

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 7 年 6 月 16 日現在

機関番号：32517

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2024

課題番号：21K11683

研究課題名（和文）ビタミンE同族体の肝線維化抑制効果を増強させる間質環境の探索

研究課題名（英文）Investigation of the interstitial microenvironment in potentiating the anti-fibrotic effects of vitamin E analogues in hepatic fibrogenesis

研究代表者

石川 朋子（Ishikawa, Tomoko）

聖徳大学・人間栄養学部・教授

研究者番号：70212850

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）：ビタミンE投与は、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）唯一の薬剤療法であるが、ヒト臨床研究における効果は一様ではない。その一因として、ビタミンE同族体の効果は、病期によって異なる間質環境の影響を受けることが予測される。今回、組織損傷時の間質環境を規定する細胞外マトリックスであるテネイシンC（TNC）を中心に、ビタミンE同族体の治療効果との関連を検証した。NASHモデル動物において、ビタミンE同族体、特にトコトリエノール（T3）は、発症初期および治癒過程において肝線維化関連遺伝子発現を有意に低下させた。また治癒過程におけるT3の効果は、TNC発現および局在の影響を受けることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASHは重篤化すると肝硬変や肝癌へと進展する生活習慣関連疾患で、近い将来、肝癌の主因になると考えられている。NASHに特化した治療薬は開発途上であり、ビタミンE投与は、今もなお唯一の薬剤療法である。しかしビタミンE投与は治療効果への期待と長期投与に伴う副作用への懸念のバランスから、絶対的選択肢にはなっていない。本研究成果は、ビタミンE、特にT3は、NASH発症初期および初期病態からの緩徐な回復期において線維化抑制効果を発揮すること、間質環境によってその効果が失われることを示している。ビタミンEの短期投与に適した病期の判断や、同族体を含めた新規配合治療製剤開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Administration of vitamin E is the sole medication for nonalcoholic steatohepatitis (NASH), but its efficacy in human clinical studies has been inconsistent. One reason for this is that the efficacy of vitamin E analogues is expected to be influenced by the interstitial environment, which differs depending on the stage of the disease. In this study, we focused on tenascin-C (TNC), an extracellular matrix that determines the interstitial environment during tissue injury, and examined its relationship to the therapeutic efficacy of vitamin E analogues. In diet-induced NASH model mice, vitamin E analogues, especially tocotrienol (T3), significantly reduced the expression of hepatic fibrosis-related genes during the early onset and healing process. It was also suggested that the effect of T3 during the healing process was influenced by TNC expression and localization.

研究分野：機能形態学 栄養化学

キーワード：肝線維化 ビタミンE 間質 細胞・組織

様式 C-19、F-19-1 (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、「NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2020」において、組織診断あるいは画像診断で脂肪肝を認め、アルコール性肝障害など他の肝疾患を除外した病態と定義される。このうち炎症や線維化を伴う NASH は、肝硬変や肝癌などに進展する進行性疾患である。ウイルス性肝炎の克服以降は、肝癌の主因となる生活習慣関連疾患として、予防法および治療法の開発が求められている。2020 年の診療ガイドラインにおいても、肥満や高血圧などの基礎疾患が無い患者の場合、NASH 治療の選択肢は生活習慣の改善とビタミン E 投与のみである。ビタミン E は、血中 ALT を低下させ、不可逆的ともいわれた肝硬度(肝線維指標)を軽減するとの臨床報告もあり、ランダム化比較試験においても有用性が示されている (N Engl J Med 362: 1675, 2010)。しかし長期の服用によって脳出血や前立腺癌の発症を増加させる可能性もあり、長期投与への懸念は未だに払拭されていない。NASH 患者の病態は様々である。ビタミン E の線維化抑制作用が最も効果的に発揮される病期や治療期が明らかとなれば、より短期間の効率的な投与が可能となる。

近年、NASH 治療法開発のための病態研究の主軸は、肝実質細胞への脂肪蓄積の軽減や炎症の鎮静から、重篤化の鍵となる肝線維化の抑制・改善へと推移している。肝組織の修復と線維化の分岐点では、肝微小環境を織りなす細胞外マトリックスが病態の推移に影響すると予測されている。ビタミン E の線維化抑制効果と間質環境との関連を解明することは、効率的治療法開発の新たな戦略として期待される。

