

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09440

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎 - サルコペニアにおける脂肪酸 酸化不全と脂質組成変化の役割

研究課題名(英文)The impact of lipid composition alteration via beta-oxidation failure on the pathophysiological linkage between nonalcoholic steatohepatitis and sarcopenia

研究代表者

今 一義 (Kon, Kazuyoshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30398672

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)：本研究では加齢マウス+高脂肪食モデルを用いて、加齢が高脂肪負荷時の肝細胞脂肪変性・細胞内ストレスの亢進を生じて脂肪肝炎および肝線維化を増悪させること、機序として肝内の中性脂肪の量的増加に加えてリン脂質の多価不飽和脂肪酸基の減少を明らかにし、背景にSIRT1減少、PPAR および脂肪酸不飽和化酵素の発現低下を示した。さらに加齢+高脂肪食による骨格筋力低下、速筋/遅筋比低下を見出し、機序として、ヘパトカインselenoprotein Pの発現亢進と骨格筋のPGC1 α の減少、コピキチンリガーゼの発現亢進を証明した。

肝内の脂質代謝の変性による脂肪肝炎増悪、肝筋連関によるサルコペニア増悪機序を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪肝炎(NASH)が加齢により悪化すること、NASHとサルコペニアの進行が相関することは疫学的研究で示されているが、機序はこれまで不明であった。さらに、超高齢化社会においてサルコペニアの予防は重要な社会的課題だが、フィジカルトレーニングのみでは十分な予防は達成できていなかった。本研究は加齢に伴う脂質代謝の変調を介したNASHの病態増悪機序を証明にすることによって次世代のNASH治療のターゲットを明確にした。さらに、肝-筋連関を介したサルコペニアの進展機序を明らかにすることにより、肝病態コントロールを基軸としたサルコペニアの発症予防・治療を確立するための基礎的知見を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated age-related exacerbation of steatohepatitis with activation of fibrogenesis through hepatic fatty acid degeneration and intracellular stress enhancement after high fat loading using aged mice + high-fat diet model. As an exacerbation mechanism, we revealed a decrease in polyunsaturated fatty acid groups in phospholipids in addition to a quantitative increase in neutral fat and decreased expression of SIRT1, PPAR α and fatty acid desaturase. Aging plus high-fat diet also caused a decrease in skeletal muscle strength and a decrease in the fast/slow muscle ratio.

We elucidated the mechanism of age-related exacerbation of steatohepatitis/sarcopenia through liver-muscle axis following alteration of hepatic lipid metabolism.

研究分野：肝臓病学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 脂肪毒性 ジェントロジー サルコペニア リピドミクス 酸化ストレス
ヘパトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 非アルコール性脂肪肝炎とサルコペニアの未知の関連性

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は非飲酒～少量飲酒者が脂肪肝に炎症・線維化を伴う「脂肪肝炎」の病態を呈し、肝硬変もしくは肝癌をも発症する進行性の疾患である。NASH の罹患数は先進国を中心に罹患数の増加が続いており、特に米国では肝関連死の最大の要因として大きな問題になっているが、いまだに治療法が確立されていない。さらに、近年の疫学研究では NASH は肝関連死に限らず全体的な予後の悪化に寄与し、加齢性筋萎縮 (サルコペニア) の進行とも関連することが明らかになった。また、加齢も NASH 増悪の独立した危険因子である。サルコペニアも癌を含む多くの疾患の予後不良因子だが、治療法が確立されていない。NASH の病態の解明は重要な課題であり、かつサルコペニア/加齢の病態と NASH の関連も重要な要素であることが示唆されたが、両疾患の間を繋ぐ因子は不明であった。

(2) NASH における脂肪毒性と脂質代謝

NASH の病態には不明な点が多く残されているが、過剰な脂質による細胞毒性 (脂肪毒性) が重要な働きを果たしていると考えられている。脂質は量的変化だけでなく質的な変化も重要で、不飽和脂肪酸の減少が NASH の増悪因子であることが報告されている。

