

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19340

研究課題名(和文) NASH病態における各種脂肪酸の毒性および感受性に関するメカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms related to toxicity and susceptibility of various fatty acids in NASH pathology

研究代表者

小川 祐二 (OGAWA, Yuji)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20644959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：パルミチン酸投与は、普通食負荷マウスではALT上昇は起こらないが、高脂肪食負荷マウスではALT上昇を起こすことを示した。腸管由来のエンドトキシンがALT上昇の因子であった。パルミチン酸および超微量LPSの投与はアポトーシスを起こし有意なALT上昇を引き起こすことから、パルミチン酸とLPSが共同することが示唆された。さらに、パルミチン酸はTLR4経路を介したケモカイン発現により肝臓に炎症細胞浸潤を引き起こすこと、さらには微細な肝線維化を起こすことを示した。私たちの結果は、NAFLD治療には腸管由来のエンドトキシンの低減のみならずFFAの低減が必要であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, after palmitate-injection, basal diet (BD)-fed mice did not alter the serum ALT, but high fat diet (HFD)-fed mice exhibited increased the serum ALT. Very low dose lipopolysaccharide (LPS)-injection increased the plasma endotoxin on BD-fed mice as same as HFD-fed mice. Both palmitate and very low dose LPS increased ALT on BD-fed mice. On BD-fed mice, palmitate induced inflammatory cells infiltration due to chemokines without ALT elevation and induced mild liver fibrosis via toll like receptor 4 (TLR4) pathway. Collectively, palmitate alone induced inflammatory cells infiltration and mild liver fibrosis without ALT elevation. Furthermore, palmitate exacerbated NAFLD pathogenesis by cooperative interaction with gut-derived endotoxin. Our results indicate that serum palmitate and plasma gut-derived endotoxin reduction are important for NAFLD treatment.

研究分野：NASH/NAFLD

キーワード：lipotoxicity NAFLD NASH palmitate saturated fatty acid

1. 研究開始当初の背景

NAFLD は NAFL と NASH を包括した概念であり、肥満、糖尿病、高脂血症、高血圧などの生活習慣病と関与する。NAFLD は近年増加傾向にある肝疾患であり日本においては検診受診者の 29.7% (1) に存在するとされる。NASH は NAFLD の 20 ~ 30% が罹患しているとされ、約 50% が進行性で、10 年間で 20% が肝硬変に移行し、最終的に肝臓癌に進行する。しかしながら、NAFL から NASH へと至るメカニズムは未だ不明であり、そのため有効な治療法が確立されていない。現時点で病態を最も有力に説明しているのは、肝臓に脂肪が沈着し(1st hit)、次に炎症が惹起される(2nd hit)という two-hit theory (2) である。我々は 2nd hit の部分として遊離脂肪酸に着目した。TLR4 は肝内炎症の key factor とされており、そのリガンドとして LPS の他に脂肪酸が挙げられる (3)。飽和脂肪酸は全身臓器での慢性炎症の誘因、インスリン抵抗性増悪や膵島細胞での細胞障害による糖尿病の悪化 (4)、動脈壁のアポトーシスに伴う動脈硬化の進展 (5) などを引き起こす。それらは “lipotoxicity” と称され (6) 大きな注目を浴びている。肝臓での lipotoxicity は、in vitro において飽和脂肪酸が JNK のリン酸化を介して肝細胞のアポトーシス感受性を増大させるとの報告があるが (7)、in vivo での単一脂肪酸投与と肝障害に関する報告はない。我々は世界に先駆けて、WT マウスへの経内頸静脈的飽和脂肪酸持続投与で脂肪肝炎が起こることを発見し報告した。in vivo での経内頸静脈的飽和脂肪酸持続投与によって、肝臓の脂肪化とともにヒト NASH に類似する好中球を中心とした炎症細胞浸潤を起こすモデルを確立した。さらに飽和脂肪酸を長期投与すると星細胞の活性化とともに肝臓繊維化を引き起こしたことは、ヒト NASH 病態に類似した。

2. 研究の目的

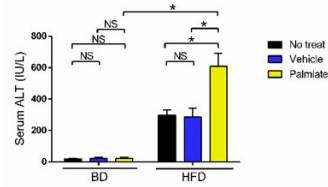
NAFLD/NASH 病態における lipotoxicity を評価するモデルマウスを用いて、各種脂肪酸の肝臓における lipotoxicity の臨床的意義をさらに深く追求し、さらにはその感受性に関するメカニズムを解明する研究である。

