

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：34423

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19938

研究課題名（和文）小さな運び屋、脂肪酸結合タンパク質の非アルコール性脂肪肝炎NASH改善の可能性

研究課題名（英文）The effect of fatty acid binding protein 1 on non-alcoholic fatty liver

研究代表者

向井 貴子（MUKAI, TAKAKO）

帝塚山学院大学・人間科学部・助手

研究者番号：60701464

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、FABP1抑制によるNASH病態、及びNASH病態発症改善の可能性を評価した。高脂肪・高コレステロール食誘導性NASHモデルマウスに、アデノ随伴ウイルスベクターを用いてFABP1を抑制し検討を行った。その結果、FABP1抑制による炎症や線維化の改善は見られなかった。しかし、FABP1抑制がNASHを含めた生活習慣病発症の重要ファクターである耐糖能異常を改善させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、NASHの罹患者数は増加しており、予防法・治療法の開発が求められている。本研究で得られた高脂肪・高コレステロール食によるNASH進行過程のデータは、今後のNASH研究進展の足場となり得る。また、本研究ではFABP1抑制が耐糖能を改善することを明らかにした。耐糖能異常は、NASHを含めた生活習慣病の重要ファクターであることから、新たな治療シーズの発見という点で学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effects of FABP1 repression on NASH pathology and pathogenesis. The expression of FABP1 in the liver of NASH model mice fed a high-fat and high-cholesterol was suppressed by adeno-associated virus vector-mediated FABP1 knockdown. The silencing of FABP1 did not improve inflammation and fibrosis of these mice. However, FABP1 knockdown mice exhibited an improvement in glucose tolerance, which is an important factor in the development of lifestyle-related diseases, including NASH.

研究分野：健康科学

キーワード：FABP1 脂肪酸結合たんぱく質 NASH 非アルコール性脂肪肝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの増加に伴い、脂肪肝の罹患者数も増加してきており、その数は約2000万人と言われている。これまでメタボリックシンドローム由来の脂肪肝は悪性化しない良質なものと考えられてきたが、近年、その10%~20%が炎症や線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎(NASH)へと進行することが明らかとなった。NASHを放置した場合、その一部は不可逆性の肝硬変、肝臓へと進行することから、NASHの予防・治療法が求められている。現在、NASH発症のメカニズムは不明であり特効薬も存在せず、治療は運動療法と食事療法を基本として行われているが、自覚症状の乏しい脂肪肝においては治療を徹底することは難しく、簡便で効果の高い治療法が望まれている。

Fatty acid binding proteins (FABPs)は脂肪酸などの脂溶性分子に対して高いアフィニティを持つ14-15 kDaの小型の細胞内タンパク質であり、脂溶性物質と結合し、各細胞小器官へ輸送することで、細胞内脂質代謝に重要な働きをしている。申請者らはこれまで、FABPsと生活習慣病との関係や細胞内代謝について研究してきた(*FEBS Lett.* 2015、*Genes to Cells* 2011)。FABPsが細胞内における脂溶性物質の輸送という脂質代謝において重要な役割を果たすことから、肝臓におけるFABPsの発現や機能制御によって肝臓脂質蓄積を制御できるのではないかとこの着想に至った。

この可能性を実証するために、申請者らは肝臓の主なFABP種であるFABP1を標的としアデノウイルスベクターを用いたマウスへの投与実験を行った。その結果、FABP1発現アデノウイルスを通常マウスへ投与したところ脂肪肝が誘発され、逆に、FABP1抑制アデノウイルスを肥満マウスへ投与したところ、わずか一週間で脂肪肝が劇的に改善した(*FEBS Open Bio.* 2017)。

2. 研究の目的

申請者は肝細胞内のFABP1の発現量を減少させることで、短期間で劇的に脂肪肝を改善させることに成功した。また、FABP1の抑制は脂肪肝の改善のみならず炎症性マーカーの発現も低下していたことから、本方法はNASH治療の有望なシーズとなり得ると確信した。そこで、本研究では、FABP1抑制によるNASH病態、及びNASH病態発症に対する予防・改善効果を検証し、画期的なNASH治療法の開発に挑戦することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NASHモデルマウスの作製

8週齢のC57BL/6J(雄)に、高脂肪・高コレステロール(HFHC)食(D16010101:RESERCH DIET)を摂食させ、10ヶ月飼育した。コントロール食としてはCE-2を用いた。なお、動物実験は帝塚山学院大学の動物実験委員会の承認を受けその規定に従って行った。

(2) 生化学的評価

解剖時に採血し血清サンプルを調整した。トリグリセライド、コレステロール、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、総蛋白、アルブミンを測定した。

(3) 肝臓脂肪測定

肝臓サンプルをホモジネートし、n-ヘキサン法により脂質を抽出した。抽出サンプルを10% Triton/isopropyl alcoholに再懸濁した後、トリグリセライド、コレステロールを測定した。

