, Narimatsu K, Yoshikawa K, Kurihara C, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Nagao S, Miura S, Hokari R.

Platelet interaction with lymphatics aggravates intestinal inflammation by suppressing lymphangiogenesis.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 查曉有 2016; 311: G276-G285. doi: 10.1152/ajpgi.00455.2015.

Omori-Mizuno Y, Nakayama N, Inao M, Fungu J, Asabe S, Tomita K, Nishikawa K, Hosoda Y, Tanaka M, Hashimoto Y, Yakabi K, Koshima Y, Mochida S.

Randomized study comparing vitamin D3 and 1 α -Hydroxyvitamin D3 in combination with pegylated interferon/ribavirin therapy for chronic hepatitis C.

J Gastroenterol Hepatol. 查曉有 2015; 30: 1384-1390. doi: 10.1111/jgh.12949.

Kagawa T, Hirose S, Arase Y, Oka A, Anzai K, Tsuruya K, Shiraishi K, Orii R, Ieda S, Nakazawa T, Tomita K, Hokari R, Miura S, Ebinuma H, Saito H, Kitamura T, Horie Y, Okuse C, Wasada M, Inoko H, Tohkin M, Saito Y, Maekawa K, Takikawa H, Mine T. No contribution of the ABCB11 p.444A

polymorphism in Japanese patients with drug-induced cholestasis.

Drug Metab Dispos. 查曉有 2015; 43: 691-697. doi: 10.1124/dmd.114.061325.

Narimatsu K, Higashiyama M, Kurihara C, Takajo T, Maruta K, Yasutake Y, Sato H, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Nagao S, Miura S, Hokari R.

Toll-like receptor (TLR) 2 agonists ameliorate indomethacin-induced murine ileitis by suppressing the TLR4 signaling.

J Gastroenterol Hepatol. 查曉有 2015; 30: 1610-1617. doi: 10.1111/jgh.12980.

Ueda T, Higashiyama M, Narimatsu K, Yasutake Y, Kurihara C, Okada Y, Watanabe C, Yoshikawa K, Maruta K, Komoto S, Tomita K, Nagao S, Hokari R, Miura S.

Recombinant Thrombomodulin Modulates Murine Colitis Possibly via High-Mobility Group Box 1 Protein Inhibition.

Digestion. 查曉有 2015; 92: 108-119. doi: 10.1159/000438507.

Sato H, Tamura C, Narimatsu K, Shimizu M, Takajyo T, Yamashita M, Inoue Y, Ozaki H, Furuhashi H, Maruta K, Yasutake Y, Yoshikawa K, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Nagao S, Miura S, Shinmoto H, Hokari R.

Magnetic resonance enterocolonography is highly detectable of erosion and redness in intestinal mucosa of patients with Crohn's disease.

J Gastroenterol Hepatol. 查曉有 2015; 30: 667-673. doi: 10.1111/jgh.12851.

Ueda T, Hokari R, Higashiyama M, Yasutake Y, Maruta K, Kurihara C, Tomita K, Komoto S, Okada Y, Watanabe C, Usui S, Nagao S, Miura S.

Beneficial effect of an omega-6 PUFA-rich diet in non-steroidal anti-inflammatory drug-induced mucosal damage in the murine

small intestine.

World J Gastroenterol. 査読有 2015; 21: 177-186. doi: 10.3748/wjg.v21.i1.177.

〔学会発表〕(計 8 件)

富田謙吾, 寺谷俊昭, 穂苅量太.

NAFLD病態での、肝類洞内皮細胞TLR9シグナルを介した、アセトアミノフェン肝障害易感受性機構の解明.

第42回日本肝臓学会西部会. 2017. シンポジウム.

Tomita K, Furuhashi H, Higashiyama M, Shirakabe K, Maruta K, Okada Y, Kurihara C, Watanabe C, Komoto S, Hokari R.

Reducing free cholesterol accumulation specifically in hepatic stellate cells, by using either SREBP2-siRNA-bearing or anti-miR-33a-bearing vitamin A-coupled liposomes, ameliorates liver fibrosis in mice.

The 68th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2017.

Tomita K, Higashiyama M, Furuhashi H, Shirakabe K, Maruta K, Okada Y, Kurihara C, Watanabe C, Komoto S, Hokari R.

Chitinase 3-like 1 plays a key role in the progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice.

The 68th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2017.

富田謙吾, 古橋廣崇, 穂苅量太.

ビタミンA結合型リポソームシステムを利用した肝星細胞遊離コレステロール蓄積制御による肝線維化抑制効果の検討.

第 21 回日本肝臓学会大会. 2017. ワークショップ.

Teratani T, Tomita K, Suzuki T, Furuhashi H, Irie R, Hida S, Okada Y, Kurihara C, Ebinuma H, Nakamoto N, Saito

H, Hibi T, Miura S, Hokari R, Kanai T. Free cholesterol accumulation in liver sinusoidal endothelial cells exacerbates acetaminophen hepatotoxicity in mice.

The 52nd Annual Meeting of the European Association for the Study of Liver Diseases. 2017.

富田謙吾, 寺谷俊昭, 穂苅量太, 金井隆典.

脂肪性肝障害における肝線維化病態でのコレステロールの役割.

第 35 回アルコール医学生物学研究会. 2016. シンポジウム.

富田謙吾, 寺谷俊昭, 鈴木貴博, 岡田義清, 栗原千枝, 中本伸宏, 海老沼浩利, 齋藤英胤, 渡辺知佳子, 高本俊介, 永尾重昭, 杉山和夫, 三浦総一郎, 穂苅量太, 金井隆典.

NASH 新規治療標的としての、肝星細胞遊離コレステロール制御機構の解析

第 22 回肝細胞研究会. 2015. シンポジウム.

富田謙吾, 穂苅量太, 金井隆典.

ASH/NASH 新規治療標的としての、肝星細胞遊離コレステロール制御機構の解析.

第 51 回日本肝臓学会総会. 2015. ミニワークショップ.

6. 研究組織

(1)研究代表者

富田 謙吾 (TOMITA, Kengo)

防衛医科大学校・病院内科・准教授

研究者番号: 50317129

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

清水 孝彦 (SHIMIZU, Takahiko)

千葉大学・医学部・客員准教授

研究者番号: 40301791