2. 研究の目的

NASH 患者を対象とした臨床研究で、ビタミン E 投与は肝硬度を軽減するとの報告がある。食餌誘導性 NASH モデルマウスにおいても、我々は、ビタミン E 同族体には肝線維化を抑制する効果があるとの所見を得ている。ビタミン E 同族体の肝線維化抑制効果は、病態の進行度や治療過程によって異なることが予測される。そこで本研究では、病態の亢進と改善が複雑に展開する NASH 病態を様々な条件で再現し、ビタミン E 同族体の肝線維化抑制効果が最も発揮される病期を見定め、その効果を増強する肝微小環境について検討することとした。将来的にビタミン E 同族体の肝線維化抑制機構が明らかとなれば、ビタミン E の短期投与に適した病期の判断や、効果を増強させる間質環境へと導く配合治療剤開発の一助となることが期待される。

3. 研究の方法

(1) ビタミン E 同族体の NASH 予防効果

食事誘導性 NASH モデルとして、5 週齢の C57BL/6J 系雄性マウスにコリン欠乏・メチオニン制限・高脂肪食(以下、NASH 誘導食)を与え、1 週間後からビタミン E 同族体 (Toc: α -トコフェロールまたは T3: トコトリエノール混合物)の経口投与を 2 週間行い、発症初期における予防効果を検証した。

(2) NASH 治療過程におけるビタミン E 同族体の肝線維化抑制効果

NASH 治療としてのビタミン E 同族体投与を想定し、線維化抑制効果と間質環境の関係解明に向けて、様々な治療過程をモデル動物で再現し検証を行った。

初期 NASH 病態からの急激な回復期

5 週齢の C57BL/6J 系雄性マウスに NASH 誘導食を 3 週間与え、初期 NASH を誘導した。次いで標準食を基本とする回復食に切り替え、1 週間の回復期を設定した。回復食にビタミン E 同族体 (Toc, T3) を添加し、対照群(標準食)と比較した。

NASH 病態からの急激な回復期

5 週齢の C57BL/6J 系雄性マウスに NASH 誘導食を 6 週間与え、NASH を誘導したのち、標準食を基本とする回復食に切り替え、1 週間の回復期を設定した。回復食にビタミン E 同族体 (Toc または T3) を添加し、対照群(標準食)と比較した。

NASH 病態からの緩徐かつ長期の回復期

5 週齢の C57BL/6J 系雄性マウスに NASH 誘導食を 6 週間与え、NASH を誘導した。次いで回復食として高脂肪食を 1, 2, 6 週間与え、厳しい食事制限を伴わない緩徐な回復期を設定した。回復食に Toc を添加し、対照群(高脂肪食)と比較した。

(3) NASH 治療過程におけるビタミン E 同族体の線維化抑制効果と間質環境の関連

NASH 治療過程再現実験(2)においては、NASH 発症初期(1)で確認されたビタミン E の肝線維化抑制効果は認められなかった。モデル動物の系統を Th2 活性優位といわれる BALB/cA に変更して、治療過程におけるビタミン E 同族体の効果を検証した。次いで組織修復時の間質環境を規定する TNC の局在と組織修復との関連、TNC 欠損時の組織修復について形態学的な解

析を行った。

初期 NASH 病態からの緩徐な回復期

5 週齢の BALB/cA 系雄性マウスに NASH 誘導食を 3 週間与え、初期 NASH を誘導した。次いで回復食として高脂肪食を 2 週間与え、厳しい食事制限を伴わない緩徐な回復期を想定した実験系を設定した。回復食にビタミン E 同族体 (Toc または T3) を添加し、対照群 (高脂肪食) と比較した。また回復期の毛細血管化、炎症、線維化の各発症部位における間質環境変化について、TNC 局在との関連を解析した。

初期 NASH 病態からの緩徐な回復期における TNC 欠損の影響

ビタミン E 同族体の肝線維化抑制効果と間質環境の関連を検証するため、組織修復に関わる TNC を欠損させた BALB/cA 系 TNC ノックアウトマウス (TNCKO) を用いた。5 週齢の雄性 TNCKO を用い、と同様の実験デザインで、Toc または T3 の効果を対照群と比較した。肝微小環境を制御する各種間質関連分子の遺伝子発現および肝組織内局在を検討した。

