

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10033

研究課題名(和文) 高血圧による非アルコール性脂肪性肝炎発症・進展とその作用機序の解明

研究課題名(英文) The effect of hypertension on the development and progression of nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者

内藤 久雄 (Naito, Hisao)

金城学院大学・生活環境学部・教授

研究者番号：90547556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪・高コレステロール飼料(HFC)摂取によって肝線維化を伴った非アルコール性脂肪性肝炎を発症するモデルラットSHRSP5/Dmcrとその系統元の高血圧ラット(SHR)、正常血圧ラット(WKY)を用い、Cyp7a1プロモーター領域のDNAメチル化頻度および肝臓サンプルによるプロテオーム解析を行った。その結果、Cyp7a1プロモーター領域のDNAメチル化頻度はHFC摂取により増加し、また高血圧モデルで高かった。プロテオーム解析では、DNAメチル化頻度と相関のあるものとしてグルクロン酸抱合に関与するUGTやケモカイン関連(CXCL10)の蛋白が検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでNASH発症に高血圧が関与するという研究報告は疫学研究のみであり、そのメカニズムは不明であった。この研究では、1つの要因としてHFC摂取によるCyp7a1プロモーター領域のDNAメチル化頻度の増加が肝炎・線維化進展につながると考えられた。ただし、この研究はラットの結果であり、ヒトにおける分子疫学研究の結果が待たれる。一方、高脂肪食の制限自体はすでにメタボリックシンドロームの一次予防として、そして高血圧の治療自体も脳・心血管疾患の発症予防としてすでに行われており、保健指導にそれらをMixして指導することが可能である。また、これらの結果から創薬のターゲットとして開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the mechanism of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) using the SHRSP5/Dmcr, which is rat model of nonalcoholic steatohepatitis with liver fibrosis, Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) and Wistar Kyoto Rat (WKY) fed high fat and high cholesterol diet (HFC). We performed DNA methylation frequency in the Cyp7a1 promoter region and proteomic analysis using these liver samples. Results showed that DNA methylation frequency of the Cyp7a1 promoter region was increased by HFC intake and hypertensive model. Proteomic analysis revealed UGT, involved in glucuronide conjugation, and CXCL10, which is chemokine-related proteins, as correlates of DNA methylation frequency.

研究分野：衛生学

キーワード：高血圧 NASH 肝線維化 CYP7A1 DNAメチル化 プロテオミクス

## 1. 研究開始当初の背景

近年、わが国では食生活の欧米化などで生活習慣病の予防が重要視されている。この1つの表現形とされる非アルコール性脂肪性肝疾患は、今まで進展することのない良性的な病態と考えられてきたが、その中に肝炎・線維化・肝硬変へ進展する NASH という病態が注目されるようになった。NASH は 10 年間で約 2 割が肝硬変に進展するが、血液検査や画像検査では良性的単純性脂肪肝との区別は困難であり、確定診断には侵襲の強い肝生検のみが現段階では唯一の方法である。そのため、多くの NASH 患者が顕在化しても診断されず肝硬変へ進展していく例も少なくない。NASH は、ウイルス性肝疾患に代わり、今後肝疾患の中で最も多くなることが予測され、NASH の予防・診断・治療法の開発は急務である。

申請者らは、高脂肪・高コレステロール飼料 (HFC) 摂取によって肝線維化を伴った非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) を発症するモデル動物 (SHRSP5/Dmcr) を確立し (1)、コレステロール代謝産物である胆汁酸の肝臓内蓄積による細胞毒性の増加が壊死・線維化に進展することを明らかにした (2-4)。さらに系統元 (SHR、WKY) との解析により、HFC 摂取により高血圧系ラット (SHRSP5/Dmcr、SHR) が正常血圧系ラット (WKY) より肝線維化進展が早いことが判明し、特に胆汁酸合成酵素 CYP7A1 蛋白の発現が HFC 摂取する以前から高血圧系ラットで高く、高血圧と肝線維化進展との関連が示唆された (5)。また、次世代シーケンサーによる DNA メチル化頻度解析の結果、HFC 摂取が *Cyp7a1* プロモーター領域の DNA メチル化頻度を増加させることが判明した。

