

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：24302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12905

研究課題名(和文) NAFLDの病態増悪に寄与するセラミド分子種の同定とその作用の解明

研究課題名(英文) Identification of ceramide molecular species contributing to exacerbation of NAFLD and elucidation of its action

研究代表者

小林 慧子 (Kobayashi, Keiko)

京都府立大学・生命環境科学研究科・助手

研究者番号：50611117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)は、脂肪の蓄積を起因とした慢性的な炎症を呈する疾患であり、肝硬変の発症母地ともなるNASHへの増悪機序の解明は急務である。これまで慢性炎症疾患に伴って特定のセラミド分子種が増加することを見出していることから、この分子種の違いがNAFLDの病態増悪に寄与すると考えられた。Sprague Dawleyラットに高脂肪・コレステロール食を自由摂食させ、作成したNAFLDモデルラットの肝臓におけるセラミド量は、総量に有意な増加は認められなかったが、HFCC食投与群はコントロール群に比してC18:0およびC24:1セラミドの分子種が優位に増加することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、「生理活性脂質セラミドは分子種の違いによりその作用が異なる」という独自の視点から、NAFLDの増悪機構の探索を試みた。結果、NASH以降段階においてC18:0およびC24:1セラミドの分子種が優位に増加することを初めて明らかにした。これらの研究を通して得た知見から、特定のセラミド分子種の生成に関わる酵素を明らかにし、これを阻害することで、NAFLDの病態増悪の予防に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is caused by an imbalance in hepatic lipid homeostasis and hepatic fat accumulation. Some fatty livers develop inflammation that progresses to cirrhosis. Ceramide is known as an apoptotic lipid mediator and we identified that increasing ceramide affects diabetes and atherosclerosis exacerbation. In this study, we examined the relationship between fibrosis development and ceramide metabolism. Administration of high fat, high cholesterol and cholic acid diet to Sprague Dawley rat revealed that specific ceramide species increased significantly in high leveled fibrosis even though the total ceramide concentration did not significantly.

研究分野：栄養学

キーワード：セラミド代謝 脂質代謝 NAFLD

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は飲酒歴がないにも関わらず慢性的な炎症を伴う肝疾患であり、発症には高糖質食や高脂肪食、インスリン抵抗性の獲得が関わっている。NAFLD のうちの 10% が、肝細胞の変性、壊死、また繊維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) となる。NASH では慢性的な酸化ストレスの亢進や鉄の蓄積、炎症性サイトカインなどの複数の要因が複雑に絡み合って肝障害を引き起こされることが明らかとなっている。

近年、炎症を基盤病態とするさまざまな疾患において、飽和脂肪酸や n-6 系多価不飽和脂肪酸 (PUFAs) が炎症惹起作用を有するのに対し、n-3 系 PUFAs は抗炎症性に働くといったように、生体内の脂肪酸の質の違いが病態の増悪に関わることが多く報告されるようになった。NAFLD においても、飽和脂肪酸の摂取により病態が増悪するという報告がある。一方、生理活性脂質セラミドは、結合する脂肪鎖の違いによってアポトーシスや細胞分化など異なった現象を誘導することが近年明らかになってきているが、NAFLD の病態増悪時にセラミドの分子種がどのように変化するか解析した報告はまだ無い。

我々はこれまで、糖尿病や動脈硬化などの慢性的な酸化ストレスが亢進する病態時にセラミドが血液中に増加し、他臓器に蓄積して障害を起こす可能性について報告してきた。また他の報告では、セラミドはインスリン抵抗性を惹起することや、TNF- $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカインの刺激によって増加し、さらに炎症性サイトカインの生成を促進させる悪循環を形成することなどが見出されている。以上のことから、セラミドは酸化ストレスの亢進やインスリン抵抗性が惹起される慢性的な炎症状態の悪化に関わることが考えられた。

また、セラミドの分子種ごとの変化に着目した結果では、加齢とともに動脈硬化を形成する apoE ノックアウトマウス (apoE) の動脈中で、動脈硬化形成開始時は C24:0 セラミドが増加すること、また一方で、動脈硬化形成後期には C16:0 セラミドが有意に増加することを見出した。他の報告では、C16:0 セラミドの生成に関わる酵素を過剰発現させた細胞はアポトーシスを引き起こし、逆に C24:0 セラミドでは細胞増殖を起こすことが明らかとなっている。以上のことから、セラミドの分子種の違いが病態に寄与することが予想された。

### 2. 研究の目的

NAFLD はインスリン抵抗性を基盤とした脂質代謝異常による単純性脂肪肝と、それがさらに進行し、酸化ストレスの亢進、肝細胞の壊死・変性、鉄の蓄積などによって増悪する NASH の 2 病態が含まれる。そこで、本研究では正常肝と、炎症・線維化を呈する NASH での肝臓及び血中のセラミドの分子種の動態を比較することで、NAFLD の病態増悪時のセラミド動態を網羅的に解析し、セラミド分子種が NAFLD の増悪に関わる炎症作用にどのように影響するのかを明らかにすることを目的とした。

