様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 １８ 日現在

機関番号：３３９０５
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2024
課題番号：２１Ｋ１０４０６

研究課題名（和文）胆汁酸合成酵素CYP7A1を介した高血圧と高脂肪食のNASH発症・進展相互作用

研究課題名（英文）Association of fibrotic steatohepatitis rat fed high-fat-cholesterol diet with hypertension via bile acid synthesis enzyme CYP7A1

研究代表者
内藤　久雄（Naito, Hisao）

金城学院大学・生活環境学部・教授

研究者番号：９０５４７５５６

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）：高脂肪・高コレステロール飼料（HFC）により肝臓の炎症・線維化が進展する高血圧自然発症ラット（SHR）に降圧剤ヒドララジンを投与し、肝臓のプロテオーム解析をした結果、降圧剤により肝線維化進展が抑制された。
次に、先行研究で高血圧と胆汁酸合成酵素CYP7A1蛋白に正の相関があり、Cyp7a1 mRNAには変化がなく、Cyp7a1プロモーター領域のDNAメチル化頻度が増加していたことから、SHRに降圧剤を投与した肝臓からCyp7a1のDNAメチル化頻度やmRNA発現量を測定した。その結果、降圧剤によりCyp7a1のDNAメチル化頻度は低下し、mRNA発現量は増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
高血圧がNASHの原因の１つとして報告されているが、詳細なメカニズムは不明である。今回の研究結果から、血圧の抑制はNASH進展に対して抑制効果があることが確認され、より強固な証拠となった。以上のことから、高血圧予防はNASH予防につながる重要なポイントとして保健指導などに有用な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：Hypertensive spontaneously hypertensive rats (SHRs) fed a high-fat-cholesterol diet (HFC) developed fibrotic steatohepatitis. Hydralazine, an antihypertensive agent, was administered to these rats, and proteomic analysis of the liver was performed. The results confirmed that the antihypertensive agent suppressed fibrotic steatohepatitis.
Previous studies have shown a positive correlation between hypertension and the bile acid synthesis enzyme CYP7A1 protein expression, with no changes in Cyp7a1 mRNA expression but an increase in DNA methylation frequencies in Cyp7a1 promoter region. Therefore, we measured the DNA methylation frequencies and the mRNA expression levels in the livers of SHRs administrated with the antihypertensive agent. The results showed that the antihypertensive agent reduced the frequencies of the DNA methylation and increased the mRNA expression.

研究分野：衛生学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎　線維化　高血圧　プロテオミクス　DNAメチル化　CYP7A1　ヒドララジン　胆汁酸

様　式　C－１９、F－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

我が国の非アルコール性脂肪性肝疾患・肝炎（NAFLD/NASH）は近年増加傾向である。一方、ウイルス性肝炎は治療薬の開発により減少傾向であり、今後肝疾患の多くは NAFLD/NASH になることが予測されている。NAFLD/NASH のリスク因子として、高脂血症だけでなく高血圧、糖尿病などが関与しており、NAFLD/NASH の診断・予防・治療法は十分確立されておらず、エビデンスに基づいた方法論の確立が急務である。

我々は高脂肪・高コレステロール飼料(HFC)摂取により短期間で脂肪肝炎から線維症に進展する NASH モデルラット(SHRSP5/Dmcr)を開発した [1]。先行研究で SHRSP5/Dmcr と系統元 SHRSP との解析により、コレステロール代謝産物である胆汁酸の肝臓内蓄積による細胞毒性の増加が壊死・線維化に進展することを明らかにした [2-4]。これらの動物は高血圧モデルであり、系統元の高血圧自然発症ラット(SHR)も同様に HFC 摂取により SHRSP/5Dmcr より軽度であるが肝炎・線維症に進展した。しかし、正常血圧ラット(WKY)に同期間 HFC 摂取させても線維症を発症せず、肝線維化が進展するには高血圧とコレステロール蓄積が相乗的に作用して発症することが考えられた。また、これらの系統間の解析により、高血圧系ラットでのみ胆汁酸合成酵素 CYP7A1 蛋白の発現が HFC 摂取する以前から高血圧系ラットで高く、高血圧と肝線維化進展との関連が示唆された [5]。しかし、これらのラットの *Cyp7a1* mRNA の発現には正常血圧・高血圧動物間に差を認めておらず、前研究課題 18K10033 では mRNA 発現を介さないシグナル伝達メカニズム、すなわち後天的要因に着目し、*Cyp7a1* プロモーター領域の DNA メチル化頻度に違いがあるのではないかとの仮説の元に上記系統間の *Cyp7a1* 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化頻度を測定した。その結果、高血圧モデルでは正常血圧モデルよりも *Cyp7a1* プロモーター領域の DNA メチル化頻度が増加していた。

