

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11743

研究課題名(和文) コレステロール摂取が非アルコール性脂肪肝の進展と発癌に及ぼす影響とその機序の解明

研究課題名(英文) Effect of excessive cholesterol intake on the development of non-alcoholic fatty liver and hepatocellular carcinoma

研究代表者

三宅 映己 (Miyake, Teruki)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80573659

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)：本研究では、コレステロールの過剰摂取が人体(NAFLD)へ与える影響を解明するために、高コレステロール含有高脂肪食を用いてマウスを飼育し検討を行った。コレステロールの過剰摂取は肝内のCYP7A1の発現増加とCYP27A1の発現低下を誘導し、胆汁酸の代謝に影響を及ぼした。その結果、胆汁酸の分画、腸内細菌叢を変化させ、肝臓内の中性脂肪やコレステロールの沈着量を増加させることにより脂肪肝を悪化し、長期間の負荷により肝炎や肝線維化を増悪させ、肝癌を発生させることが示唆された。食事中のコレステロールの摂取制限を行うことは、非アルコール性脂肪性肝疾患の病態の悪化を予防するために重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年疫学研究や動物実験でコレステロール摂取により脂肪沈着の増強や肝炎、線維化の増悪が報告され、脂肪性肝疾患の病態進展におけるコレステロール代謝の重要性が認識され始めている。従来、コレステロールは動脈硬化性疾患との関連が強いため、心筋梗塞、脳梗塞のリスクをもとに管理目標が設定されている。また、食事からのコレステロール摂取量と血中コレステロール値の関連を示す根拠がないため、コレステロール摂取制限に対する意識が低下している。しかし、肝疾患ではコレステロール過剰摂取が肝硬変、肝細胞癌などのリスクを増加させる可能性が報告され、肝疾患をもとにコレステロール摂取制限について再検証する必要があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined mice fed with a high cholesterol-containing high fat diet to elucidate the effects of excessive cholesterol intake on the pathophysiology of non-alcoholic fatty liver disease. Excessive cholesterol intake increased expression of CYP7A1 and decreased expression of CYP27A1 in the liver, and affected the metabolism of bile acids. These changes altered the bile acid fractionation and gut microbiota, and increased the deposition of triglycerides and cholesterol in the liver. Additionally, prolonged excessive cholesterol diet load exacerbated hepatitis and liver fibrosis, and caused hepatocarcinogenesis. Limiting dietary cholesterol intake might be important to prevent the deterioration of the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease.

研究分野：代謝

キーワード：コレステロール摂取 非アルコール性脂肪性肝疾患 肝発癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体内へ吸収されるコレステロールは、食事からの吸収が約 20%と少なく、残りの約 80%は腸肝循環によるコレステロール再吸収に依存している。さらに、食事中のコレステロール摂取量と血中コレステロール値の関連を示すエビデンスがないことから、米国心臓協会と米国心臓病学会は、コレステロール摂取制限の推奨を撤廃する声明を行った。一方で、コレステロール摂取の増加は、肝硬変や肝臓癌など肝疾患のリスクを上昇させ(1)、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) における脂肪沈着の程度を増加させる(2,3)ことが報告されている。さらに、胆管結紮や化学物質による肝障害モデル動物においても、食事中のコレステロール含有量の増加が、肝炎の増悪や肝線維化の進展に寄与することが明らかとなり(2,3)、その機序に、肝臓におけるインフラマソームや星細胞の活性化が関与することが報告されている(4,5)。しかし、食事由来のコレステロールが、直接肝内の脂質代謝や発癌に及ぼす機序は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究ではコレステロールの過剰摂取が人体 (NAFLD) へ与える影響を解明するために、高コレステロール含有高トランス脂肪酸食を用いてマウスを飼育し、a. NAFLD の増悪と発癌への影響、b. 肝脂肪化と炎症・線維化を誘導する因子の同定、c. 肝発癌に関与する因子の同定を行い、さらに d. NAFLD 患者検体を用いた検証を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) モデルマウスの作製と検体の採取・・・8週齢雄性の C57Bl6 マウスを用いて高コレステロール含有高トランス脂肪酸食、高トランス脂肪酸食、コントロール食を用いて飼育し、血清、肝臓、糞便を採取。