(4) 病理学的評価

摘出した肝臓を4%パラホルマリンで固定後、パラフィンに包埋し、薄切切片を作製した。定法に従い、ヘマトキシリンエオジン、及びシリウスレッドにより染色後、顕微鏡観察を行い、脂肪蓄積、炎症、線維化を評価した。

(5) 遺伝子発現解析

肝臓サンプルよりtotal RNAを抽出しcDNAを合成した。炎症マーカー(MCP-1、TNF α)、線維化マーカー(Col1a1、 α -SMA)、酸化ストレスマーカー(HO-1)の遺伝子発現量をリアルタイムPCRにより測定した。

(6) リポソームによるFABP1発現抑制

In vivo jetPEI (Polyplus-transfection SAS)とFABP1抑制プラスミドを混合し、C57BL/6J(雄)マウスに投与した。

(7) FABP1抑制アデノ随伴ウイルスの作製

アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)の作製には、AAVpro Helper Free Systemを用いた。HEK293T細胞を用いてFABP1抑制AAVを産生させ、AAVpro Purification Kitを用いて精製後、C57BL/6J(雄)マウスに投与した。

4. 研究成果

(1) NASH モデルマウスの評価

8週齢の C57BL/6J (雄) マウスに HFHC 食を 10ヶ月間摂食させ、経時的に解剖を行い脂肪肝から NASH に至る病態発症過程を詳細に検討した。その結果、HFHC 食の摂食により体重、肝重量比、肝臓脂肪蓄積は有意に増加し、投与 4ヶ月ではほぼ高値で安定した(図 1 A、B)。また、肝臓の炎症は摂食開始後 2ヶ月ではほとんど変化が認められなかったが、3ヶ月後に急激に上昇した(図 1 C)。一方、肝組織における線維化は投与 4ヶ月ではほとんど見られず、投与 5ヶ月以降で継続的に増加する傾向が認められ、投与 7ヶ月ではほぼ全ての個体で肝線維化が認められた(図 1 D)。投与 7ヶ月の時点で、糖負荷試験を行ったところ、コントロール食と比較して有意な耐糖能の低下が認められた。以上のことから、HFHC 食の長期摂食は生活習慣病に伴って病態が進行するヒトに近いモデルであることが確認された。また、脂肪肝から NASH への進行過程に対する効果を研究する場合には 3-4ヶ月程度、NASH に対する効果を検討する場合には 7ヶ月以上摂食させたマウスを使用するのが適切であると考えられた。

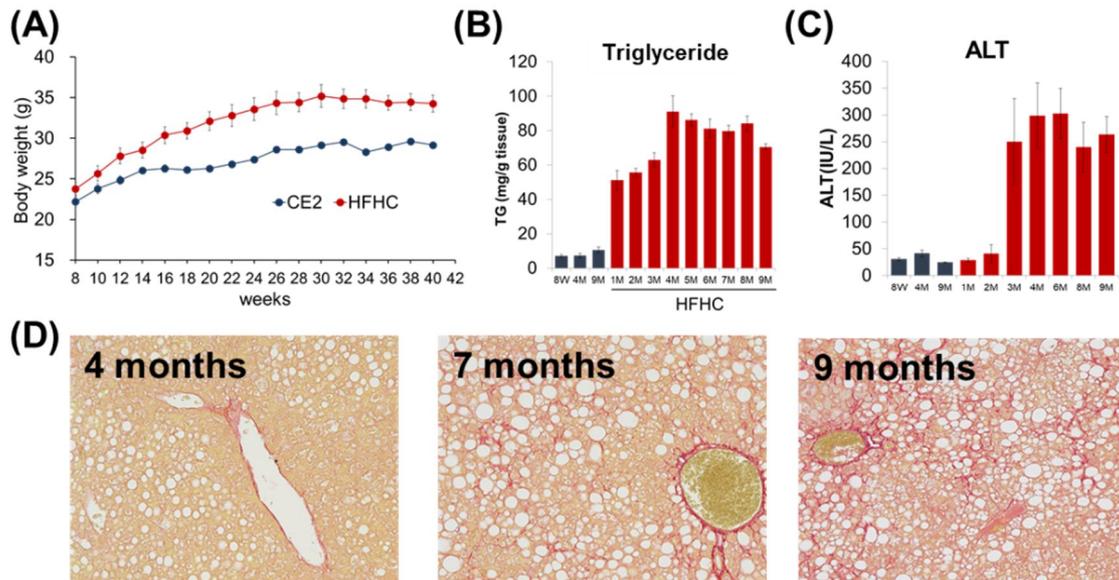


図1 HFHC食摂取によるNASH進行過程

A. 体重変化、B. 肝臓トリグリセライド、C. 血中ALT、D. シリウスレッド染色像

(2) 遺伝子抑制法の検討

免疫応答を誘導せずに遺伝子を抑制するため、in vivo jet-PEI を用いて FABP1 抑制プラスミドを肝臓に導入した。その結果、投与後 48 時間で肝臓における FABP1 発現量はコントロールの約 25%にまで減少した。しかし、投与後 1 週間ではコントロールの約 75%の発現量となり、持続時間に問題が残された。