２．研究の目的

以上のことから、この病態の鍵は胆汁酸律速酵素 CYP7A1 蛋白過発現及び *Cyp7a1* プロモーター領域の DNA メチル化頻度増加にあることが考えられ、今回の研究では高血圧と *Cyp7a1* メチル化頻度増加の関係を明らかにするために、高血圧モデルに降圧剤を摂取させ、HFC 摂取による NASH 進展予防の分子基盤をプロテオーム解析などにより明らかにし、CYP7A1 が介在する NASH の非侵襲的バイオマーカーを創出し、エビデンスに基づいた血圧管理からの予防・治療戦略を立てることを目的とした。

３．研究の方法

(1) 動物実験

8 週齢の雄 SHR を 2 群（各群 12 匹）に分け、1 群に降圧剤ヒドララジン(60 mg/L)を 2 週間投与（順化）し、残りの群は通常飼料のみとした。10 週齢に達したところ（実験開始）で、さらに 2 群に分け（計 4 群）、①コントロール(Ctrl)群、②Ctrl+降圧剤群、③HFC 群、④HFC+降圧剤群とし、8 週後(18 週齢)で解剖し、血清・肝臓サンプルを抽出した。血圧測定は 2 週間に 1 回のタイミングで行った。

(2) 病理標本作成及び血清生化学分析

4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した肝臓サンプルから病理標本作成し、病理染色、血清肝機能・脂質測定を行った。

(3) プロテオーム解析

肝臓サンプルを RIPA Buffer に溶解・調整後、次世代質量分析装置(Orbitrap LC-MS：藤田医科大学)でプロテオーム解析した。その他、関連する蛋白発現量を Western blot 法で、遺伝子発現量を mRNA 抽出後リアルタイム PCR 法で測定した。

(4) *Cyp7a1* プロモーター領域の DNA メチル化頻度測定

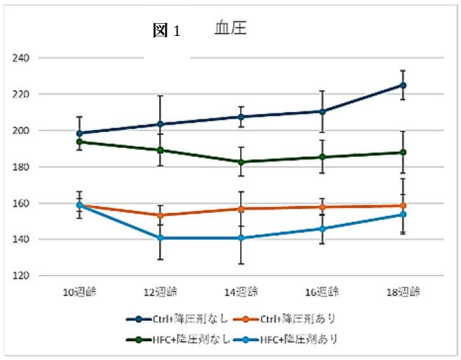
4 群の肝臓から DNA を抽出しバイサルファイト処理後、山梨大学（三宅先生）のところにある次世代シークエンサー（Ion PGM）を用いて *Cyp7a1* プロモーター領域の DNA メチル化頻度を測定した。

４．研究成果

(1)解剖時所見、血清生化学所見、血圧、病理評価

18 週齢時の肝体重比は Ctrl 群及び Ctrl+降圧剤群で 3.8±0.1、HFC 群で 8.9±0.4、HFC+降圧剤群で 8.2±0.6 であり、HFC 摂取により有意に増加し、HFC+降圧剤群は HFC 群よりもその増加が少なかった。この結果は血清生化学所見の肝機能値（AST、ALT、γ-GTP）も同様の結果となった。血清脂質値は先行研究同様、HFC 摂取により TC の増加を認めたが、TG は逆に低下していた。また、Ctrl+降圧剤投与群も Ctrl 群よりも TG 値の有意な低下を認めた（80→58 mg/dL）。

血圧は降圧剤投与群では 160mmHg 付近であるのに対し、Ctrl 群では 200～220mmHg であった（図 1 参照。また、HFC 群では Ctrl 群に比べ低く 190mmHg 前後であった。



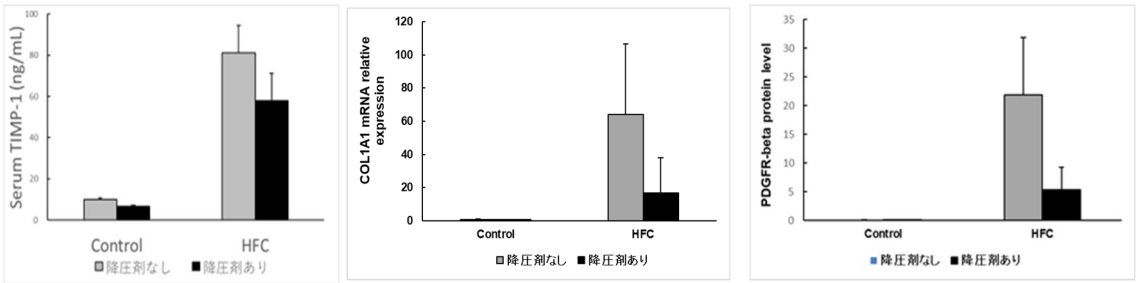
病理所見としては、降圧剤群は Ctrl 群、HFC 群よりも脂質（TG）沈着量が少なくなっていた。これは肝臓内脂質の測定結果と一致した。また HFC 摂取による線維化に関しても HFC+降圧剤群では有意に減少していた。

