

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09442

研究課題名(和文) 迷走神経に着目したNASH病態の解明と治療応用

研究課題名(英文) The involvement of vagus nerve on the pathogenesis of NASH

研究代表者

中出 幸臣 (NAKADE, YUKIOMI)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70431400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：迷走神経肝臓枝切断術(HV)が非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)に及ぼす影響を検討するため、6週齢雄性BALB/CマウスにHVおよびsham手術を行い、高脂肪食(HFD)を開始後18週目まで継続した。HV群においてHFDによる肝脂肪はsham群に比べ減少した。迷走神経求心性線維の除神経を行った群ではHFDによる肝脂肪は軽減し、さらに迷走神経背側核に存在するN-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体に対する拮抗剤を用いると肝脂肪は軽減した。以上のことからNASHによる肝脂肪化は迷走神経求心性線維および迷走神経背側核を介する経路が関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに迷走神経を介して特殊飼料や特定の遺伝子KOマウスを用いたNASHモデルにおいて脂肪性肝炎を促進するといった報告があった。一方で迷走神経刺激はnicotinic  $\gamma$ 7受容体を介して抗炎症作用を有するという報告があり、NASHにおける役割についてははっきりしなかった。本研究でマウスにおいて高脂肪食によるNASHの肝脂肪化に迷走神経求心性線維および延髄迷走神経背側核を介していることが明らかになった。一方でNASHにおける肝炎症および肝線維化に迷走神経は保護的に作用する可能性があることも明らかとなり、NASHの病態に迷走神経が関与している可能性がある意義深い研究と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effect of hepatic branch of vagus nerve transection (HV) on nonalcoholic steatohepatitis (NASH), 6-week-old male BALB/C mice were subjected to HV and sham surgery and then fed a high fat diet (HFD). It continued until the 18th week after the commencement of HFD. HFD-induced fatty liver was decreased in HV group compared to sham group. Vagal afferent fibers denervation reduced HFD-induced fatty liver, and hepatic fat was reduced by using an antagonist to the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor present in the dorsal nucleus of the vagus nerve. These results suggest that NASH-induced hepatic steatosis may involve vagal afferent fibers and vagal dorsal nucleus pathways.

研究分野：非アルコール性脂肪性肝炎

キーワード：NASH 迷走神経 高脂肪食 肝脂質代謝 求心性線維

## 1. 研究開始当初の背景

近年、我が国では肥満、高血圧、糖尿病、高脂血症を基盤とするメタボリックシンドロームが増加し、心疾患および脳血管障害の危険因子であることから注目を集めている。メタボリックシンドロームの肝臓での表現型として非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) という疾患概念が提唱され、なかでも肝脂肪化から炎症および線維化まで進展する非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) は肝硬変まで進展するため注目されている。本邦における全国 33379 例の非 B 非 C 肝硬変の調査報告によれば NASH 関連肝硬変は 647 例 (2.1%) であり、さらに 2011 年の調査では、肝硬変全体の NASH の占める割合は 3.7% と増加傾向にある。また肝硬変は非代償期になると最終的には移植でしか肝不全を回避できないが、全米では肝移植待機患者が C 型慢性肝炎に続いて、NASH が第 2 位を占めるまでにいたっている。NASH はインスリン抵抗性、アディポサイトカイン、エンドトキシン、酸化ストレス、食事因子、遺伝因子など多様な要因 (multiple parallel hit) により病態が進行し肝硬変に至ると考えられているが、その本態は明らかではない。さらに NASH は背景に肥満、高血圧、糖尿病、高脂血症を合併していることから、食事療法による減量および運動をはじめとして、ビタミン E や経口血糖降下薬であるピグアナイドおよびピオグリタゾン、スタチン、アンジオテンシン受容体拮抗剤など薬物治療が試みられているが確立した治療はない。一方、迷走神経は副交感神経としてシナプス末梢でアセチルコリンを放出し、情報伝達を行うパスイとして知られている。生体における恒常性維持をはかる役割をはたしていると考えられており、近年迷走神経は肝および末梢脂肪組織のエネルギー代謝に関する相互情報伝達の役割を果たしていることが報告されている。マウスにアデノウイルスベクターを用いて peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$ 2 を肝に強制発現させると末梢脂肪組織は減少し、迷走神経を切断することで末梢脂肪組織減少が抑制されることが報告されている。PPAR- $\gamma$ 2 のアゴニストであるチアゾリジンは末梢でのインスリン抵抗性を改善するが、迷走神経切断によってインスリン抵抗性改善が抑制されることが報告されている。(Science:312 1656-1659,2006)。またラット腸管内に長鎖脂肪酸を注入すると、迷走神経求心路を介して脳内へ情報伝達され、迷走神経遠心路を介して肝での糖新生を抑制すること、また迷走神経求心路の神経終末に局在する N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体に対する拮抗剤を脳内に前投与するとその効果が消失することが報告され (Nature: 452 100-106,2008)。腸—脳—肝相関における情報伝達経路の存在が明らかとなってきた。さらに迷走神経はエンドトキシンやサイトカインに対する副腎皮質ホルモンや発熱などの全身反応を仲介する構成要素で、迷走神経の電気刺激はエンドトキシンによる全身性炎症反応を軽減し、血中および肝における TNF $\alpha$  を低下させるなど抗炎症作用を有することが報告されている (Nature: 405 458-462,2000)。しかし、迷走神経が NASH 病態における肝脂肪化、炎症および線維化に関与するかどうかは明らかでない。