また、血中のセラミドの分子種の変化を検討し、NAFLD の確定診断材料の一つとしての活用が可能か同時に検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) NAFLD モデル動物の作製

5週齢の Sprague Dawley ラットをまず 2 群に分け、コントロール群には MF 食を自由摂食させ、高脂肪・高コレステロール+コール酸食 (ラード 20%, コレステロール 2.5%, コール酸 0.1%) を自由摂食させる群を HFCC 群とした。後者をさらに①そのまま継続して HFCC 食を与えながら、週 2 回生理食塩水を腹腔内投与する群、②16週間の摂食飼育 (脂肪肝形成) 後に低濃度 LPS を週 3 回の頻度で 6 週間、合計 0.225 mg/kg BW 投与する群と、③低濃度 LPS を週 2 回の頻度で 6 週間、合計 0.15 mg/kg BW 投与する群、更に LPS 投与開始時期をずらして④低濃度 LPS を週 3 回の頻度で 4 週間、合計 0.15 mg/kg BW

投与する群 に分けて評価を行った。以上の5群(コントロール、HFCC①、②、③、④)を自由摂食開始から23週間後、麻酔下で解剖し、血液生化学検査(AST、ALT、血漿コレステロール値、血漿TG 値)および肝臓切片の組織染色(ヘマトキシリン・エオジン染色、Sirius-red 染色)を行った。

## (2) 肝臓および血漿中のセラミドの測定

各群の肝臓および血漿中のセラミドは、Folch 法によって抽出した脂質画分を TLC で精製した後、LC-MS/MSを用いた高感度定量を行った。条件は下記のとおりである。

三連四重極型質量分析計 :ACQUITY TQD mass spectrometer (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipped with the ACQUITY ultra performance liquid chromatography (UPLC) system (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

カラム条件 :ACQUITY UPLC BEH, 1.7 mm, 2.1 × 50 mm, C18, (Waters Corporation, Milford, MA, USA) ]、50° C.

質量分析計の条件 :ESI positive ion mode, Multiple reaction monitoring (MRM)モードで Daughter ion  $m/z=264.2$  を与えるものをセラミドと同定し、検量線から各サンプルの濃度を算出した。

## (3) 血漿中のセラミド生成酵素

NBD ラベル化スフィンゴミエリンを基質として、血漿中のセラミド生成酵素と反応させ、生成された NBD ラベル化セラミドを HPLC で定量した。生成セラミドと基質スフィンゴミエリンから、酵素の比活性を算出した。

## 4. 研究成果

### (1) NASH モデルの評価

高脂肪・高コレステロール+コール酸食を23週間与えた HFCC①②③④群では、すべての個体で肝臓の高度な脂肪化(肝臓重量の増加、肝臓脂質量の増加および肝細胞内の脂肪滴サイズの増大)が認められた。また、個体によって程度は異なるものの、食事誘発性の線維化が引き起こされることが Sirius Red によるコラーゲン染色結果より示された (Fig.1)。

また、コントロール群と HFCC①群との  $\alpha$ -SMA 発現を比較したところ、HFCC①群で有意に発現が増加した。しかしながら、Col1A1 mRNA および血漿 ALT 値にコントロール群との有意差は示されなかった。以上の結果から、HFCC 食 23 週間投与は軽度の NASH を引き起こすことが示された。

また、今回試みた LPS 投与の量および期間は、HFCC①群と HFCC②③④群の間に血液生化学検査に有意差が認められなかったことから、本条件では線維化の増悪に影響しないことが示された。

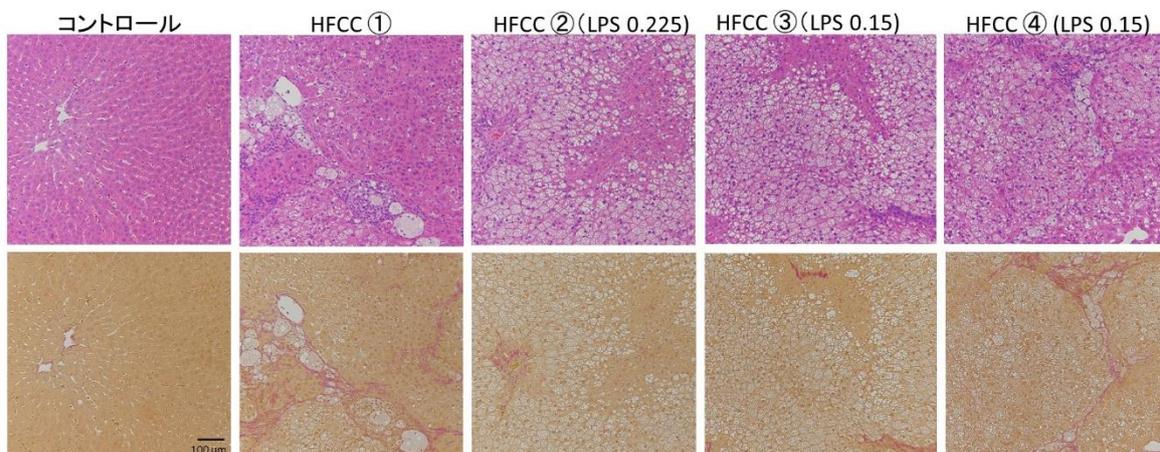


Fig.1 肝臓組織切片の HE 染色結果(上段)および Sirius red 染色結果(下段)

