

令和 2 年 5 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09409

研究課題名(和文)7,8-ジヒドロキシフラボンのNASHにおける病態改善メカニズムの解明と治療応用

研究課題名(英文)Mechnism for improvemnt of pathophysiological condition in NASH treated with 7,8-Dihydroxyflavone

研究代表者

川合 弘一 (Kawai, Hirokazu)

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：80419291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：当初、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルであるメラノコルチン4受容体ノックアウト(MC4R-KO)マウスを用いて7,8-ジヒドロキシフラボンの治療効果を検討したが有効性が認められなかったため、計画を変更し、MC4R-KOマウスに高脂肪食とエタノールを負荷したアルコール群を作成し、NASHにおけるアルコール摂取の影響につき検討した。アルコール摂取により肝/精巣周囲脂肪重量比と肝組織内脂肪量が増加し、ERストレスマーカー、炎症反応、脂質代謝関連遺伝子のmRNA発現量の増加も認めた。NASHにおけるアルコール摂取は肝内脂肪量を増加させ、ERストレス、炎症反応を増強させることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はまず、MC4R-KOマウスがヒトNASHの全身病態に酷似していることを確認した。本研究は現代社会人のライフスタイルを念頭に置き、モデルマウスを用いて肥満を背景に発症するNASHに少量アルコールを摂取した際の病態変化を解析し、体重変化がなくとも体内脂肪分布が変化し、肝脂肪量が増加することを明らかにした。ヒトNASHにおいてもアルコール摂取が同様の影響を与えている可能性があり、本研究結果はライフスタイル是正による病態改善が期待できる根拠となりうる。

研究成果の概要(英文)：We initially investigated the therapeutic efficacy of 7,8-dihydroxyflavone (7,8-DHF) on non-alcoholic steatohepatitis (NASH) using the melanocortin 4 receptor-knocked out (MC4R-KO) mouse, however the beneficial effect of 7,8-DHF was not found. Then, we conducted the adjusted plan to reveal the effect of alcohol intake on NASH using the MC4R-KO mouse which were fed high-fat diet and alcohol. The ingestion of alcohol significantly increased liver/epididymal fat weight ratio, fat area in the liver histology, and mRNA expression of an ER stress marker, an inflammatory marker, and lipid metabolism-related genes. In conclusion, this study demonstrated that alcohol intake in NASH augmented fat deposition, ER stress, and inflammation in the liver.

研究分野：肝臓学

キーワード：NASH アルコール MC4R-KOマウス ERストレス 7,8-ジヒドロキシフラボン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

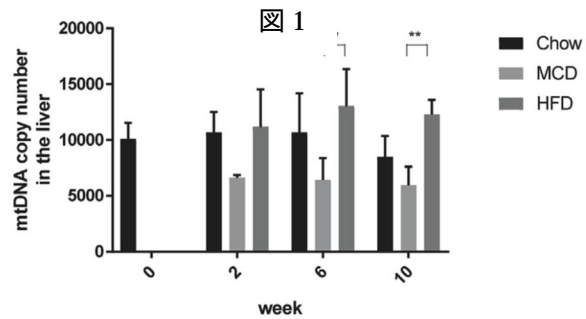
### 1. 研究開始当初の背景

(1) 7,8-ジヒドロキシフラボン (7,8-DHF) の非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) における病態改善メカニズムの解明と治療応用を目的とした研究。

当初は以下のような背景から、NASH モデルマウスを用いて 7,8-DHF の治療応用を目指した研究を開始した。

NASH に対する tropomyosin-related kinase B (TrkB) アゴニストの治療効果に関して、臓器連関に着目した検討はこれまでなされていない。

NASH は、肥満とインスリン抵抗性を基盤として発症するが、臓器連関を含む全身性病態が内在する。NASH 発症・病態進展には、ミトコンドリアにおける脂肪酸の酸化能が関与する。我々は、脂肪肝モデルマウスである高脂肪食 (HFD) を与えたマウスの肝臓ではミトコンドリア DNA (mtDNA) コピー数が増加するの