## 2. 研究の目的

この研究では、高血圧と HFC 摂取による CYP7A1 蛋白の過発現と DNA メチル化頻度の変化が蛋白間相互作用物質によると仮説を立て、高血圧及び HFC 摂取の双方向から NASH (肝線維化) 発症メカニズムを解明し、その予防に資する知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物実験

10 週齢の WKY, SHR, SHRSP5/Dmcr にコントロール飼料または HFC を 8 週間摂取させ (各群 6 匹) 血液・肝臓サンプルを採取し、DNA 抽出および蛋白解析 (Western Blot 法、プロテオーム解析) で使用した。その他、一部の肝臓サンプルは病理標本の作製のため、4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、H&E 染色およびエラスチカ・ワンギーソン染色を行った。血液サンプルは、遠心分離後、上清の血清を凍結保存し、肝機能マーカーなどを測定した。

### (2) *Cyp7a1* プロモーター領域 (NDR 領域) の DNA メチル化頻度解析

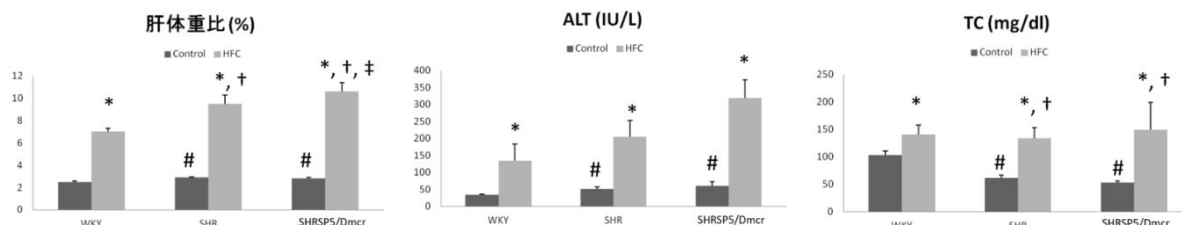
コントロール飼料及び HFC 摂取した WKY, SHR, SHRSP5/Dmcr の肝臓 (各群 6 匹) の DNA を抽出する。メチル化部位の特定のため、DNA をバイサルファイト処理後、山梨大学 (三宅先生) のところにある次世代シーケンサー (Ion PGM) を用いて *Cyp7a1* プロモーター領域の DNA メチル化頻度を測定した。

(3) Western Blot 解析およびプロテオーム解析: 肝臓サンプルのホモジネートを RIPA buffer で作成し、蛋白測定後、Western Blot サンプルを作成 (各群 6 匹)。同時に蛋白量 100µg のホモジネートを用いて、アルキル化、酵素消化などを行い精製し、LC-MS 用サンプルを作成した (各群 4 匹)。精製産物を 0.1% Trifluoroacetic Acids (TFA) に溶解し、藤田医科大学にある nano LC-MS/MS, Orbitrap Fusion で測定し (各群 4 匹)、そのうち一番外れ値を外した各群 3 匹によるプロテオーム解析を行った。

## 4. 研究成果

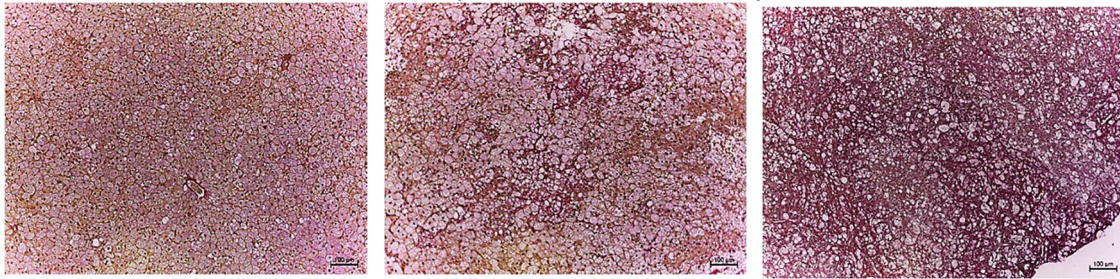
### (1) 解剖・生化学所見 (図 1) および病理所見 (図 2)

