

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16987

研究課題名（和文）非アルコール性脂肪肝炎の病態形成における  $\omega$ -6脂肪酸代謝異常の意義

研究課題名（英文）The role of omega-6 fatty acid metabolism in non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

坂根 貞嗣 (Sakane, Sadatsugu)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30817515

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）： $\omega$ -6脂肪酸は体内の遊離脂肪酸の約3割を占め、生体内では合成出来ない必須脂肪酸である。本課題は、 $\omega$ -6脂肪酸が肝細胞恒常性維持に与える影響と、非アルコール性脂肪性肝疾患における  $\omega$ -6脂肪酸の意義を明らかにすることを目的に行った研究である。培養細胞とマウスを用いた研究結果から、非アルコール性脂肪性疾患モデルにおいて  $\omega$ -6脂肪酸代謝酵素の発現が上昇していることと、 $\omega$ -6脂肪酸の後期代謝産物に肝細胞保護効果があることを明らかにした。臨床検体を用いた検討により、 $\omega$ -6脂肪酸代謝酵素Fads1活性の高い症例において非アルコール性脂肪性肝疾患の病態が増悪していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、本邦で最大の慢性肝疾患である非アルコール性脂肪性肝疾患において  $\omega$ -6脂肪酸代謝および  $\omega$ -6脂肪酸が病態に深く関わっていることが明らかとなった。特に  $\omega$ -6脂肪酸の一種であるアラキドン酸は肝細胞単独の検討では肝細胞保護的に働く一方で、生体においては含有量が多い群において肝障害が強く誘導されることがわかり、 $\omega$ -6脂肪酸が背反する作用を持つ可能性が示唆された。今後は  $\omega$ -6脂肪酸の持つこの二面性に着目することで、非アルコール性脂肪性肝疾患の新たな病態が明らかになることが期待される。

研究成果の概要（英文）： $\omega$ -6 fatty acids account for about 30% of free fatty acids in the body, which are essential fatty acids. The purpose of this research was to clarify the effects of  $\omega$ -6 fatty acids on hepatocyte homeostasis and the significance of  $\omega$ -6 fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. The results of studies using cultured cells and mice revealed that the expressions of  $\omega$ -6 fatty acid metabolizing enzymes are elevated in nonalcoholic fatty liver disease mice model. In addition,  $\omega$ -6 fatty acids have protective effects in hepatocytes. Studies using clinical samples showed that the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease was exacerbated in patients with high Fads1 activity.

研究分野：消化器内科学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患  $\omega$ -6脂肪酸 アラキドン酸 遺伝子多型 アルコール性肝障害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患(**NAFLD**)は本邦で最も罹患者数の多い慢性肝疾患である。一部が線維化進展や肝細胞癌発症のポテンシャルを持つ非アルコール性脂肪肝炎(**NASH**)に移行するが、**NAFLD** と **NASH** の有効な治療薬は未だに存在しない。血中遊離脂肪酸量は **NAFLD/NASH** における線維化進展のリスク因子であり、脂肪酸は **NAFLD/NASH** の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられているがその詳細な機序は不明である。 $\omega$ -6 脂肪酸は体内の遊離脂肪酸の約 3 割を占め、生体内では合成出来ない必須脂肪酸である。主には食事中よりリノール酸として摂取した後、 $\omega$ -6 脂肪酸代謝酵素(**Fads2**, **Elovl5**, **Fads1**)の作用によりリノール酸から  $\gamma$  リノレン酸、ジホモ  $\gamma$  リノレン酸、アラキドン酸へと順に代謝され、脂質メディエーターの原料となる。**NASH** 症例の肝組織では  $\omega$ -6 系脂肪酸含有量が変化していると報告されているが、その意義は不明である。また **NAFLD/NASH** における  $\omega$ -6 脂肪酸代謝遺伝子の遺伝子多型の影響についてもこれまで検討されていない。

### 2. 研究の目的

申請者らはこれまで、ヒト **NAFLD/NASH** やマウスの **NAFLD** モデル、さらに飽和脂肪酸であるパルミチン酸投与モデルにおいてオートファジー抑制を介した肝細胞脂肪蓄積やアポトーシス亢進が生じ、肝細胞恒常性が破綻していることを報告してきた。肝内における  $\omega$ -6 系脂肪酸代謝の変化が肝細胞恒常性維持に影響を与え、これが **NAFLD** の肝病態に影響を与えているのではないかと仮説を建てた。そこで本研究課題では、肝内  $\omega$ -6 脂肪酸代謝異常が肝細胞恒常性維持に与える影響と、**NAFLD/NASH** における肝内  $\omega$ -6 脂肪酸の意義を明らかにすることを目的に研究を行った。