3. 研究の方法

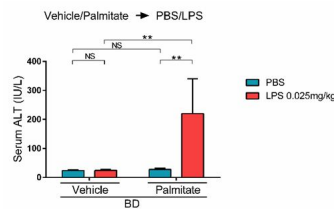
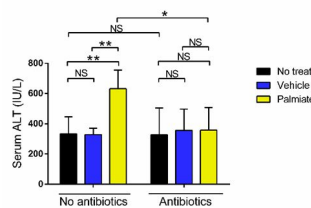
経内頸静脈的脂肪酸持続投与による脂肪肝炎を呈した NAFLD/NASH 様病態モデルマウスを用いて脂肪酸の肝臓における lipotoxicity の臨床的意義、さらには NASH 病態の解析を行う。

4. 研究成果

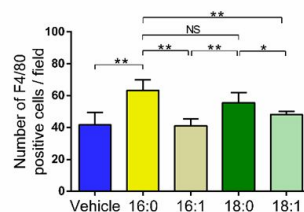
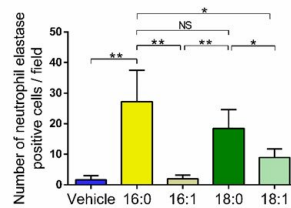
(1) パルミチン酸投与による ALT に関する検討：高脂肪食負荷モデルマウスへのパルミチン酸投与で血清 ALT 上昇を認めた。



(2) 高脂肪食負荷モデルでの血清 ALT 上昇に関する検討：腸管滅菌をた高脂肪食負荷モデルではパルミチン酸投与による血清 ALT は起こらなかった。また、普通食負荷モデルマウスにパルミチン酸 + very low dose LPS (0.025mg/kg) 投与を行うと血清 ALT は上昇した。以上から、パルミチン酸と LPS には共同増悪作用があることが示唆された。

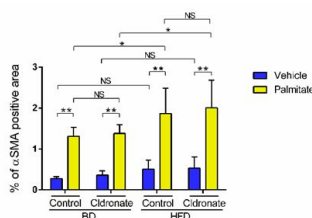
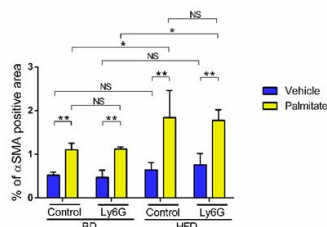


(3) 各種脂肪酸投与が肝臓に及ぼす影響の比較検討：パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、パルミトレイン酸を投与後では、好中球およびマクロファージの肝臓への浸潤はパルミチン酸がもっとも多かった。

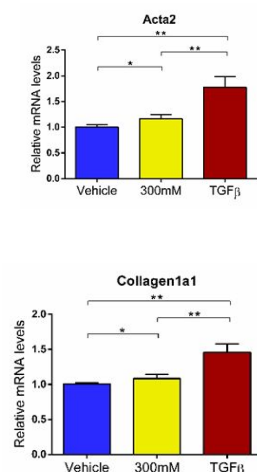


(4) *cc12* KO、*ccr2* KO、*cxcl2* KO、*cxcr2* KO マウスでの検討:好中球浸潤には *cxcl2* 経路、マクロファージ浸潤には *ccl2/ccr2* 経路が重要であった。

(5) clodronate liposomes、抗 Ly-6G のよるマクロファージ浸潤、好中球浸潤と線維化との関連:マクロファージ浸潤、好中球浸潤はパルミチン酸が引き起こす線維化シグナルに影響を与えなかった。



(6) 星細胞活性化について: *in vitro* において、パルミチン酸による肝細胞刺激が星細胞活性化に關与した。



(7) TLR4 の内因性リガンドとなる Fetuin-A の關与について: 今回の高脂肪負荷モデルでは、肝臓 mRNA および血中タンパク解析で Fetuin-A 発現が増加しないことを確認した。

#### <引用文献>

(1) Eguchi Y, Hyogo H, Ono M, et al: Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver

disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan : a multicenter large retrospective study. *J Gastroenterol.* 2012; 47; 586-595.

(2) Day CP, et al. *Gastroenterology.* 1998; 114: 842-845.

(3) Huang S, Rutkowski JM, Snodgrass RG, et al. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res.* 2012; 53(9): 2002-2013.

(4) Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, et al. Saturated fatty acid and TLR signaling link cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab.* 2012; 15(4): 518-33.

(5) Furuhashi M, Tuncman G, Görgün CZ, et al. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature.* 2007; (6): 959-965.

(6) Weinberg JM. Lipotoxicity. *Kidney Int.* 2006; (9):1560-6.

(7) Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, et al. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem.* 2006; (17): 12093-12101.

#### 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 12 件)

Hotta K, Kikuchi M, Kitamoto T, Kitamoto A, Ogawa Y, Honda Y, Kessoku T, Kobayashi K, Yoneda M, Imajo K, Tomeno W, Nakaya A, Suzuki Y, Saito S, Nakajima A. Identification of core gene networks and hub genes associated with progression of non-alcoholic fatty liver disease by RNA sequencing. *Hepatol Res.* 2017 Feb 20. 査読有.