私たちはこれまでに糖尿病を自然に発症し脂肪肝の病理像を呈する肥満マウス KK-*A^y* を用いた研究で、高脂肪食を負荷すると血清中・肝組織中の遊離脂肪酸が増加すると共に L-カルニチン欠乏を生じ、肝臓の酸化不全が惹起されることを示した。さらに、L-カルニチンの補充によって脂肪酸酸化が亢進し、脂肪肝炎が改善することを明らかにした (基盤研究 C 課題番号 24590995) [1]。このことから、脂肪肝炎を生じる際には脂質の供給過剰による蓄積だけでなく脂質代謝にも変化を生じている可能性が考えられた。

脂肪肝炎を来した KK-*A^y* マウスの肝組織の脂質解析を行ったところ、不飽和/飽和脂肪酸比が高脂肪食負荷で低下し、L-カルニチン投与で増加することが明らかになった。さらにジアシルグリセロール (DAG) およびトリアシルグリセロール (TAG) が高脂肪食負荷で増加し、L-カルニチン補充により減少したのに対して、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、プラズマローゲン (アルケニル PE) といった *de novo* 脂質合成で生合成されるリン脂質は、高脂肪食負荷で減少、L-カルニチンによって増加することを新たに見出した。

2. 研究の目的

これら研究当初の背景から、**肝臓における脂質代謝の変化が肝組織中の脂肪毒性を増加させることによって NASH を進展させ、かつ肝筋連関を介してサルコペニアの発症に寄与すると仮説を立てた。**脂質代謝の変化を来す要素の一つとして、加齢の影響を想定した。この仮説を症例するため、大きく分けて以下の 2 つをテーマとして実験を行った。

(1) 加齢によって脂肪肝炎の病態はどのように変化するのかを、特に脂質代謝および脂肪毒性を中心に明らかにする。

(2) 脂肪肝炎および筋萎縮の病態形成における肝-筋連関の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

実験 1. 8 週齢 (若年群) および 55 週齢 (加齢群) の雄性 C57BL6 マウスに、通常食 (ND) もしくは高脂肪食 (HFD) を 8 週間摂餌させた。酸化ストレスの評価として病理を 4-hydroxynonenal (4-HNE) の免疫組織染色で評価した。肝臓における脂質代謝、炎症に関連する遺伝子発現を RT-PCR で定量した。液体クロマトグラフィー質量分析計 (Waters, Xevo TQ-S micro) を用いて肝組織の脂質組成の網羅的解析 (リピドミクス解析) を行った。酸化の代謝産物として α -ヒドロキシ酪酸を比色法で定量した。抗加齢遺伝子といわれるヒストン脱アセチル化酵素 sirtuin (SIRT)1 の発現を RT-PCR および Western blot で評価した。

実験 2. 8 週齢 (若年群) および 55 週齢 (加齢群) の雄性 C57BL6 マウスに、通常食 (ND) もしくは高脂肪食 (HFD) を 8 週間摂餌させた。1 週間毎に小動物握力測定装置 (GPM-100B) を用いて筋力測定を行った。腓腹筋 (速筋 + 遅筋)、足底筋 (速筋)、ひらめ筋 (遅筋) を採取して重量を測定した。肝組織と腓腹筋の mRNA 発現を RT-PCR で定量した。

