

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06536

研究課題名（和文）NASHにおける体内時計の変調を介した肝線維化の解明

研究課題名（英文）NASH induced-liver fibrosis was mediated by the disruption of circadian clock system

研究代表者

和田 平（WADA, Taira）

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号：20597398

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）：本研究では、肝細胞特異的に時計遺伝子BMAL1が欠損した(HKO)マウスを用いて、体内時計システムの変調によるNASH発症に伴う線維化の増悪化機構を解析した。NASH誘導食を給餌したControlマウスでは、肝障害、炎症及び線維化が明期に高く、暗期に低くなる日内変動を示したが、HKOマウスにおいて日内変動は見られなかった。また、NASH線維化の日内変動にはTGF- β 1のタンパク質発現量の変動の関与が示唆された。さらにHKOマウスはNASH誘発性の肝がんへの進行が増悪化した。したがって、NASHの発症及び増悪化にBMAL1を介した体内時計の関与が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASHは、肥満や2型糖尿病を背景に線維化を伴って発症し、肝硬変、肝がんへと進展する代謝性疾患であり、近年、その有病率が増加している。線維化の進展は、NASHの予後と強い相関性を示すが、線維化の機序については未知な部分が多い。近年、生活習慣の変化に伴う体内時計の変調が代謝性疾患発症リスクとして注視されている。本研究成果は、体内時計の変調に起因した線維化の新たなメカニズムを示す知見である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the development of NASH and exacerbation of fibrosis by using hepatocyte-specific deletion of the clock gene BMAL1 (HKO) mice. The diurnal variation in liver injury, inflammation, and fibrosis were higher during light hours and lower during dark hours in Control mice fed a NASH-inducing diet. However, those diurnal variation were not observed in HKO mice. Moreover, the diurnal variation in NASH fibrosis was implicated in TGF- β 1 protein expression. Furthermore, HKO mice showed exacerbated progression to NASH-induced hepatocarcinoma. These results indicate molecular clock system mediated by BMAL1 is associated with the development of NASH and exacerbation of fibrosis.

研究分野：生物系薬学

キーワード：NASH 線維化 体内時計

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国では生活習慣病の罹患率の増加とともに、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)患者数が急増している。NASH は、肥満などの生活習慣病に伴う非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)に、炎症、酸化ストレスなどの要因が加わることで線維化を伴って発症する。また、我が国におけるウイルス性肝炎を合併しない肝がんの急速な増加の主因は NASH であると考えられている。NASH 患者の一部は肝線維化の進展により予後不良な肝硬変及び肝がんへと病態が悪化する。しかしながら、NASH 発症に伴う線維化の詳細なメカニズムが解明されていないため、NASH に対する有効な治療薬が未だ確立されていない。

疫学調査から、NAFLD、肝がんなどの NASH に関連した疾患の発症リスクとしてシフトワークなどの生活習慣が報告されている。シフトワークによる NASH 関連疾患の発症メカニズムは明らかにされていないが、体内時計の変調がその主たる要因であると考えられている。事実、NASH 発症マウスの肝臓では、体内時計システムの構成因子である時計遺伝子(*Bmal1*, *Per1*)の発現の概日リズムが変調している。さらには肝細胞の体内時計が消失したマウスにおいて NASH 発症に伴う肝線維化が増悪化する。したがって、社会生活の 24 時間化が進行する我が国において、体内時計の変調に起因した線維化の増悪化の理解は、NASH、さらにはその先にある肝がん患者数の抑制に大きく寄与するものである。

2. 研究の目的

体内時計システムは複数の時計遺伝子により構成され、中でも転写因子 Brain and Muscle Arnt like protein 1(BMAL1)が中心的な役割を果たしている。上述したように、NASH ならびにその関連病態を示す患者数が増加していること、さらにその一因として体内時計の変調が示唆されていることから、本研究では、肝細胞特異的に BMAL1 が欠損した(HKO)マウスを用いて、体内時計の変調による NASH 発症に伴う肝線維化の増悪化機構を解明する。

