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　６ 年　６ 月 ２１ 日現在

機関番号：３２７０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ１０４２１

研究課題名（和文）脂肪性肝炎の進展における炎症メディエーターに対する亜鉛制御の解明

研究課題名（英文）Study on the effects of zinc on the fatty liver

研究代表者
吉岡　亘（Yoshioka, Wataru）

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：８０４２５４９６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は亜鉛欠乏が肝炎の増悪因子になる可能性についてマウスを用いた実験モデルを構築して検討した。まず、食餌性の脂肪肝と薬剤誘導性の亜鉛欠乏の2つの条件について個別にまたは重ね合わせて、影響が相加的には表れないことを明らかにした。次いで、亜鉛欠乏が肝臓において炎症関連因子をどのように変化させるかということに焦点を当て、薬剤誘導性の亜鉛欠乏モデルマウスにおける遺伝子発現変化と関連の変化について実験研究を実施した。本研究の結果から、亜鉛欠乏状態は全身的に共通して好中球の増加を引き起こし、肝臓では炎症の前段階ないし初期段階まで進展すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
運動不足と現代的食生活を背景としてメタボリックシンドロームが社会的な問題となっている。このようなエネルギー代謝障害を基盤とする生活習慣病の肝での病態が脂肪肝であり、脂肪肝炎から肝硬変および肝癌への進展が問題であると考えられる。本研究は、単純性脂肪肝から脂肪肝炎への増悪という観点から、亜鉛欠乏が肝臓において炎症性の反応を引き起こすかといういうことならびにその分子メカニズムを検討した。その結果、亜鉛欠乏によって肝臓に炎症準備状態になるここがことが判明した。この状態が単純性脂肪肝を脂肪肝炎に進展させるリスク因子となる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the potential of zinc deficiency as an exacerbating factor for hepatitis by establishing an experimental model in mice. First, the effects of the two conditions, dietary fatty liver and drug-induced zinc deficiency, were examined individually or in combination, and it was found that the effects were not additive. Next, experimental studies were conducted on changes in gene expression and related changes in a mouse model of drug-induced zinc deficiency, focusing on how zinc deficiency alters inflammation-related factors in the liver. The results of this study suggest that zinc deficiency commonly leads to a systemic increase in neutrophils and progresses to the pre- or early stages of inflammation in the liver.

研究分野：環境衛生学

キーワード：zinc　inflammation　liver

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

生体内のタンパク質には亜鉛を含むものが多く、およそ10%の生体内タンパク質がzinc fingerモチーフ等の構造を介して亜鉛を結合している。その内の約1,000種が酵素であることから、生体内の酵素が担う生化学反応には亜鉛の寄与が大きいと考えられる。このような背景から、生体内の化学反応の要である肝臓は、亜鉛結合酵素群を介して亜鉛の影響を強く受けると想定された。この想定に符合して、慢性肝障害には亜鉛欠乏症が併発することが多いと報告されていた。また、肝硬変患者に亜鉛補充すると肝機能指標が改善する。これらの知見は、血清亜鉛値は肝機能に関係し、血清亜鉛低値は肝障害および肝疾患のリスク因子となることを示唆している。しかしながら、どのような条件と機序で亜鉛が肝臓に影響を及ぼすのかということは明らかでなかった。一方で、現代社会では運動不足および栄養摂取過多に起因するメタボリックシンドロームが問題となっている。メタボリックシンドロームの肝での病態は脂肪肝である。脂肪肝は炎症を伴うことで脂肪性肝炎から肝硬変へと進展していく。従って、肝臓で炎症が生じる要因および機序を明らかにすることが重要であると考えられた。

２．研究の目的

亜鉛欠乏状態と肝臓での炎症の関係を解明することを目標とし、実際に生体内で生じる現象を捉えるために、動物個体において亜鉛欠乏が肝臓に及ぼす影響を明らかにすることとした。研究の目的は、動物体内の亜鉛欠乏状態と肝臓における炎症に関連する反応について定量的に関係を解明することとした。また、亜鉛欠乏状態が肝臓に及ぼす影響の時間的変化を明らかにすることを目的とした。

