

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08315

研究課題名(和文) 脂肪性肝疾患の病態進展における脂肪酸代謝不均衡を介した肝毒性亢進機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of enhanced hepatotoxicity through fatty acid metabolic imbalance in the progression of fatty liver disease

研究代表者

今 一義 (Kon, Kazuyoshi)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：30398672

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)：脂肪性肝疾患の病態進展における脂肪毒性の発生機序とその影響を解明するため、複数の動物モデルを用いた研究を行った。脂肪酸不飽和化酵素2の発現を低下させ脂質代謝不均衡を惹起したマウスでは、高脂肪・高コレステロール食による脂肪肝炎の増悪と肝線維化の進展を生じた。脂肪肝炎関連肝発がんモデルは脂肪肝炎から肝がん発症に至る過程で、抗酸化物質の減少と炎症性サイトカインの増加を生じたが、グリシン投与でこれらを抑制すると、抗腫瘍免疫が亢進され肝発がんが有意に減少した。脂質代謝不均衡が脂肪肝炎の増悪進展に働き、抗腫瘍免疫の障害を惹起して肝発がんに至るプロセスが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、脂肪酸代謝の変調による脂肪毒性の増加が脂肪肝炎を増悪させ、肝線維化を亢進させることが明らかになり、加齢に伴う脂肪肝炎増悪のメカニズムの一端が明確になった。脂肪酸代謝酵素の評価が脂肪肝炎増悪リスクのスクリーニングに有用である可能性、脂肪酸代謝酵素を標的とした新規治療法の可能性が示され、現在の脂肪肝炎の持つ諸問題の解決に重要な知見を得ることができた。さらに抗腫瘍免疫の制御に脂肪毒性の関与が示唆されたことは重要であり、脂肪肝炎の重大な予後規定因子である肝発がんの早期発見および治療法の確立に寄与しうる学術的意義の大きな結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the induction mechanism and effects of lipotoxicity in the progression of fatty liver disease, we conducted studies using animal models mimicking some processes of fatty liver disease. Mice with imbalance in lipid metabolism by reduction of fatty acid desaturase 2 showed exacerbation of steatohepatitis and hepatic fibrosis due to a high-fat/high-cholesterol diet. Hepatocyte-specific PTEN knockout mice, a model of steatohepatitis-associated liver carcinogenesis, exhibited a decrease in antioxidants and an increase in inflammatory cytokines during the process from steatohepatitis to hepatocellular carcinogenesis, all which were suppressed by glycine administration. In addition, anti-tumor immunity was also enhanced and hepatocarcinogenesis was significantly reduced by glycine. It was suggested that lipid metabolism imbalance contributes to exacerbation of steatohepatitis, and that lipotoxicity impairs antitumor immunity and leads to hepatocarcinogenesis.

研究分野：肝臓病学

キーワード：脂肪毒性 脂肪酸不飽和化酵素 非アルコール性脂肪肝炎 肝がん 肝線維化 抗酸化物質

1. 研究開始当初の背景

脂肪性肝疾患（アルコール性肝障害および非アルコール性脂肪肝炎“NASH”）は大滴性脂肪沈着・肝細胞死・炎症を特徴とする生活習慣病関連の慢性肝疾患で、進行すると肝線維化を生じ、肝癌を発症する。先進国を中心に脂肪性肝疾患に関連した非ウイルス性の肝硬変・肝癌の罹患数は増加しており、病態機序の解明による予防・治療法の確立が急務であった。

