

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17032

研究課題名（和文）加齢における脂肪肝炎の増悪と骨格筋萎縮の病態メカニズム

研究課題名（英文）Pathophysiological mechanisms of age-related exacerbation of steatohepatitis and skeletal muscle atrophy

研究代表者

石塚 敬（Ishizuka, Kei）

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：70870327

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）：加齢性筋萎縮（サルコペニア）と非アルコール性脂肪肝炎との関連を明らかにするために、加齢マウスを用いて肝臓および骨格筋の高脂肪食負荷への応答性に対する加齢の影響を解析した。加齢・高脂肪食負荷の状況では肝組織内における脂質代謝の不均衡、肝内脂質の量的・質的变化、脂肪毒性の増悪が脂肪肝炎の進展に寄与した。さらに、IGF-1およびヘパトカインの発現が変化することによって骨格筋組織の炎症およびユビキチン化を促進し、骨格筋萎縮が惹起されたことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は加齢性筋萎縮と非アルコール性脂肪肝炎との病態関連を明らかにするために肝筋連関に着目した。これまでに当研究室で行ってきた肝の脂質代謝・ストレス応答に関する研究の蓄積と、骨格筋萎縮との関連を活かした独創的なものである。本研究での成果により、NASHの予防・新規治療法だけでなく高齢に伴う筋萎縮の軽減にも繋がることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：To clarify the relationship between age-related muscle loss (sarcopenia) and nonalcoholic steatohepatitis, we investigated the effects of aging on the responsiveness of liver and skeletal muscle to a high-fat diet using aged mice. Our findings demonstrated that imbalances in lipid metabolism in liver, quantitative/qualitative changes in hepatic lipids and exacerbation of lipotoxicity contribute to the development of steatohepatitis in aged mice fed a high-fat diet. Additionally, they clearly suggested that changes in IGF-1 and hepatokine expression in liver promote inflammation and ubiquitination in skeletal muscle tissue.

研究分野：肝臓病学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 加齢 脂質代謝 サルコペニア（筋萎縮）

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、近年の肥満人口の増加に伴い、世界中で慢性肝疾患の原因として増加傾向にある¹。臨床研究によると、NAFLD 患者の約 10% が、NAFLD の進行性サブタイプである非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に移行することが示されている。NASH の発症メカニズムは完全には解明されていないが、当研究グループはこれまでに NASH を中心とした脂肪性肝疾患のメカニズムに関する基礎的研究を多く行ってきた。L カルニチン投与による肝細胞の脂肪酸酸化の促進が高脂肪食誘導脂肪肝炎の抑制に寄与したことを報告した頃より肝筋連関に着目していた²。

加齢性筋萎縮 (サルコペニア) は加齢に伴う骨格筋減少症と定義され、ロコモティブシンドロームのひとつと考えられている。加齢以外の疾患を有する場合の骨格筋減少は二次性サルコペニアと呼ばれ、肝硬変や透析患者、様々な臓器の癌患者で生じ、予後増悪因子であることが示されている。しかし、サルコペニアを生じる機序は十分には明らかにされておらず、予防・治療法も確立されていない。サルコペニアで認められる筋萎縮は速筋優位に進行し、遅筋優位の萎縮をきたすギプス固定や寝たきりによって生じる廃用症候群とは病態が異なる。遅筋はミトコンドリアを豊富に含み酸化的リン酸化が優位に働くのに対して速筋ではグリコーゲンによる解糖系とクレアチンリン酸からのリン酸化による ATP 産生に依存し、核内レセプターの分布も異なることから、廃用症候群とサルコペニアは全く異なる機序で生じていることが示唆された。

近年の疫学研究で、サルコペニアが NASH の病態進展の独立した増悪因子であることが報告され、骨格筋代謝の変調と脂肪性肝炎の間には強い相関関係があると想定された³。

2017 年 2019 年 基盤研究 C 代表「非アルコール性脂肪肝炎 - サルコペニアにおける脂肪酸酸化不全と脂質組成変化の役割」の研究で加齢マウスにおいて高脂肪食 (HFD) 摂取に対する脂質代謝が脂肪合成促進、脂質分解抑制に傾くことで脂肪肝炎が増悪することを明らかにしたが、その一環の実験で HFD を摂取した加齢マウスが速筋優位の骨格筋萎縮を生じていることを見出して、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は近年急増している脂肪肝炎と加齢性筋萎縮 (サルコペニア) との病態の関連を明らかにするために、脂肪供給過多を背景とした肝臓の代謝系の破綻と栄養素の再配分の障害に伴った骨格筋萎縮に焦点を当てた。ヒトのサルコペニアの特徴である速筋優位の筋萎縮をきたす加齢マウス + HFD モデルを用いて、脂肪肝炎 + サルコペニアの病態のキーとなる代謝産物を同定し、障害をきたすメカニズムを明らかにすることを目的とした。さらに脂肪肝炎の治療的アプローチを加えることでサルコペニアの改善の有無を確認し、脂肪肝炎の治療を中心とした新たなサルコペニアの予防・治療戦略を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

