

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07913

研究課題名（和文）非アルコール性脂肪性肝炎に基づく肝発癌における概日時計の影響

研究課題名（英文）Effect of circadian clock on liver carcinogenesis based on non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

佐々木 茂 (SASAKI, SHIGERU)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10305229

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：脂肪肝は、脂肪性肝炎、さらに肝硬変、肝がんに至る症例もある。この病態の原因を生活習慣の違い、特に概日時計（サーカディアンリズム）の変化の観点から解明することを本研究の主な目的とした。また、歯周病菌が腸内細菌に影響を与え、脂肪肝にも影響を与えているかどうかを明らかにし、さらに歯周病菌に対する抗菌作用が脂肪肝に与える影響も明らかにしたいと考えている。これまでの研究結果からは、脂肪肝に与える概日時計の変化の影響はまだ明らかにならなかった。さらに検討を行っていく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満とともに脂肪肝の増加が近年著しい。特にアルコール多飲のない非アルコール性脂肪肝が注目され、患者数は増加が続いている。この脂肪肝は、一部が肝硬変、肝がんを発症することが知られている。今後、この肝硬変、肝がんの増加が予想されている。このことからこの脂肪肝の克服は、本邦、さらに世界中の喫緊の課題となっている。本研究はこの課題を生活習慣の一つの指標である概日リズムの観点で明らかにし、課題解決に迫る社会的に大きな意義を有している。

研究成果の概要（英文）：Fatty liver may lead to steatohepatitis, cirrhosis, and liver cancer. The main purpose of this study was to elucidate the cause of this pathological condition from the viewpoint of lifestyle differences, especially changes in circadian rhythms. We also want to clarify whether periodontal disease bacteria affect the intestinal flora and affect the formation of fatty liver and the exacerbation of fatty liver. Furthermore, we would like to clarify the effect of antibacterial agents against periodontal disease bacteria on fatty liver. From the results of this study, the effect of changes in circadian rhythm on fatty liver has not yet been clarified. We need to consider further.

研究分野：肝発がん

キーワード：脂肪肝 概日リズム 肝がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満とともに脂肪肝の増加が近年著しい。脂肪肝にはアルコール多飲に起因する脂肪肝と非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease : 以下NAFLD) が存在する。後者の有病率は欧米諸国で20~40%、本邦では9~30%とされ、患者数は増加傾向が持続している。NAFLDは、予後良好の非アルコール性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver : 以下NAFL) と線維化の進行した肝疾患である非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis : 以下NASH) に分けられる。後者のNASHの一部が肝硬変に移行し、さらに肝癌を発症することが注目されている。このNASHの発症機序として、脂肪組織や腸管由来のサイトカイン、食餌由来の因子など多種多様な要因があげられ、それらが重なってNASHを発症すると考えられているが、詳細は不明なままとなっている。一方、NAFLのままの症例とNASHへ進行していく症例が存在するのも事実である。このNAFLそしてNASHへの線維化の進行に関して、生活習慣の一つである食餌すなわち栄養は重要な位置を占めている。しかしながら、食餌以外の生活習慣に関する検討は少なく、さらには、生活習慣の根幹と考えられる概日時計の変化が与える影響などは不明のままとなっている。一方、その肥満の一因として概日時計の障害が注目されていて、慢性的な時差ぼけにより体脂肪量が増加することが報告されている。また、時計遺伝子の変異や多型は肥満と関連することが報告され、肥満モデル動物、さらには内臓脂肪を有する者では実際に時計遺伝子発現量が低いことも明らかにされている。この時計遺伝子の異常発現は癌の発生とも関係していることが報告されている。

2. 研究の目的

NAFLDにおいては、NAFLのままNASHへの進行を認めない症例、NAFLからNASHへの進行を認める症例、さらにはNASHから肝硬変、肝癌の発症まで進行する症例といった様々な病態が存在しているが、この各病態の相違を生活習慣の違い、特に概日時計の変化の観点から解明することを本研究の主な目的とした。

また、歯周病菌が腸内細菌に影響を与えることも報告され、NAFLD患者唾液中のPorphyromonas gingivalis検出率は対照者と比較して有意に高く、NAFL、NASHと疾患が重症化するにつれて検出率が高くなることが報告されている。さらに、抗菌療法を併用した歯周病治療により、NAFLD患者血清における肝細胞障害の有意な改善も認められている。また、肝硬変患者の腸内細菌叢を解析したところ、口腔由来と思われる細菌が高頻度に検出され、その比率が疾患の重症度と相関したとの報告もなされた。以上から、本研究の今後の展開として、ヒト腸内細菌叢に関する検討では、この唾液を用いた研究を行うことで、研究の簡便性や反復性が増し、今後の研究の進展が早まることも期待されることから、本研究では、この点も目的とした。同時に、これを行うことで、抗菌薬の使用により、NAFL、NASHの改善が期待されるかどうかを明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) 正常肝細胞および肝癌細胞株における時計遺伝子の発現と炎症性サイトカインに対する反応

正常ヒト肝細胞および肝癌細胞株における時計遺伝子Bmal1、Rev-erb alpha、Rev-erb beta、Per1、Per2、Cry1の発現についてqPCR法、western blotting法を用い検討する。