ことを見出し (図 1) 報告した<sup>1)</sup>。また、新潟県内当科関連施設における NASH 190 例の合併症調査では、2.6%にうつ病などの精神疾患を認め、全国成人における気分障害の受療率 0.11% を大きく上回っていた。近年、うつ病や統合失調症などの精神疾患と脳由来神経栄養因子 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の脳内発現量低下に強い関連があることが示されているが、BDNF は摂食抑制作用、血糖降下作用、エネルギー代謝促進作用もあることが知られている。我々は、NASH 症例において線維化進行度や血小板数と BDNF 濃度に有意な相関を認め、BDNF が NASH の病態に関与していると推定している。これは脳を中心とした臓器連関と捉えることができる。BDNF はその受容体である TrkB に結合して作用することより、TrkB は治療ターゲットの有力候補となりうる。最近、TrkB アゴニストである 7,8-ジヒドロキシフラボン (7,8-DHF) が、メスの脂肪肝モデルマウスにおいて、骨格筋の脱共役蛋白 1 (UCP1) を活性化させることにより脂肪肝を改善させたことが報告された<sup>2)</sup>。しかし、これまで NASH における 7,8-DHF による病態改善作用については検討されていない。

メラノコルチン 4 受容体ノックアウト (MC4R-KO) マウスは NASH モデルに適している。

これまで NASH モデルマウスは MCD マウスをはじめ様々なモデルが作成されてきたが、肝病変は NASH に類似しているものの、ヒト NASH の全身病態を忠実に再現できるものはなかった。特に NASH モデルとして多用されている MCD マウスは、インスリン抵抗性は生じず、るい瘦を呈するため、肝以外の臓器の検討は困難であった。MC4R-KO マウスは、肥満、耐糖能異常、高脂血症を伴った NASH モデルであり、ヒト NASH の肝臓だけでなく全身病態を反映すると報告されている<sup>3)</sup>。本モデルでは、レプチン-MC4R-BDNF 経路が不活化するため、本研究における TrkB アゴニストによる病態改善効果を検討するのに最適である。

これらの背景から理論的に MC4R-KO マウスに対して 7,8-DHF 投与による病態改善効果を期待していたが、後述の研究結果のように改善効果はほとんど得られなかった。

(2) 少量アルコール摂取が NASH 病態へ及ぼす影響の解析。

7,8-DHF を NASH の新規治療薬として開発を進めるのは困難と考えた。しかし、MC4R-KO マウスはヒト NASH の全身病態に酷似しており、NASH モデルとして非常に有用性が高いことが確認できた。これまで NASH およびアルコール性肝障害については個別に盛んに基礎・臨床研究は行われているものの、NASH を基礎疾患としてもちながら飲酒した場合の病態についてはこれまで全く検討されていない。現代社会人は肥満者が増加するとともに脂肪肝患者が増加しているが、その中で少量飲酒者も多く存在していることが推測され、NASH の病態へのアルコール摂取の関与については重要な検討課題である。このような現代社会人のライフスタイルを念頭に置き、これまでの MC4R-KO マウスの基礎データを活用しながら、少量アルコール摂取の NASH 発症または病態進行への関与とそのメカニズムにつき解析する計画に変更した。

### 2. 研究の目的

(1) ヒト NASH の全身病態に酷似したモデルである MC4R-KO マウスを用いて、脳、肝、骨格筋、白色脂肪、褐色脂肪の各臓器における病態と臓器連関につき解析する。さらに BDNF 受容体である TrkB に対するアゴニストの 7,8-DHF による NASH 病態改善作用のメカニズムを臓器連関の観点から解明し、ヒトへの治療応用に向けた基礎的根拠を構築する。