本実験は、お茶の水女子大学動物実験委員会および東京大学バイオサイエンス委員会の承認を得て、法令及び同委員会規程を遵守して実施した。

4. 研究成果

(1) ビタミン E 同族体の NASH 予防効果

NASH 発症初期において、Toc または T3 経口投与による病理学的所見に違いは認められなかった。T3 投与により *Col1a1* 遺伝子発現は有意に低下、*Col1a1* も低下傾向を示した。NASH 発症初期において、T3 は線維化抑制に寄与することが明らかとなった (J Clin Biochem Nutr. 70(2)(2022) 140-146)。

(2) NASH 治癒過程におけるビタミン E 同族体の肝線維化抑制効果と間質環境

初期 NASH 病態からの急激な回復期

NASH 誘導食を 3 週間摂取した NASH 群に対し、回復食として標準食を 1 週間摂取した対照 (control) 群では、血清 ALT、AST の低下が確認され、組織学的解析では脂肪蓄積の減少が見られた。肝臓遺伝子発現については、炎症、線維化関連遺伝子の減少傾向が確認された (図 1)。しかしながらビタミン E 同族体投与の影響は認められなかった。

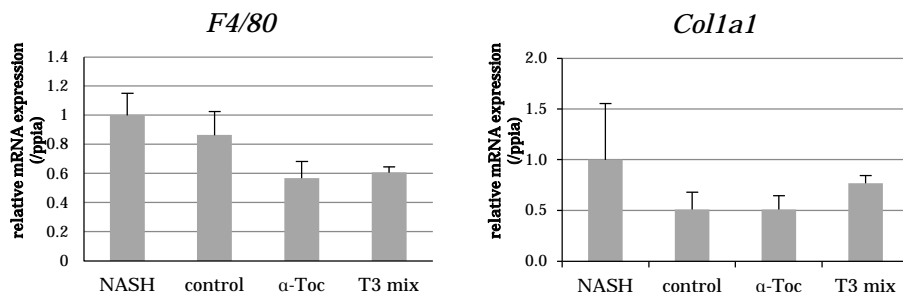


図 1 炎症および線維化関連遺伝子発現

NASH 病態からの急激な回復期

NASH 誘導食の給餌期間を 6 週間としてより亢進した病態からの回復期を再現した。NASH 群に対し、回復食として標準食を 1 週間摂取した control 群では、血清 ALT の低下が確認され、組織学的にはビタミン E 投与群で肝細胞内の脂肪滴軽減が顕著であった。線維化抑制効果については、T3 群で間質の膠原線維がやや軽減した。また線維化関連遺伝子の発現は低下傾向を示した (図 2)。しかしながらビタミン E 同族体投与の影響は認められなかった。

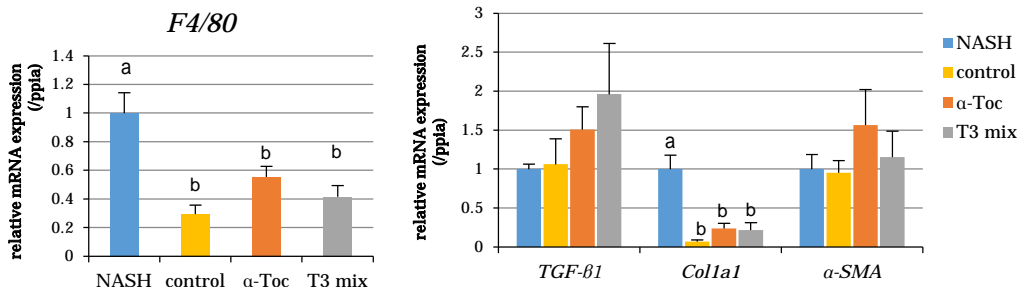


図 2 炎症および線維化関連遺伝子発現

NASH 病態からの緩徐かつ長期の回復期

血清 ALT、炎症関連遺伝子発現は回復期 (HF) 1 週から顕著に減少し、回復期 6 週では更に低値を示した。線維化関連遺伝子発現も回復期には速やかに減少し、特に *Col1a1* 発現は 6 週で更に顕著に低下した。しかし Toc 群に有意差は認められなかった (図 3)。

