

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15929

研究課題名(和文)胆汁酸代謝に着目したNASH発症機序の解明と新規治療法の探索

研究課題名(英文) Investigation of a novel mechanism of NASH pathogenesis focused on bile acid metabolism, and exploration of a new therapeutic strategy

研究代表者

奥新 和也 (OKUSHIN, KAZUYA)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40753918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒトNASH肝組織における排出型胆汁酸トランスポーターbile salt export pump (BSEP)の発現低下を模倣するモデルとして、主に高脂肪食摂取下のBsepヘテロノックアウトマウスについて検討した。

本モデルでは野生型マウスと比較して、肝脂肪化および体重増加の低減を認め、一方で肝内に部分的な炎症細胞浸潤を認めた。胆汁酸および脂質代謝関連遺伝子の発現は、肝臓に加えて小腸での様々な変化が認められ、肝臓特異的に発現するBSEPの発現調節を起点として多様な変化が生じることが明らかとなった。これらはGut-Liver-Axis及び代謝調節におけるBSEPの重要性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NAFLD/NASHの病態と胆汁酸代謝の関連は注目度が高く、国内外で積極的に研究が行われている。実際に、オベチコール酸を筆頭に胆汁酸代謝を標的とした各種薬剤が基礎的および臨床的な検討が加えられた上で、最も進んだものでPhase まで進行している。

そのような中、我々は多数例のヒト肝組織での胆汁酸代謝関連遺伝子発現の変化をいち早く報告してきた。本研究はこれらヒト肝組織での変化から得られた仮説を、マウスモデルにおいて検証することを起点としており、胆汁酸トランスポーターBSEPが肝臓から腸管にわたる代謝に重要な役割を果たすことを明らかとした極めてオリジナリティが高い研究と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that the intrahepatic expression of the bile salt export pump (BSEP) was downregulated during progression of NAFLD, suggesting that BSEP is involved in the pathogenesis of NASH. In this study, to investigate the role of BSEP in the pathogenesis of NASH, we have designed two approaches to regulate BSEP in mouse models via genetic modification: in vivo gene knockdown and gene knockout.

Knockdown of BSEP gene in wild type mice induced the enhanced expression of the cholesterol uptake pathway, including low-density lipoprotein receptor. BSEP heterozygous knockout mice fed a high-fat diet exhibited significant alterations of the expression levels of genes related to bile acid and lipid metabolism in the liver and ileum, resulting in alleviated steatosis and less weight gain. These results suggest the importance of BSEP for maintenance of bile acid and cholesterol metabolism. Further investigations of the functions of BSEP will provide insight into NASH pathogenesis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患 非アルコール性脂肪肝炎 胆汁酸代謝 脂質代謝 bile salt export pump ノックアウトマウス siRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 肝臓は代謝中枢臓器であり、急増する非アルコール性脂肪性肝疾患である NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease)、NASH (Non-Alcoholic Steatohepatitis) は肝病変の進行に加え、糖尿病や大血管疾患にも関与が示唆されているが、その病態は未だに不明な点が多い。また、NASH に対する確立された有効な治療薬は未だに確立されておらず、非侵襲的な診断方法や、NASH へと進展するリスクファクターの解明、そしてその治療法の開発は急務である。
- (2) そのような中、胆汁酸は従来では脂肪吸収を補助する乳化剤としての作用のみ認識されていたが、核内受容体である farnesoid X receptor (FXR) のリガンドとしての役割が示されたことを契機に研究が急速に進展し、脂質代謝や糖質代謝を中心とした全身の代謝中枢機構への関与が示されてきた。そして FXR を中心とする胆汁酸代謝は、脂質代謝・糖質代謝と密接な関連を有する NAFLD・NASH の治療標的として有望視されている。
- (3) 研究代表者らは、病理組織学的に NAFLD と診断されたヒト肝生検組織の遺伝子発現を検討し、NAFLD の病期進行と胆汁酸トランスポーター、特に主要な排泄型トランスポーター bile salt export pump (BSEP) の発現が有意に負の相関を示すことを明らかにしてきた (Okushin K, et al. J Gastroenterology 2016)。

