

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19335

研究課題名(和文) 小腸脂肪酸吸収関連蛋白のNASH病態へ与える影響と治療標的分子の解明

研究課題名(英文) Upregulated absorption of dietary saturated fatty acids with changes in intestinal fatty acid transporters in non-alcoholic steatohepatitis.

研究代表者

山本 安則 (Yamamoto, Yasunori)

公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器内科・医員

研究者番号：20649066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis: NASH)は、肝硬変、肝臓がんを発症する肝疾患である。食事由来の飽和脂肪酸は、NASHにおいてその重要な危険因子である。本研究では、その小腸における食事由来飽和脂肪酸の吸収動態を評価し、以下を明らかにした。(1) 小腸での飽和脂肪酸吸収は、NASH患者のほうが健常者よりも増加している。(2) (1)の理由に、小腸粘膜上皮における脂肪酸吸収関連蛋白(MTTPとglycosylated CD36)の発現増加の関与が示唆された。

この結果によって、NASHの新しい治療標的を見出した可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Background & Aims: Saturated fatty acids (SFAs) such as palmitic acid are an important risk factor for the development of hepatic steatosis, lipotoxicity (hepatocellular death), and hepatocarcinogenesis. Major sources of hepatic SFAs are adipose tissue, de novo lipogenesis in the liver, and diet. Increases in SFA from adipose tissue and de novo lipogenesis have been reported in non-alcoholic steatohepatitis (NASH), but changes in dietary SFA intestinal absorption are unclear. Thus, we aimed to clarify these changes and their role in NASH. Conclusion: Significantly upregulated absorption of dietary SFA was evident in the jejunum of e-NASH patients. This alteration in absorption of SFA would be associated with the increase of MTTP and FABPs in the jejunum, and resulted to the chylomicronemic response in e-NASH patients. Those change of SFA metabolism might relate to the onset or pathogenesis of the early stages of NASH.

研究分野：肝臓

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 飽和脂肪酸 MTTP CD36

1. 研究開始当初の背景

(1). 食事由来の飽和脂肪酸は、NASH の発症、肝細胞障害機序に強く関与する。

我が国における非アルコール性脂肪肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) の頻度は、成人健診受診者の約 30%に見られ、年々その割合も増加している¹⁾。NAFLD は、その 20%前後が NASH となり、治療介入がない場合 5~10 年で、その 5~20%が肝硬変へ進行し、一部が肝細胞癌を発症する予後不良な疾患である²⁾。NASH の発症、病態進展において、飽和脂肪酸 (saturated fatty acids : SFA) は、肝臓における脂肪沈着や炎症性サイトカインの誘導³⁾、酸化ストレスの惹起や肝発癌⁴⁾等の肝毒性を有することで強く関与する。この SFA の肝細胞への供給源は、肝 de novo 合成、内臓脂肪組織、そして小腸から吸収される食事由来脂肪酸からの動員である。これまで、前者 2 つからの供給増加は報告されているが、小腸由来 SFA の供給変化に関しては十分に解明されていない。

(2). 評価困難であった肝疾患患者における小腸 SFA 吸収能の評価方法の確立。

ヒトを対象とした小腸粘膜の機能的評価は、本邦において、世界に先駆けて 2007 年に小腸内視鏡が保険適応となり試みられつつあるが、小腸粘膜の SFA 吸収動態に関する機能評価は未だ報告に乏しい。その要因の一つに、小腸 SFA 吸収能評価の困難さがある。近年、小腸 SFA 吸収能の評価方法として、非放射性同位元素 ¹³C 標識 SFA 試薬を経口負荷し、その代謝産物である ¹³CO₂ を測定、解析する方法⁵⁾が報告されているが、胃の排出時間の差が、小腸での試薬吸収の経時的変化を評価する上で大きなバイアスとなった。特に肝疾患患者では、食物胃内停滞時間が健常人より延長していることが報告されており⁶⁾、従来法では評価がで

なかった。そこで申請者らは、上部消化管内視鏡を用いて、胃を介さず液状化 ¹³C 標識 SFA 試薬を直接十二指腸水平脚に投与する、新たな SFA 吸収試験法を開発した⁷⁾。一見簡単に見えるこの手法がこれまで実施できなかったのは、常温で固形、かつ水に不溶である SFA を、人体に安全に投与できる温度かつ溶媒で液状化できなかったためである。申請者らは、経腸栄養剤「ラコール[®]NF 配合経腸溶液(大塚製薬)」のミセル化作用に注目し、これを利用することで ¹³C 標識 SFA 試薬を液状化した状態に保つ手法を確立した。この技術開発により、先端径 0.5mm の散布チューブを介して内視鏡下で腸管内に試薬散布を行うことができ、健常者、肝疾患患者、糖尿病患者など様々な患者群において従来法より正確な評価ができることを確認した。