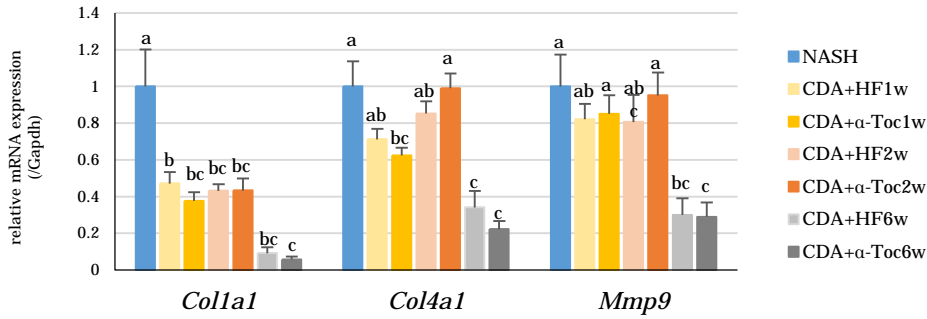


図 3 回復期間中の線維化関連遺伝子発現の推移

(3) ビタミン E 同族体の線維化抑制効果と間質環境の関連

初期 NASH 病態からの緩徐な回復期

回復期全群で肝重量および血清 AST 値は有意に低下した。血清 AST 値は、ビタミン E 投与により対照 (HFD) 群よりもさらに有意に減少した。線維化誘導因子 *Tgfb* の遺伝子発現は、ビタミン E 投与で HFD 群と比較して有意に減少した。星細胞活性化指標は、一般的指標である SMA (*Acta2*) に差はみられなかったが、ビメンチン (*Vim*) および *Pdgfb* はビタミン E、特に T3 投与により有意に低下した (図 4)。肝組織のアザン染色では、膠原線維に顕著な減少は確認できなかった (図 5)。 *Tnc* 遺伝子発現に群間差は認められなかったが、免疫組織化学解析では、TNC は HFD 群では炎症細胞集結部位に発現するのに対し、T3 群では肝細胞索の修復が認められる領域の間質に多く局在していた (図 6)。また同領域には、PDGFR の局在も認められた (図 7)。

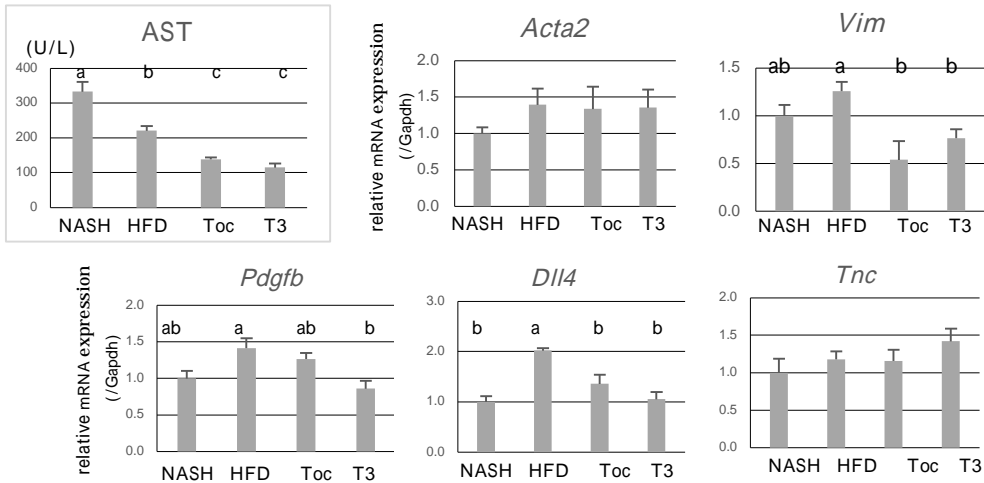


図 4 野生型マウスの NASH 治癒における線維化・間質関連遺伝子発現

図 5 アザン染色

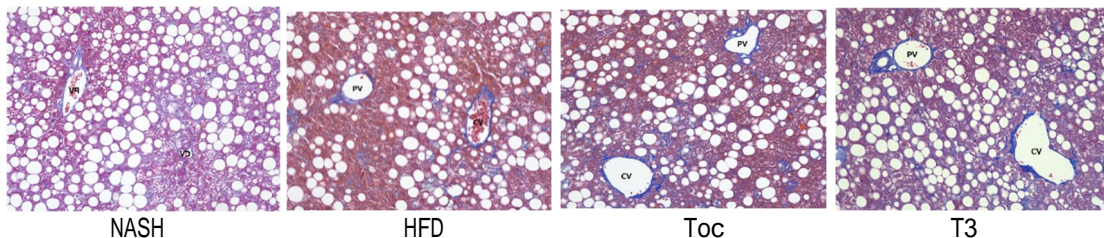
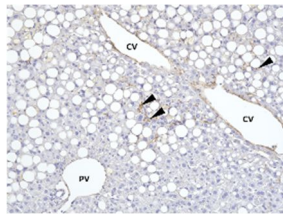
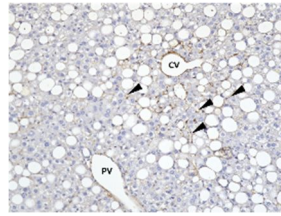