### 3. 研究の方法

- (1) 培養細胞を用いた実験として、 $\omega$ -6 脂肪酸代謝の変化が肝細胞恒常性維持に及ぼす影響を検討するために、マウス肝細胞株 **CL2** 株においてパルミチン酸を投与して、**Caspase 3/7** 活性の上昇および **Annexin V** 陽性細胞を計測することによりアポトーシスを評価した。同時に、リソソーム阻害薬バフィロマイシンを用いてオートファジーフラックスを測定した。次に、パルミチン酸投与した **CL2** 細胞に各種  $\omega$ -6 脂肪酸を添加することにより、アポトーシスとオートファジーへの影響を検討した。また、**CL2** を  $\omega$ -6 脂肪酸代謝酵素(**Fads2**, **Elovl5**, **Fads1**)を **siRNA** を用いてノックダウンし、アポトーシスへの影響を検討した。これらの実験の細胞数の推移についてはいずれも生細胞解析システム **Incucyte®**を用いて測定した。
- (2) マウスを用いた実験では、野生型の **C57BL/6J** 雄マウス 6 週令に対して 2 カ月間高脂肪食負荷を行い、肝組織の表現型を検討した。また、高脂肪食負荷マウスに対し 30%エタノールの経口投与を行い 9 時間後の表現型についても検討した。上記マウス肝組織における  $\omega$ -6 脂肪酸代謝関連遺伝子発現を検討すると共に、肝組織中  $\omega$ -6 脂肪酸量についても評価した。また、ヒト肝細胞キメラマウスに対して通常食および高脂肪食負荷を行い 2 カ月後の肝組織の表現型を検討した。肝線維化の評価を **Sirius red** 染色にて行った。また、マウス用とヒト用の両方のプロンプを用いることにより、マウス肝組織における  $\omega$ -6 脂肪酸代謝関連遺伝子と、ヒト肝細胞における  $\omega$ -6 脂肪酸代謝関連遺伝子の発現差異について検討した。
- (3) ヒト **NAFLD/NASH** 症例の保存血清を用いて、血中の  $\omega$ -6 脂肪酸量と病態の比較検討を行うと共に、肝組織中 **mRNA** 発現を測定可能であった症例については **Fads2**, **Elovl5**, **Fads1** 遺伝子発現を測定し、血中  $\omega$ -6 脂肪酸量との関連を検討した。また、血液ゲノムを測定可能であった症例については **Fads1** の **rs174537** 遺伝子多型を検討した。

### 4. 研究成果

(1)肝細胞株 **CL2** に対してパルミチン酸を負荷すると、脂肪滴の蓄積に加えて **Caspase 3/7** 活性の上昇および **Annexin V** 陽性細胞の増加を伴いアポトーシスが亢進した。この **Lipoapoptosis** に対する  $\omega$ -6 脂肪酸の影響を検討するために  $\omega$ -6 脂肪酸であるリノール酸(**LA**)、 $\gamma$  リノレン酸( $\gamma$ **LA**)、ジホモ  $\gamma$  リノレン酸(**DGLA**)、アラキドン

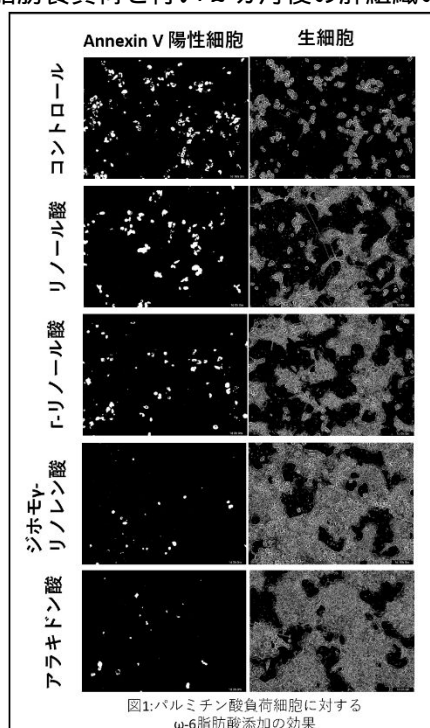


図1:パルミチン酸負荷細胞に対する  $\omega$ -6脂肪酸添加の効果

酸(AA)を添加したところ、いずれの脂肪酸においても **Caspase 3/7** 活性の低下と **Annexin V** 陽性細胞数の低下を認め、その程度は AA, DGLA,  $\gamma$ LA, LA の順であり、 $\omega$ -6 脂肪酸の後期代謝物ほどその効果は強かった(図 1)。AA の投与下では、パルミチン酸投与により生じるオートファジー抑制の改善も見られた。

(2)肝細胞株 **CL2** に対するパルミチン酸負荷により  $\omega$ -6 脂肪酸代謝酵素である **Fads2**, **Elovl5**, **Fads1** はいずれも発現亢進が見られた。そこで **Fads2**, **Elovl5**, **Fads1** を **siRNA** によりノックダウンを行い細胞死への影響を検討したところ、アポトーシスの増悪を認めた。