図 1. 肝体重比、血清 ALT、総コレステロール



$p < 0.05$  \* vs same Control, # vs WKY Control, † vs WKY (HFC/Ctrl), ‡ vs SHR (HFC/Ctrl)

図 2. エラスチカワンギーソン染色（濃い部分が線維化部位）



WKY（正常血圧）                      SHR（高血圧）                      SHRSP5/Dmcr（高血圧）  
HFC8 週間摂取では、高血圧ラット（SHR、SHRSP5/Dmcr）でのみ線維化を認めた。

(2) *Cyp7a1* プロモーター領域 (NDR 領域) の DNA メチル化頻度解析

転写開始点から上流 530bp までにあった 11 か所の CpG アイランドのメチル化頻度を測定した。そのうち各系統 (WKY、SHR、SHRSP5/Dmcr) の 9~10 か所の部位で、HFC 摂取によりメチル化頻度が有意に増加した。また、コントロール群での系統間においても、高血圧群が正常血圧群よりも 7~9 か所メチル化頻度は有意に高かった。

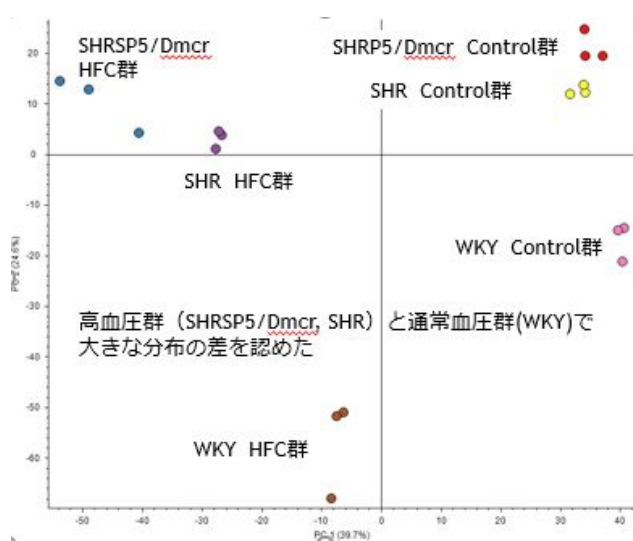
(3) プロテオーム解析

Nano LC-MS/MS Orbitrap fusion の測定により、2665 種類のたんぱく質を検出し、各群間で主成分分析により大きな差を認め、高血圧群と正常血圧群での差が大きかった (図 3)。

HFC 摂取により増加したのものとして、病態と類似している近年 NASH や肝がんのマーカーとして注目されている CD44 が HFC 摂取により増加したが、線維化のない WKY でも同様に増加していた。また、薬物代謝に関連するものとして、*Aldh3b1*、*Cyp3a1,2*、*Cyp4a12* などを検出した。

次に CYP7A1 蛋白発現と相関のあったものは、グルクロン酸抱合関連の *Ugt2b2*、小胞体ストレスに関連する *Asparagin synthetase*、ケモカイン関連の *CXCL10* などを検出した。

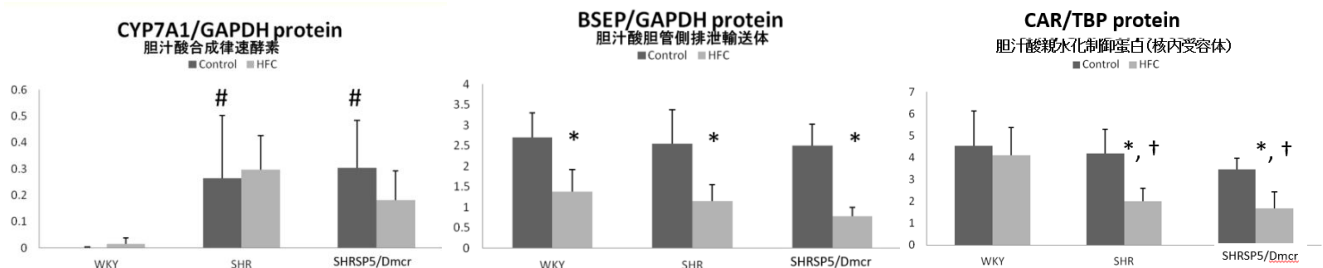
図 3. 主成分分析結果



(4) Western Blot 解析結果

HFC 摂取による病態として、コレステロールを多く含んだ肝細胞内で胆汁酸への異化が亢進することにより細胞毒性が発現し、壊死・線維化へ進展することから、プロテオーム解析の結果も踏まえて、胆汁酸関連蛋白の解析を行った。差があったものを図 4 に示す。