(2) ヒト NASH モデルである MC4R-KO マウスを用いて、NASH を基礎疾患としてもちながらアルコール摂取した際の肝の病態変化を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 7,8-DHF の NASH における病態改善メカニズムの解明と治療応用を目的とした研究  
 MC4R-KO マウスに生後より通常食を与えた後、8 週齢より 20 週間 HFD と水を与えた群と、  
 HFD と 7,8-DHF (0.16mg/ml) を給水に混じて与えた治療介入群をした。対照として C57BL/6J  
 マウスに通常食 (SD) と水を与えた群、SD と 7,8-DHF を与えた群を用いた。各群 9 匹ずつ割  
 り当て、飼育期間中は週 1 回の体重 (BW) 測定と食餌摂取量を測定した。8 週齢、28 週齢で屠  
 殺し、血液採取、肝臓、大腿筋、精巣周囲脂肪 (WAT)、褐色脂肪を摘出、各臓器の重量測定、  
 写真撮影を行った。得られた臓器サンプルは、-80 の凍結保存を行うとともに、肝臓と大腿筋  
 はホルマリン固定、グルタルアルデヒド固定も行った。血液は血糖測定後、血清を凍結保存し  
 た。血清からは中性脂肪、ALT、GGT、インスリン等の生化学検査を ELISA にて測定した。  
 MC4R-KO マウスで、7,8-DHF 投与により体重減少、肝組織内脂肪量減少、生化学検査改善な  
 どの病態改善が期待できる結果が得られた場合、肝臓と骨格筋の 8-OHdG 定量、肝組織の CE-  
 MS、LC-MS によるメタローム解析、RT-PCR、ウエスタン・ブロッティングによる発現量確  
 認、各臓器における定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析 (肝: 脂質代謝関連遺伝子、糖代謝  
 関連遺伝子、ミトコンドリア合成・分解関連遺伝子、熱産生遺伝子、炎症マーカー、線維化マ  
 ーカー、骨格筋: 糖代謝関連遺伝子、熱産生遺伝子、ミトコンドリア合成・分解関連遺伝子、  
 脂肪: 脂質代謝関連遺伝子、熱産生遺伝子) 肝臓と骨格筋の mtDNA コピー数の絶対定量、電  
 子顕微鏡によるミトコンドリアの形態観察を行う予定とした。

(2) NASH へのアルコール摂取による肝病態修飾の検討

0 週齢の MC4R-KO マウスに通常食で 8 週間飼育した後、高脂肪食 (WD) および水または 5%・10%・20%エタノールを自由摂取させた群、さらにより強いアルコール性肝障害モデルとして 5%・10%・20%エタノール自由摂取に加え同濃度エタノールを週 2 回 binge する群の計 6 群を作成し、8 週間後に屠殺した (図 2)。飼育期間中は体重と食餌摂取量を測定し、屠殺時には血液採取、肝臓、大腿筋、精巣周囲脂肪、褐色脂肪を摘出し、各臓器の重量測定、写真撮影を行った。得られた臓器サンプルは、-80 の凍結保存を行うとともに、肝臓と大腿筋はホルマリン固定を行った。血清からは血糖、中性脂肪、総コレステロール、AST、ALT、GGT、等の生化学検査を ELISA にて測定した。本法により作成したモデルマウスが、血液検査、肝病理組織等から、病態モデルとして適切であることを確認した後、各臓器における RT-PCR による脂質代謝関連・ER ストレス関連・炎症反応関連の遺伝子発現解析を行った。

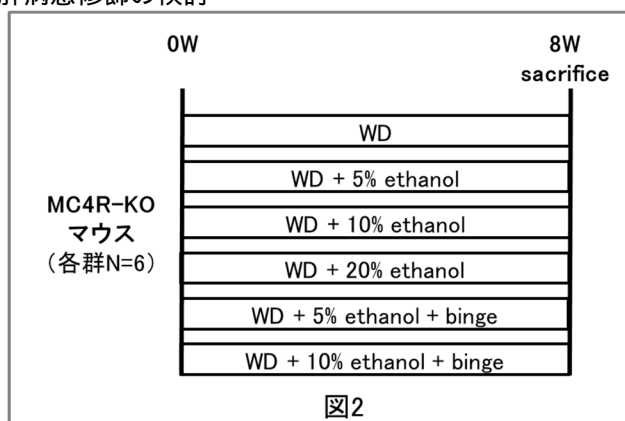


図2

4. 研究成果

(1) 7,8-DHF の NASH における病態改善メカニズムの解明と治療応用を目的とした研究  
 NASH モデルである MC4R-KO マウスにおいて、control 群と 7,8-DHF 投与群を比較すると、  
 体重 (図 3)、肝重量、肝組織内脂肪面積・線維化面積 (図 4) に有意差を認めず、7,8-DHF の  
 病態改善効果は不十分と考えた。このまま解析をすすめても有益な結果は得られない可能性が  
 高いため、本研究の基礎データを活用しつつも研究の方向性を転換し、NASH へのアルコール  
 摂取による肝病態修飾について検討することとした。