(3)マウスモデルとして、野生型マウスに高脂肪食を 2 ヶ月負荷するモデルにおける肝組織内の  $\omega$ -6 脂肪酸代謝酵素遺伝子発現を検討したところ、**Fads2**, **Elovl5**, **Fads1** のいずれも発現が増加した。次に高脂肪食負荷後に 30%エタノールの経口大量投与を行うと、肝組織において **Fads2** と **Fads1** の発現が著明に低下し、肝細胞アポトーシスの亢進を認めた。高脂肪食摂取マウス肝組織の脂肪酸組成を検討したところ、高脂肪食摂取マウスでは肝組織中アラキドン酸(AA)量が著明に増加しており、高脂肪食負荷後に 30%エタノールの経口大量投与を行ったマウスでは肝組織中 AA 量がさらに増加した。

(4)ヒト肝細胞キメラマウスに対して高脂肪食を 2 ヶ月負荷させたときの肝組織の表現型につき検討した。ヒト肝細胞キメラマウスに対する高脂肪食負荷により、通常食負荷群と比較して肝内脂肪滴の増加、肝線維化の増悪を認めた。続いて肝組織内の  $\omega$ -6 脂肪酸代謝酵素遺伝子発現を検討した。高脂肪食負荷によりマウス肝細胞では **Fads2**, **Elovl5**, **Fads1** のいずれも発現が増加した一方で、ヒト肝細胞キメラマウスのヒト肝細胞では **Fads2** と **Fads1** だけが発現亢進した。

(5)NAFLD 患者サンプルを用いて、 $\omega$ -6 脂肪酸の意義を検討した。NAFLD 症例約 60 例の組織学的に非アルコール性脂肪肝 (NAFL) と NASH が鑑別できた症例において、血清中の DGLA 量と AA 量、血液ゲノムを測定した症例について **Fads1** の rs174537 遺伝子多型、肝組織中 mRNA が測定できた症例について **Fads1** の mRNA 発現を検討し、臨床背景との比較を行った。NASH 群は NAFL 群に比較して血清 AA/DGLA 比が高値であった。血清 AA/DGLA 比により NASH を予測する AUROC は 0.664 であり、血清 AA/DGLA 比 3.65 カットオフとすると、感度 79%、特異度 56%で NASH を鑑別可能であった。NAFL と NASH の鑑別としてロジスティック回帰分析により評価したところ、FIB4-index と血清 AA/DGLA 比が有意な因子として抽出された。**Fads1** の rs174537 遺伝子多型を検討したところ、GG 群は GT 群に比し血清 AA/DGLA 比が有意に高く、TT 群は 3 群の中で最も血清 AA/DGLA 比が低く、全例が NAFL であった。また、血清 AA/DGLA 比と肝組織中 **Fads1** mRNA 量には正の相関がみられた(図 2)。

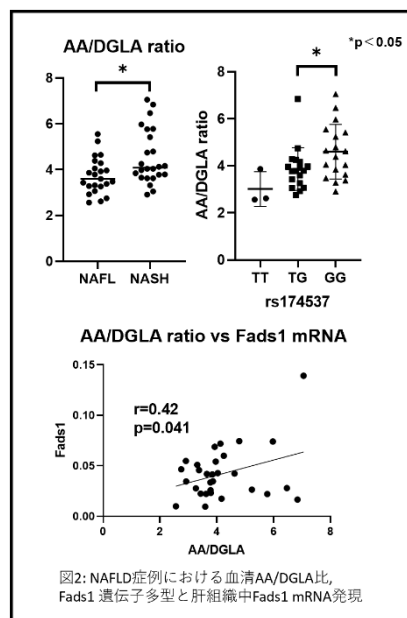


図2: NAFLD 症例における血清 AA/DGLA 比, Fads1 遺伝子多型と肝組織中 Fads1 mRNA 発現

(6)今回の研究結果により、**In vitro** と **in vivo** の両方で非アルコール性脂肪性疾患モデルにおいて  $\omega$ -6 脂肪酸代謝酵素の発現が上昇していることが示された。肝細胞の **Lipoapoptosis** に対して  $\omega$ -6 脂肪酸の後期代謝産物に細胞保護効果があることが示された。一方で、野生型マウスの高脂肪食摂取モデルでは肝組織中 AA 量が増加し、エタノールの投与によりさらに肝組織中 AA 量は増加しており、AA 含有量が多い状態において肝障害が強く誘導されていた。また、ヒト肝細胞キメラマウスの結果から、ヒト細胞はマウス細胞と異なり、**Elovl5** と比較して **Fads1** 発現のみが上昇しやすいことがわかった。さらに臨床検体の検討においても、**Fads1** 活性が高く血中 AA/DGLA 比が高い症例において NAFLD の病態増悪が見られた。以上より、**in vitro** で想定された結果とは異なり、NAFLD の病態においては AA の増加は肝病態増悪に寄与することが示唆された。AA が NAFLD の肝病態を増悪させる機序については肝マクロファージの非実質細胞などの関与が推測されるが、更なる研究による検討が必要と考える。

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 坂根貞嗣、阪森亮太郎、竹原徹郎
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患 におけるFads1の意義
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会
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
---------	---------