脂肪性肝疾患の病態には脂肪酸による細胞障害（脂肪毒性）が深く関与し、肝細胞死や低レベルの慢性炎症“metaflammation”が惹起される。脂肪酸の毒性は分子構造によって大幅に異なり、飽和脂肪酸およびトランス脂肪酸の摂取がNASHの増悪因子とされている。申請者らは初代培養肝細胞と肥満 KK-Ay マウスを用いた実験で、トランス脂肪酸を加えた肝細胞では小胞体(ER)ストレスの増大および酸化ストレス応答性の亢進により軽度の刺激で肝細胞死が誘導されることを証明した(1)。対照的に不飽和脂肪酸、特に 3 系脂肪酸は基礎研究では細胞保護・炎症細胞活性化抑制効果が示され治療薬として有望視されてきたが、メタ解析で 3 系脂肪酸はNASH患者のAST、ALT 値を有意に低下させず、外から脂肪酸を投与するアプローチでは脂肪肝炎を抑制する方法として不十分であることが明らかになった(2)。

肝臓内の脂肪酸は肝外からのものと de novo 脂肪酸合成由来のものがあるが、いずれも脂肪酸伸長酵素 (ELOVL) 1~7 やステアロイル CoA 不飽和化酵素 (SCD)、脂肪酸不飽和化酵素 (FADS) 1, 2 による代謝を受けて肝細胞内で構造が変化する。申請者らはこれまでの研究で同一組成の高脂肪食を摂取した高齢マウスは若年マウスと比較して肝脂肪化・炎症・肝線維化が亢進すること、および一価不飽和脂肪酸を含む中性脂質の増加と多価不飽和脂肪酸を含むリン脂質の減少を示した。その背景として高脂肪食摂取に対する肝細胞内の FADS1 および 2 の発現亢進が ELOVL および SCD の発現亢進と比較して大幅に減弱しており、脂肪酸代謝の不均衡が生じていることを初めて明らかにした(3)。さらに、肥満 KK-Ay マウス + 高脂肪食モデルで抗酸化作用を有するアルケニル型リン脂質の減少を報告した (Kon K et al. Gastroenterology 152;5,Supple 1, 2017)。しかしながら、脂肪酸代謝の不均衡がNASHの病態にどのように影響するのかは不明であった。

2. 研究の目的

上記の背景から、申請者らは「加齢・糖尿病などの因子が脂質代謝酵素バランスの変調（脂肪酸代謝の不均衡）を惹起して脂質の分子構造変化を誘導し、脂肪毒性を増加させ、肝炎・肝線維化・肝癌に至る」と仮説を立てた。本研究では代謝不均衡が脂肪肝炎の病態進展に与える影響を明らかにすることを目的とし、さらに脂肪毒性の抑制が脂肪肝炎に関連した肝発がんまでの一連のプロセスに与える影響を解析した。

3. 研究の方法

(1) 脂肪酸代謝の不均衡による脂肪性肝疾患の病態への影響

FADS2 の発現が低下する FADS2 ヘテロノックアウトマウス (FADS2^{+/-}) を用いて FADS2 発現低下が脂肪肝炎に与える影響を検討した。12 週齢の雄性 FADS2^{+/-} マウスおよび野生型 C57Bl/6 (BL6) マウスに高脂肪・高コレステロール (HFHC) 食もしくは対照食を 8 週間摂餌させ、実験に供した。肝組織のウエスタンブロットおよび RT-PCR で蛋白/mRNA の発現を定量し、線維化を Sirius Red 染色で評価した。

(2) 脂肪肝炎関連肝発がんにおける脂肪毒性の影響

11~17 週齢の雄性 Alb-Cre TG (+) PTEN^{flox/flox} マウスに、通常食もしくは 5% グリシン含有食を 2 週間ないし 24 週間摂餌させ、実験に供した。対照群として通常食を与えた TG (-) マウスを用いた。直径 2mm 以上の肝腫瘍の個数を計測した。4-hydroxynonenal (4HNE) および CD8 の免

