

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07982

研究課題名(和文) 非アルコール性脂肪肝炎に対する小腸脂肪酸輸送体を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for nonalcoholic steatohepatitis by targeting small intestinal fatty acid transporters

研究代表者

山本 安則 (Yamamoto, Yasunori)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20649066

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)：本研究は、腸管MTPを含む小腸脂肪酸輸送体を制御するPPAR アゴニストが、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の肝線維化を抑制するかを検証することを目的とした。高脂肪食を与えたNASHモデルラットをPemafibrate(PPAR アゴニスト)投与群と非投与群に分け評価したところ、Pemafibrate投与群では、非投与群と比べて腸管内の脂肪滴沈着が著明に減少し、脂質調節関連分子の発現が抑制された。また、肝線維化の改善と線維化関連分子の発現低下が認められた。PPAR アゴニストは、腸管での脂肪滴形成と吸収を抑制することで肝線維症を軽減し、NASHの新たな治療ターゲットとなる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

【学術的意義】本研究は、NASHモデルラットにおいて、選択的PPAR モジュレーターであるpemafibrateが腸管での脂質吸収および肝線維化に及ぼす影響を明らかにした初めての研究である。本研究の結果は、NASHにおける腸管脂質吸収動態の調節が、肝線維化を予防する新たな治療戦略となる可能性を示唆している。

【社会的意義】NASHは肝硬変や肝細胞がんに進行し得る慢性疾患であり、その有病率は人口の3-5%と推計される。本研究で示されたpemafibrateによるNASHの腸管脂質吸収抑制と肝線維化軽減効果は、NASHの新たな治療選択肢となる可能性があり、患者の予後改善に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to verify whether PPAR agonists, which control intestinal fatty acid transporters including intestinalMTP, suppress liver fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). NASH model rats fed a high-fat diet were divided into Pemafibrate (PPAR agonist) administration group and non-administration group, and lipid deposition in the small intestine and the expression of lipid metabolism-related genes, as well as liver fibrosis and α -SMA level, were evaluated. In the Pemafibrate-treated group, lipid droplet deposition in the intestinal tract was markedly reduced and the expression of lipid regulation-related molecules was suppressed compared to the non-treated group. In addition, improvement in liver fibrosis and decreased expression of fibrosis-related molecules were observed. PPAR agonists reduce liver fibrosis by inhibiting lipid droplet formation and absorption in the intestine, suggesting that they may serve as a new therapeutic target for NASH.

研究分野：消化器病学

キーワード：NASH 腸管脂肪酸吸収 選択的 PPAR モジュレーター 肝線維化抑制 pemafibrate

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肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis : NASH) は、肝硬変や肝細胞がんに行進し得る予後不良の慢性疾患であるが、未だ十分なエビデンスのある治療薬は登場していない。近年、飽和脂肪酸であるパルミチン酸が肝脂肪毒性を有し、NASH の発症や線維化進展に強く関与することが報告された。申請者らの先行研究では、NASH 患者の小腸におけるパルミチン酸吸収能が健常人より有意に亢進していることが判明した。さらに、NASH 小腸粘膜上皮において、長鎖脂肪酸受容体 CD36、腸管カイロミクロン合成の律速酵素である microsomal triglyceride transfer protein (MTP) など複数の脂肪酸吸収関連蛋白が過剰発現していることも明らかとなった。これらの知見は、小腸における食事性脂肪酸の調節が NASH の新たな治療標的となる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、NASH 小腸粘膜における脂肪酸吸収関連蛋白を阻害し、腸管パルミチン酸吸収を抑制することで、NASH の肝線維化進展を改善し得る可能性があるか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 腸管 MTP 阻害剤を用いた腸管パルミチン酸吸収抑制試験

研究立案当初は、NASH モデルラットに対する小腸特異的 MTP 阻害薬を用いた小腸パルミチン酸吸収阻害試験を計画した。しかし、使用予定の小腸特異的 MTP 阻害薬の販売が急遽中止となり、研究遂行困難となった。そこで代替案として、マウスにおける基礎実験データがある小腸特異的 MTP 阻害薬 (SLx-4090) を使用し、NASH モデルマウスを用いた腸管パルミチン酸吸収阻害試験を再計画した。既報に準じ超高脂肪コリン欠乏メチオニン減食による NASH モデルマウスを作成し、腸管特異的 MTP 阻害剤投与群、非投与群に分け、以下の比較検討を行った。

a) 食後トリグリセリド分泌の評価

小腸特異的 MTP 阻害薬 (SLx-4090) を強制注入し、12 時間絶食の後、オリーブオイルを経口投与した。その投与前・投与 2 時間後・投与 4 時間後の血漿 TG 濃度を測定した。

b) 小腸脂肪酸輸送蛋白の発現調整解析

小腸全組織を採取し各脂肪酸吸収関連蛋白 (CD36、MTTP、FABP、FATP4 など) について real-timePCR 法により mRNA 量を測定した。

c) 肝線維化マーカーの評価

炎症性ケモカインマーカー (Cxcl2、Ccl2) や肝星細胞の線維化マーカー (α SMA、TGF β) の mRNA 量を評価した。また、肝全体のコラーゲン沈着、 α SMA 局在を免疫染色で評価し、肝炎の活動性 (NAS スコア)、線維化進展を比較した。