(2) 血清の解析・・・肝酵素、脂質の変化を解析。

(3) 肝臓の解析

食事開始 3 カ月後の肝臓を用いて肝内の外因性と内因性のコレステロール量、遊離コレステロール量、中性脂肪量、胆汁酸を測定し、各群で比較検討。

食事開始 3 カ月後の肝臓から mRNA を抽出し、脂肪酸代謝とコレステロール代謝に関与する因子の PCR array を用いて比較検討する。変化がみられた肝代謝関連 key molecule を RT-PCR で確認するとともに、Western Blot を用いてタンパク量を解析する。

食事開始 12 カ月後の肝臓を用いて肝発癌の有無、癌の個数を観察し、組織で脂肪沈着量、炎症・線維化の程度を検討。

肝組織を用いて、肝臓内の線維化関連因子 (TGF- β , SMA 等) の測定を行う。

肝組織を用いて癌関連遺伝子の PCR array を行い、発癌に関する key molecule の遺伝子発現を絞りこみ、Western Blot で確認する。

(4) 肝癌細胞株を用いた実験・・・上記で絞り込んだ肝代謝関連 key molecule を、肝癌細胞株で過剰発現、もしくは発現抑制を行い、細胞増殖 (proliferation assay) や apoptosis への影響など、癌進展に関わる形質変化について解析する。また、絞り込んだ癌関連 key molecule や線維化関連因子との相互作用について検討する。

(5) 腸内細菌叢の解析・・・次世代シーケンサーを用いて腸内細菌叢の変化を確認し、肝内の胆汁酸量と分画、脂質代謝の変化、血中エンドトキシン量の変化との関連を検討する。

(6) 薬剤を用いた介入実験

薬剤によってコレステロールトランスポーターを阻害しコレステロールの吸収を抑制した後、肝臓の脂肪沈着の程度、炎症・線維化の程度、肝臓内のコレステロール量や胆汁酸量、脂肪酸代謝、コレステロール代謝の変化、肝線維化と発癌抑制の有無を比較する。

抗生物質を用いて腸内細菌叢を変化させ、肝臓の脂肪沈着量、炎症・線維化の程度、肝臓内のコレステロール量や胆汁酸量、脂肪酸代謝、コレステロール代謝の変化を比較検討する。

(7) NAFLD 患者の生検組織を用いた実験・・・NAFLD による発癌患者の癌部・非癌部、健常者あるいは単純性脂肪肝患者の肝組織を用いて、動物実験と培養細胞実験で得られた肝脂肪沈着、肝炎、肝線維化、肝発癌に関する key molecule の発現を確認する。

4. 研究成果

(1) 高コレステロール含有高トランス脂肪酸食、高トランス脂肪酸食、コントロール食で3カ月間マウスを飼育した結果、体重、全脂肪量、肝重量がコントロール食に比較して、高脂肪食群で増加していたが、高コレステロールの負荷よりさらに増加がみられた。

(2) 血液検査では、3カ月間の食事負荷により高コレステロール含有高トランス脂肪酸食群では、コントロール群、高トランス脂肪酸食群に比較して、総コレステロール値、遊離コレステロール値、ALT 値、胆汁酸値の上昇がみられた。

(3) 肝臓内の脂肪量の測定では、3カ月間の食事負荷により高コレステロール含有高トランス脂肪酸食群では、コントロール群、高トランス脂肪酸食群に比較して、総コレステロール値、遊離コレステロール値、中性脂肪値、総胆汁酸値が増加していた。

(4) 食事開始3カ月後の肝臓から mRNA を抽出し、コレステロール代謝に関与する因子を RT-PCR を用いて行った解析では、高コレステロール含有高トランス脂肪酸食群は、コントロール群、高トランス脂肪酸食群に比較して、CYP7A1 の上昇と CYP27A1 の低下がみられた。また、胆汁中の胆汁酸の分画の解析では、高コレステロール含有高トランス脂肪酸食群は、コントロール群、高トランス脂肪酸食群に比較して、タウロコール酸の上昇がみられ、コレステロール負荷により胆汁酸隊は Classical Pathway へ傾いていることが示唆された。

(5) 食事開始12カ月後の肝臓の観察では、肝発癌がコントロール群では0%、高トランス脂肪酸食群45%、高コレステロール含有高トランス脂肪酸食群100%と高コレステロール含有高トランス脂肪酸食群で発癌率が高値であった。また、肝線維化や炎症に関しても高コレステロール含有高トランス脂肪酸食群で増悪がみられた。

(6) 食事開始12カ月後の肝臓内の線維化関連因子(TGF- β 1, SMA 等)、癌関連遺伝子の解析は現在進行中である。

(7) 腸内細菌の解析では、高トランス脂肪酸食群、高コレステロール含有高トランス脂肪酸食群は、コントロール群に比較して、Firmicutes 門は減少、Bacteroides 門は増加を認めた。Proteobacteria 門は高コレステロール含有高トランス脂肪酸食群で増加を認めた。