4. 研究成果

(1) **加齢マウスでは脂質代謝酵素の変調を生じ、脂質の“量的”“質的”変化を来し、脂肪肝炎が増悪した**

若年 HFD 群は軽微な脂肪変性に留まったのに対し、加齢 HFD 群では風船様変性を伴う著明な大滴性脂肪変性を生じた。加齢 HFD 群は若年 HFD 群と比較して NAS スコアが有意に高値となり、肝体重比は 2 倍弱に増加し、血清 AST および ALT 値が有意に上昇した(図 1)。若年 HFD 群では 4HNE の発現は軽微であったが、加齢 HFD 群は Zone3 有意に強い発現を認め、酸化ストレスの亢進が示された。加齢 HFD 群では肝組織中の hemoxygenase 1 (HO1)、iNOS、tumor necrosis factor- (TNF)、IL-6 mRNA の発現も上昇し、酸化ストレスの亢進および炎症性サイトカインの活性化が示された。肝組織中の mRNA の解析では、脂質分解の制御に参与する peroxisome proliferator-activated receptor- (PPAR) の発現は若年 HFD 群と比較し、加齢 HFD 群で有意に低下を認めた。さらに、脂肪酸酸化の律速酵素の carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A) の発現および脂肪酸酸化の最終代謝産物である β -ヒドロキシ酪酸の産生は両 HFD 群で増加したが、加齢群では若年群ほどの増加はなかった。一方、肝細胞における *de novo* 脂肪酸合成を制御する sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP1c) および acetyl-CoA carboxylase (ACC) の発現は加齢 HFD 群では若年 HFD 群より有意に高値で、肝細胞から VLDL による肝細胞外への脂質の輸送に参与する microsomal triglyceride transfer protein (MTP) および apolipoprotein B (ApoB) の発現は加齢 HFD 群で低下しており、加齢マウスでは *de novo* 脂肪酸合成の亢進および脂肪酸分解の低下、肝細胞外への輸送の低下が生じたために肝細胞の脂肪変性が亢進したことが明らかになった。より上流の変化としては、加齢マウスの肝臓では SIRT1 の発現が減少していたが、HFD 摂取により肝内 SIRT1 の発現はさらに減少し、脂質代謝関連遺伝子の発現の変調に参与した可能性が考えられた。

肝組織のリピドミクス解析では、肝組織内の中性脂肪は diacylglycerol (DAG)、triacylglycerol (TAG) 共に加齢 HFD 群は若年 HFD 群と比較し顕著に増加し、特にオレイン酸を含む中性脂肪が増加した。オレイン酸の合成に関わる脂肪酸伸長酵素 elongation of long-chain fatty acids family member 6 (ELOVL6) と stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) の発現は両 HFD 群で増加を認めたが、ELOVL6 は加齢群で有意に増加した。肝組織内のリン脂質ではドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) といった多価不飽和脂肪酸を含むリン脂質が若年 HFD 群よりも加齢 HFD 群で低下し、内因性 DHA や EPA の合成に関わる不飽和化酵素 fatty acid desaturase (FADS) 1, 2 の発現は加齢 HFD 群で有意に鈍化した (図 3)。よって、加齢マウスでは高脂質負荷で脂質代謝の鈍化による肝内の脂肪変性が顕著になったのみならず、脂肪酸の多価不飽和化が抑制されることにより脂質組成の質の変化惹起され、NASH 進展に寄与したと考えられた。本研究結果は、*Journal of Gastroenterology and Hepatology* 誌に受理された[2]。

