

平成22年3月31日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2008 ~ 2009
 課題番号： 20790508
 研究課題名 (和文) 脂肪性肝炎の発癌プロセスと小胞体 - ミトコンドリアストレス関連
 研究課題名 (英文) The role of endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathway in carcinogenesis of steatohepatitis.
 研究代表者
 今 一義 (KON KAZUYOSHI)
 順天堂大学・医学部・助教
 研究者番号： 30398672

研究成果の概要 (和文)：

培養肝細胞を用いた実験で、シス脂肪酸とトランス脂肪酸はいずれも肝細胞の脂肪滴蓄積を誘導するが、トランス脂肪酸は肝細胞のミトコンドリア由来の酸化ストレスを亢進させ、肝細胞死をきたしやすくすることを明らかにした。肥満モデルマウスを用いた実験では、シス脂肪酸摂取が単純性脂肪肝を誘導したのに対して、トランス脂肪酸摂取は肝細胞の小胞体ストレス、酸化ストレスを亢進させ、肝細胞膨化、肝細胞死を誘導することを示し、トランス脂肪酸が脂肪性肝炎の発症増悪因子である可能性を示した。

研究成果の概要 (英文)：

In vitro experiments using isolated mouse hepatocytes demonstrated that *trans*-fatty acid but not *cis*-fatty acid exacerbates hepatocyte death via increasing mitochondrial oxidative stress, although both *cis*-fatty acid and *trans*-fatty acid induces fatty accumulation in hepatocytes. *In vivo* experiments using obese mice indicated that *trans*-fatty acid containing diet increases endoplasmic reticulum stress and oxidative stress, followed by hepatocytes ballooning and death whereas *cis*-fatty acid containing diet induces simple liver steatosis. In conclusion, our findings suggested that *trans*-fatty acid diet is a potent risk factor of steatohepatitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、消化器内科学

キーワード：肝臓病学

1. 研究開始当初の背景

(1) メタボリックシンドロームの増加と慢

性肝疾患に対する影響

本邦におけるメタボリックシンドローム

の患者が増加傾向にあり、それに伴い脂肪肝の罹患数が増加している。非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の病態がメタボリックシンドロームと密接に関連していることが示され、また、C 型慢性肝炎が脂肪肝の合併によって治療抵抗性になり病態の進行が促進されることが明らかになってきた。このため、慢性肝疾患と脂肪肝、メタボリックシンドロームの関連が注目されていた。

(2) 酸化ストレスと肝発癌

酸化ストレスの亢進は肝発癌のトリガーになりうるということがこれまでに指摘されている。脂肪肝を自然発症する Pten ノックアウトマウスは肝細胞の ROS 産生が亢進しており、最終的には肝癌の発症に至る。このことから、脂肪性肝炎における酸化ストレスの亢進が肝発癌に関与する可能性が考えられる。

(3) トランス脂肪酸に対する注目

これまでに遊離脂肪酸が肝脂肪化、酸化ストレスを介して NASH の病態に関与する可能性がいくつかの報告で示されており、我々は動脈硬化の危険因子として知られるトランス脂肪酸に注目した。遊離脂肪酸は 2 重結合部分がシス型のシス脂肪酸が多くを占めるが、脂肪酸を固体化する際に副産物として 2 重結合部分がトランス型に変位した異性体のトランス脂肪酸が生じることが知られている。培養肝細胞にトランス脂肪酸であるエライジン酸を添加したところ、同量の分子量のシス脂肪酸と比較して、トランス脂肪酸を添加した肝細胞では肝細胞内の小滴性脂肪沈着が増加し、*tert*-butylhydroperoxide (*t*-BuOOH) 添加によるミトコンドリア由来の酸化ストレス誘導刺激に対する酸化ストレス応答性の亢進と細胞死の増加を認めた。

2. 研究の目的

以上の背景から、我々は遊離脂肪酸が肝細胞内の小胞体の脂肪沈着を惹起し、ミトコンドリアとの相互作用により ROS 産生を亢進させ、肝発癌を促進させるという仮説を立てた。本研究ではそのメカニズムの解明と肝発癌の予防を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vivo*:

8 週齢の雄性 KK-*A^y* マウスに 2% オレイン酸 (シス脂肪酸) もしくは 2% エライジン酸 (トランス脂肪酸) を添加した食餌で 4 週間飼育した。一部のエライジン酸群のマウスは化学シャペロンの 4-フェニル酪酸 (120 mg/kg BW) を連日腹腔内投与して小胞体ストレスを抑制した。血清 AST を比色法で測定して肝細胞障害を定量した。

(2) *in vitro*:

12 週齢の雄性 C57BL/6 マウスよりコラゲナーゼ灌流法で肝細胞を単離し、初代培養肝細胞の系を作成した。培養液中にオレイン酸もしくはエライジン酸 1 mM を添加し 12 時間の培養後、実験に供した。一部の肝細胞はウルソデオキシコール酸 200 μ M もしくは鉄キレート剤のデフェロキサミン 1 mM を投与して酸化ストレスを抑制した。Oil red O 染色で脂肪成分を染色した。PI もしくは CM-H₂DCF で染色後、微量の *t*-BuOOH 20 μ M を添加して酸化ストレスを誘導し、ネクロシスおよび酸化ストレスを測定した。

