

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K11096

研究課題名(和文)肝微小環境から捉えるビタミンE同族体の非アルコール性脂肪肝炎(NASH)改善機構

研究課題名(英文) Effects of vitamin E on improving nonalcoholic steatohepatitis (NASH) focusing on the hepatic microenvironment

研究代表者

石川 朋子 (Tomoko, Ishikawa)

聖徳大学・人間栄養学部・教授

研究者番号：70212850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： ビタミンE投与は、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)唯一の薬剤療法であるが、治療効果への期待と副作用への懸念のバランスから絶対的選択肢にはなっていない。本研究では、より効率的なビタミンE療法の確立を目指して、主に食餌誘導性NASHモデルを用い、NASH発症初期、進行過程、治癒過程のそれぞれの病態において、ビタミンE同族体による効果の違い、抗酸化剤との相乗効果、肝組織環境がNASH病態からの回復や進展に及ぼす影響を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は、近い将来、日本における肝癌の主因となる生活習慣病として注目され、有効な予防法、診断法および治療法の開発が望まれている。本研究成果は、ビタミンE同族体のトコトリエノールに肝線維化の抑制効果がみられること、多価不飽和脂肪酸との同時投与は炎症や脂質代謝の改善に寄与することを示唆している。病態に適したビタミンE投与タイミングの決定や、同族体配合の治療製剤開発の手掛かりとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)： Administration of vitamin E is the sole medication for nonalcoholic steatohepatitis (NASH), but it is not considered the gold standard because of the balance between therapeutic benefits and adverse reactions. This study aims to establish more efficient vitamin E therapies. Using diet-induced NASH model mice, we investigated differences in effects among vitamin E homologues, synergistic effects with antioxidants, and influence of hepatic microenvironment on recovery and progression of NASH during the early onset, advanced, and healing stages of NASH.

研究分野：機能形態学、栄養化学

キーワード：肝疾患 栄養 細胞・組織

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、「HAFLD/NASH 診療ガイドライン 2014, 2020」において、組織診断あるいは画像診断で脂肪肝を認め、アルコール性肝障害など他の肝疾患を除外した病態と定義されている。このうち炎症や線維化を伴う NASH は肝硬変や肝癌などに進展する進行性疾患であり、我が国では NASH 患者は約 100 万人弱と成人人口の 1%に達するといわれている。

ところが現在、肥満や高血圧などの基礎疾患が無い場合、その治療法は生活習慣の改善が中心で、NASH に特化した治療の選択肢はビタミン E 投与のみである。ビタミン E は、血中 ALT を低下させ、不可逆的ともいわれた肝硬度(肝線維指標)を軽減するとの臨床報告もあり、ランダム化比較試験においても有用性が示されている(N Engl J Med 362: 1675, 2010)。しかし長期の服用によって脳出血や前立腺癌の発症を増加させる可能性もあり、長期投与への懸念は払拭されていない。このようにビタミン E 投与は NASH 治療において一定の有用性が示されながらも、治療効果への期待と副作用への懸念のバランスから、絶対的選択肢とはなっていないのが現状である。

NASH 患者の病態は様々であり、投与タイミングの決定や有効な同族体の活用は、効率的治療のための戦略として期待される。そのためには“ビタミン E およびその同族体は、肝炎の鎮静に寄与するのか、肝組織の再生に寄与するのか”という根本的な問いに対して、病態の進行に伴う肝組織環境との関連を詳細に検証することが求められる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ビタミン E 同族体の NASH 改善効果について、類洞内皮細胞や細胞外マトリックス等の肝組織環境との関連を検証し、より効果的かつ積極的な治療法の開発に寄与することである。本研究では主に食餌誘導性 NASH モデルマウスを用い、病態の亢進と改善が複雑に展開する NASH 病態を様々な条件で再現し、ビタミン E 同族体による効果の違い、抗酸化剤との相乗効果、肝組織環境が NASH 病態からの回復や進展に及ぼす影響を検証する。ビタミン E 同族体の NASH 改善機構が明らかとなれば、より病態に適した投与タイミングの決定や、配合治療剤の開発が可能となる。

3. 研究の方法

(1) ヒト NASH 病態と類洞毛細血管化との関連

病理検査により NAFLD と診断され、同意を得た 26 症例の肝生検試料において、類洞内皮細胞に特異的に発現する FcγRIIb を酵素抗体法で検出、形態計測を行い、各種血中生化学検査値および病理診断スコア等との関連を解析した。この研究は、東京慈恵会医科大学およびお茶の水女子大学の各倫理委員会の承認を得て実施した。