(2) 加齢マウスではヘパトカインの発現が変化し、骨格筋のユビキチン化を生じてサルコペニア様の

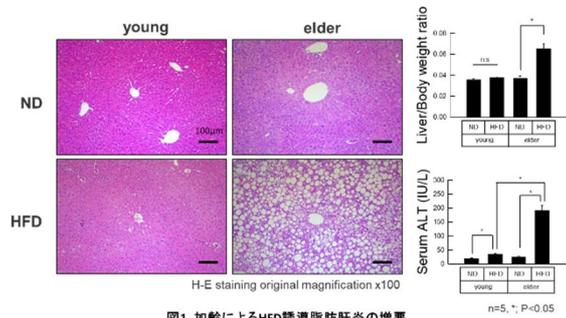


図 1. 加齢によるHFD誘導脂肪肝炎の増悪

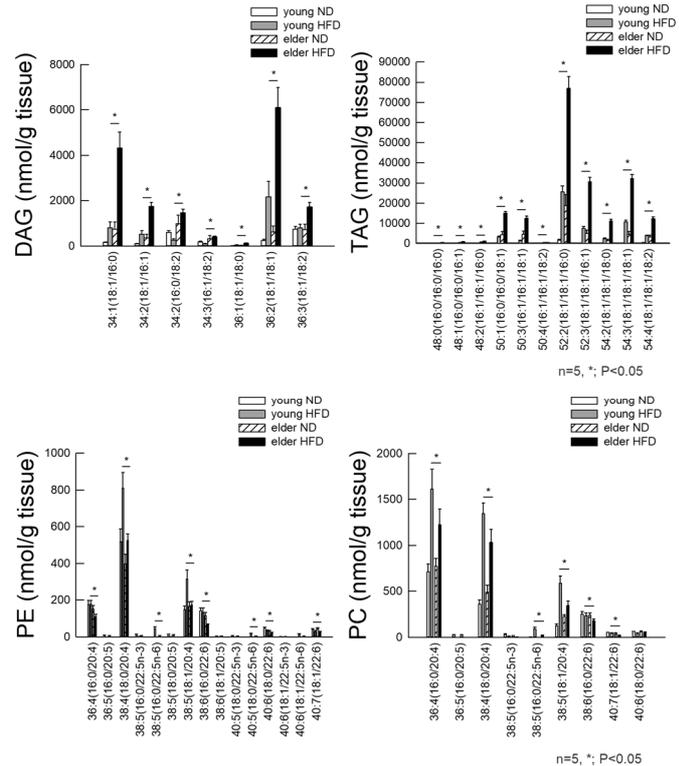


図 2. リピドミクス解析: 加齢による中性脂肪およびリン脂質の組成変化

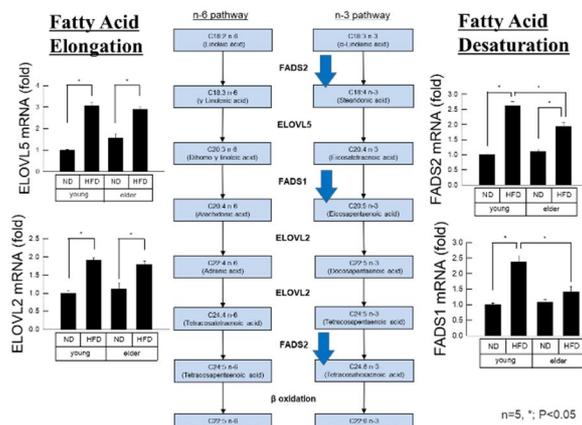


図 3. 加齢による脂肪酸合成酵素および不飽和化酵素の変化

変化をきたした

加齢 HFD 群の腓腹筋は筋繊維径の有意な減少を示した。筋力測定では加齢・若年群では HFD 負荷により各 ND 群と比べて筋力は低下したが、加齢群では若年群よりも筋力低下が顕著であった。若年・加齢群のいずれも HFD 負荷により腓腹筋/体重比および足底筋/ヒラメ筋の低下を生じたが、加齢群では若年群よりもさらに有意に減少し、加齢 HFD 群では骨格筋の質的、量的減少を示したのみならず、サルコペニアで特徴的な速筋/遅筋比の減少を示した (図 4)。

腓腹筋の TNF、IL-6 mRNA の発現は加齢 HFD 群では若年 HFD 群よりも上昇し腓腹筋における炎症の亢進が示唆された。

肝組織中のヘパトカイン selenoprotein P の発現は加齢 HFD 群で増加した。一方、腓腹筋内の受容体 low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) の発現は加齢 HFD 群で発現の亢進し、selenoprotein P によって負に制御される PGC1 の発現は有意に減少した。