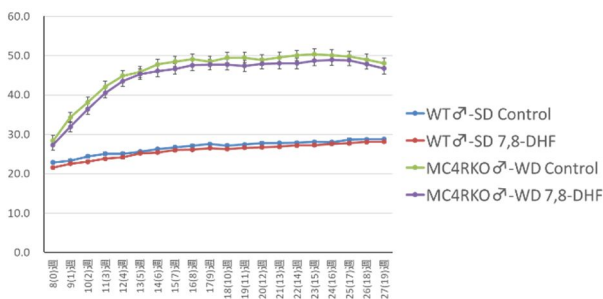


図3

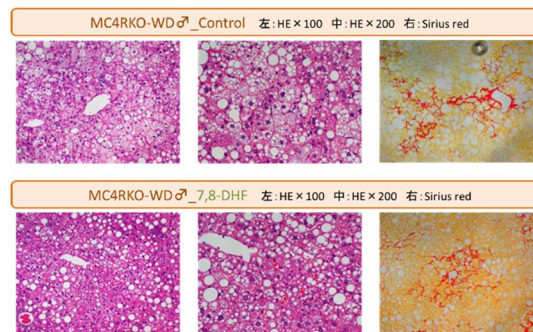


図4

(2) NASH へのアルコール摂取による肝病態修飾の検討

WD およびエタノール負荷 8 週後、5%・10%エタノール摂取群は control 群と比較し有意差なく体重増加がみられたが、20%エタノール摂取群と binge 群は有意に体重減少した (図 5)。Binge

群には途中死亡例も発生した。血液検査では、アルブミン、総コレステロール、ALT には各群間で有意差は認めなかったが、中性脂肪は 5%・10%エタノール摂取群が control 群より有意に高値であり、血糖は 20%エタノール摂取群が control 群より有意に低値だった。これらの結果から、20%エタノール摂取群と binge 群は、本研究の目的とする肥満を背景とした NASH+ アルコール摂取モデルには不適切と考えた。8 週後の肝重量/体重比では 10%エタノール群で高い傾向を認めたが、有意差はなかった (図 6)。しかし 5%・10%エタノール摂取群は control 群と比べ、精巣周囲脂肪重量/体重比は有意に低下し (図 7) 肝重量/精巣周囲脂肪重量比は有意に高値だった (図 8)。肝組織像の比較では、10%エタノール摂取群では、脂肪面積や炎症細胞浸潤が増加していたが、線維化はごく軽度だった (図 9)。しかし、10%エタノール摂取群では、肝組織中の脂質代謝・合成関連遺伝子、ER ストレスマーカー、炎症マーカーの有意な発現亢進を認めた (図 10、11)。