Honda Y, Kessoku T, Ogawa Y, Tomeno W, Imajo K, Fujita K, Yoneda M, Takizawa T, Saito S, Nagashima Y, Nakajima A. Pemafibrate, a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha modulator, improves the pathogenesis in a rodent model of nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Rep.* 2017 Feb 14;7:42477. 査読有.

Kessoku T, Imajo K, Honda Y, Kato T, Ogawa Y, Tomeno W, Kato S, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Nagashima Y, Saito S, Wada K, Nakajima A. Resveratrol ameliorates fibrosis and inflammation in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Rep.* 2016 Feb 25;6:22251. 査読有.

Honda Y, Yoneda M, Kessoku T, Ogawa Y,

Tomeno W, Imajo K, Mawatari H, Fujita K, Hyogo H, Ueno T, Chayama K, Saito S, Nakajima A, Hotta K. Characteristics of non-obese non-alcoholic fatty liver disease: Effect of genetic and environmental factors. *Hepatol Res.* 2016 Sep;46(10):1011-8. 査読有.

Honda Y, Imajo K, Kato T, Kessoku T, Ogawa Y, Tomeno W, Kato S, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Saito S, Nakajima A. The Selective SGLT2 Inhibitor Ipragliflozin Has a Therapeutic Effect on Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice. *PLoS One.* 2016 Jan 5;11(1):e0146337. 査読有.

Nozaki Y, Fujita K, Wada K, Yoneda M, Shinohara Y, Imajo K, Ogawa Y, Kessoku T, Nakamuta M, Saito S, Masaki N, Nagashima Y, Terauchi Y, Nakajima A. Deficiency of eNOS exacerbates early-stage NAFLD pathogenesis by changing the fat distribution. *BMC Gastroenterol.* 2015 Dec 17;15:177. 査読有.

Imajo K, Kessoku T, Honda Y, Tomeno W, Ogawa Y, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Taguri M, Hyogo H, Sumida Y, Ono M, Eguchi Y, Inoue T, Yamanaka T, Wada K, Saito S, Nakajima A. Magnetic Resonance Imaging More Accurately Classifies Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Than Transient Elastography. *Gastroenterology.* 2016 Mar;150(3):626-637.e7. 査読有.

Tokushige K, Hyogo H, Nakajima T, Ono M, Kawaguchi T, Honda K, Eguchi Y, Nozaki Y, Kawanaka M, Tanaka S, Imajo K, Sumida Y, Kamada Y, Fujii H, Suzuki Y, Kogiso T, Karino Y, Munekage K, Kuromatsu R, Oeda S, Yanase M, Mori K, Ogawa Y, Seko Y, Takehara T, Itoh Y, Nakajima A, Kanemasa K, Nishino K, Masaki N, Takahashi H, Seike M, Torimura T, Saibara T, Toyota J, Chayama K, Hashimoto E. Hepatocellular carcinoma in Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease: multicenter survey. *J Gastroenterol.* 2016 Jun;51(6):586-96. 査読有.

Kitamoto A, Kitamoto T, Nakamura T, Matsuo T, Nakata Y, Hyogo H, Ochi H, Kamohara S, Miyatake N, Kotani K, Mineo I, Wada J, Ogawa Y, Yoneda M, Nakajima A, Funahashi T, Miyazaki S, Tokunaga K, Masuzaki H, Ueno T, Chayama K, Hamaguchi K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Sakata T, Tanaka K, Matsuzawa Y, Hotta K. CDH13 Polymorphisms are Associated with Adiponectin Levels and Metabolic Syndrome Traits Independently of Visceral Fat Mass. *J Atheroscler Thromb.* 2016;23(3):309-19. 査読有.

Nozaki Y, Fujita K, Wada K, Yoneda M, Kessoku T, Shinohara Y, Imajo K, Ogawa Y, Nakamuta M, Saito S, Masaki N, Nagashima Y, Terauchi Y, Nakajima A. Deficiency of iNOS-derived NO accelerates lipid accumulation-independent liver fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis mouse model. *BMC Gastroenterol.* 2015 Apr 1;15:42. 査読有.

Kitamoto A, Kitamoto T, So R, Matsuo T, Nakata Y, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Kamohara S, Miyatake N, Kotani K, Mineo I, Wada J, Ogawa Y, Yoneda M, Nakajima A, Funahashi T, Miyazaki S, Tokunaga K, Masuzaki H, Ueno T, Chayama K, Hamaguchi K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Sakata T, Tanaka K, Matsuzawa Y, Hotta K. ADIPOQ polymorphisms are associated with insulin resistance in Japanese women. *Endocr J.* 2015;62(6):513-21. 査読有.