3. 研究の方法

肝細胞特異的 BMAL1 欠損(HKO)マウスは、BMAL1^{flx/flx} マウスにアルブミンプロモーターの下流に Cre リコンビナーゼを組み込んだトランスジェニックマウスを掛け合わせて作製し、BMAL1^{flx/flx} マウスをコントロールマウスとして用いた。動物実験に関しては、日本大学薬学部実験動物倫理規定に基づいて行った。マウスは 1 ケージあたり 4-5 頭で飼育し、温度 23±1℃、相対湿度 50±10%、明暗周期(明期 8:00-20:00、暗期 20:00-8:00)の条件で飼育した。マウスの飼育には通常食に固形 NMF(オリエンタル酵母株式会社)、NASH 誘導食に CDAHFD(コリン欠乏メチオニン添加高脂肪食、リサーチダイエツト)を給餌した。NASH 誘発性肝がんモデルマウスは、妊娠 15 日目の雌親マウスにジエチルニトロソアミン(DEN、富士フィルム和光純薬株式会社)を投与し、4 週齢で仔マウスを離乳し、6 週齢から NASH 誘導食下で飼育し、肝がんを誘発した。マウスの生存率については、カプラン・マイヤー曲線を作製し、統計解析を行った。胆管結紮モデルによる肝線維化モデルについては、マウスを麻酔(三種混合麻酔薬(ドミトール(日本全薬工業株式会社)、ドミルカム(アステラス製薬株式会社)、ベトルファール(Meiji Seika ファルマ 株式会社)下で、総胆管を結紮(BDL)あるいは偽手術(Sham)を施して 1 週間飼育した後、解析した。肝障害について血清 ALT 及び AST 値をトランスアミナーゼ CII-テストワコー(富士フィルム和光純薬株式会社)を用いて測定した。マウスの肝臓を 10%ホルマリン溶液で固定した後、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン(HE)染色により、病理組織学的に解析した。また、肝臓における線維化についてはパラフィン切片を用いてピクロシリウス染色によりコラーゲンを染色するとともに、コラーゲンの構成成分であるヒドロキシプロリン含量の定量により解析した。肝臓トリグリセリド含量については、Carlson 法で肝臓より脂質を抽出して測定した。さらに、酸化ストレスについては、脂質の過酸化の指標であるマロンジアルデヒド(MDA)を肝臓より抽出して常法により測定した。遺伝子発現量の解析は、肝臓より RNAiso Plus(Takara)を用いて RNA を抽出し、逆転写酵素(Revertra Ace, TOYOBO)を用いて cDNA を合成した後、SYBR Green PCR reagents(Promega) を用いて遺伝子発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) NASH 線維化に対する体内時計の関与を明らかにする目的で、まず初めに NASH 発症マウスの線維化の概日リズムを肝臓切片のピクロシリウス染色、ヒドロキシプロリン含量及び線維化関連遺伝子の発現量より検討した。その結果、NASH 線維化は明期に高く、暗期に低くなる日内変動を示した(図 1)。

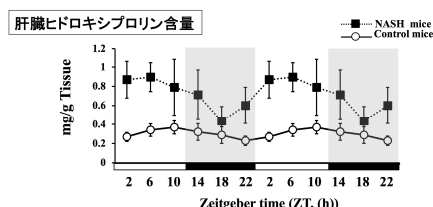


図1. NASH発症マウスにおける肝線維化の概日リズム

そこで、肝線維化制御機構を明らかにするため、血液パラメーターについて解析したところ、NASH 発症マウスでは ALT、AST 濃度(肝障害マーカー)ならびに血清フェリチン濃度においても線維化と類似した日内変動が見られた。また、NASH 肝線維化の発症要因である炎症及び活性酸素の日内変動について、炎症生サイトカイン発現量及び MDA 含量を解析したところ、線維化と連動したリズム性が見られた。一方、肝臓トリグリセリド含量及び脂肪変性において日内変動は認められなかった。またこれらの Control マウスにおいて見られた日内変動は、HKO マウスでは認められなかった。これらの結果より肝細胞 BMAL1 は、炎症、活性酸素量の日内変動の制御を介して NASH 肝線維化の概日リズムの制御に関与していることが示唆された。