(2) NASH 病態と間質環境の関連

NASH 進展時の細胞外マトリックス発現

食事誘導性肝障害モデルとして、マウスにコリン欠乏・メチオニン制限・高脂肪食を与え NASH を誘導した。NASH 進展時の毛細血管化、炎症、線維化の各発症部位における間質環境変化について、組織修復に関わる細胞外マトリックスであるテネイシン C (TNC) 局在との関連を解析した。

NASH 進展および治癒過程における細胞外マトリックス欠損の影響

TNC 欠損マウスに NASH 誘導食を 6 週間与えて NASH を誘導した。その後標準食に切り換え 1 週間の治癒期間を設けた。NASH 進展および治癒過程の病態変化を野生型マウスと比較した。

(3) NASH 発症初期、進行過程、治癒過程におけるビタミン E 同族体の効果

ビタミン E 同族体の予防効果

NASH 誘導食摂餌 1 週間後から、ビタミン E 同族体 (α-Toc: α-トコフェロール; T3: トコトリエノール混合物) の経口投与を 2 週間行い、発症初期における予防効果を検証した。

進行過程における魚油とビタミン E の相乗効果

NASH 誘導食 3 週間摂餌により NASH を誘導した。次いで NASH 誘導食を継続しつつ、魚油およびビタミン E 同族体 (α-Toc; T3) を 2 週間経口投与し、相乗効果を検証した。

治癒過程における魚油とビタミン E の相乗効果

NASH 誘導食 3 週間摂餌により NASH を誘導した。次いで食餌を高脂肪食に切り替えて、魚油およびビタミン E 同族体 (α-Toc; T3) を 2 週間経口投与し、相乗効果を検証した。

- (4) NASH 治癒過程におけるビタミン E 同族体の改善効果と細胞外マトリックスの関係
 組織修復に関わる細胞外マトリックスであるテネイシン C 欠損マウスに NASH 誘導食 3 週間給餌後、ビタミン E 同族体を含む高脂肪食に切り換え、治癒過程における効果を検証した。

4. 研究成果

(1) ヒト NASH 病態と類洞毛細血管化との関連

ヒト NAFLD/NASH 患者の肝生検試料における FcγRIIb 発現は、NASH 発症初期の線維化ステージ 1 で最も発現が高く、その後減少する傾向が認められた (図 1,2; PLOS One (2018) e0211543 一部改変)。さらに NASH 亢進や線維化の指標であるコラーゲン IV (IVCol)、ヒアルロン酸 (Hyal) の血中濃度と負の相関を示すことが明らかとなった。IVCol はマンノース受容体の、Hyal はヒアルロン酸受容体のリガンドとして知られている。どちらも類洞内皮細胞のスカベンジャー受容体であり、FcγRIIb 発現は複数のスカベンジャー機能と連動することが示唆された。

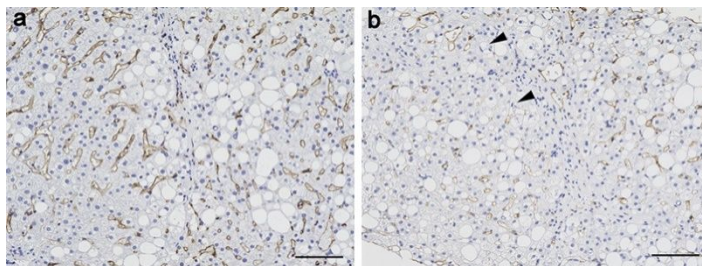


図 1. ヒト NASH 肝生検の FcγRIIb 免疫染色像
 a: NAS スコア 2; b: NAS スコア 8, Bar= 100 μm

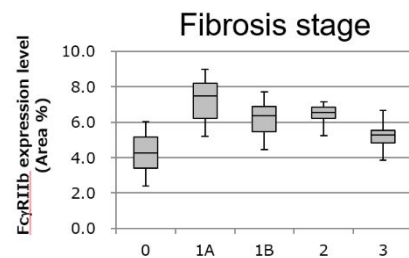


図 2. ヒト NASH 肝生検における FcγRIIb 発現と線維化スコア

(2) NASH 病態と間質環境の関連

NASH 進展時の細胞外マトリックス発現

TNC は NASH 発症の初期段階から、肝小葉内間質の炎症性細胞浸潤部や類洞壁に強い発現が認められた。さらに詳細に観察すると、TNC は毛細血管化した類洞 (FcγRIIb(-)) を取り囲むように分布することが明らかとなった (図 3)。活性化星細胞 (-SMA(+)) との共局在は認められなかった (図 4)。TNC は炎症部位のみならず、類洞の毛細血管化部位においても組織修復に関わる可能性が示唆されたことは大変興味深い。