## 2. 研究の目的

(1) 実験動物に対して高脂肪高コレステロール食により NASH を作成し、迷走神経肝臓枝切断を行い NASH における肝脂肪化、炎症および線維化がコントロール群と比較し進展するか否か明らかにする。次に迷走神経求心路の関与を明らかにするため、迷走神経求心路のみの除神経を行い、NASH における肝脂肪化、炎症および線維化がコントロール群と比較し進展するか否か明らかにする。さらに脳内での神経伝達を介することを明らかにするため、延髄迷走神経背側核に局在する、神経伝達に関わる NMDA 受容体に対する拮抗剤を投与することで、NASH における肝脂肪化、炎症および線維化がコントロール群と比較し進展するか否か明らかにする。いずれの検討においても全身に対する影響を検討するため、内蔵脂肪組織 (精巣上体脂肪) の量および組織学的検討を行い、末梢でのインスリン抵抗性を評価し比較する。

(2) NASH の病態に迷走神経が関与しているという仮説のもと、迷走神経の電気刺激が NASH における肝脂肪化、炎症および線維化を抑制するか検討を行う。全身麻酔下で左頸部迷走神経 (迷走神経肝臓枝は左迷走神経に端を発する) を露出し、プラチナ電極を装着した上で、電気刺激コードを背側皮下に留置する。その際迷走神経肝臓枝切断群とコントロール群を設定し、実験開始後連日一定の電気刺激を加えていく。最終的に、NASH における肝脂肪化、炎症および線維化がコントロール群と比較し抑制するか否か明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 迷走神経肝臓枝切断が高脂肪高コレステロール食投与マウスの NASH に及ぼす影響: 週齢 6 週雄性 BALB/C マウスに対して選択的迷走神経肝臓枝切断術を摂食開始 1 週間前に施行する。イソフルレンによる全身麻酔下にラット腹部を切開し、実態顕微鏡を用いて胃噴門部より数 mm 手前の迷走神経前枝 (肝臓枝は前枝より分岐する) より切離する。コントロールは迷