(2) NASH 線維化の概日リズムについて線維化促進因子である TGF β シグナル活性を検討した。NASH 発症マウスの肝臓において *Tgfb1* mRNA 発現量の日内変動は見られなかったが、TGF β 1 タンパク質発現量は、ZT(zeitgeber time)2, 6 に高くなることが示された。また、それに伴って SMAD2/3 活性の増大が見られた。したがって、NASH 線維化の概日リズムは TGF β /SMAD シグナル活性と連動していることが示された。TGF β 1 タンパク質発現量に日内変動があったことから、*Tgfb1* mRNA の翻訳あるいは分解が要因で概日リズムを示すことが示唆された。近年、TGF β 1 タンパク質発現に RNA 結合タンパクによる制御機構が存在することが報告されている。そこで、TGF β 1 タンパク質の安定化あるいは翻訳に関連する RNA 結合タンパク質を UV クロスリンキング法によって探索した。その結果、*Tgfb1* mRNA の 5'非翻訳領域(UTR)+302~+480 の配列に、明期 ZT6 に多く結合し、暗期 ZT18 でその結合が弱まる mRNA 結合タンパク質が存在していること、そして、その RNA 結合タンパク質の分子量が 60Kda であることを見出した。

(3) NASH 線維化は、予後不良な肝がんへと進展する。HKO マウスにおける NASH 線維化の進展に伴う肝がんの発生について検討した。その結果、HKO マウスにおける NASH 肝がんに関連した生存曲線はコントロールマウスに比較して寿命が有意に縮むことが示された。また、NASH 誘導食負荷 30 週目における HKO マウスの肝臓における腫瘍数の増加が観察された。