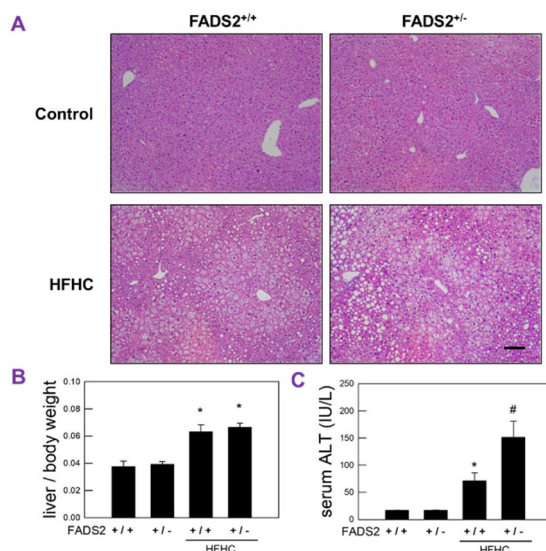


Fig 1. FADS2^{+/-} mice develop more severe liver injury than wild-type mice in HFHC diet-induced steatohepatitis. A: Representative image of H-E staining (scale bar 100 μm). B: The liver-to-body weight ratio was significantly increased in both groups by HFHC. C: Serum ALT levels were significantly elevated by HFHC in FADS2^{+/-} mice compared to wild-type mice.

疫組織染色を行い、肝臓組織中の mRNA の発現を RT-PCR で測定した。総グルタチオンを酵素法で測定した。

4. 研究成果

(1) 脂肪酸不飽和化酵素 2 の発現低下は脂肪肝炎の増悪進展に寄与する

肝病理像は対照食群では FADS2^{+/-} マウスと BL6 マウスの間に違いはなく、血清 ALT 値も差が無かった。しかしながら、HFHC 食を与えると BL6 マウスの肝組織では軽度の脂肪化を生じ、血清 ALT 値が 71 ± 15 IU/L に上昇したのに対して、FADS2^{+/-} マウスでは著明な大滴性脂肪化を生じ、血清 ALT 値は 151 ± 30 IU/L まで有意に上昇、さらに肝細胞周囲の線維化を認めた (Fig 1)。

HFHC 食 FADS2^{+/-} マウスの肝組織では HFHC 食 BL6 マウスと比較して TNF α の発現が 2 倍以上、ケモカインの CCL2 も 2 倍以上、CXCL10 は 3 倍以上に亢進した (Fig. 2)。酸化ストレスマーカー heme oxygenase 1 の発現も、HFHC 食 FADS2^{+/-} マウスの肝組織では BL6 マウスの 2 倍以上に増加した。肝線維化関連では、PDGF、TGF β 1、type I collagen、TIMP1 の発現が HFHC 食 FADS2^{+/-} マウスで HFHC 食 BL6 マウスより有意に高値であった (Fig. 3)。

以上のことから、FADS2^{+/-} マウスは HFHC 食摂餌によって TNF α およびケモカイン、酸化ストレスの発現亢進を呈して高度の脂肪肝炎を生じたのみならず線維合成が誘導され、肝線維化の増悪を来したと考えられた。FADS2 の発現低下が脂肪肝炎の発症および病態進展に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

(2) 脂肪肝関連肝発がんの過程において、脂肪毒性の抑制は抗腫瘍免疫の促進に寄与する

開始 2 週間後の時点で、PTEN^{flox/flox} マウスの肝組織は小葉内炎症と肝細胞の風船様変性を伴う著明な脂肪肝炎を呈し、血清 ALT 値は対照群の 41 ± 4 IU/L に対して 163 ± 30 IU/L と有意に増加した。それに対してグリシン食摂取により脂肪性肝炎像は軽快し、血清 ALT 値も 23 ± 10 IU/L と大幅に抑制された。

PTEN^{flox/flox} の肝組織では酸化ストレスマーカーの 4HNE の発現亢進を認めたが、グリシン投与によって抑制された。PTEN^{flox/flox} マウスの肝臓組織中の総グルタチオンは対照群の 2.2 ± 0.2 μ mol/g から 1.4 ± 0.1 μ mol/g と有意に減少したが、グリシン投与により 1.8 ± 0.1 μ mol/g と有意に増加した。