走神経を切断せずただ確認を行っただけのsham群とする。高脂肪高コレステロール食投与およびコントロール食を開始し18週間にわたり体重測定を行い摂食開始時より採血を行い、血清AST、ALT、TNF- $\alpha$ 、IL-6、インスリンおよび血糖を測定する。その後2週間毎採血を行い、高脂肪高コレステロール食投与開始から12週間後にラットを屠殺して採血の後、血清AST、ALT、TNF- $\alpha$ 、IL-6、インスリンおよび血糖を測定し経時的变化を比較する。肝および精巣上体脂肪を採取し、肝組織はOil red O染色、ヘマトキシリン・エオジン染色、マッソン・トリクローム染色を行い、肝における脂肪化、炎症細胞浸潤および線維化の程度を評価する。肝脂肪化に関してはOil red O染色にて顕微鏡的1視野における肝脂肪の割合をBruntの分類にしたがってmild: 33%以下、moderate: 33-66%、severe: 66%以上の3段階にわけて評価する。肝炎細胞浸潤に関してはヘマトキシリン・エオジン染色にてBruntの分類(Am J Gastroenterol 1999; 116: 2467-74)にしたがって、1: mild、2: moderate、3: severeの3段階で評価する。さらに肝線維化に関してはマッソン・トリクローム染色にて門脈域および中心静脈を含む任意の5視野を選択し、青紫色に染まる領域をコンピュータイメージ分析装置にて面積を算出し、これらを迷走神経肝臓枝切断術とsham群で比較する。さらに精巣上体脂肪量を定量し、脂肪組織はヘマトキシリン・エオジン染色を行い脂肪滴の形態を比較する。

(2) 選択的迷走神経求心路の除神経が高脂肪高コレステロール食投与BALB/CマウスのNASHに及ぼす影響：週齢6週雄性BALB/Cマウスに対して選択的迷走神経求心路の除神経（迷走神経遠心路は障害しない）を施行する。イソフルレンによる全身麻酔下にラット頸部迷走神経を露出し、オリーブオイルに溶解したカプサイシン（10 mg）を迷走神経に30分間浸す。その後5分ごとにカプサイシンを滴下し、最後にオリーブオイルおよび蒸留水ですすぐ。コントロールはカプサイシンの代わりにオリーブオイルで処置を行ったsham群とする。2週間後より高脂肪高コレステロール食投与およびコントロール食を開始し18週間にわたり体重測定を行い摂食開始時より採血を行い、血清AST、ALT、TNF- $\alpha$ 、IL-6、インスリンおよび血糖を測定する。その後2週間毎採血を行い、高脂肪高コレステロール食投与開始から18週間後にラットを屠殺して採血の後、血清AST、ALT、TNF- $\alpha$ 、IL-6、インスリンおよび血糖を測定し経時的变化を比較する。さらに上述同様、肝における脂肪化、炎症細胞浸潤および線維化の組織学的変化を比較し、精巣上体脂肪量を定量し組織学的に脂肪滴の形態を比較し、迷走神経求心路除神経による影響を検討する。

(3) 脳室内N-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体拮抗剤投与が高脂肪高コレステロール食投与BALB/CマウスのNASHに及ぼす影響：週齢6週雄性BALB/Cマウスに対して延髄迷走神経背側核に局在し神経伝達に関わるNMDA受容体に対する拮抗剤であるMK-801または生理食塩水を投与する。18週間にわたり体重測定を行い摂食開始時より採血を行い、血清AST、ALT、TNF- $\alpha$ 、IL-6、インスリンおよび血糖を測定する。その後2週間毎採血を行い、高脂肪高コレステロール食投与開始から18週間後にラットを屠殺して採血の後、血清AST、ALT、TNF- $\alpha$ 、IL-6、インスリンおよび血糖を測定し経時的变化を比較する。さらに上述同様、肝脂肪化、炎症細胞浸潤および線維化の組織学的変化を比較し、精巣上体脂肪量を定量し組織学的に脂肪滴の形態を比較し、延髄での神経伝達の関与について評価する。