Kitamoto T, Kitamoto A, Ogawa Y, Honda Y, Imajo K, Saito S, Yoneda M, Nakamura T, Nakajima A, Hotta K. Targeted-bisulfite sequence analysis of the methylation of CpG islands in genes encoding PNPLA3, SAMM50, and PARVB of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2015 Aug;63(2):494-502. 査読有.

〔学会発表〕(計 11 件)

小川祐二, 本多靖, 結束貴臣, 留野渉, 今城健人, 米田正人, 斉藤聡, 中島淳: M2BPGi による NAFLD の肝線維化ステージ診断における有用性. 第四回 神奈川県肝線維化マーカーM2BPGi 研究会 一般演題, 2017.3.4, ホテル横浜キャメロットジャパン (神奈川県).

小川祐二, 本多靖, 結束貴臣, 留野渉, 今城健人, 米田正人, 斉藤聡, 中島淳: M2BPGi による NAFLD の肝線維化ステージ診断に関する検討. 第 36 回アルコール医学生物学会学術集会 一般演題, 2017.1.28, 新横浜プリンスホテル (神奈川県).

小川祐二, 本多靖, 結束貴臣, 留野渉, 今城健人, 米田正人, 斉藤聡, 中島淳: RNA シークエンスを用いた NAFLD の肝線維化に関する解析. 第 36 回アルコール医学生物学会学術集会 一般演題, 2017.1.27, 新横浜プリンスホテル (神奈川県).

小川祐二, 今城健人, 中島淳: 非ウイルス性肝臓症例における肝硬度および肝内鉄沈着に関する検討. 第 41 回日本肝臓学会東部会 ワークショップ 6 非ウイルス性肝臓の現況と治療戦略, 2016.12.8, 京王プラザホテル (東京都).

小川祐二: 肥満に伴う endotoxemia が引き起こす肝臓における lipotoxicity 増悪の機序解明についての検討. 第 3 回肝臓と糖尿病・代謝研究会 ポスターセッション NASH/NAFLD の成因と病態 2 (基礎),

2016.7.16,石川県立音楽堂邦楽ホール・交流ホール(石川県).

小川祐二、本多 靖、結束貴臣、加藤真吾、今城健人、米田正人、中島 淳: パルミチン酸が引き起こす肝臓における自然免疫応答と肥満に伴う endotoxemia の相互作用についての検討. 第 23 回肝細胞研究会 シンポジウム 3「肝細胞微小免疫環境の解明に基づく疾患研究 - 動的平衡の維持と破綻のメカニズム」, 2016.7.8, 大阪大学中之島センター(大阪府).

Y. Ogawa, Y. Honda, T. Kessoku, W. Tomeno, S.Kato, K. Imajo, H. Mawatari, K. Hujita, S. Saito, A. Nakajima: SATURATED FATTY ACID, PALMITATE, INDUCED LIVER INFLAMMATION AND FIBROSIS IN VIVO. The International Liver Congress 2016, EASL Presentations: PAPER POSTER PRESENTATION, Barcelona, 2016.4.16, Fira Barcelona Gran Via (Barcelona, Spain).

小川祐二、本多靖、結束貴臣、加藤真吾、今城健人、米田正人、齊藤聡、中島淳: 飽和脂肪酸経静脈投与による NASH 病態モデルマウスの病態解明と治療法の検討. 第 18 回 Liver Forum in Kyoto 主題 2-1 肝炎の病態と治療, 2016.3.26 京都ホテルオークラ(京都府).

Yuji Ogawa, Kento Imajo, Atsushi Nakajima: Obesity exacerbates lipotoxicity induced by saturated fatty acid. JDDW2015 International Session (Workshop) 1, 2015.10.9, Grand prince hotel new Takanawa (Tokyo).

小川祐二、加藤孝征、廣田展久、中島淳、厚川和裕、大澤仁: 経皮的胆嚢ドレナージチューブ長期留置が奏功した胆嚢結石胆嚢炎の 2 例. 第 18 回日本高齢消化器病学会総会シンポジウム, 2015.7.11, ビッグハート出雲(島根県).

小川祐二、今城健人、中島淳: パルミチン酸単独投与による自然免疫を介した肝臓における炎症細胞浸潤と線維化についての検討. 第 101 回 消化器病学会総会 ワークショップ 12, 2015.4.25, 仙台国際センター(宮城県).

〔図書〕(計 1 件)

小川祐二、本多靖、結束貴臣、留野涉、今城健人、米田正人、齊藤聡、中島淳: 肝臓における脂肪毒性. メジカルレビュー, 2016, 58-65.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
研究代表者  
小川 祐二 (OGAWA, Yuji)  
横浜市立大学・医学部・助教  
研究者番号: 20644959

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号:

(4) 研究協力者  
( )