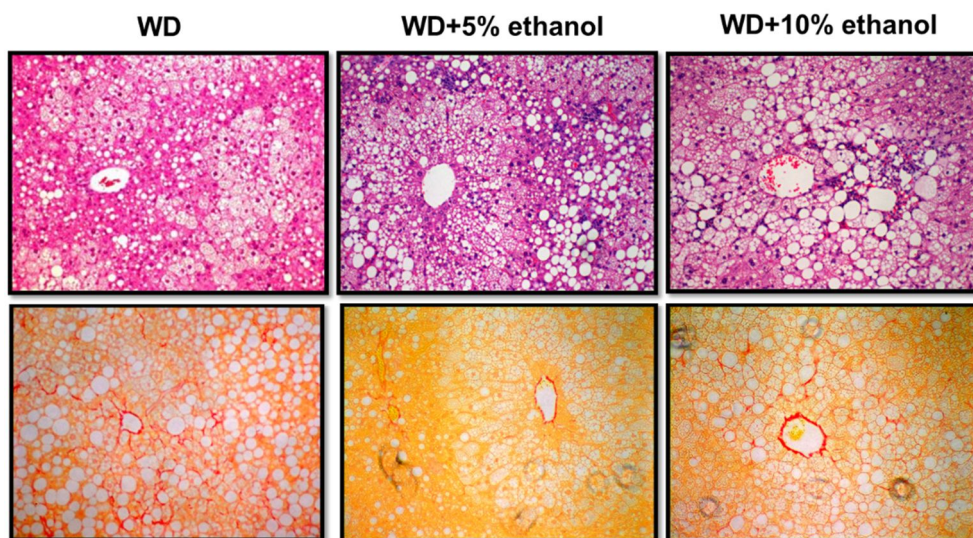
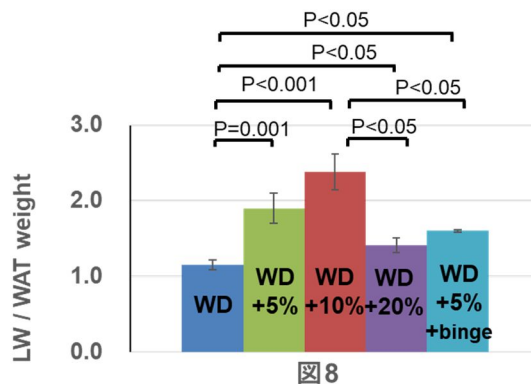
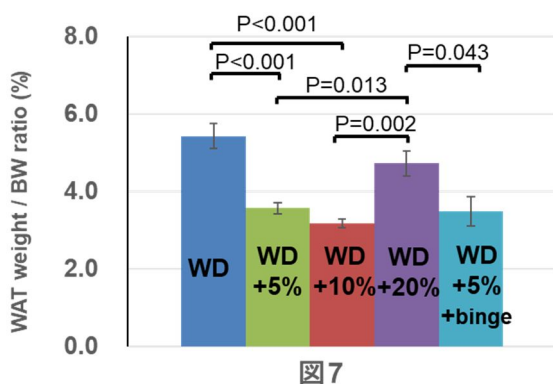
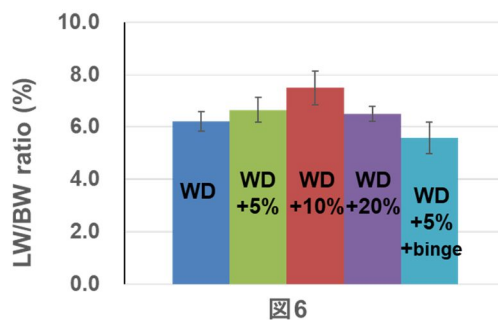
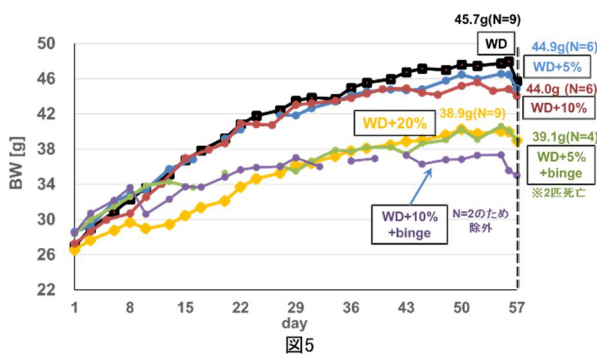