(4)胆管結紮誘導性(BDL)の肝線維化の発症に対する体内時計の役割を検討するため、BDL マウスの肝臓における時計遺伝子発現量を測定した。その結果、Sham 群において見られた時計遺伝子の発現量の概日リズムは、BDL 処理したマウスにおいて消失していた。そこで、肝臓の体内時計が変調の肝線維化への影響を明らかにするため、HKO を用いて検討した。BDL 処理した HKO マウスにおいてコラーゲンの蓄積の増加及び線維化関連遺伝子発現量(*Colla1*, *Col3a1*, α SMA, *Tgfb1*)の増加が認められた。また、BDL 処理した HKO マウスにおいて炎症、酸化ストレス及び肝障害が増加していた。これらの結果より、肝線維化において BMAL1 は線維化の抑制因子であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wada, T., Yamamoto, Y., Takasugi, Y., Ishii, H., Uchiyama, T., Saitoh, K., Suzuki, M., Uchiyama, M., Yoshitane, H., Fukada, Y., Shimba, S.	4. 巻 254
2. 論文標題 Adiponectin regulates the circadian rhythm of glucose and lipid metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 121-133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/JOE-22-0006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 2. Nobushi, Y., Wada, T., Koike, Y., Kaneko, H., Shimba, S., Uchiyama, T., Kishikawa, Y.	4. 巻 45
2. 論文標題 Inhibitory Effects of hydrolysable tannins on lipid accumulation in 3T3-L1 cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 1458-1465
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b22-00227.	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47件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 和田平, 山本晋子, 高杉幸子, 石井宏剛, 斉藤かおり, 鈴木正泰, 内山真, 吉種光, 深田吉孝
2. 発表標題 アディポネクチンは肝臓における糖・脂質代謝の概日リズムを制御する
3. 学会等名 第96回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北浦慧, 石井宏剛, 高杉幸子, 和田平, 榎葉繁紀
2. 発表標題 体内時計システムの破綻は水代謝異常を誘発する
3. 学会等名 次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフィォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石井宏剛, 北浦慧, 高杉幸子, 和田平, 榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子Bmal1による脂肪組織インスリン感受性調節機構の解明
3. 学会等名 第22回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフィォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北浦慧, 石井宏剛, 高杉幸子, 和田平, 榛葉繁紀
2. 発表標題 体内時計システムの破綻は水代謝異常を誘発する
3. 学会等名 第67回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木宙夢, 北浦慧, 高杉幸子, 和田平, 榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子Bmal1による脾機能調節
3. 学会等名 第67回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西牧薫穂, 高杉幸子, 和田平, 榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子Bmal1によるマクロファージ機能の制御とその破綻によるメタボリックシンドロームの増悪化
3. 学会等名 第67回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 榛葉 繁紀, 和田 平, 山本 晋子, 高杉 幸子, 石井 宏剛, 斉藤 かわり, 鈴木 正泰, 内山 真, 吉種 光, 深田 吉孝
2. 発表標題 アディポネクチンは糖・脂質代謝の概日リズムを制御する
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石井宏剛, 北浦慧, 高杉幸子, 和田平, 榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子 Bmal1 による脂肪組織インスリン感受性調節機構の解明
3. 学会等名 第44回日本肥満学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石井宏剛, 北浦慧, 和田平, 榛葉繁紀
2. 発表標題 脂肪細胞Bmal1はFGF21を介して脂肪細胞から全身への脂質供給を制限する
3. 学会等名 第27回アディポサイエンス・シンポジウム
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木 宙夢, 北浦 慧, 高杉 幸子, 和田 平, 榛葉 繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子Bmal1による膵機能調節
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 北浦 慧, 石井 宏剛, 高杉 幸子, 和田 平, 榛葉 繁紀
2. 発表標題 腎虚血再灌流障害における時計遺伝子BMAL1の役割
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 和田 平, 竹島 幸亮, 高杉 幸子, 榛葉 繁紀
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)発症に伴う線維化の概日リズム
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 石井宏剛, 北浦慧, 高杉幸子, 和田平, 榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子Bmal1による脂肪細胞機能調節
3. 学会等名 第67回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 和田 平, 中嶋 孝久, 齋藤 賢宏, 高杉 幸子, 榛葉 繁紀
2. 発表標題 シフトワークは胆汁脂質成分バランスの破綻をもたらす
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石井 宏剛, 北浦 慧, 高杉 幸子, 和田 平, 榛葉 繁紀
2. 発表標題 脂肪細胞において時計遺伝子BMAL1はFGF21を介して全身のインスリン感受性を制御する
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北浦 慧, 石井 宏剛, 高杉 幸子, 和田 平, 榛葉 繁紀
2. 発表標題 マウス成獣期において時計遺伝子BMAL1は水代謝を制御する。
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石井 宏剛, 北浦 慧, 高杉 幸子, 和田 平, 榛葉 繁紀
2. 発表標題 脂肪細胞における時計遺伝子 Bmal1 は FGF21 の発現調節を介して全身のイン スリン感受性を制御する
3. 学会等名 第26回アディポサイエンス・シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 榛葉繁紀, 和田平, 戸塚ゆ加里, 北浦慧, 鈴木捺也, 廣田幸奈, 高橋真美
2. 発表標題 時計遺伝子 Bmal1 欠損は高脂肪食負荷による大腸がん発症リスクを増加する
3. 学会等名 第26回アディポサイエンス・シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 和田平, 山本晋子, 高杉幸子, 石井宏剛, 斉藤かおり, 鈴木正泰, 内山真, 吉種光, 深田吉考, 榛葉繁紀
2. 発表標題 アディポネクチンは糖・脂質代謝の概日リズムを制御する
3. 学会等名 第33回分子糖尿病学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 和田平, 坂井 晶紀, 宮内 俊幸, 田辺 真夕, 石井 宏剛, 高杉 幸子, 榛葉 繁紀
2. 発表標題 Aryl hydrocarbon receptorによる非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の肝線維化制御機構の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北浦 慧, 石井宏剛, 和田平, 榛葉繁紀
2. 発表標題 マウス成獣期においてBMAL1は水代謝を制御する。
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井宏剛, 北浦慧, 高杉幸子, 和田平, 榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子Bmal1による脂肪細胞ベージュ化の制御
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井宏剛, 北浦慧, 高杉幸子, 和田平, 榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子Bmal1による脂肪細胞ベージュ化の制御
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井 宏剛,北浦 慧,高杉 幸子,和田 平,榛葉 繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子BMAL1による脂肪細胞ベージュ化の制御
3. 学会等名 第21回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフィォーラム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井 宏剛,北浦 慧,高杉 幸子,和田 平,榛葉 繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子BMAL1による脂肪細胞ベージュ化の制御
3. 学会等名 フォーラム2022 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 和田平、坂井晶紀、田辺真夕、石井宏剛、高杉幸子、榛葉繁紀
2. 発表標題 Aryl hydrocarbon receptorによる非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の肝線維化制御機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井宏剛、北浦慧、高杉幸子、和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子BMAL1による脂肪細胞ベージュ化の制御
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 和田平、田辺真夕、石井宏剛、高杉幸子、榛葉繁紀
2. 発表標題 NASH発症に伴う肝線維化の概日リズム
3. 学会等名 第25回アディポサイエンスシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井宏剛、北浦慧、高杉幸子、和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子BMAL1による脂肪細胞ベージュ化の制御
3. 学会等名 第25回アディポサイエンスシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 和田平、田辺真夕、石井宏剛、高杉幸子、榛葉繁紀
2. 発表標題 NASH発症に伴う肝線維化の概日リズム
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井宏剛、保科秀樹、高杉幸子、和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子BMAL1による脂肪細胞の機能調節
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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