(2) NASH における肝臓セラミド分子種の評価

肝臓中の Ceramide を定量したところ、コントロール群と HFCC①群の総量の有意差は見られなかったものの、増加傾向にあることが示された (Fig.2)。また、各分子種ごとの比較をしたところ、C18:0 および C24:1 といった複数の Ceramide 分子種で有意な増加がみられた (Graph.1)。さらに、分子種ごとの比を算出したところ、HFCC①群で線維化のより進んでいる個体は C16:0/C24:0 の比が高くなる傾向が示された。以上のことから、NASH モデルでは肝臓中のセラミド総量が増加傾向にあること、また線維化がより進んだ個体では、肝臓セラミドの分子種の割合に変化があることが示された。

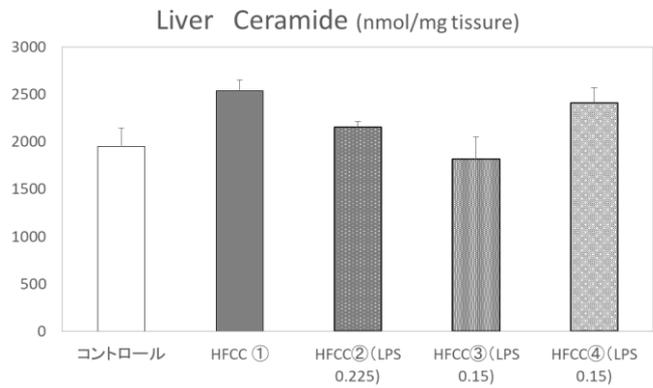


Fig.2 肝臓の総セラミド量 (nmol/mg tissue)

	C16:0	C18:0	C22:0	C24:0	C24:1	C24:2
コントロール	164 ± 12	79 ± 6	649 ± 51	858 ± 127	193 ± 18	8.52 ± 1.06
HFCC ①	193 ± 26	134 ± 18 *	766 ± 48	1078 ± 101	354 ± 21**	13.76 ± 2.88
HFCC ② (LPS 0.225)	134 ± 12	107 ± 13	662 ± 26	982 ± 27	264 ± 8	6.69 ± 0.89
HFCC ③ (LPS 0.15)	102 ± 17	85 ± 12	525 ± 75	866 ± 101	229 ± 31	6.86 ± 1.16
HFCC ④ (LPS 0.15)	142 ± 17	109 ± 13	750 ± 78	1112 ± 77	288 ± 11*	7.19 ± 0.64

Graph.1 肝臓の分子種ごとのセラミド量 (nmol/mg tissue)

\*p<0.05 vs コントロール, \*\*p<0.01 vs コントロールをそれぞれ示す

(3) NASH における血漿中セラミド動態の評価

血漿中の Ceramide を定量したところ、コントロール群と HFCC 群の総量の有意差は見られなかった (Fig.3) さらに、血液中のセラミド生成酵素の活性を比較したところ、有意差は認められなかった。

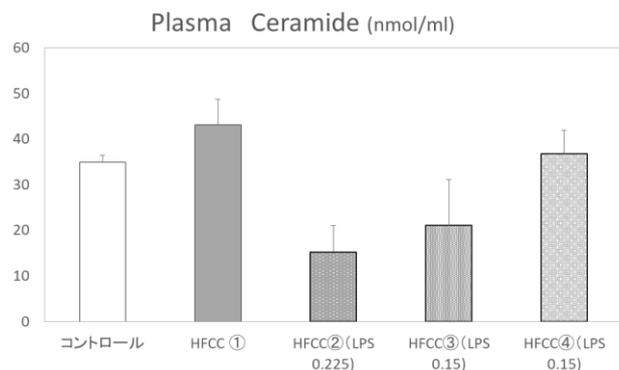


Fig.3 血漿中の総セラミド量 (nmol/ml)

(4) まとめ

今回、NAFLD モデル動物の肝臓中および血中のセラミド動態の網羅的解析をおこなったところ、肝臓において、特定のセラミドが増加することが示された。しかし、この増加が線維化の亢進にどのように影響するかについての検討までに至らなかった。すでに一部のグループで、肝線維化に直接的に関わる肝星細胞の活性化に、セラミド生成酵素が関わるという報告があることから、特定のセラミドが NAFLD の増悪に寄与する機序に関しては、さらに詳細に解明されることが臨まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林慧子, 大塚初菜, 竹村茂一, 市川 寛, 南山幸子, 久保正二
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）に対する S-アリルグルタチオンの有効性
3. 学会等名 第72回 日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----