2. 研究の目的

ヒト NAFLD で見出された病態進行に伴う BSEP の発現低下という知見を基盤として、

- (1) BSEP 発現調節による NASH 病態の再現とそのメカニズムの解明、特に栄養負荷との協調により肝細胞の恒常性が破綻する要因の解明
- (2) BSEP 発現低下に起因するヒト NASH 病態模倣モデルマウスの確立を行うことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

マウスでの BSEP の発現調節において、2 通りの遺伝子発現制御方法を検討した。一つは siRNA を用いた BSEP のマウス生体内 (in vivo) でのノックダウン (KD) テクニック、そしてもう一つは BSEP ノックアウト (KO) マウスの活用である。

- (1) 前者については、野生型マウス C57BL/6J (オス 16 週齢) に通常食 (ND) または高脂肪食 (HFD, 動物性脂質 14.4 %) を自由摂取させた。BSEP の生体内発現抑制 (in vivo KD) には BSEP 特異的な small interfering RNA (siRNA) を経尾静脈的に投与した。投与後 7 日で夜間絶食の後に肝組織を採取し、胆汁酸と脂質代謝に関係する肝内遺伝子発現および肝組織内の総胆汁酸と脂質について評価した。
- (2) 後者については、野生型マウス (C57BL/6J) と *Bsep* ヘテロノックアウトマウス (*Bsep*^{+/-} マウス) を通常食 (ND) または高脂肪食 (32.0 % の動物性脂質含有) で生後 8 週から 20 週にかけて飼育した。組織学的評価は HE 染色および Azan 染色で行い、肝臓および回腸末端における胆汁酸・脂質代謝に関わる遺伝子発現を検討した。

4. 研究成果

- (1) ノックダウンテクニックを用いた検討について
siRNA 投与により BSEP の mRNA およびタンパクレベルでの発現低下が確認できた。高脂肪食摂取下での BSEP KD に伴い、胆汁酸排出を司る multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) の発現亢進や胆汁酸合成の律速酵素 cholesterol 7 alpha-hydroxylase (CYP7A1) の発現抑制といった代償機構の作動が認められた。
上流に位置するコレステロール代謝においては、BSEP KD に伴い合成を司るメバロン酸経路の律速酵素 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase (HMGCR) はタンパクレベルで発現が抑制されていたが、一方で肝細胞内への輸送を行う low-density lipoprotein receptor (LDLR) は高脂肪食負荷での発現亢進に加えて BSEP KD に伴う増強傾向が認められた。さらに LDLR を制御する SREBP2 の発現も BSEP KD により亢進していた。
これらの結果から、BSEP の生体内での発現抑制は、SREBP2 により制御される肝細胞へのコレステロール取り込み経路に高脂肪食負荷と相乗的に作用することで、その恒常性破綻を引き起こす可能性が示唆された。
- (2) *Bsep* ヘテロノックアウトマウスを用いた検討について
高脂肪食摂取下の *Bsep*^{+/-} マウスは野生型マウスに比較して、体重増加が緩やかとなり肝脂肪化も軽減していたが、一方で部分的な炎症細胞の浸潤が認められた。通常食摂取群

では同様の变化を認めなかった。予想外に肝内の胆汁酸濃度は *Bsep*^{+/-}マウスで低下していた。胆汁酸代謝について、肝内の *Fxr* や *Mrp2* の遺伝子発現は高脂肪食摂取 *Bsep*^{+/-}マウスで野生型マウスに比較して亢進していた。回腸末端での *Fxr* およびその下流に位置する *Intestinal bile acid-binding protein* の発現も、高脂肪食摂取 *Bsep*^{+/-}マウスで野生型マウスに比較して亢進していた。コレステロール代謝については、肝細胞からコレステロールを排出する *ATP-binding cassette sub-family G member 5* の発現は高脂肪食摂取 *Bsep*^{+/-}マウスで野生型マウスに比較して亢進していた。

これらの結果から、*Bsep*^{+/-}マウスは高脂肪食摂取下において 20 週齢の時点で野生型マウスと比較して、1) 脂肪化が減弱すること、および、2) 炎症が惹起されること、が見出された。これは、ヒト NAFLD および NASH で得られた知見から予想された結果と、炎症という点では類似しているが、一方で脂肪化の減弱という点では相違している。