図 6 TNC 免疫組織化学

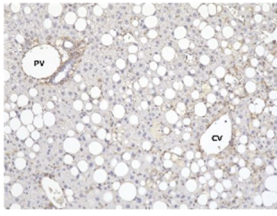


HFD

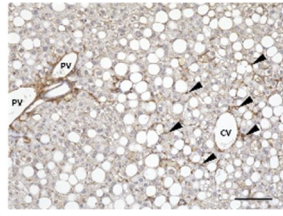


T3

図 7 PDGFR 免疫組織化学



HFD



T3

PV: 門脈, CV: 中心静脈, Bar=100 μm

初期 NASH 病態からの緩徐な回復期における TNC 欠損の影響
 TNCKO では、¹⁰ で認められた Toc, T3 の肝線維化抑制効果がキャンセルされた (図 8)。

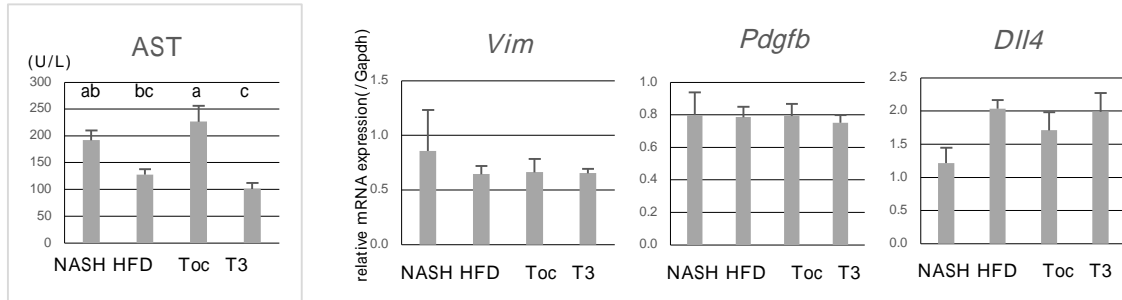


図 8 TNC 欠損マウスの NASH 治癒過程における線維化・間質関連遺伝子発現

本研究では、NASH の発症初期と回復期において、ビタミン E 同族体の肝線維化抑制効果および間質環境を規定する TNC との関連について検証を行った。NASH 発症初期には、T3 は線維化抑制に寄与する可能性が示された。NASH 誘導後に標準食に切り替える急激な回復期には、ビタミン E は炎症、線維化関連遺伝子の発現を抑制する傾向を示したが、その効果は明確ではなかった。厳しい食事制限を伴わない緩やかな治癒過程を想定した高脂肪食による回復期には、ビタミン E、特に T3 は肝線維化抑制効果を示したが、TNC 非存在下ではこの効果は認められなかった。NASH 治癒過程におけるビタミン E の治療効果には、創傷治癒過程の間質環境を規定する TNC が影響することが示唆された。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Noichi Jun、Ishiakawa Tomoko、Ichi Ikuyo、Fujiwara Yoko	4. 巻 70
2. 論文標題 Effect of tocotrienol on the primary progression of nonalcoholic steatohepatitis in a mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 140 ~ 146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcfn.21-69	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石川朋子、日下部守昭、藤原葉子
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎の治癒過程においてビタミンEが組織修復に及ぼす影響
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Tomoko Ishikawa, Moriaki Kusakabe, Yoko Fujiwara
2. 発表標題 Influence of extracellular matrix deficiency on effects of vitamin E during recovery from the diet-induced NASH
3. 学会等名 22nd International Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究分担者	藤原 葉子 (Fujiwara Yoko) (50293105)	お茶の水女子大学・ ・名誉教授 (12611)	

6. 研究組織（つづき）

	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 分 担 者	日下部 守昭 (Kusakabe Moriaki) (60153277)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任教授 (12601)	

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