4. 研究成果

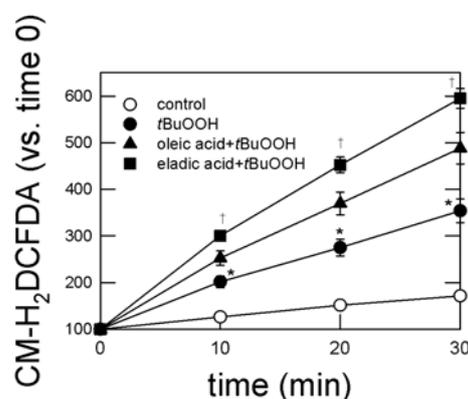
(1) 研究で得られたデータ

① *in vivo*

オレイン酸およびエライジン酸群の肝臓でいずれも肝細胞の脂肪化を認めたが、エライジン酸群では肝細胞が膨化し、肝細胞障害が示唆された。AST 値も OA 群 53.5 \pm 1.9 IU/L に対して、EA 群 73.4 \pm 2.1 IU/L と有意な上昇を認めた ($p < 0.05$)。4-フェニル酪酸添加によってエライジン酸による肝細胞の膨化は消失し、血清 AST 値は 47.6 \pm 6.3 IU/L と有意に低下した ($p < 0.05$)。

② *in vitro*

オレイン酸を添加した肝細胞よりエライジン酸を添加した肝細胞で有意に脂肪沈着の増加を認めた。オレイン酸で前処置した肝細胞は *t*-BuOOH 添加後 30 分以降に PI 陽性肝細胞の増加が認められたのに対し、エライジン酸で前処置した肝細胞ではより早期の 15 分後から有意な増加を認め、早い段階でネクロシスに至ったと考えられた。CM-H₂DCF の染色では *t*-BuOOH 添加後 30 分でオレイン酸群が 488 \pm 34% の蛍光増強であったのに対し、エライジン酸群では 595 \pm 21% と有意に強い増強を認め、酸化ストレスの亢進が示された ($p < 0.05$)。また、ウルソデオキシコール酸もしくはデフェロキサミンで前処置を行うと、肝細胞の脂肪沈着が減少し、酸化ストレスの有意な低下を認め、肝細胞死はほぼ完全に抑制された。



③ まとめと考察

オレイン酸とエライジン酸はいずれも肝脂肪化に対しては増悪因子として働いたが、オレイン酸が単純性脂肪肝を惹起したのに対して、エライジン酸添加食を摂取した肥満マウスは肝組織内の酸化ストレスが亢進し、ヒトの NASH の初期像に酷似した病理像を呈した。また、小胞体ストレスの抑制によってエライジン酸による諸病態は著明な改善を認め、エライジン酸が小胞体ストレスの亢進を介して酸化ストレスの亢進、肝細胞障害を誘導した可能性が示された。初代培養肝細胞を用いた検討では、エライジン酸が肝細胞に対して直接酸化ストレスを著増させる効果を有することが示され、酸化ストレスの抑制によって細胞死のみならず肝細胞内の脂肪滴も減少させたことから、エライジン酸による肝細胞内脂肪沈着と酸化ストレスの亢進には相互的な関係があると考えられた。以上の事象から、トランス脂肪酸が脂肪性肝炎の病態の増悪因子になる可能性が示された。

(2) 国内外における位置づけとインパクト

これまでに多くの研究者によって、食生活と NASH の病態に密接な関連があることは指摘されていた。しかし、慢性肝疾患におけるトランス脂肪酸の影響についての検討はなかった。トランス脂肪酸は動脈硬化の増悪因子としての観点から、米国の一部の州では使用が禁止されていたが、本邦での規制は行われていなかった。今回の成果で、トランス脂肪酸が脂肪性肝炎の増悪因子になりうるということが明らかになり、国内のみならず国外においても、より多角的な見方でトランス脂肪酸と疾患の関連が注目されてくると思われる。

(3) 今後の課題と展望

今回の我々の検討で、トランス脂肪酸が脂肪性肝炎の病態の増悪因子になることが明らかになり、酸化ストレスの亢進によってトランス脂肪酸が発癌のトリガーになり得ることが示唆された。今後は動物実験レベルの検討として、トランス脂肪酸の摂取による肝発癌の誘導を確認していく必要がある。また、今回の検討をさきがけとして、ヒトの NASH をはじめとした慢性脂肪性肝疾患の病態とトランス脂肪酸の関連が明らかになり、慢性脂肪性肝疾患の予防法および治療法の確立がなされることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Kon K, Ikejima K, Okumura K, Arai K, Aoyama T, Watanabe S. Diabetic KK-A^y mice are highly susceptible to

oxidative hepatocellular damage induced by acetaminophen. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 査読有、in press.