図 4. CYP7A1、BSEP、CAR 蛋白発現量



CYP7A1 は高血圧グループでの発現が顕著であった。胆汁酸排泄に参与する BSEP は、HFC 摂取により発現が低下し胆汁酸の排泄遅延が推察された。さらに、グルクロン酸抱合の制御に参与する核内受容体 CAR の発現は HFC を摂取した高血圧群でのみ発現が低下しており、血中への排泄遅延も伴い、肝臓内への胆汁酸蓄積が正常血圧群よりも高いことが示唆された。また、定量リアルタイム PCR 法での *UGT1a3* の mRNA 発現についても同様の結果であった (データ非公表)。

以上の結果から、HFC 摂取により高血圧ラットでは正常血圧ラットよりもコレステロー

ルを肝臓内に早く取り込み始め、その後胆汁酸異化が促進されても排泄は遅延することにより肝臓内への胆汁酸蓄積が肝炎・線維化へ続いたことが明らかとなった。今後の課題としては、プロテオーム解析で認められた小胞体ストレスへの影響やケモカインなどの解析を行い、バイオマーカーとして有用なものがないかを検討する必要があると考えられた。

#### 参考文献

1. Kitamori K, Naito H, Tamada H, Kobayashi M, Miyazawa D, Yasui Y, Sonoda K, Tsuchikura S, Yasui N, Ikeda K, Moriya T, Yamori Y, Nakajima T. Development of novel rat model for high-fat and high-cholesterol diet-induced steatohepatitis and severe fibrosis progression in SHRSP5/Dmcr. *Environ Health Prev Med* 2012;17(3):173-82. doi: 10.1007/s12199-011-0235-9.
2. Jia X, Naito H, Yetti H, Tamada H, Kitamori K, Hayashi Y, Wang D, Yanagiba Y, Wang J, Ikeda K, Yamori Y, Nakajima T. Dysregulated bile acid synthesis, metabolism and excretion in a high fat-cholesterol diet-induced fibrotic steatohepatitis in rats. *Dig Dis Sci*. 2013;58(8):2212-22. doi: 10.1007/s10620-013-2747-1.
3. Jia X, Suzuki Y, Naito H, Yetti H, Kitamori K, Hayashi Y, Kaneko R, Nomura M, Yamori Y, Zaitso K, Kato M, Ishii A, Nakajima T. A possible role of chenodeoxycholic acid and glycine-conjugated bile acids in fibrotic steatohepatitis in a dietary rat model. *Dig Dis Sci*. 2014;59(7):1490-501. doi: 10.1007/s10620-014-3028-3.
4. Naito H, Jia X, Yetti H, Yanagiba Y, Tamada H, Kitamori K, Hayashi Y, Wang D, Kato M, Ishii A, Nakajima T. Importance of detoxifying enzymes in differentiating fibrotic development between SHRSP5/Dmcr and SHRSP rats. *Environ Health Prev Med*. 2016;21(5):368-381. doi: 10.1007/s12199-016-0539-x.
5. Yuan Y, Naito H, Jia X, Kitamori K, Nakajima T. Combination of Hypertension Along with a High Fat and Cholesterol Diet Induces Severe Hepatic Inflammation in Rats via a Signaling Network Comprising NF- $\kappa$ B, MAPK, and Nrf2 Pathways. *Nutrients*. 2017;9(9):1018. doi: 10.3390/nu9091018.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Asano Tomomi, Taki Kentaro, Kitamori Kazuya, Naito Hisao, Nakajima Tamie, Tsuchihashi Hitoshi, Ishii Akira, Zaitzu Kei	4. 巻 6
2. 論文標題 One-Pot Extraction and Quantification Method for Bile Acids in the Rat Liver by Capillary Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 8588-8597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.1c00403	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 Yuan Yuan, Naito Hisao, Kitamori Kazuya, Hashimoto Sayuki, Asano Tomomi, Nakajima Tamie	4. 巻 15
2. 論文標題 The antihypertensive agent hydralazine reduced extracellular matrix synthesis and liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis exacerbated by hypertension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0243846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0243846	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 橋本沙幸、内藤久雄、那須民江	4. 巻 47