3-2. NASH モデルラットにおける pemafibrate の腸管脂質代謝および肝線維化抑制効果についての検討。

3-1 の検討において MTP 単独阻害が十分に行えず、肝線維化マーカーの改善も限定的であったため、複数の脂質代謝関連蛋白を調整するペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 α (PPAR α) に着目した。申請者らは、選択的 PPAR α モジュレーターである pemafibrate を NASH モデルラットに投与することで、腸管脂肪滴が減少することを確認した (未発表データ)。そこで、pemafibrate を用い腸管脂肪酸吸収関連蛋白の制御と肝線維化の関連を明らかにするため以下の研究を行った。

a) NASH モデルラットの作成と pemafibrate 投与群、非投与群の条件設定

本研究は愛媛大学動物実験委員会の承認を得て実施した (承認番号 05T186-2)。8 週齢の Sprague-Dawley (SD) ラットに高脂肪・高コレステロール食を 9 週間摂取させ、NASH モデルラットを作成した。その後、ラットを pemafibrate 投与群と非投与群の 2 群に分け、7 日間 pemafibrate もしくはプラセボを 1 日 1 回強制経口投与した。実験期間中、体重および食餌量を記録し、糞便を回収した。

b) 腸管脂肪吸収量の評価

腸管における脂肪吸収量を評価するため、空腸組織を採取し、Oil red 染色により腸管内脂肪沈着量を評価した。また、食餌と糞便中の脂肪量を Bligh-Dyer 法で抽出・定量し、以下の式により小腸からの脂肪吸収率を算出した。

$$\text{脂肪吸収率} = (\text{食餌中脂肪量} - \text{糞便中脂肪量}) / \text{食餌中脂肪量} \times 100$$

c) 腸管脂質代謝関連遺伝子発現の評価

小腸における脂質代謝の変化を評価するため、空腸組織から RNA を抽出し、腸管脂肪吸収および代謝動態に関与する遺伝子 (Ppara, Cd36, Mtp, Fabp1, Fabp2, Fatp4, Apoa-IV) の発現

量を定量した。

d) 肝線維化および肝星細胞活性化の評価

NASHの肝線維化進行度を評価するため、肝組織の Sirius Red 染色および α -SMA 免疫染色を行った。Image J を用い染色陽性面積を定量し、肝線維化の重症度および肝星細胞活性化の指標とした。また、肝臓組織から RNA を抽出し、肝線維化マーカーおよび肝星細胞活性化マーカー(Tgfb, Col1a1, Acta2, Timp1, Serpine1)の mRNA 量を定量した。

4. 研究成果

【研究方法 3 - 1 の結果】

小腸特 MTP 阻害薬投与群では、非投与群と比較し、オリーブオイル投与前後での血清トリグリセリド変化量は抑制傾向が見られたが、有意差はなかった(図 1)。また、小腸 MTP の mRNA 量は、小腸 MTP 阻害薬投与群は非投与群と比較し、低下がみられたものの、有意差がなかった(図 2)。肝組織において、小腸 MTP 阻害薬投与群では、線維化や肝星細胞活性化に関する因子の発現が一部のみ低下していた(図 3)。SLX-4090 投与量を 2 倍量、3 倍量に増やし同研究をおこなったが、十分な小腸 MTP 阻害効果は得られなかった。