正常ヒト肝細胞に対して種々の炎症性サイトカイン(TNF- alpha、IL-1 beta、IL-17、IL-10、IL-13など)の添加によって生じる時計遺伝子の変化を明らかにする。

(2) C57/BL6Jマウスにおける概日時計の変化と腸内細菌叢および肝組織の変化について

C57/BL6Jマウスを用い、概日時計の変化に伴う腸内細菌叢の変容を検討する。概日時計に関しては、12時間毎の明暗群と24時間毎の明暗群に分けて行う。それぞれ、高脂肪食とコントロール食の2群に分け12週間飼育する。12週経過した時点で、マウスの大腸より腸内細菌を分離し、各群の腸内細菌叢について検討する。腸内細菌叢プロファイルの変化に関しては16S rRNA gene sequence法を用いて行い、また、腸内に存在する代謝物質動態について、メタボローム解析を行う。

各群のそれぞれのマウス肝組織において、脂肪化、線維化の程度を含めて組織学的に検討し、概日時計の変化に伴う肝組織の変化を明らかにする。また、肝組織における種々の炎症性サイトカインの発現について検討する。

各群のマウス肝組織における時計遺伝子の発現について、qPCR法、western blotting法を用い検討する。

(3) Nr1p3^{-/-} C57/BL6Jマウスにおける概日時計の変化に対する肝組織の変化

NAFLDを生じるNr1p3^{-/-} C57/BL6JマウスおよびWTマウスを用い、概日時計の変化に伴う腸内細菌叢プロファイルの変化を検討する。各グループ分けと実験法は上記(2)と同様に行うが、特に、概日時計の変化がNAFLからNASHへの進行を早めるか否かに関して明らかにする。

(4) NAFLおよびNASH患者における唾液に関する概日時計の変化

組織学的に診断がなされたNAFLおよびNASH患者、コントロールとして健常ボランティアの各食事の前後、そして就寝前に唾液を採取し、細菌叢プロファイルの検討を16SrRNA gene sequence法を用いて行い、また、代謝物質動態について、メタボローム解析を行う。今後のヒト試料を用いる研究への発展の端緒としたい。

(5) 肝癌術後の肝組織を用い、時計遺伝子の変化

肝癌組織において時計遺伝子の発現の変化を明らかにし、特に、Per2の発現変化から肝癌で多様に生じているメチル化などのエピゲノムに関する変化も明らかにしたい。

4. 研究成果

(1) 正常肝細胞および肝癌細胞株における時計遺伝子の発現と炎症性サイトカインに対する反応

正常ヒト肝細胞および各種ヒト肝癌細胞株(HuH6、HuH7、HepG2、HLE、HLF、PLC-PRF-5、Hep3B)を用いて、時計遺伝子(Bmal1、Rev-erb alpha、Rev-erb beta、Per1、Per2、Cry1)の発現に関するqPCR法、western blotting法を用いた検討。

いずれの時計遺伝子も多寡はあるものの、正常肝細胞および肝癌細胞株において発現を確認できた。細胞株による差は認めるが、Per1、Per2、Cry1は正常細胞に比べて発現が低い傾向にあった。逆に、Bmal1の発現は高い傾向にあった。この細胞株間における差異について、今後、さらに明らかにしたい。

正常ヒト肝細胞に対して種々の炎症性サイトカイン(TNF-alpha、IL-1 beta、IL-17、IL-10、IL-13など)の添加によって生じる時計遺伝子の発現の変化について。

いずれのサイトカインの添加によっても肝細胞の時計遺伝子の発現に有意な変化は認めなかった。この結果に関して、条件設定をさらに検討して行う予定となっている。

(2) C57/BL6Jマウスにおける概日時計の変化と腸内細菌叢および肝組織の変化に関する検討

C57/BL6Jマウスを用いた概日時計の変化に伴う腸内細菌叢の変容の検討。

まず、マウスにおける脂肪肝作成の検討を行った。C57/BL6Jマウスを用いて、12週間の高脂

肪食摂取群において、コントロール食摂取群に比べて明らかに脂肪肝を認めた。次に、12 時間毎の明暗群と 24 時間毎の明暗群における脂肪肝作成の違いを検討したが、明らかな相違を認めなかった。条件を変更して行っているが、概日時計の変化を生じる条件設定が不適切なのかを含めてさらに検討を要するものであった。この実験に関しては、最終的に概日時計の変化による腸内細菌の相違も検討する予定である。

各群のそれぞれのマウス肝組織における脂肪化、線維化の程度を含めた組織学的検討と概日時計の変化に伴う肝組織の変化についての検討。

のマウスの作成が明らかになった段階で、こちらの実験に取り掛かる予定である。

これまでの実験を通して、概日時計の変化の条件設定の詳細化、適切化が必要であると考え、これを早急に決め、今後、少なくとも、C57/BL6J マウスを用いた実験から Nr1p3^{-/-} C57/BL6J マウスを用いた実験まで進め、その結果を明らかにし、そしてさらに最終的には、研究の方法 (4) および (5) のヒトの検体を用いた検討に必ず進みたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	阿久津 典之 (AKUTSU Noriyuki) (50531191)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	
研究分担者	仲瀬 裕志 (NAKASE Hiroshi) (60362498)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関