(3) プロテオーム解析

プロテオーム解析では、2500 種類の蛋白が検出された。前研究の系統間の解析に比べ、降圧剤の影響は Ctrl 群や HFC 群と大きな違いは少なかった。HFC 摂取により増加した蛋白としては、前研究同様 NASH や肝癌で増加することで近年注目されている CD44、α2-マクログロブリンが 100 倍以上増加したのに対し、HFC+降圧剤投与群では HFC 群に比べ、それぞれ 0.75 倍、0.12 倍と低下した。ただし、CD44 は前研究で線維化の認めない WKY 群でも HFC 摂取により増加していた。α2-マクログロブリンに関しては、クッパー細胞や線維芽細胞で産生されることから HFC+降圧剤群は線維化抑制に関連している可能性が示唆された。線維化に関するマーカも、HFC 群で増加しており、Collagen alpha-1(I)、procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2（PLOD2）、Platelet-derived growth factor（PDGF）などが HFC+降圧剤群で低下していた。Ctrl 群と Ctrl+降圧剤群で差が認められたものとしてチオレドキシン、サイトグロビンなど抗酸化関連マーカーが降圧剤投与により有意に増加していた。

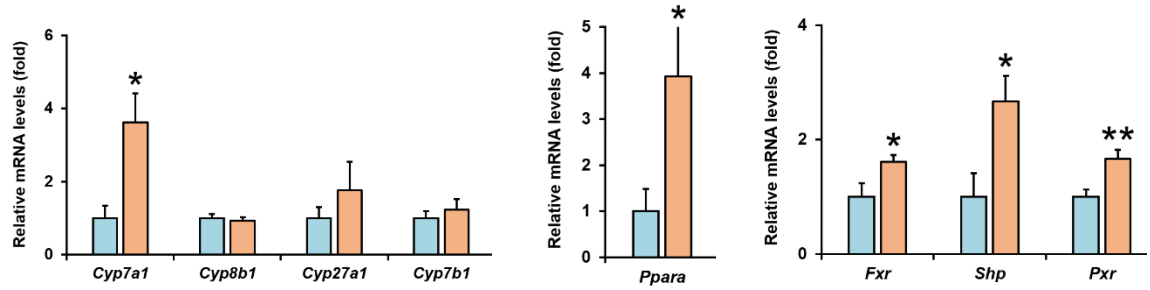
これらの結果をもとに血清 TIMP-1、Collagen1a1 mRNA、PDGF Receptor β 蛋白発現量を測定し、同様の結果が得られた（図 2 参照）。

図 2．線維化関連マーカー[6)]



次に、Ctrl 群と Ctrl+降圧剤群に関して胆汁酸合成、脂質代謝に関連する核内受容体の mRNA 発現量を測定した結果、胆汁酸律速酵素の *Cyp7a1* mRNA 発現が有意に増加しており、脂質代謝に関連する核内受容体（Ppara，Fxr，shp，Pxr）も降圧剤により発現が有意に増加していた（図 3 参照）。

図 3. 胆汁酸合成酵素、脂質代謝関連核内受容体の mRNA 発現量 [7)]



(4) *Cyp7a1* プロモーター領域の DNA メチル化頻度

Ctrl 群に比べ Ctrl+降圧剤群は、複数の *Cyp7a1* プロモーター領域の DNA メチル化頻度を低下させた（3～6%）。また、前研究の正常血圧 WKY の *Cyp7a1* のメチル化頻度は降圧剤を与えた SHR ラットよりさらに低かった。即ち、血圧上昇と *Cyp7a1* のメチル化頻度は正の相関を示すことが考えられた。

以上の結果から、先行研究の高血圧モデルで肝線維化が進展することに加え、降圧剤の投与実験から血圧の上昇が肝線維化進展に重要な役割を果たすことが確認された。次に、降圧剤投与により *Cyp7a1* プロモーター領域の DNA メチル化頻度の低下を認め、高血圧と線維化進展との関連をより強固なものとした。しかし、降圧剤ヒドララジンの投与では正常血圧ラット WKY では認められていなかった *Cyp7a1* mRNA の発現増加も認められており、これがヒドララジンの効果なのかほかの降圧剤でも同様の結果をもたらすかはさらなる研究が必要である。

＜引用文献＞

① Kitamori K, Naito H, Tamada H, Kobayashi M, Miyazawa D, Yasui Y, Sonoda K, Tsuchikura S, Yasui N, Ikeda K, Moriya T, Yamori Y, Nakajima T. Development of novel rat model for high-fat and high-cholesterol diet-induced steatohepatitis and severe fibrosis progression in SHRSP5/Dmcr. Environ Health Prev Med 2012;17(3):173-82. doi: 10.1007/s12199-011-0235-9.