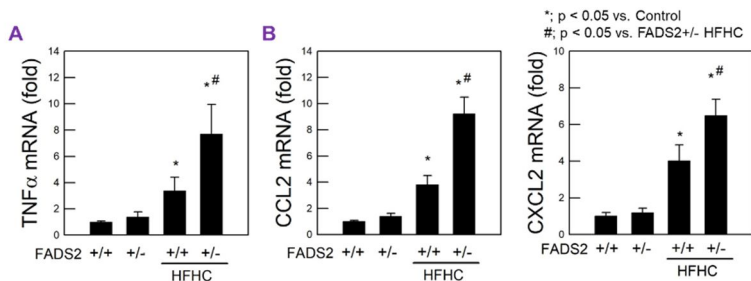


Fig 2. Expression of inflammatory cytokine and chemokines in liver is enhanced by HFHC in FADS2^{+/-} mice. A: HFHC-fed FADS2^{+/-} mice showed more than 2-fold upregulation in hepatic expression of TNF α as compared to HFHC-fed wild-type mice. B: The expression of chemokines such as C-C motif chemokine 2 (CCL2) and chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2) in liver tissue was more increased in HFHC-fed FADS2^{+/-} mice than in HFHC-fed wild-type mice.

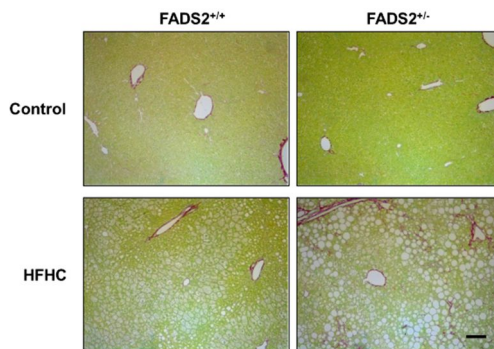


Fig. 3. FADS2^{+/-} mice develops marked fibrosis by HFHC diet. Sirius red staining revealed marked pericellular fibrosis in FADS2^{+/-} mice fed HFHC (scale bar 100 μ m).

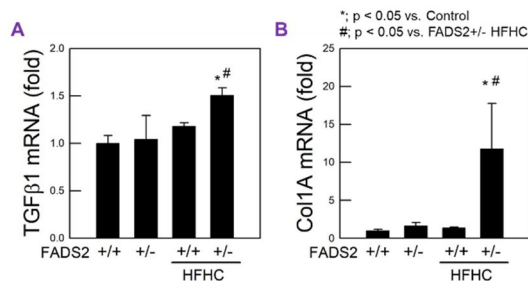


Fig. 4. Expression of fibrosis-associated factors in liver is enhanced by HFHC in FADS2^{+/-} mice. A: TGF β 1 mRNA expression was significantly increased by 1.5 ± 0.1-fold in HFHC-fed FADS2^{+/-} mice compared to 1.2 ± 0.0-fold in HFHC-fed wild-type mice. B: Whereas the mRNA expression of type I collagen was not increased by HFHC diet in wild-type mice, it was significantly increased in HFHC-fed FADS2^{+/-} mice.

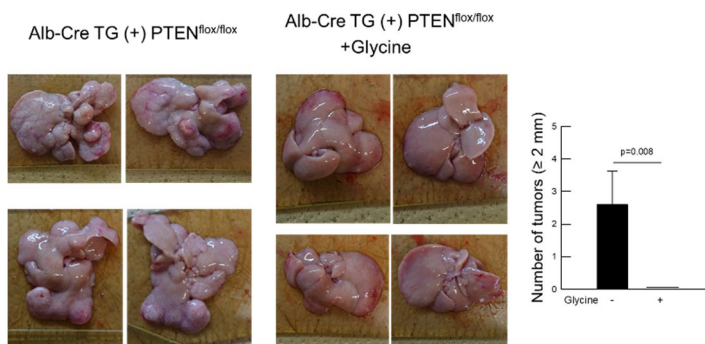


Fig. 5. The effect of glycine on tumorigenesis of hepatocyte-specific PTEN KO mice

実験開始 24 週間後まで経過すると PTEN^{flox / flox} マウスの肝臓には肝がんが多発的に発生し、肝臓あたり 2.6 ± 1.0 個の肝がんの形成生じた。これら肝がんの形成も、グリシン食摂取により腫瘍数 0 ± 0 個と完全に抑制された (Fig. 5)。一方、抗腫瘍免疫の制御因子である Interleukin 12B の mRNA の発現は対照群と比較して PTEN^{flox / flox} マウスの肝組織でもわずかに増加したが、グリシン食投与によりさらに 4 倍以上に発現が著増した。また、PTEN^{flox / flox} マウスの肝臓組織中の CD8 陽性リンパ球の発現も、グリシン食摂取によって増加した (Fig. 6)。

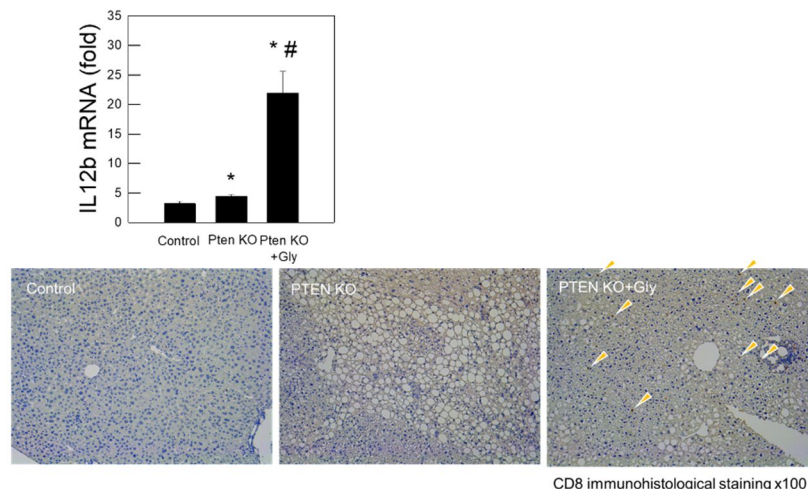


Fig. 6. The effect of glycine on anti-tumor immunity in liver of hepatocyte-specific PTEN KO mice

以上のことから、短期的には PTEN^{flox / flox} マウスの肝組織で生じた酸化ストレスの亢進はグリシンによる抗酸化分子の増加によって抑制され、脂肪性肝炎の改善を認めた。長期的にはグリシン投与群では抗腫瘍免疫の活性化がみられ、肝組織における CD8 陽性細胞が増加し、肝がん形成の抑制に至ったと考えられた。

< 引用文献 >

1. Morinaga M, Kon K, Saito H, Arai K, Kusama H, Uchiyama A, et al. Sodium 4-phenylbutyrate prevents murine dietary steatohepatitis caused by trans-fatty acid plus fructose. *J Clin Biochem Nutr.* 2015;57(3):183-91.
2. Lu W, Li S, Li J, Wang J, Zhang R, Zhou Y, et al. Effects of Omega-3 Fatty Acid in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-Analysis. *Gastroenterol Res Pract.* 2016;2016:1459790.
3. Ishizuka K, Kon K, Lee-Okada HC, Arai K, Uchiyama A, Yamashina S, et al. Aging exacerbates high-fat diet-induced steatohepatitis through alteration in hepatic lipid metabolism in mice. *J Gastroenterol Hepatol.* 2020;35(8):1437-48.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件）