(3). 肝硬変患者では、食事由来 SFA の小腸からの吸収動態が変化する。

通常、食事由来 SFA は、カイロミクロンの一部としてリンパ管を介し体循環に入り、その一部が肝臓に到達する。申請者らは、肝硬変患者において SFA の吸収の場である小腸絨毛粘膜が形態変化を起こしていることを同定しており⁸⁾、この形態変化により、肝硬変患者で小腸脂肪酸吸収能に変化が起きていると予想した。そこで、肝硬変患者において食事由来 SFA の吸収動態を評価した結果、SFA の一部がリンパ管ではなく、門脈を介し直接肝臓に輸送される吸収経路に変化していることを明らかにした。また、この吸収動態の変化の機序として、リンパ管輸送に関するカイロミクロン合成関連蛋白 MTP : microsomal triglycerides transfer protein、FATP 4 : fatty acid transporter protein 4) の発現低下と、小腸細血管における長鎖脂肪酸受容体 glycosylated CD36 の過剰発現が関与していることを報告した⁷⁾。この変化は、特に門脈圧亢進症を伴う肝硬変患者におい

て顕著である。申請者らは、NASH 患者ではまだ肝硬変に至らない早期より門脈圧が亢進している⁹⁾ことも報告している。以上より、NASH 患者の小腸においても脂肪酸吸収動態の変化やこれら脂肪酸吸収関連蛋白の発現が変化している可能性が十分示唆される。NASH/NAFLD 患者は、他のメタボリックシンドロームの合併率も高いことから、高脂肪食の過剰摂取状態と考えられ、食事由来 SFA の吸収動態と小腸粘膜における脂肪酸吸収関連蛋白の細胞分子学的評価は、これら NASH 患者における治療ターゲットの同定に結びつくものと考え、解明すべき研究課題とし立案した。

2. 研究の目的

本研究は、NASH 患者を対象に小腸における SFA 吸収動態と脂肪酸吸収関連蛋白の細胞分子学的評価を行うことで、以下の 3 つの事項を明らかにする。

(1) 先行研究により確立した小腸 SFA 吸収能の評価法を用い、NASH 患者の小腸 SFA の吸収動態の変化を明らかにする。

(2) 小腸生検組織を用い、形態学的評価や脂肪酸吸収関連蛋白の分子細胞学的評価を行うことで、その変化の機序を解明する。

(3) 上記で得られた知見と、NASH 患者の肝組織における炎症、線維化、肝発癌との関連、

既存の NASH 病態・予後に関する血液マーカーおよび画像データとの相関を解析することで、食事由来 SFA が NASH 病態へいかに関与し、また治療標的の候補となる小腸脂肪酸吸収関連蛋白が存在するかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ¹³C 標識脂肪酸試薬を用いた ¹³C 呼気試験法

愛媛大学臨床倫理委員会にて承認を得た後、健常者群 33 名、NASH 患者 73 名 (線維化 stage1,2 : e-NASH 32 名、線維化 stage3,4 :

a-NASH 41 名) を対象とした。長鎖脂肪酸である [1-¹³C] sodium palmitate を上部消化管内視鏡を用いて十二指腸水平脚に投与し、呼気中の ¹³CO₂ 排出量を経時的に解析した。

(2) 食餌摂取後の血清 apoB-48 の変化

試験食摂取後、経時的に採血して血清 apoB-48 を血清カイロミクロンの動態の指標として評価した。

(3) 小腸粘膜組織を用いた脂肪酸吸収関連分子の発現変化と血漿 glucagon-like-peptide-2 (GLP-2) の定量

同臨床倫理委員会にて承認(1407007)を得た後、小腸内視鏡で得た生検検体を用いて、脂肪酸吸収に関連する細胞内分子の PCR とウエスタンブロットを行った。CD36 の glycosylation を促進する血漿 GLP-2 濃度を、各症例で定量した。

(4)、glycosylated CD36 の免疫組織学的評価

小腸生検検体を用いて、リンパ管、毛細血管、および脂肪酸輸送蛋白である glycosylated CD36 の免疫組織学的評価を行った。

(5)、脂肪酸吸収量と臨床パラメーター・組織学的肝臓線維化との相関分析

血液検査、非侵襲的画像検査から得られた臨床検査値と脂肪酸吸収量との相関を解析した。更に、肝生検組織の線維化 stage 毎の脂肪酸吸収量を比較した。

4. 研究成果

(1) NASH 群において、[1-¹³C] sodium palmitate 投与早期(0-120分)の ¹³CO₂ 呼気排出量が有意に増加した(p<0.01)。e-NASH 群では投与後期(120-360分)の ¹³CO₂ 呼気排出量は増加したが、a-NASH 群は低下した。

(2) 試験食負荷後の血清 apoB-48 濃度は、e-NASH 群で有意に高値であった(p<0.05)。

(3) CD36、MTTP の mRNA、Glycosylated CD36、MTTP のタンパク発現は NASH 群で有意に増加した。

(4) NASH 群では血管上皮と絨毛上皮における

glycosylated CD36 の増加が見られた。そのため、NASH では glycosylated CD36 を介して門脈へ直接脂肪酸が吸収されると考えられた。また、血漿中の GLP2 は NASH 群で有意に増加しており、NASH 患者における glycosylated CD36 増加に GLP-2 が関与すると考えられた。