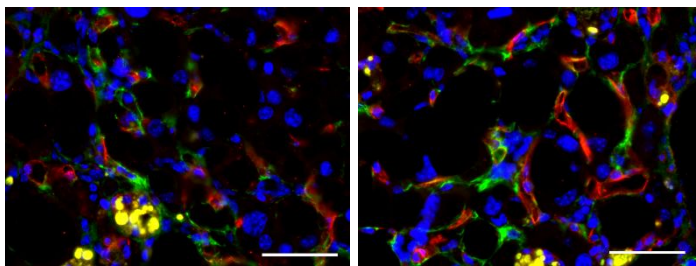


図 3. NASH 誘導 (6 週間) マウス肝臓の免疫染色像
 緑: TCN, 赤: FcγRIIb, Bar = 50 μm

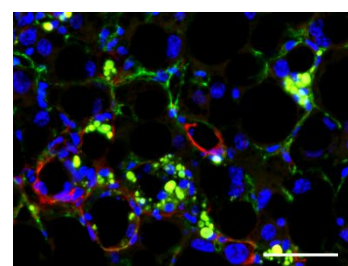


図 4. NASH 誘導 (6 週間) マウス肝臓の免疫染色像
 緑: TCN, 赤: -SMA, Bar = 50 μm

NASH 進展および治癒過程における細胞外マトリックス欠損の影響

組織修復に関わる TNC 欠損が、NASH 亢進および治癒過程に及ぼす影響を検討した。NASH 進展時、TNC 欠損群では一部の肝葉に結節性過形成が発達していた。また回復期には、肝葉は局所的に著しい傷害を呈して機能を失い、代償的な再生性過形成が顕著であった。この時、傷害の少ない肝葉では、炎症および線維化関連遺伝子発現が低下していた。TNC は病巣の進展を制御し、臓器全体の緩徐な修復に寄与する可能性が示唆された。

(3) NASH 発症初期、進行過程、治癒過程におけるビタミン E 同族体の効果

異なる NASH 病態において、ビタミン E 同族体の NASH 改善効果、魚油との相乗効果を検証した。

ビタミン E 同族体の予防効果

NASH 発症初期において、-Toc または T3 経口投与による病理学的所見に変化は認められなかった。T3 投与により Col4a1 遺伝子発現は有意に低下、Col1a1 も顕著な低下傾向を示した。NASH 発症初期において、T3 は線維化抑制に寄与することが示唆され

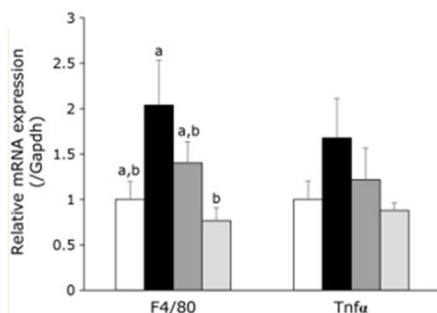


図 5 . NASH 発症初期における炎症関連遺伝子発現

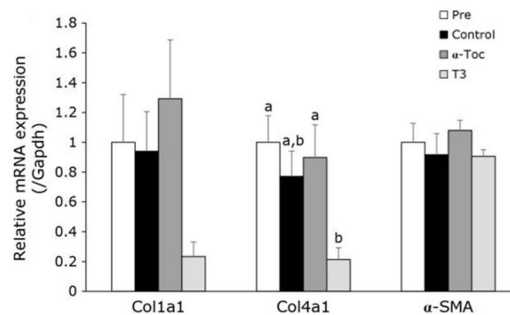


図 6 . NASH 発症初期における線維化関連遺伝子発現

進行過程における魚油とビタミン E の相乗効果

NASH 進行過程の肝臓において、魚油投与は脂質合成関連遺伝子を有意に低下させたが、 α -Toc や T3 との相乗効果はみられなかった。炎症関連遺伝子である *Tnf* は、魚油投与により有意に低下した。同時に α -Toc または T3 を投与するとさらに有意に低下した。ビタミン E 同族体間に有意差はみられなかった。ビタミン E と魚油の同時投与は、NASH 進行過程において炎症の鎮静に寄与することが示唆された。