３．研究の方法

動物個体において亜鉛欠乏状態を惹起する亜鉛欠乏モデルを作成するためにマウスに亜鉛キレート剤を投与することで体内の亜鉛濃度を低下させることとした。このためにN,N,N′,N′-テトラキス(2-ピリジルメチル)エチレンジアミン(TPEN)をマウスに投与する実験系を構築した。投与用量および経過時間の影響を明らかにするために、血漿亜鉛濃度および肝臓中亜鉛濃度に基づいて亜鉛欠乏状態を評価し、肝臓の組織学解析と遺伝子発現解析を実施した。組織学解析については、Hematoxylin-Eosin染色により肝組織の障害の程度と現れ方を評価した。また、Myeloperoxidaseに対する免疫染色によって好中球の浸潤を評価した。さらに、遺伝子発現解析において顕著な発現増加をみいだしたCalprotectinの免疫染色を実施した。遺伝子発現解析については、肝障害の発症の有無および程度についてはQuantitative reverse transcription polymerase chain reaction法によって実施した。肝障害については、L-Alanineを用いた色素法を利用して定量した血漿ALP活性を指標として評価した。肝臓中の炎症性細胞浸潤の原因を探索するために、末梢血を用いて血球の分析をおこなった。さらに、脂肪肝と亜鉛欠乏による肝臓における炎症正反応の関連について検討するために高脂肪食を与えたマウスを用いたTPEN投与実験を実施した。

４．研究成果

亜鉛欠乏が肝炎の増悪因子になる可能性についてマウスを用いた実験モデルを構築して検討した。まず、食餌性の脂肪肝と薬剤誘導性の亜鉛欠乏の2つの条件について個別にまたは重ね合わせて、影響が相加的には表れないことを明らかにした。次いで、亜鉛欠乏が肝臓において炎症関連因子をどのように変化させるかということに焦点を当て、TPEN誘導性の亜鉛欠乏モデルマウスにおける遺伝子発現変化と関連の変化について実験研究を実施した。その結果、亜鉛欠乏によって、Calprotectin両サブユニットであるS100a8ならびにS100a9のmRNAならびにタンパク質の量が増加することを見出した。これらのmRNAはTPEN用量に依存して発現量が増加した。両者の発現レベルの相関係数が0.998と非常に高いことから、同様のメカニズムで発現誘導を受けてヘテロダイマーとして機能していると推定された。Calprotectinの発現が多い炎症性細胞として好中球を候補に挙げて免疫組織学解析をおこない、好中球の増加を確認した。また、好中球の増加は*Myeloperoxidase* mRNAの増加によって確認した。マクロファージ浸潤について検証するためにその表面抗原F4/80をコードする*Adgre1* mRNAを定量したところ増加はみとめられなかった。すなわち、マクロファージの浸潤は肝において生じていないと考えられた。好中球の増加がみとめらたことから炎症性細胞の走化因子の探索のために遺伝子発現解析をおこない、*Cxcl1*、*Cxcl2*、*Ccl2*の発現増加を見出した。*Cxcl4*は発現量が変化していなかった。炎症性サイトカインとして*Tnf-a*、*Il-1b*、*Il-6*について遺伝子発現解析をおこない、最高用量ではIl-1bの増加がみとめられたが、増加の程度は顕著ではなかった。血液の分析からは、TPEN投与マウスの血中で白血球数が増加していることが判明した。増加の内訳として、リンパ球、好中球、単球が寄与していた。また、血液分析では網赤血球の減少が生じていることが判明した。血漿ALT活性は上昇がみとめられなかった。

以上の結果から、亜鉛欠乏マウスモデルにおいて、好中球の肝臓中への浸潤に伴う炎症関連分

子の増加が生じることが明らかとなった。この現象には、血中での白血球の増加が関連している可能性がある。走化因子の増加が原因となっているのかあるいは結果として生じたのか、本研究からはどちらの可能性も考えられた。マクロファージの増加がみとめられなかったこと、炎症性サイトカインの明瞭な増加までは生じていなかったこと、肝障害マーカーの増加が認められなかったこと、これらのことからは、炎症の初期段階の反応が亜鉛欠乏によって生じ、組織障害が起こる炎症までには至っていないと考えられた。炎症の初期段階であることは、肝炎の発症や進展を引き起こす機序となる可能性が考えられた。これらのことを総合して、亜鉛欠乏状態は全身的に共通して好中球の増加を引き起こし、肝臓では炎症の前段階ないし初期段階まで進展すると考えられた。

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 森美咲　吉岡亘
２．発表標題 高脂肪食負荷およびTPEN投与がマウス肝臓に及ぼす影響
３．学会等名 第165回日本獣医学会学術総会
４．発表年 2022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