(4) 迷走神経の電気刺激が高脂肪高コレステロール食投与BALB/CマウスのNASHに及ぼす影響：マウス左頸部迷走神経にbipolar cuff electrodeを用いて迷走神経刺激を行う。週齢8週雄性BALB/Cマウスにイソフルレン全身麻酔下に左頸部迷走神経を暴露した後、bipolar cuff electrodeを迷走神経周囲に留置する。1週間後より高脂肪高コレステロール食投与を開始と同時に連日午後4時から30分間にわたり迷走神経に電気刺激(0.2mA)を加える。その後連日体重測定および採血を行い、血清AST、ALT、TNF- $\alpha$ 、IL-6、インスリンおよび血糖を測定する。その後2週間毎に採血を行い、高脂肪高コレステロール食投与開始から18週間後にラットを屠殺して採血の後、血清AST、ALT、TNF- $\alpha$ 、IL-6、インスリンおよび血糖を測定し経時的变化を比較する。また上述の実験と同様、肝における脂肪化、炎症細胞浸潤および線維化の組織学的変化を比較し、精巣上体脂肪は組織学的に脂肪滴の形態を比較する。次に迷走神経電気刺激が迷走神経求心路の除神経を行った後にどのように影響するか検討するため、選択的迷走神経求心路の除神経を行うと同時にbipolar cuff electrode を迷走神経周囲に留置する。以下上記同様の迷走神経の電気刺激を行い6週間継続し、肝における脂肪化、炎症細胞浸潤、線維化の組織学的変化、精巣上体脂肪量および組織学的に脂肪滴の形態を比較し、NASH病態に対する影響について治療手段となる可能性を含め評価する。

#### 4. 研究成果

6週齢雄性BALB/Cマウスに、迷走神経肝臓枝切断術およびsham手術を実験開始1週間前に行

い、その後高脂肪食 (High Fat Diet 32: HFD32) および対照食を自由摂食させ実験食開始後18週目まで継続した。その後安楽死させ肝および血液を採取し、肝脂肪化、炎症に関して病理学的に評価した。Sham手術群はHFD32によって著明に体重が増加した。一方迷走神経肝臓枝切断術群では普通食に比べHFD32群において体重増加は顕著ではなかった。Sham手術群の精巢上体脂肪はHFD32により著明に増加したが、迷走神経肝臓枝切断術群では普通食に比べHFD32群において精巢上体脂肪の増加は顕著ではなかった。脂質に関しては、血清中性脂肪 (TG) および遊離脂肪酸 (FFA) はSham手術群においてはHFD32により顕著な変化がなかったが、迷走神経肝臓枝切断術群においては、HFD32により増加傾向を示した。一方、肝組織に関してSham手術群においてHFD32により著明に肝脂肪が増加したが、迷走神経肝臓枝切断術群においては肝脂肪化に有意差を認めなかった。肝脂質代謝の関連遺伝子発現について検討したところ、de novo脂質合成に関わるSREBP1 mRNA、肝酸化に関わるPPAR およびCPT1 mRNAの発現は、迷走神経肝臓枝切断術群およびsham手術群の間で特に著変なかった。また肝脂質排出に関わるMTTP mRNAの発現も各群間で有意差を認めなかった。一方、肝脂質取り込みに関わるCD36 mRNA発現はSham手術群においてはHFD32により著明な発現増加を認めたが、選択的迷走神経肝臓枝切断術群では有意差がなかった。NASHにおける肝炎症および肝線維化がHFD32によって誘導された。迷走神経肝臓枝切断術群においても同様に肝炎症および肝線維化が出現し、これらはsham手術群と迷走神経肝臓枝切断術群の間で有意差を認めなかった。さらに迷走神経求心性線維のみ除神経を行ったperivagal capsaicin処置群においては迷走神経肝臓枝切断術群と同様に高脂肪食による肝脂肪化は軽減した。一方NASHにおける肝炎症とくに肝線維化はperivagal capsaicin処置群において軽減しなかった。肝炎症および肝線維化に関わる遺伝子発現ではTIMP1およびcollagen1 mRNAが迷走神経肝臓枝切断術群およびperivagal capsaicin処置群においてもsham手術群と同様に増加していることが確認された。次に迷走神経が延髄内に投射している背側核に存在するN-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体に対する拮抗剤であるMK-801を投与するとNASHにおける肝脂肪は軽減した。一方、MK-801投与でNASHにおける肝炎症および肝線維化は軽減しなかった。以上のことから、高脂肪食による脂肪性肝炎において、脂肪肝は迷走神経求心性線維および迷走神経背側核を介する経路が関与する可能性が示唆された。一方、NASHにおける肝炎症および肝線維化に関してはこれらの処置によって軽減しなかったことから、迷走神経は抗炎症作用に働いているものと考えられた。