8 週齢 (若年) と 55 週齢 (加齢) の雄性 C57BL6 マウスに高脂肪食 (HFD32; Nihon CLEA, Japan) を 8 週間与え、普通食 (ND) を与えた同週齢のマウスをコントロールとして比較検討した。マウスの筋力評価は、マウス用握力測定装置 (GPM-100; Melquest, Toyama, Japan) を用いて 1 週間毎に筋力測定を行った。高脂肪食を 8 週間与えた後に肝組織、血清および骨格筋として速筋 (足底筋)、遅筋 (ひらめ筋)、速筋 + 遅筋 (腓腹筋) を採取して解析を行った。

4. 研究成果

8週齢（若年）の雄性 B57BL6 マウスに高脂肪食（HFD）を8週間与えた群（若年 HFD 群）の肝組織では軽微な脂肪変性を認めたのに対して、55週齢（加齢）の雄性 C57BL6 マウスに HFD を8週間与えた群（加齢 HFD 群）では風船様変性を伴う著明な大滴性脂肪変性を生じた。肝体重比、血清 ALT 値においては、いずれも加齢 HFD 群では若年 HFD 群に比べて有意に上昇した（図1）⁴。

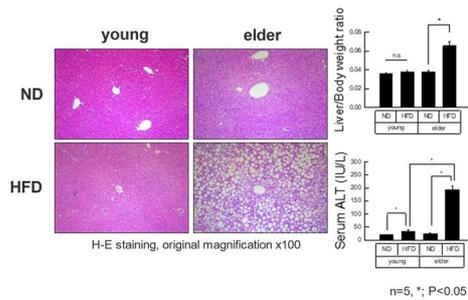


図1

マウスの筋力の評価目的で、マウス用握力測定装置を用いて1週間毎に筋力測定を行ったところ、若年・加齢マウスの両 HFD 群で普通食群（ND 群）と比べ筋力は低下したが、加齢マウスでより顕著に筋力低下を認めた（図2）。

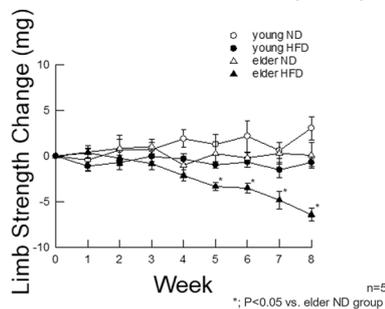


図2

骨格筋の重量、筋組織の評価では、腓腹筋（速筋 + 遅筋）の重量に有意な差は見られなかったが、速筋/遅筋（足底筋/ひらめ筋）重量比では若年 HFD 群に比べて加齢 HFD 群で有意に低下しており、ヒトのサルコペニアの特徴である速筋優位の筋萎縮と一致する結果となった。腓腹筋線維の横断面積は若年 HFD 群では ND 群と比べて面積の減少は認められなかったのに対し、加齢 HFD 群では有意に減少していた（図3）。

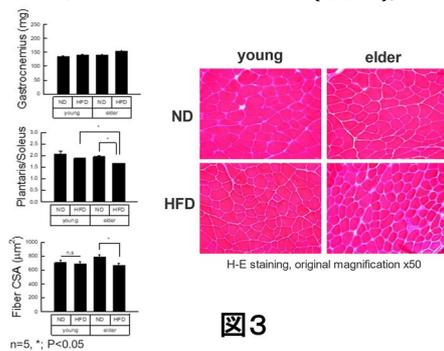


図3

肝組織、骨格筋組織における病態形成機序を分子生物学的に解析した。肝組織における脂質代謝への加齢・高脂肪食の影響は、肝組織中の脂肪酸合成を制御する SREBP1c mRNA の発現は加齢 HFD 群では若年 HFD 群より有意に上昇しており、一方で、脂肪酸酸化に関わる PPAR α mRNA の発現は加齢 HFD 群では若年 HFD 群より有意に低下していた。炎症性サイトカインの発現においても、加齢 HFD 群でより発現の上昇を認めた(図 4)。加齢マウスの肝組織内では高脂肪食負荷に対して、脂肪酸がより合成される一方で、酸化の低下により脂肪酸の分解が追いつかない状況のために脂質が肝臓内にさらに蓄積したと考えられた。また、炎症性サイトカインの上昇も招く結果となった。

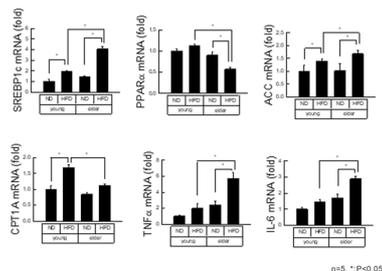


図 4

IGF-1 は成長ホルモンに刺激され、主に肝臓で産生される筋タンパク質合成に関わる増殖因子であるが、IGF-1 mRNA の肝組織中の発現は、両 HFD 群で ND 群よりも減少したが、加齢 HFD 群でさらに減少した。肝臓で産生されるヘパトカインのひとつである selenoprotein P (SeP) は骨格筋で活性酸素・AMPK を上方制御することにより運動抵抗性を誘発するが、SeP mRNA の肝組織中の発現は加齢 HFD 群でのみ有意に上昇した。一方、SeP の受容体にあたる LRP1 mRNA の腓腹筋における発現は若年 HFD 群より加齢 HFD 群で有意に上昇し、SeP で負に制御される PGC1 α mRNA の発現は加齢 HFD 群で有意に低下した(図 5)。