2. 論文標題 非アルコール性脂肪性肝炎に対する食事介入と降圧剤投与の有効性とメカニズム	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 64-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Naito H, Yoshikawa-Bando Y, Yuan Y, Hashimoto S, Kitamori K, Yatsuya H, Nakajima T.	4. 巻 9
2. 論文標題 High-fat and high-cholesterol diet decreases phosphorylated inositol-requiring kinase-1 and inhibits autophagy process in rat liver.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48973-w.	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8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内藤久雄、山口央輝、北森一哉、那須民江
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎モデルラットを用いたプロテオーム解析
3. 学会等名 第94回日本産業衛生学会・学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内藤久雄、北森一哉、橋本沙幸、浅野友美、八谷寛、那須民江
2. 発表標題 ウルソデオキシコール酸添加による高脂肪食誘導性肝炎・線維化の軽減作用
3. 学会等名 第93回日本産業衛生学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内藤久雄、袁媛、北森一哉、橋本沙幸、浅野友美、那須民江
2. 発表標題 高脂肪食摂取SHRにおける降圧剤投与と肝線維化進展抑制効果
3. 学会等名 第56回高血圧関連疾患モデル学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内藤久雄、袁媛、北森一哉、橋本沙幸、浅野友美、八谷寛、那須民江
2. 発表標題 降圧薬ヒドララジンは高脂肪食摂取した高血圧ラットの肝線維化を抑制する
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内藤久雄、三宅邦夫、袁媛、橋本沙幸、浅野友美、北森一哉、八谷寛、那須民江
2. 発表標題 降圧剤の投与は高血圧ラット肝臓Cyp7a1プロモーターのメチル化頻度を低下させる
3. 学会等名 第91回日本産業衛生学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内藤久雄、三宅邦夫、袁媛、橋本沙幸、北森一哉、八谷寛、那須民江
2. 発表標題 高血圧因子及び高脂肪食摂取がラット肝臓Cyp7a1プロモーター領域のDNAメチル化頻度を増加させる
3. 学会等名 第54回高血圧関連疾患モデル学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 那須民江、袁媛、内藤久雄、北森一哉、橋本沙幸
2. 発表標題 降圧剤による非アルコール性脂肪性肝炎抑制とそのメカニズム
3. 学会等名 第54回高血圧関連疾患モデル学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内藤久雄、三宅邦夫、橋本沙幸、浅野友美、北森一哉、八谷寛、那須民江
2. 発表標題 高血圧ラットは肝臓Cyp7a1 promoterメチル化頻度が高く、降圧剤投与で一部低下する
3. 学会等名 第89回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yuan Y, Naito H, Nakajima T	4. 発行年 2018年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 16
3. 書名 Cholesterol - Good, Bad and the Heart: Chapter 7; The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of Hypertension-Associated Nonalcoholic Steatohepatitis	

〔産業財産権〕

〔その他〕

金城学院大学 学術研究データベース <a href="http://tdb.kinjo-u.ac.jp/search/index.php/search/teacher_info?teacherid=13625">http://tdb.kinjo-u.ac.jp/search/index.php/search/teacher_info?teacherid=13625</a> reserchmap <a href="https://researchmap.jp/naitoh1973">https://researchmap.jp/naitoh1973</a> ReserchGate <a href="https://www.researchgate.net/profile/Hisao-Naito">https://www.researchgate.net/profile/Hisao-Naito</a>
---

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
研究協力者	山口 央輝  (Yamaguchi Hisateru)		プロテオーム解析
研究協力者	三宅 邦夫  (Miyake Kunio)		DNAメチル化解析
連携研究者	那須 民江  (Nakajima Tamie)  (10020794)	中部大学・生命健康科学部・客員教授   (33910)	研究総括



6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	北森 一哉  (Kitamori Kazuya)  (80387597)	金城学院大学・生活環境学部・教授    (33905)	動物実験

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