2. Kon K, Kim J, Uchiyama A, Jaeschke H, Lemasters J. Lysosomal iron mobilization and induction of the mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced toxicity to mouse hepatocytes. *Toxicol Sci*. 査読有、in press.
3. 今一義、池嶋健一、青山友則、山形寿文、渡辺純夫. 肝細胞内脂肪滴蓄積と肝細胞死における肝細胞内貯蔵鉄の役割. *Jpn Pharmacol Ther*. 査読無、37:Supple 103-105, 2009

[学会発表] (計 12 件)

1. Kon K, Ikejima K, Aoyama T, Arai K, Yamashina S, Watanabe S. Acetaminophen Induces Severe Liver Injury Caused by Increased Susceptibility to Oxidative Stress in Obese KK-A^y mice. 43th European Association for the Study of the Liver. Milano, Italy, 2008
2. Kon K, Ikejima K, Aoyama T, Yamagata H, Arai K, Yamashina S, Watanabe S. Involvement of Iron in Trans-fatty Acid-induced Lipid Accumulation and Oxidative Stress in Mouse Hepatocytes. 59th American Association of Study of Liver Disease.: Boston, U.S.A., 2009.
3. Kon K, Ikejima K, Aoyama T, Okumura K, Arai K, Watanabe S. Trans-fatty acid induces lipid accumulation and increases susceptibility to oxidative stress in hepatocytes. European Association for the Study of the Liver. Special Conference. NAFLD/NASH and Related Metabolic Disease. 2009, Bologna, Italy.
4. Kon K, Ikejima K, Aoyama T, Ishikawa S, Hosoya S, Arai K, Takashima M, Yamashina S, Watanabe S. Hepatocyte ballooning but not hepatic steatosis depends on endoplasmic reticulum stress in trans-fatty acid induced steatohepatitis in KK-A^y mice. 60th American Association of Study of Liver Disease.: 2009, November, Boston, U.S.A.
5. Saito H, Kon K, Ishikawa S, Hosoya S, Arai K, Takashima M, Yamashina S,

- Ikejima K, Watanabe S. High-carbohydrate diet containing trans-fatty acid induces severe steatohepatitis via the enhancement of endoplasmic reticulum stress in KK-Ay mice. 45th Annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. :2010, April, Vienna, Austria.
6. 今一義、池嶋健一、青山友則、山形寿文、内山明、柳沼礼子、山科俊平、渡辺純夫. 肝細胞の脂肪沈着とネクローシスに対するトランス脂肪酸の影響. 肝臓 44.suppl.(1):A379 第 44 回日本肝臓学会総会: 2008、愛媛
 7. 今一義、池嶋健一、青山友則、山形寿文、柳沼礼子、石川幸子、山科俊平、鈴木聡子、渡辺純夫. HBs 抗原陰性・HCV 抗体陰性の肝細胞癌症例に対する臨床的解析. 第 12 回日本肝臓学会大会:2008、東京
 8. 今一義、池嶋健一、渡辺純夫. ラミブジン耐性 B 型肝炎ウイルスに対するアデホビル併用療法の効果とリスクについての検討. シンポジウム 1-9. 第 37 回日本肝臓学会東部会: 2008、東京
 9. 今一義、池嶋健一、渡辺純夫. メタボリックシンドロームにおける肝内酸化ストレス応答性亢進とそのメカニズム. パネルディスカッション 2-1. 第 37 回日本肝臓学会東部会、東京
 10. 今一義、池嶋健一、青山友則、山形寿文、柳沼礼子、石川幸子、高島基樹、山科俊平、鈴木聡子、渡辺純夫. HBs 抗原陰性・HCV 抗体陰性の肝細胞癌における臨床的特徴と腫瘍マーカー測定的重要性. 第 95 回日本消化器病学会総会: 2009、札幌
 11. 今一義、池嶋健一、青山友則、山形寿文、内山明、高島基樹、石川幸子、柳沼礼子、山科俊平、鈴木聡子、渡辺純夫. 脂肪性肝炎形成における肝細胞内貯蔵鉄の役割 - マウス初代培養肝細胞を用いた検討 -. 第 45 回日本肝臓学会総会 ワークショップ 1-8 2009 年 6 月、神戸
 12. 今一義、池嶋健一、渡辺純夫. NAFLD 関連肝細胞癌の初期治療にかかわる因子の解明 - 腫瘍マーカー測定的重要性 -. JDDW2009 2009 年 10 月 京都ワークショップ 1-7

[図書] (計 4 件)

1. 今一義、池嶋健一、渡辺純夫. 酸化ストレス. NASH 診療 best approach 西原利治編著. p206-212, 2008 中外医学社
2. 今一義、竹井謙之. 専門医のための薬物

療法 Q&A. B 型慢性肝炎. 消化器. 164-166 中外医学社

3. 今一義、池嶋健一、渡辺純夫. NAFLD/NASH の発症機序. BIO Clinica 24(13):30 - 34, 2009 ニューサイエンス社
4. 今一義、渡辺純夫. Biomarkers. NASH/NAFLD の診断. NASH/NAFLD の Up to Date. 肝胆膵 60(6): 955-961, 2010 アークメディア

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今 一義 (KON KAZUYOSHI)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号: 30398672

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし