

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16063

研究課題名(和文)小腸粘膜恒常性を標的とした非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の新規治療法の研究

研究課題名(英文)Research of new therapies targeting small intestinal mucosal homeostasis for non-alcoholic steatohepatitis (NASH).

研究代表者

河内 正二(Kawauchi, Shoji)

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30549308

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)：アミオダロン(AMD)による薬剤性非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルマウスを作成し、小腸粘膜恒常性の破綻がNASHの病態形成に関与しているかを検討した。NASHモデルマウスの小腸では、小腸絨毛の短縮、タイトジャンクションタンパク質の消失、小腸粘膜透過性の亢進が生じていた。NASHモデルマウスの肝臓では、LPSの共受容体であるCD14を発現したマクロファージの活性化とTNF- α の発現増加が認められた。AMD誘発NASHモデルでは、小腸粘膜恒常性の破綻が生じており、NASHの発症、進展の予防に小腸粘膜の恒常性維持が重要である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASH発症の背景因子には、生活習慣病と薬剤の2つがある。NASHの病態進展には、腸内細菌の過増殖による粘膜透過性亢進を介して、腸内細菌由来成分が肝臓に移行する機序が指摘されている。これは生活習慣を基盤としたNASHに関する報告であり、薬剤性のNASHに関する報告はほとんどない。本研究では、NASHを高頻度で発症することが報告されているAMDを用いてNASHモデルを作成した。その結果、薬剤性NASHの発症や進展の予防において、小腸粘膜の恒常性維持が重要である可能性が示唆された。本成果は、現在、有効な治療薬がないNASHにおいて新たな治療標的を生み出す端緒となる学術的意義を有している。

研究成果の概要(英文)：In amiodarone (AMD)-induced NASH model mice, we examined whether disruption of small intestinal mucosal homeostasis is involved in the pathogenesis of NASH. Villus shortening, disruption of tight junction proteins localization and increased intestinal permeability were observed in the small intestine of the AMD group mice. In the liver of AMD group mice, activation of macrophages expressing CD14, which is a co-receptor of LPS, and increased expression of TNF- α were observed. Those results suggest that AMD-induced NASH progression is likely associated with the disruption of intestinal barrier function. Thus, it is thought that intestinal homeostasis could slow or prevent NASH progression.

研究分野：医療薬学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎(NASH) アミオダロン塩酸塩 腸肝関連 小腸粘膜恒常性

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 発症の背景因子には、生活習慣病を基盤とするものと、薬剤が原因となるものがある。NASH の病態進展には、腸内細菌の過増殖による粘膜透過性亢進を介して、腸内細菌由来成分が肝臓に移行する機序が指摘されている。これは生活習慣を基盤とした NASH に関する報告である。例えば、致死性不整脈予防に用いるアミオダロン塩酸塩 (AMD) は NASH を高頻度で発症し、肝硬変に進展する症例も報告されている。薬剤性 NASH では、原疾患の治療で使用しているために発症により薬剤を中止することが難しい。しかし、現時点では薬剤による NASH についてはまとまった報告はなく、またその機序も十分に明らかにされていない。NASH に対する新規治療薬の研究開発が世界的に望まれているが、生活習慣を基盤とした NASH と薬剤性の NASH が同じ機序で発症を抑制できるかという点は全く分かっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、小腸粘膜恒常性の維持により NASH の進展が抑制できるのかを明らかにすることである。中でも薬剤性 NASH での小腸粘膜恒常性の破綻の有無とその機序の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) AMD による NASH の誘発

NASH は C57BL/6 系マウスに 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁した AMD を 200 mg/kg の用量で 7 日間経口投与することで誘発した。コントロール群には溶媒である 0.5%メチルセルロース溶液を投与した。肝臓の脂肪蓄積および肝障害は、Oil Red O 染色および血漿中 ALT 濃度により評価した。肝マクロファージの浸潤および活性化は、組織切片をマクロファージマーカーの F4/80、マクロファージに発現するエンドトキシンの共受容体である CD14 を蛍光免疫染色した。肝臓での炎症は、炎症性マーカーの mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。

(2) 小腸の組織学的評価

小腸組織切片を作製し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色により絨毛構造の形態変化を観察後、HE 染色後に撮影した画像を ImageJ に取り込み、絨毛の高さと幅を計測した。

(3) 小腸粘膜透過性およびタイトジャンクションタンパクの局在評価

マウスに蛍光標識された dextran (FITC-dextran) を経口投与し、血漿中の FITC-dextran の濃度を測定した。小腸組織切片を ZO-1 および Claudin-3 の抗体で蛍光免疫染色した後、蛍光顕微鏡でシグナルを観察した。

(4) 小腸陰窩での幹細胞の発現および細胞増殖能の評価

Lgr5 陽性幹細胞の mRNA 発現量はリアルタイム PCR 法で解析した。小腸陰窩の細胞増殖は Ki-67 の免疫組織化学染色により評価した。

4. 研究成果

(1) AMD 誘発 NASH モデルの作成

AMD 群では Oil Red O で赤色に染色された無数の脂肪滴が見られ、肝細胞内に脂肪が蓄積していた (図 1a)。AMD 群では、コントロール群と比較して、肝重量/体重比および血漿中 ALT 値が有意に増加していた (図 1b および図 1c)。炎症性サイトカインである *Tnfa* の mRNA 発現量は AMD 群で有意に増加した (図 1d)。AMD 群では、コントロール群に比べ F4/80 と CD14 の蛍光シグナルは強く、シグナル同士は重なっていた。AMD の投与により、NASH の病態を反映した結果が得られ、NASH モデルが作成できた。AMD 誘発 NASH モデルマウスの肝臓では、マクロファージの活性化による TNF- α の発現増加によって炎症が生じていると考えられた。マクロファージの活性化には、腸内細菌由来のエンドトキシンの関与が示唆された。

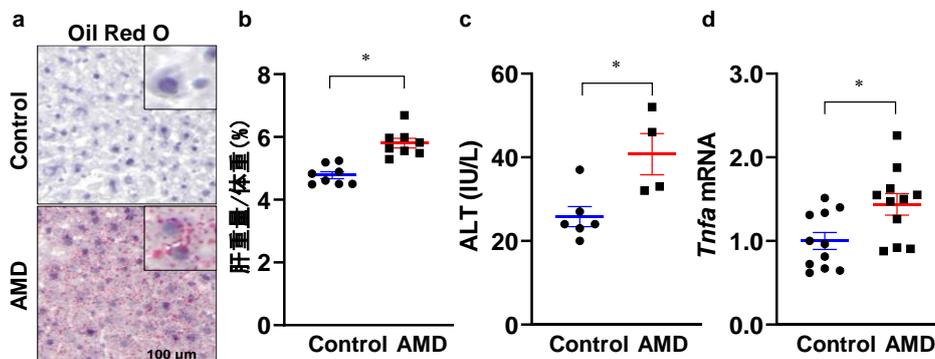


図1 AMD誘発NASHモデルの作成

(a) 肝臓組織切片をOil Red O染色し、顕微鏡で観察した。(b)コントロール群 (n=8)とAMD群 (n=6)の肝重量の体重当たりの重量比を算出した。(c)コントロール群 (n=4)とAMD群 (n=4)の血漿中ALT濃度を測定した。(d) コントロール群 (n=11)とAMD群 (n=11)の *Tnfa* のmRNA発現をリアルタイムPCR法を用いて解析した。データは平均値±標準誤差として表示した。* $p < 0.05$

(2) AMD 誘発 NASH モデルにおける小腸粘膜恒常性の評価

AMD 群では絨毛の損傷や短縮が観察された (図 2a)。小腸絨毛の形態を詳細に評価するため、絨毛の高さと幅を計測した。その結果、AMD 群では絨毛の高さがコントロール群と比較して、有意に短縮していた (図 2b)。次に、小腸粘膜恒常性の指標として小腸粘膜の透過性について検討した。AMD 群では、コントロール群に比べて、血漿中 FITC-dextran 濃度は有意に増加した (図 2c)。タイトジャンクションタンパクの局在は、AMD 群ではコントロール群と比べ、ZO-1 および Claudin-3 のシグナルは減弱した (図 2d)。AMD 誘発 NASH モデルマウスの小腸では、タイトジャンクションタンパクの局在変化により粘膜透過性が亢進し、小腸粘膜恒常性が破綻している可能性が示唆された。

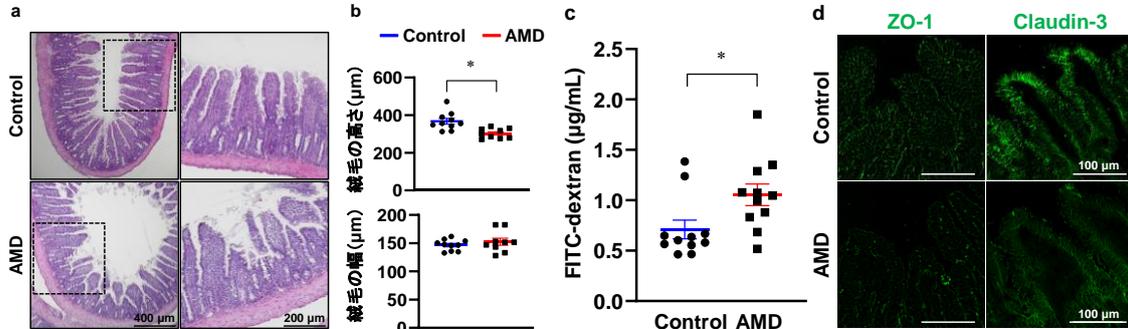


図2 AMD誘発NASHモデルにおける小腸粘膜恒常性の評価

(a) 小腸組織切片をHE染色し、顕微鏡で観察した。(b) コントロール群 (n=10) とAMD群 (n=9) の各マウスから少なくとも13個以上の絨毛の高さと幅を計測し、その平均値を各マウスの値として表示した。(c) コントロール群 (n=11) とAMD群 (n=11) の血漿中のFITC-dextran濃度を測定した。(d) 小腸組織切片をZO-1およびClaudin-3の抗体で蛍光免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察した。データは、平均値±標準誤差として表示した。* $p < 0.05$

(3) AMD 誘発 NASH モデルにおいて小腸粘膜恒常性の破綻が生じる機序の検討

小腸陰窩に存在し、小腸上皮の形成に重要な役割を果たす幹細胞に着目して検討した。AMD 群では、コントロール群に比べて、*Lgr5* の mRNA 発現量は低下し (図 3a)、Ki-67 陽性細胞数もAMD 群で減少した (図 3b)。AMD 誘発 NASH モデルマウスで認められる小腸粘膜恒常性の破綻は、陰窩底部の *Lgr5* 陽性幹細胞の機能低下によって小腸上皮構成細胞の分化・増殖が抑制されることで生じる可能性が示唆された。

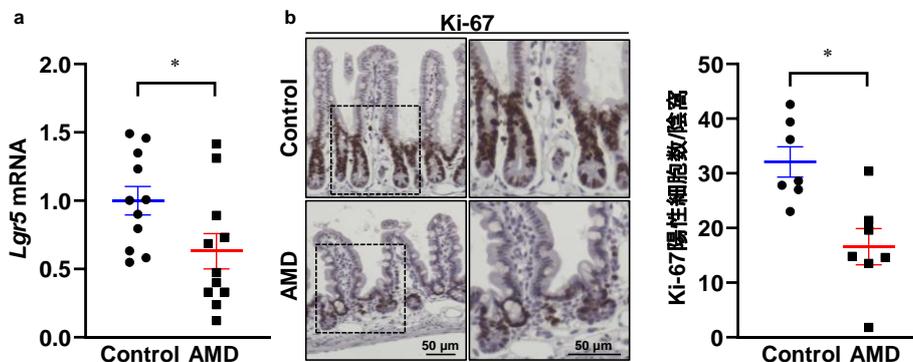


図3 小腸陰窩での幹細胞の発現および細胞増殖能の評価

(a) コントロール群 (n=11) とAMD群 (n=11) の *Lgr5* の mRNA 発現をリアルタイムPCR法を用いて解析した。(b) Ki-67の核発現は小腸組織切片を免疫組織化学染色し、顕微鏡で観察した。コントロール群 (n=7) とAMD群 (n=7) の各マウスから5個の陰窩でKi-67陽性細胞数を計測し、その平均値を各マウスの値として表示した。データは、平均値±標準誤差として表示した。* $p < 0.05$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 錦織リオ, 河内正二, 沖井美月, 田中優花, 田中亨, 堀部紗世, 佐々木直人, 力武良行, 國正淳一
2. 発表標題 薬剤性非アルコール性脂肪肝炎（NASH）が小腸粘膜恒常性に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
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
---------------------------	-----------------------	----

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