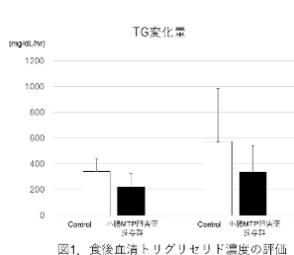


図1. 食後血清トリグリセリド濃度の評価

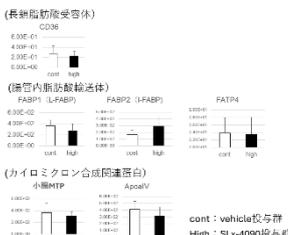


図2. 小腸における脂肪酸輸送関連蛋白質の発現

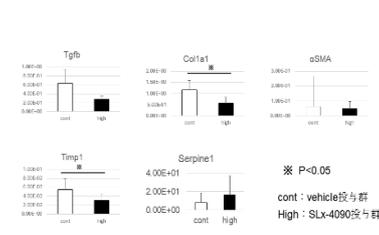


図3. 小腸における脂肪酸輸送関連蛋白質の発現

【研究方法 3 - 2 の結果】

NASH モデルラットにおける pemafibrate 投与による腸管脂質吸収の検討では、pemafibrate 投与群は、非投与群と比較して、小腸における脂肪沈着量と脂肪吸収率が有意に低下した($p = 0.0472$, 図 4)。NASH モデルラットの腸管における PPAR α および脂肪酸吸収・輸送関連分子の発現の検討では、Pemafibrate 投与群は非投与群と比較して、小腸における PPAR α の発現が有意に増加していた($p = 0.0367$)。一方、長鎖脂肪酸の取り込みに関与する CD36、腸内脂肪酸輸送に関与する FABP1、カイロミクロン合成の律速酵素である MTP などの脂質吸収関連分子の発現は、pemafibrate 投与群で有意に低下していた(それぞれ $p = 0.0304$, 図 5)。さらに肝組織における線維化および肝星細胞活性化に対する pemafibrate 投与の影響の検討では、pemafibrate 投与群では、非投与群と比較して、肝線維化ならびに α -SMA 沈着の抑制が確認された(図 6)。また、pemafibrate 投与群において、TGF- β 、Collagen 1a1、 α -SMA などの肝線維化関連分子や肝星細胞活性化因子の mRNA 量は有意に低下していた(図 7)。

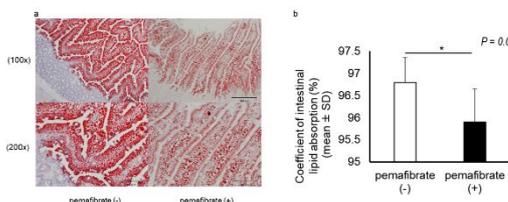


図4 (a) オイルレッド O で染色した小腸組織の代表画像。上: $\times 100$ 、スケールバー: 200 μ m 下: $\times 200$ 、スケールバー: 100 μ m。
(b) 腸管脂質吸収係数。* $P < 0.05$

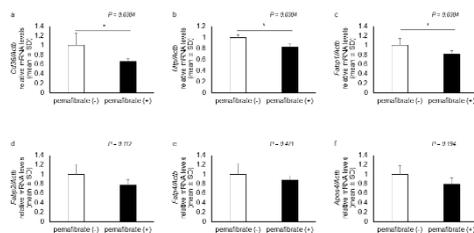


図5 腸管における脂肪酸および脂質の吸収に関与する遺伝子の発現。

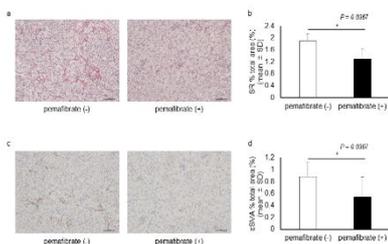


図6 (a) シリウスレッド染色。倍率 $\times 200$ 、スケールバー: 100 μ m。(b) 肝臓におけるシリウスレッド染色面積。* $P < 0.05$ 。(c) 抗 α -SMA 抗体。 $\times 200$ 、スケールバー: 100 μ m。(d) 肝臓における抗 α -SMA抗体の面積。* $P < 0.05$

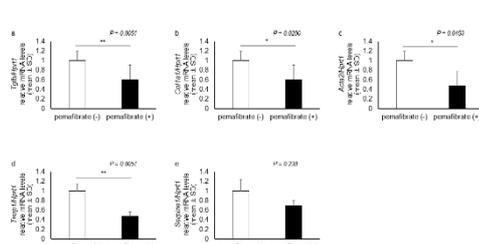


図7 肝臓の線維化およびHSC活性化に関する遺伝子の発現。

以上の結果から、pemafibrate は、NASH モデルラットにおいて、小腸での脂質滴合成と吸収を減少させ、肝星細胞の活性化を抑制し、肝線維化を阻害することが明らかとなった。本研究は、PPAR α アゴニストが NASH の小腸脂肪吸収および脂質滴合成に及ぼす影響を、in vivo で組織学的に評価した初めての研究である。

【結語】

pemafibrate による複数の腸管脂質代謝関連分子の制御は、NASH 腸管における脂肪滴形成と脂質吸収を減少させ、肝線維化を軽減した。NASH における腸管脂質吸収動態の調節は、肝線維化を予防する新たな治療戦略となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田 正也、花山 雅一、山本 安則、日浅 陽一
2. 発表標題 NASHモデルラットにおけるpemafibrateの腸管脂質代謝および肝線維化抑制効果
3. 学会等名 第36回 肝類洞壁細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田 正也、花山 雅一、山本 安則、吉田 理、池田 宜央、日浅 陽一
2. 発表標題 NASHモデルラットにおけるpemafibrateの腸管脂質代謝および肝線維化抑制効果
3. 学会等名 第41回サイトプロテクション研究会
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
---------------------------	-----------------------	----

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