(8) 介入実験は、胆汁酸高含有の高脂肪食と抗生物質を含有した高脂肪食をマウスに給餌し飼育を行っている。今後、解析を行う予定である。

(9) NAFLD 患者の生検組織を用いた実験は現在検体を収集してる。今後解析を行う予定である。

以上の結果から、コレステロールの過剰摂取は胆汁酸の代謝に影響を及ぼし、胆汁酸の分画、腸内細菌叢を変化させ、肝臓内の中性脂肪やコレステロールの沈着量を増加させることにより脂肪肝を悪化し、長期間の負荷により肝炎や肝線維化を増悪させ、肝癌を発生させることが示唆された。これらのことから食事中のコレステロールの摂取制限を行うことは、非アルコール性脂肪性肝疾患の病態の悪化を予防するために重要である。

<引用文献>

- Hepatology. 2009,50:175-184.
- Hepatology. 2003,37:909-916.
- Scand. J. Gastroenterol. 2009,44:471-477.
- Gastroenterology 2012,142:152-164.
- J. Hepatol. 2014,61:98-106.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Miyake Teruki, Matsuura Bunzo, Furukawa Shinya, Yoshida Osamu, Hirooka Masashi, Kumagi Teru, Ishihara Toru, Kanzaki Sayaka, Nakaguchi Hironobu, Miyazaki Masumi, Nakamura Yoshiko, Yamamoto Yasunori, Koizumi Yohei, Tokumoto Yoshio, Takeshita Eiji, Ikeda Yoshio, Abe Masanori, Kitai Kohichiro, Hiasa Yoichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Nonalcoholic fatty liver disease is a risk factor for glucose intolerance onset in men regardless of alanine aminotransferase status	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1890 ~ 1898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13548	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 Miyake Teruki, Miyazaki Masumi, Yoshida Osamu, Kanzaki Sayaka, Nakaguchi Hironobu, Nakamura Yoshiko, Watanabe Takao, Yamamoto Yasunori, Koizumi Yohei, Tokumoto Yoshio, Hirooka Masashi, Furukawa Shinya, Takeshita Eiji, Kumagi Teru, Ikeda Yoshio, Abe Masanori, Toshimitsu Kumiko, Matsuura Bunzo, Hiasa Yoichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Relationship between body composition and the histology of non alcoholic fatty liver disease: a cross sectional study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12876-021-01748-y	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 Konishi K, Miyake T, Furukawa S, Senba H, Kanzaki S, Nakaguchi H, Yukimoto A, Nakamura Y, Watanabe T, Koizumi Y, Yoshida O, Tokumoto Y, Hirooka M, Kumagi T, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y.	4. 巻 299
2. 論文標題 Advanced fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis affects the significance of lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 32-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.atherosclerosis.2020.02.026	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 Miyachi S, Miyake T, Miyazaki M, Eguchi T, Niiya T, Yamamoto S, Senba H, Furukawa S, Matsuura B, Hiasa Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Insulin-like growth factor-1 is inversely associated with liver fibrotic markers in patients with type 2 diabetes mellitus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1083-1091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13000.	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三宅映己, 吉田沙希子, 渡部杏子, 宮崎万純, 神崎さやか, 中口博允, 酒井武則, 梅岡二美, 宮岡弘明, 古川慎哉, 阿部雅則, 日浅陽一, 松浦文三
2. 発表標題 2型糖尿病患者では夕食にかける時間は血糖コントロールと有意な関係がある
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅映己, 多田藤政, 岡本唯, 藤岡耀祐, 宮崎万純, 中口博允, 山本晋, 宮内省蔵, 古川慎哉, 阿部雅則, 日浅陽一, 松浦文三
2. 発表標題 NASH患者における血糖値のコントロールはNAFLD Activity Scoreに影響を与える
3. 学会等名 第31回臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Teruki Miyake, Osamu Yoshida, Masanori Abe, Masumi Miyazaki, Hironobu Nakaguchi, Atsushi Yukimoto, Takao Watanabe, Yohei Koizumi, Yoshio Tokumoto, Masashi Hirooka, Bunzo Matsuura, Yoichi Hiasa
2. 発表標題 Trans-fatty acids exacerbate fat deposition in the liver and reduce fat accumulation in the visceral adipose tissue by upregulating GPAM which regulates TG release from the liver
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------