また、これらの検討の中で、主に肝臓でのみ発現する BSEP の発現を調節することにより、肝臓のみならず腸管での胆汁酸および脂質代謝関連遺伝子に幅広い発現変化が生じることが確認できた。

これらの結果は、BSEP が胆汁酸および脂質代謝に中心的に役割を果たしていること、さらには NAFLD・NASH の病態に関与していることを示唆するものであり、その詳細なメカニズムのさらなる解明が重要と考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Kazuya Okushin, Takeya Tsutsumi, Kazuhiko Ikeuchi, Akira Kado, Kenichiro Enooku, Hidetaka Fujinaga, Kyoji Moriya, Hiroshi Yotsuyanagi, and Kazuhiko Koike	4. 巻 24
2. 論文標題 Helicobacter pylori infection and liver diseases: Epidemiology and insights into pathogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 3617-3625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3748/wjg.v24.i32.3617	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 K. Enooku, M. Kondo, N. Fujiwara, T. Sasako, J. Shibahara, A. Kado, K. Okushin, H. Fujinaga, T. Tsutsumi, R. Nakagomi, T. Minami, M. Sato, H. Nakagawa, Y. Kondo, Y. Asaoka, R. Tateishi, K. Ueki, H. Ikeda, H. Yoshida, K. Moriya, H. Yotsuyanagi, T. Kadowaki, M. Fukayama, and K. Koike	4. 巻 53
2. 論文標題 Hepatic IRS1 and β -catenin expression is associated with histological progression and overt diabetes emergence in NAFLD patients.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1261-1275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-018-1472-0	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 T. Sasako, M. Ohsugi, N. Kubota, S. Itoh, Y. Okazaki, A. Terai, T. Kubota, S. Yamashita, K. Nakatsukasa, T. Kamura, K. Iwayama, K. Tokuyama, H. Kiyonari, Y. Furuta, J. Shibahara, M. Fukayama, K. Enooku, K. Okushin, T. Tsutsumi, R. Tateishi, K. Tobe, H. Asahara, K. Koike, T. Kadowaki, and K. Ueki	4. 巻 10
2. 論文標題 Hepatic Sdf211 controls feeding-induced ER stress and regulates metabolism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08591-6	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 Akira Kado, Takeya Tsutsumi, Kenichiro Enooku, Hidetaka Fujinaga, Kazuhiko Ikeuchi, Kazuya Okushin, Kyoji Moriya, Hiroshi Yotsuyanagi, Kazuhiko Koike	4. 巻 54
2. 論文標題 Noninvasive diagnostic criteria for nonalcoholic steatohepatitis based on gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of gastroenterology	6. 最初と最後の頁 730-741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-019-01565-x	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 K. Enooku, T. Tsutsumi, M. Kondo, N. Fujiwara, T. Sasako, J. Shibahara, A. Kado, K. Okushin, H. Fujinaga, R. Nakagomi, T. Minami, M. Sato, K. Uchino, H. Nakagawa, Y. Kondo, Y. Asaoka, R. Tateishi, K. Ueki, H. Ikeda, H. Yoshida, K. Moriya, H. Yotsuyanagi, T. Kadowaki, and K. Koike	4. 巻 55
2. 論文標題 Hepatic FATP5 expression is associated with histological progression and loss of hepatic fat in NAFLD patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of gastroenterology	6. 最初と最後の頁 227-243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-019-01633-2	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kazuya Okushin, Takeya Tsutsumi, Kenichiro Enooku, Hidetaka Fujinaga, Akira Kado, Kyoji Moriya, Hiroshi Yotsuyanagi, and Kazuhiko Koike
2. 発表標題 disruption of the homeostasis in lipid metabolism by knock-down of bile salt export pump may be involved in NASH pathogenesis in mouse model
3. 学会等名 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥新和也、堤武也、小池和彦
2. 発表標題 胆汁酸トランスポーターBSEPのヘテロノックアウトは高脂肪食摂取マウスの肝脂肪化に対して抑制的作用を有する
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥新和也、堤武也、榎奥健一郎、門輝、藤永秀剛、森屋恭爾、四柳宏、小池和彦
2. 発表標題 生体内発現抑制を用いた胆汁酸トランスポーターBSEPがNASH発症機構に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第53回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----