1 . 発表者名 Kon K, Arai K, Uchiyama A, Fukada H, Nakadera E, Yaginuma R, Fukuhara K, Yamashina S, Ikejima K.
2 . 発表標題 Glycine ameliorates steatohepatitis via reduction of oxidative stress in hepatocyte-specific PTEN-deficient mice.
3 . 学会等名 The Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) Single Topic Conference. (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Kon K, Arai K, Uchiyama A, Fukada H, Nakadera E, Morinaga M, Fukuhara K, Yaginuma R, Yamashina S, Ikejima K.
2 . 発表標題 Amino acid prevents tumorigenesis via ameliorating steatohepatitis in hepatocyte-specific phosphatase and tensin homolog knockout mice.
3 . 学会等名 American Association for the Study of Liver Disease (AASLD) The Liver Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 今一義、新井久美子、内山明、深田浩大、中寺英介、山科俊平、池嶋健一 .
2 . 発表標題 アミノ酸グリシンによる脂肪肝炎の改善効果 肝特異的PTENノックアウトマウスを用いた検討 - .
3 . 学会等名 第58回日本消化器免疫学会総会
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 今一義、山科俊平、池嶋健一 .
2 . 発表標題 肝細胞特異的PTENノックアウトマウスにおけるグリシンの脂肪肝炎・肝がん抑制効果 .
3 . 学会等名 第22回JDDW (第25回日本肝臓学会大会) ワークショップ11 .
4 . 発表年 2021年

1. 発表者名 今一義, 山科俊平, 池嶋健一
2. 発表標題 肝特異的PTEN欠損脂肪肝炎モデルマウスにおける アミノ酸グリシンの効果
3. 学会等名 第107回 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今一義、新井久美子、内山明、深田浩大、中寺英介、山科俊平、池嶋健一
2. 発表標題 アミノ酸グリシンによる脂肪肝炎の改善効果 肝特異的PTENノックアウトマウスを用いた検討 -
3. 学会等名 第58回 日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今一義, 山科俊平, 池嶋健一
2. 発表標題 肝細胞特異的PTENノックアウトマウスにおけるグリシンの脂肪肝炎・肝がん抑制効果
3. 学会等名 Japan Digestive Disease Week 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今一義, 内山明, 池嶋健一.
2. 発表標題 肝細胞特異的 PTEN ノックアウトマウスの脂肪肝炎・肝発がんに対するグリシンの病態抑制効果
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今一義, 石塚敬, 池嶋健一.
2. 発表標題 脂肪肝炎形成の分子機構とジェントロジー. 合同シンポジウム1 (日本肝臓学会) 「脂質異常症と脂肪肝のクロストーク」
3. 学会等名 第54回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kon K.
2. 発表標題 Glycine Intake Ameliorates Steatohepatitis and Prevents Liver Carcinogenesis in Hepatocyte-specific Pten-deficient Mice.
3. 学会等名 The Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) Oncology 2022. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kon K, Arai K, Uchiyama A, Fukada H, Sato T, Morinaga M, Fukuhara K, Yaginuma R, Yamashina S, Ikejima K.
2. 発表標題 Amino acid glycine suppresses steatohepatitis and tumorigenesis in hepatocyte-specific phosphatase and tensin homolog knockout mice.
3. 学会等名 International Liver Congress 2022 of the European Association for the Study of the Liver. (EASL) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kon K, Arai K, Uchiyama A, Yaginuma R, Sato T, Yamashina S, Ikejima K.
2. 発表標題 Glycine supplementation inhibits steatohepatitis-related liver carcinogenesis in hepatocyte-specific PTEN deficient mice.
3. 学会等名 American Association for the Study of Liver Disease (AASLD) The Liver Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kon K, Lee-Okada HC, Arai K, Uchiyama A, Sato T, Fukada H, Yamashina S, Ikejima K
2. 発表標題 Downregulation of fatty acid desaturase 2 exacerbates murine steatohepatitis caused by high-fat and high-cholesterol diet.
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2023. (国際学会)
4. 発表年 2023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	池嶋 健一 (Ikejima Kenichi) (20317382)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	
研究分担者	李 賢哲 (Lee h) (30758321)	順天堂大学・医学部・助教 (32620)	
研究分担者	千葉 麻子 (Chiba Asako) (40532726)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

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