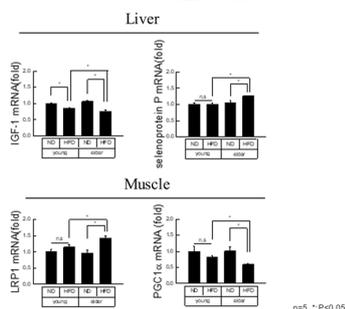


図 5

骨格筋内の炎症性サイトカインも肝臓同様に加齢 HFD 群でより上昇した。筋タンパク質分解に関わるユビキチンリガーゼの Atrogin-1 と MuRF-1 mRNA の発現は若年 HFD 群に比べ加齢 HFD 群で有意に上昇した(図 6)。加齢マウスの骨格筋組織内では高脂肪食負荷に対して、IGF-1 の低下による筋タンパク質合成の低下、SeP の上昇による運動抵抗性の増大、炎症性サイトカインの上昇に伴うユビキチンリガーゼの上昇による筋タンパク質分解が促進されたことで筋萎縮が惹起されたと考えられた。

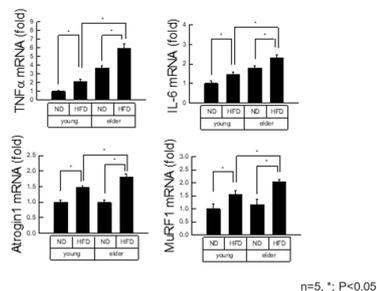


図 6

本研究期間の結果から、加齢・高脂肪食負荷の状況では肝組織内における脂質代謝の不均衡とそれによる肝内脂質の量的・質的变化、脂肪毒性の増悪が脂肪肝炎の進展に寄与しただけでなく、肝臓における IGF-1 の発現低下および SeP の発現上昇を生じ、炎症性サイトカインの上昇によりユビキチン化が誘導され、筋タンパク質代謝の不均衡が生じ、筋萎縮を惹起したと考えられた。脂肪肝炎患者のサルコペニアの発症において、肝臓由来の因子が骨格筋組織内の筋タンパク質代謝の不均衡を惹起し、肝筋連関により筋萎縮を生じた可能性が示唆された。今後、肝筋連関の生じる機序と構成因子についてより詳細な検討が必要であるが、NASH だけでなくサルコペニアに対する新規予防・治療法の選択肢としての可能性を示すことができた。

<引用文献>

1. Watanabe S, Hashimoto E, Ikejima K, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res.* 2015; 45: 363-77.
2. Kon K, Ikejima K, Watanabe S et al. L-carnitine prevents metabolic steatohepatitis in obese diabetic KK-Ay mice. *Hepatol Res.* 2017; 47(3): E44-54.
3. Petta S et al. Sarcopenia is associated with severe liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017; 45:510-18.
4. Ishizuka K, Kon K, Ikejima K et al. Aging exacerbates high-fat diet-induced steatohepatitis through alteration in hepatic lipid metabolism in mice. *J Gastroenterol Hepatol.* 2020; 35(8):1437-1448.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kei Ishizuka | 4. 巻 35(8) |
| 2. 論文標題 Aging exacerbates high-fat diet-induced steatohepatitis through alteration in hepatic lipid metabolism in mice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 journal of gastroenterology and hepatology | 6. 最初と最後の頁 1437-1448 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jgh.15006. Epub 2020 Feb 17. | 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 - |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 石塚敬、今一義、内山明、福原京子、柳沼礼子、池嶋健一 |
| 2. 発表標題 加齢における食事誘発性脂肪肝炎の増悪と骨格筋萎縮との関連 |
| 3. 学会等名 第21回日本抗加齢医学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 石塚敬、今一義、内山明、深田浩大、山科俊平、池嶋健一 |
| 2. 発表標題 加齢による脂質代謝 / 脂質組成の変化を介した脂肪肝炎の増悪機序 |
| 3. 学会等名 第34回肝臓洞壁細胞研究会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 石塚敬、今一義、内山明、山科俊平、池嶋健一 |
| 2. 発表標題 The impact of age-related lipotoxicity on high-fat diet-induced steatohepatitis |
| 3. 学会等名 第28回日本消化器関連学会週間 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 石塚敬、今一義、内山明、深田浩大、山科俊平、池嶋健一 |
| 2. 発表標題 加齢マウスにおける脂肪酸の“質”の変化および自然免疫系活性化を介した脂肪肝増悪機序 |
| 3. 学会等名 第57回日本消化器免疫学会総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 石塚敬、今一義、内山明、深田浩大、山科俊平、池嶋健一 |
| 2. 発表標題 加齢マウスを用いた食事誘発性脂肪性肝炎の脂肪毒性増悪機序 |
| 3. 学会等名 第39回アルコール医学生物学研究会学術集会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------|---------|
| | |