② Jia X, Naito H, Yetti H, Tamada H, Kitamori K, Hayashi Y, Wang D, Yanagiba Y, Wang J, Ikeda K, Yamori Y, Nakajima T. Dysregulated bile acid synthesis, metabolism and excretion in a high fat-cholesterol diet-induced fibrotic steatohepatitis in rats. Dig Dis Sci. 2013;58(8):2212-22. doi: 10.1007/s10620-013-2747-1.

③ Jia X, Suzuki Y, Naito H, Yetti H, Kitamori K, Hayashi Y, Kaneko R, Nomura M, Yamori Y, Zaitsu K, Kato M, Ishii A, Nakajima T. A possible role of chenodeoxycholic acid and glycine-conjugated bile acids in fibrotic steatohepatitis in a dietary rat model. Dig Dis Sci. 2014;59(7):1490-501. doi: 10.1007/s10620-014-3028-3.

④ Naito H, Jia X, Yetti H, Yanagiba Y, Tamada H, Kitamori K, Hayashi Y, Wang D, Kato M, Ishii A, Nakajima T. Importance of detoxifying enzymes in differentiating fibrotic development between SHRSP5/Dmcr and SHRSP rats. Environ Health Prev Med. 2016;21(5):368-381. doi: 10.1007/s12199-016-0539-x.

⑤ Yuan Y, Naito H, Jia X, Kitamori K, Nakajima T. Combination of Hypertension Along with a High Fat and Cholesterol Diet Induces Severe Hepatic Inflammation in Rats via a Signaling Network Comprising NF-κB, MAPK, and Nrf2 Pathways. Nutrients. 2017;9(9):1018. doi: 10.3390/nu9091018.

⑥ Yuan Y, Naito H, Kitamori K, Hashimoto S, Asano T, Nakajima T. The antihypertensive agent hydralazine reduced extracellular matrix synthesis and liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis exacerbated by hypertension. PLoS One. 2020;15(12):e0243846. doi: 10.1371/journal.pone.0243846.

⑦ Zhang X, Chen J, Takeda N, Kitamori K, Naito H, Nakajima T, Tanaka N. Hydralazine Lowers Serum Triglyceride Levels by Enhancing Farnesoid X Receptor Signaling and Adipose Triglyceride Lipase Expression : In Vivo Evidence from Male Spontaneously Hypertensive Rats. **信州医学雑誌** 2025;73(3):165-177.

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 Asano Tomomi、Taki Kentaro、Kitamori Kazuya、Naito Hisao、Nakajima Tamie、Tsuchihashi Hitoshi、Ishii Akira、Zaitsu Kei	４．巻 6
２．論文標題 One-Pot Extraction and Quantification Method for Bile Acids in the Rat Liver by Capillary Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry	５．発行年 2021年
３．雑誌名 ACS Omega	６．最初と最後の頁 8588～8597
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.1c00403	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 Zhang X, Chen J, Takeda N, Kitamori K, Naito H, Nakajima T, Tanaka N.	４．巻 73(3)
２．論文標題 Hydralazine Lowers Serum Triglyceride Levels by Enhancing Farnesoid X Receptor Signaling and Adipose Triglyceride Lipase Expression : In Vivo Evidence from Male Spontaneously Hypertensive Rats.	５．発行年 2025年
３．雑誌名 信州医学雑誌	６．最初と最後の頁 165～177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 内藤久雄、北森一哉、橋本沙幸、浅野友美、那須民江
２．発表標題 ウルソデオキシコール酸添加による高脂肪食誘導性肝炎・線維化とオートファジー
３．学会等名 第93回日本衛生学会学術総会
４．発表年 2023年

１．発表者名 内藤久雄、山口央輝、橋本沙幸、浅野友美、北森一哉、那須民江
２．発表標題 プロテオーム解析を用いた降圧剤による肝炎・肝線維化抑制因子の探索
３．学会等名 第92回日本衛生学会学術総会
４．発表年 2022年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金城学院大学　学術研究データベース
https://research.kinjo-u.ac.jp/kighp/k03/resid/S001599;jsessionid=CA5BEC389F5EA2218A882370D9C9AF09

Reserchmap
https://researchmap.jp/naitoh1973

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
研究協力者	三宅　邦夫 (Miyake Kunio)		DNAメチル化解析
研究協力者	山口　央輝 (Yamaguchi Hisateru)		プロテオーム解析
連携研究者	那須　民江 (Nakajima Tamie) (10020794)	中部大学・生命健康科学部・客員教授 (33910)	
連携研究者	北森　一哉 (Kitamori Kazuya) (80387597)	金城学院大学・生活環境学部・教授 (33905)	

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