図9

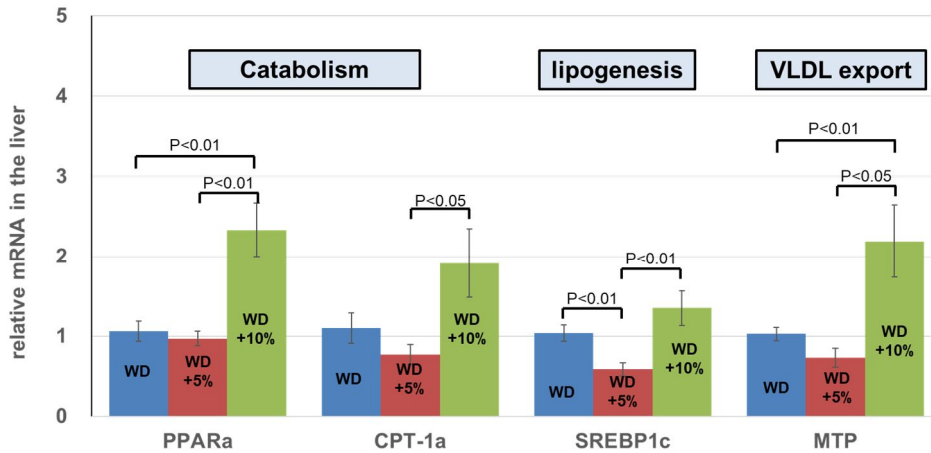


図10

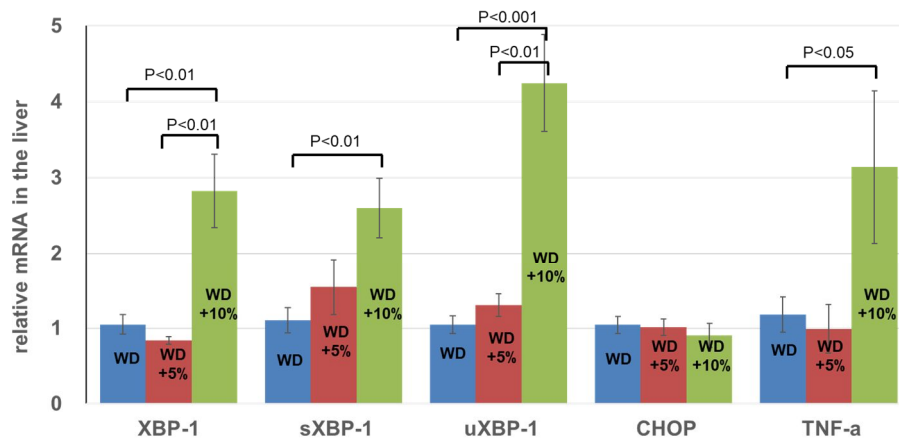


図11

以上の結果から、NASH モデルマウスでの少量アルコール摂取は体内脂肪分布を白色脂肪織から肝臓、すなわち正所性から異所性へ変化させ、肝内の脂質代謝、ER ストレス、炎症反応を増強することが判明した。本モデルは、ヒトで NASH を基礎疾患にもちながらアルコール摂取した際の肝病態を表現できている可能性が高いと我々は考えている。今後本研究結果を学会や医学誌等で発表する予定であり、本モデルを用いて多くの現代社会人が抱えていると思われる NASH + アルコール性肝障害の病態解明、病態進展予防策の確立に寄与することが期待される。

< 引用文献 >

- 1) Arao Y, Kawai H, Kamimura K, Kobayashi T, Nakano O, Hayatsu M, Ushiki T, Terai S. Effect of methionine/choline-deficient diet and high-fat diet-induced steatohepatitis on mitochondrial homeostasis in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Apr 10. pii: S0006-291X(20)30678-1. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.180.
- 2) Chan CB, Tse MC, Liu X, Zhang S, Schmidt R, Otten R, Liu L, Ye K. Activation of muscular TrkB by its small molecular agonist 7,8-dihydroxyflavone sex-dependently regulates energy metabolism in diet-induced obese mice. *Chem Biol.* 2015 Mar 19;22(3):355-68.
- 3) Itoh M, Suganami T, Nakagawa N, Tanaka M, Yamamoto Y, Kamei Y, Terai S, Sakaida I, Ogawa Y. Melanocortin 4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol.* 2011 Nov;179(5):2454-63.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	寺井 崇二  (Terai Shuji)  (00332809)	新潟大学・医歯学系・教授    (13101)	
研究分担者	上村 顕也  (Kamimura Kenya)  (00579146)	新潟大学・医歯学総合病院・講師    (13101)	
研究分担者	山際 訓  (Yamagiwa Satoshi)  (10419327)	新潟大学・医歯学総合研究科・特任教授    (13101)	削除：2018年5月31日