ヘパトカインの Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) mRNA の肝組織中の発現は若年・加齢群のいずれも HFD 負荷で各 ND 群よりも低下したが、加齢群における低下がより顕著であった。IGF-1-Akt 経路によって負に制御されるユビキチンリガーゼ Atrogin-1 および MuRF-1 mRNA の腓腹筋中の発現は加齢 HFD 群では若年 HFD 群よりも上昇した (図 5)。よって、加齢マウスでは脂質負荷により肝組織からの selenoprotein P が増加し、骨格筋内の受容体 LRP1 を介して運動抵抗性を誘発する一方で、肝臓における IGF-1 の発現低下が骨格筋のユビキチンキナーゼを誘導し、筋萎縮を惹起した可能性が示された (図 6)。本研究結果は、2019 年の米国消化器病学会週間で報告し [3]、現在は英文誌に投稿準備中である。

以上のことから、加齢によって脂質負荷に対する脂肪合成の亢進および脂肪酸酸化の低下が生じ、脂肪肝の増悪を容易に來しうることが示された。さらに、肝内の不飽和化酵素の活性低下は、肝内の脂肪酸の質的变化を誘導し、脂肪毒性を増大させ、脂肪肝の増悪に関与していることが示唆された。さらに肝組織由来のヘパトカインの変調は肝-筋連関を介して骨格筋の炎症の増悪およびユビキチン化を誘導し、サルコペニアの増大を來したことが示された。

本研究により加齢による NASH の増悪機序の一端が解明され、内因性の脂質代謝系が NASH の新たな治療ターゲットとして有望であることが示されたと同時に、肝を中心とした新しいサルコペニアの病態形成モデルが提示され、将来的なサルコペニアの予防・診断・治療に寄与する結果が得られた。

< 引用文献 >

1. Kon K, Ikejima K, Morinaga M, et al. L-carnitine prevents metabolic steatohepatitis in obese diabetic KK-A(y) mice. *Hepatology*. 2017;47(3):E44-E54.
2. Ishizuka K, Kon K, Lee-Okada HC, et al. Aging exacerbates high-fat diet-induced steatohepatitis through alteration in hepatic lipid metabolism in mice. *J Gastroenterol Hepatol*. 2020.
3. Ishizuka K, Kon K, Arai K, et al. AGING CAUSES THE EXACERBATION OF DIETARY STEATOHEPATITIS ACCOMPANIED BY MUSCLE WEAKNESS IN MICE. *Gastroenterology*.