次に、AAV を用いた FABP1 抑制系を検討した。投与 2 週間後に組織を摘出し解析したところ、肝臓において FABP1 の有意な発現低下が認められた。この FABP1 の発現抑制は投与 4 週間後においても認められた。AAV は免疫応答を誘導しないことから、AAV による抑制は本研究を遂行する上で理想的であると考えられた。

(3) NASH モデルマウスを用いた FABP1 抑制効果の評価

NASH 病態に対する FABP1 抑制効果の検討

上記(1)、(2)の結果を受け、HFHC 食を 9ヶ月間摂食させ NASH を誘発させたマウスに FABP1 抑制 AAV を投与した。投与後 HFHC 食にて 1ヶ月飼育後、解剖した。炎症マーカーを解析したところ FABP1 抑制群では ALT、AST はいずれもコントロール群に比べて有意に上昇していた。また、線維化マーカーの α -SMA の発現量に差は認められなかったが、Col1A1 の発現は 1.27 倍ではあるが有意に上昇していた。以上の結果から、FABP1 の抑制は NASH の病態に対して改善ではなく、むしろ増悪化に働く可能性が示唆された。

FABP1 抑制の長期的影響を検討するために、同実験において FABP1 を抑制後、HFHC 食にて 3ヶ月間飼育した。その結果、1ヶ月の抑制で見られた炎症の増悪化傾向は改善されていた。また、投与後、飼育 1ヶ月、3ヶ月の時点で耐糖能試験を行ったところ、FABP1 抑制群はコントロール群と比較して耐糖能が有意に改善されていた(図 2)。

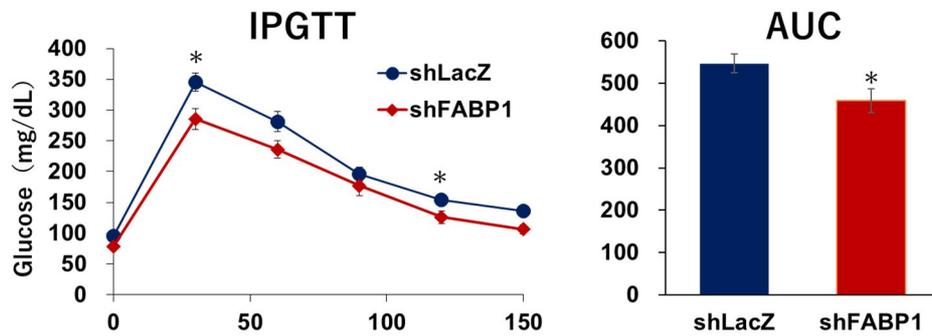


図2 FABP1 抑制による NASH モデルマウスの耐糖能改善

NASH 病態発症過程における効果の検討

NAFLD から NASH への進行は高脂肪・高コレステロール(HFHC)食の摂食 2 ヶ月以降から徐々に進行していくことから、摂食 2 ヶ月後に FABP1 抑制 AAV を投与し、NASH を発症する 6 ヶ月目まで飼育し評価した。結果、個体間の病態のばらつきが大きく、炎症や線維化の各パラメーターに有意な差は認められなかった。

以上、本研究により FABP1 の抑制が革新的な NASH 治療薬になるということを示すことはできなかった。しかしながら、FABP1 の抑制が NASH を含めた生活習慣病発症の重要ファクターである耐糖能異常を改善させることから、FABP1 抑制の有効性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mukai Takako, Egawa Miki, Takeuchi Tamaki, Yamashita Hitoshi, Kusudo Tatsuya	4. 巻 7
2. 論文標題 Silencing of FABP1 ameliorates hepatic steatosis, inflammation, and oxidative stress in mice with nonalcoholic fatty liver disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1009 ~ 1016
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.12240	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 向井 貴子、竹内 環、楠堂 達也
2. 発表標題 高脂肪高コレステロール食によるNASH病態進展と臓器由来液性因子との相関
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠堂達也、竹内環、向井貴子
2. 発表標題 食事誘導性NASH病態モデルマウスの作製と脂肪酸結合タンパク質FABP1抑制がNASH病態に及ぼす影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 楠堂達也、向井貴子
2. 発表標題 食事誘導性NASHモデルマウスにおけるNASH発症過程に関する研究
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 楠堂達也、向井貴子
2. 発表標題 高脂肪高コレステロール食の長期投与による脂肪肝からNASH発症に至る経過観察
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 向井貴子、江川美貴、山下均、楠堂達也
2. 発表標題 脂肪酸結合タンパク質の発現抑制が非アルコール性肝疾患の改善に及ぼす効果
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会
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
研究 分担 者	楠堂 達也 (KUSUDO TATSUYA) (00460535)	帝塚山学院大学・人間科学部・准教授 (34423)	