上記結果から、e-NASH における脂肪酸吸収増加の機序として、MTTP 増加を伴うカイロミクロン合成増加と glycosylated CD36 の発現増加、門脈血流を介した吸収が関与することが明らかとなった。

更に、相関解析により

(5) e-NASH 群では投与早期の $^{13}\text{C}_2$ 排出量と肝脂肪化・線維化に正の相関がみられた。また、投与後期の $^{13}\text{C}_2$ 排出量とインスリン抵抗性に正の相関がみられた。e-NASH を更に線維化 stage 1 と stage 2 に細分すると、stage 2 において投与早期の $^{13}\text{C}_2$ 排出量は有意に増加していた。

【結論】 早期 NASH 患者では、SFA の小腸からの吸収が、健常人より有意に増加していた。この変化の背景に MTTP 増加を伴うカイロミクロン合成亢進と glycosylated CD36 の発現増加、門脈血流を介した SFA 吸収の関与が示唆された。SFA の吸収増加は、肝臓の脂肪化、線維化と相関しており、早期 NASH の長鎖脂肪酸吸収増加は病態発現および進行、インスリン抵抗性に関与していると考えられた。

<引用文献>

- 1) Eguchi Y, et al. J Gastroenterol. 47:586-95, 2012.
- 2) 日本消化器病学会編集 「NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2014」
- 3) Feldstein AE, et al. Hepatology. 40:185-94, 2004
- 4) Yus, et al. Curr Mol Med. 3:561-72, 2003.
- 5) Cabre E, et al. Am J Clin Nutr. 81:692-701, 2005.
- 6) Isobe H, et al. Dig Dis Sci. 39:983-7, 1994.
- 7) Yamamoto Y, et al. Am J Clin Nutr. 2012;96:90-101
- 8) Higaki N, et al. J Gastroenterol.

43:327-31, 2008

- 9) Hirooka, et al. Radiology. 274:597-604, 2015

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 1 件)

Hiroki Utsunomiya, Yasunori Yamamoto, Eiji Takeshita, Yoshio Tokumoto, Fujimasa Tada, Teruki Miyake, Masashi Hirooka, Masanori Abe, Teru Kumagi, Bunzo Matsuura, Yoshio Ikeda, Yoichi Hiasa,

Upregulated absorption of dietary palmitic acids with changes in intestinal transporters in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). J Gastroenterology. DOI10.1007/s00535-016-1298-6

〔学会発表〕(計 5 件)

Yasunori Yamamoto, Hiroki Utsunomiya, Teruki Miyake, Yoshio Tokumoto, Yoshiou Ikeda, and Yoichi Hiasa.

Upregulated absorption of dietary saturated fatty acids with changes in intestinal fatty acid transporters in non-alcoholic steatohepatitis.

AASLD(米国肝臓病学会) Poster presentation, Sanfrancisco, November 13-17, 2015.

Yasunori Yamamoto, Hiroki Utsunomiya, Teruki Miyake, Yoshio Tokumoto, Masashi Hirooka, Masanori Abe, Bunzo Matsuura, Yoshiou Ikeda, and Yoichi Hiasa.

Upregulated intestinal absorption of dietary saturated fatty acids in non-alcoholic steatohepatitis

APASL(アジア太平洋肝臓病学会議) Poster presentation, Tokyo, 2.23, 2016

Hiroki Utsunomiya, Yasunori Yamamoto, Teruki Miyake, Yoshio Tokumoto, Masashi Hirooka, Masanori Abe, Bunzo Matsuura, Yoshiou Ikeda, and Yoichi Hiasa

Upregulated absorption of dietary palmitic acids with changes of intestinal transporters in non-alcoholic steatohepatitis (NASH)

AASLD(米国肝臓病学会) Poster presentation, Boston, November 11-15,

シンポジウム 1 NASH/NAFLD の基礎と臨床 ~病態解明に向けた新たな展開
宇都宮 大貴、山本 安則、日浅 陽一
NASH における小腸粘膜からの食事由来

パルミチン酸の吸収動態変化と病態への影響

第 53 回消化器免疫学会総会 (2016/7/14
~ 2016/7/15)

シンポジウム NASH における小腸粘膜からの食事由来パルミチン酸の吸収動態変化と病態への影響

宇都宮 大貴、山本 安則、日浅 陽一
第 30 回肝類洞壁細胞研究会学術集会
2016/11/25 ~ 2016/11/26

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 安則 (Yamamoto Yasunori)
公益財団法人がん研究会 有明病院 消化
器内科 医員
研究者番号 : 20649066

(2) 研究分担者

日浅 陽一 (Hiasa Yoichi)
愛媛大学大学院消化器・内分泌・代謝内科
学 教授
研究者番号 : 70314961