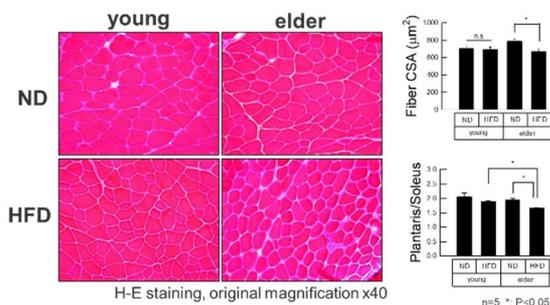


図4. 骨格筋に対する加齢・高脂肪食の影響

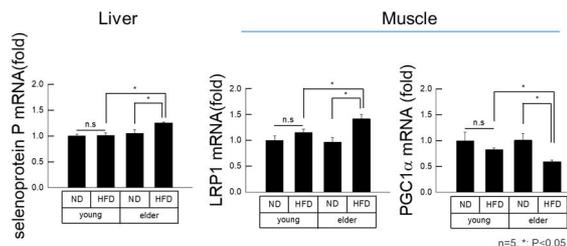


図5. 肝内のSelenoprotein Pと骨格筋内のLRP1を介したPGC1α発現への加齢・高脂肪食の影響

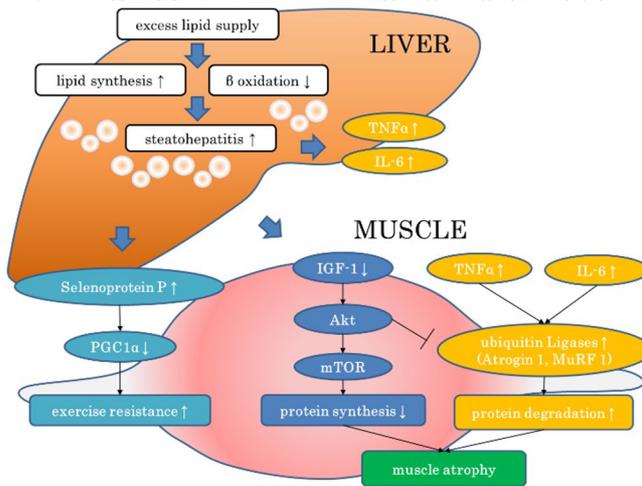


図6. 過剰な脂質供給による脂肪肝の増悪と肝-筋相関を介したサルコペニアの発症機序

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki Maiko, Kon Kazuyoshi, Ikejima Kenichi, Arai Kumiko, Uchiyama Akira, Aoyama Tomonori, Yamashina Shunhei, Ueno Takashi, Watanabe Sumio	4. 巻 43
2. 論文標題 The Chemical Chaperone 4 Phenylbutyric Acid Prevents Alcohol Induced Liver Injury in Obese KK Ay Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Alcoholism: Clinical and Experimental Research	6. 最初と最後の頁 617 ~ 627
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/acer.13982	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishizuka Kei, Kon Kazuyoshi, Lee Okada Hyeon Cheol, Arai Kumiko, Uchiyama Akira, Yamashina Shunhei, Yokomizo Takehiko, Ikejima Kenichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Aging exacerbates high fat diet induced steatohepatitis through alteration in hepatic lipid metabolism in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.15006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kei Ishizuka, Kazuyoshi Kon, Kumiko Arai, Akira Uchiyama, Tomonori Aoyama, Shunhei Yamashina, and Kenichi Ikejima
2. 発表標題 Aging-dependent alterations in hepatic fatty acid metabolism exacerbate murine dietary steatohepatitis through enhancing lipotoxicity
3. 学会等名 AASLD 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kei Ishizuka, Kazuyoshi Kon, Kumiko Arai, Akira Uchiyama, Shunhei Yamashina, and Kenichi Ikejima
2. 発表標題 AGING CAUSES THE EXACERBATION OF DIETARY STEATOHEPATITIS ACCOMPANIED BY MUSCLE WEAKNESS IN MICE
3. 学会等名 DDW 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石塚 敬、今 一義、池嶋健一
2. 発表標題 脂肪性肝炎の肝内脂質組成変化における加齢の影響
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会 シンポジウム8
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石塚敬、今一義、青山友則、内山明、山科俊平、池嶋健一
2. 発表標題 加齢による非アルコール性脂肪肝炎の増悪機序 高脂肪負荷高齢マウスを用いた検討
3. 学会等名 第22回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishizuka K, Kon K, Ikejima K, Suzuki M, Arai K, Uchiyama A, Aoyama T, Yamashina S, Watanabe S.
2. 発表標題 Aging exacerbates high-fat diet-induced steatohepatitis through blunting of lipid metabolic response in mice
3. 学会等名 AASLD annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石塚敬、今一義、青山友則、内山明、山科俊平、池嶋健一、渡辺純夫
2. 発表標題 加齢による非アルコール性脂肪肝炎の増悪機序 高齢マウスを用いた検討
3. 学会等名 第104回 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

〔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	池嶋 健一 (Ikejima Kenichi) (20317382)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	
研究 分担者	李 賢哲 (Lee Hyeon-Cheo) (30758321)	順天堂大学・医学部・助教 (32620)	
連携 研究者	町田 修一 (Machida Syuichi) (40421226)	順天堂大学・スポーツ健康科学研究科・教授 (32620)	