さらに迷走神経の電気刺激が高脂肪高コレステロール食投与BALB/CマウスのNASHに及ぼす影響を、上述の方法に従って迷走神経刺激を行いNASHに対する影響を検討した。迷走神経刺激群においてはNASHにおける肝脂肪化は非刺激群と比較し著変なかった。また肝炎症および肝線維化に関しても迷走神経刺激群は非刺激群に比べて著変なかった。これらのことから、迷走神経刺激頻度や周波数の違い、あるいは刺激回数の増加に伴う馴化などが想定され、現在も検討を継続している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ohashi, T. Nakade, Y. Ibusuki, M. Kitano, R. Yamauchi, T. Kimoto, S. Inoue, T. Kobayashi, Y. Sumida, Y. Ito, K. Nakao, H. Umezawa, K. Yoneda, M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Conophylline inhibits high fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0210068
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0210068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Umezawa, K. Kojima, I. Simizu, S. Lin, Y. Fukatsu, H. Koide, N. Nakade, Y. Yoneda, M.	4. 巻 31
2. 論文標題 Therapeutic activity of plant-derived alkaloid conophylline on metabolic syndrome and neurodegenerative disease models	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hum Cell	6. 最初と最後の頁 95-101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13577-017-0196-4	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 Ota Akinobu, Nakao Haruhisa, Sawada Yumi, Karnan Sivasundaram, Wahiduzzaman Md, Inoue Tadahisa, Kobayashi Yuji, Yamamoto Takaya, Ishii Norimitsu, Ohashi Tomohiko, Nakade Yukiomi, Sato Ken, Itoh Kiyooki, Konishi Hiroyuki, Hosokawa Yoshitaka, Yoneda Masashi	4. 巻 130
2. 論文標題 40p53 suppresses tumor cell proliferation and induces cellular senescence in hepatocellular carcinoma cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 614 ~ 625
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.190736	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 Nakade Yukiomi, Murotani Kenta, Inoue Tadahisa, Kobayashi Yuji, Yamamoto Takaya, Ishii Norimitsu, Ohashi Tomohiko, Ito Kiyooki, Fukuzawa Yoshitaka, Yoneda Masashi	4. 巻 47
2. 論文標題 Ezetimibe for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: A meta-analysis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 1417 ~ 1428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.12887	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 Nakade Yukiomi, Sakamoto Kazumasa, Yamauchi Taeko, Inoue Tadahisa, Kobayashi Yuji, Yamamoto Takaya, Ishii Norimitsu, Ohashi Tomohiko, Sumida Yoshio, Ito Kiyooki, Nakao Haruhisa, Fukuzawa Yoshitaka, Umezawa Kazuo, Yoneda Masashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Conophylline inhibits non-alcoholic steatohepatitis in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0178436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0178436	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanamori Hiroyuki, Nakade Yukiomi, Yamauchi Taeko, Sakamoto Kazumasa, Inoue Tadahisa, Yamamoto Takaya, Kobayashi Yuji, Ishii Norimitsu, Ohashi Tomohiko, Ito Kiyooki, Sumida Yoshio, Nakao Haruhisa, Fukuzawa Yoshitaka, Yoneda Masashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Influence of nicotine on choline-deficient, L-amino acid-defined diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0180475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0180475	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakade Yukiomi, Ozeki Tomonori, Kanamori Hiroyuki, Inoue Tadahisa, Yamamoto Takaya, Kobayashi Yuji, Ishii Norimitsu, Ohashi Tomohiko, Ito Kiyooki, Yoneda Masashi	4. 巻 11
2. 論文標題 A Case of Gastric Antral Vascular Ectasia Which Was Aggravated by Acid Reducer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Case Reports in Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 64 ~ 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000455967	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔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	角田 圭雄  (SUMIDA YOSHIO)  (10636971)	愛知医科大学・医学部・准教授     (33920)	