治癒過程における魚油とビタミン E の相乗効果

NASH 治癒過程の肝臓において、脂質合成酵素の遺伝子発現は魚油投与で低下傾向を示した。同時に α -Toc または T3 を投与すると遺伝子発現は有意に低下した。ビタミン E と魚油の同時投与は、NASH 治癒過程において脂質合成を抑制し、肝組織の回復に寄与することが示唆された。

(4) NASH 治癒過程におけるビタミン E 同族体の効果に対する細胞外マトリックスの影響

2 週間の治癒過程により、肥大した肝臓の重量、血中 AST 値、ALT 値は有意に低下した。

α -Toc または T3 経口投与による病理学的所見の変化は認められなかった。遺伝子発現においては、WT では、高脂肪食群 (control) で治癒過程に線維化促進に関わる *Tgf* , *Pdgfb* , *Dll4* , *Vim* 等の発現が有意に上昇するが、 α -Toc および T3 投与によりこの上昇はキャンセルされた。しかし *Col1a1* , *Col4a1* 遺伝子発現を低下させるには至らなかった。一方 TNC 欠損では、線維化関連遺伝子発現に変化はないものの、*Col1a1* は有意に低下、*Col4a1* も低下傾向が認められた。ビタミン E 同族体および TNC 欠損はそれぞれに治癒過程における線維化抑制に寄与するものの、その機序は一様ではない。

本研究により、ビタミン E、特に T3 投与は NASH 発症初期および治癒過程において、線維化促進遺伝子の発現を抑えることが明らかとなった。また多価不飽和脂肪酸の豊富な魚油との同時投与では、炎症や脂質代謝の制御にも関与することが示唆された。また組織再生細胞外マトリックスである TNC の制御は、治癒過程における線維化軽減に寄与するものと期待される。引き続き NASH 病態を制御する新たな治療法開発に寄与することを目的として、肝線維化抑制効果を増強させる肝微小環境について詳細な検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Noichi Jun, Ishikawa Tomoko, Ichi Ikuyo, Fujiwara Yoko	4. 巻 70
2. 論文標題 Effect of tocotrienol on the primary progression of nonalcoholic steatohepatitis in a mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 140 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbn.21-69	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 該当する

1. 著者名 Ishikawa Tomoko, Yokoyama Hiroshi, Matsuura Tomokazu, Fujiwara Yoko	4. 巻 14
2. 論文標題 Fc gamma R11b expression levels in human liver sinusoidal endothelial cells during progression of non-alcoholic fatty liver disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0211543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0211543	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 Momoka Hayashida, Kei Hashimoto, Tomoko Ishikawa, Yasunori Miyamoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Vitronectin deficiency attenuates hepatic fibrosis in a non-alcoholic steatohepatitis-induced mouse model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Exp. Pathol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iep.12306	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 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高橋咲貴、石川朋子、市育代、藤原葉子
2. 発表標題 食餌誘発性NASHモデルを用いた炎症の進行における魚油とビタミンEの影響
3. 学会等名 日本ビタミン学会第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原葉子、市育代、石川朋子
2. 発表標題 食餌誘発性NASHモデルマウスにおけるビタミンEと魚油の効果
3. 学会等名 第367回脂溶性ビタミン総合研究委員会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋咲貴、石川朋子、市育代、藤原葉子
2. 発表標題 NASH進行過程における魚油とビタミンEの経口投与による相乗効果の検討
3. 学会等名 第31回ビタミンE研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川朋子、日下部守昭、藤原葉子
2. 発表標題 食事誘導性非アルコール性脂肪肝炎の治癒過程における間質微小環境の影響
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川朋子、日下部守昭、藤原葉子
2. 発表標題 アルコール性脂肪肝炎発症初期の間質微小環境の解析
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川朋子、横山寛、松浦知和、藤原葉子
2. 発表標題 ヒトNASH病態と肝類洞内皮細胞FcγR2b発現との関連
3. 学会等名 第32回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川朋子、乃一純、市育代、藤原葉子
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎発症過程におけるビタミンE摂取効果の検討
3. 学会等名 日本ビタミン学会第70回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoko Ishikawa, Moriaki Kusakabe, Yoko Fujiwara
2. 発表標題 Influence of extracellular matrix deficiency on effects of vitamin E during recovery from the diet-induced NASH
3. 学会等名 22nd International Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022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	藤原 葉子 (Fujiwara Yoko) (50293105)	お茶の水女子大学・基幹研究院・教授 (12611)	

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
研究 分 担 者	日下部 守昭 (Kusakabe Mariaki) (60153277)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任教授 (12601)	

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