

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16001

研究課題名（和文）アルコール性肝障害における臓器連関の解析

研究課題名（英文）Analysis of organ interactions in alcoholic liver disease

研究代表者

馬渡 誠一（Mawatari, Seiichi）

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：50735339

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：エタノールの長期摂取は、肝障害のみならず膵や腸管機能も低下させるため、膵機能と脂肪肝、肝発癌には密接な関係があることが示唆される。今回、膵機能が低下した脂肪肝モデル動物（STAMマウス）を用いて、エタノールや消化酵素が肝に与える影響を評価した。高脂肪食+エタノール投与群では、エタノール非投与群と比較し、肝脂肪化率、肝線維化が高い傾向で、肝発癌サイズも大きい傾向であった。一方、消化酵素投与群では、肝脂肪化、線維化、発癌の抑制はみられなかった。膵機能低下している状態にエタノールが加わることで、肝脂肪化や線維化、肝発癌が促進される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、STAMマウスに高脂肪食に加えてエタノールを投与すると、肝脂肪化や線維化、肝発癌が促進される可能性が示唆された。非B非C型肝炎が実臨床で増加し、肥満を有する60g/dayに満たないアルコール摂取者といった分類不能例も増加しており、膵機能低下している状態にエタノールが加わることで、肝脂肪化や線維化、肝発癌が促進される可能性が示唆され、実臨床における肝癌増加の一因となっている可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Long-term ethanol intake not only causes liver damage but also reduces pancreatic and intestinal function, suggesting a close relationship between pancreatic function, fatty liver, and hepatocarcinogenesis. In this study, we evaluated the effects of ethanol and digestive enzymes on the liver using STAM mice, an animal model of fatty liver with reduced pancreatic function. Compared to the non-ethanol group, the high-fat diet + ethanol group tended to have a higher rate of hepatic steatosis and hepatic fibrosis, and the size of hepatocellular carcinoma also tended to be larger. On the other hand, the digestive enzyme group did not show any inhibition of hepatic steatosis, fibrosis, or carcinogenesis. It was suggested that the addition of ethanol to a state of reduced pancreatic function may promote hepatic steatosis, fibrosis, and hepatocarcinogenesis.

研究分野：消化器

キーワード：エタノール 脂肪肝 STAMマウス

1. 研究開始当初の背景

近年、肝細胞癌の成因として、C型肝炎ウイルス (HCV) や B型肝炎ウイルス (HBV) 感染といったウイルス感染が減少し、非 B 非 C 型の割合が増加している。非 B 非 C 型の中で、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) だけでなくアルコール性も増加している。前者は肥満を背景とする脂肪肝、後者はアルコールによる脂肪肝を認め、アルコール摂取量 (20-30 g と 60g/day) で分類される。しかしながら、実臨床においては、肥満を伴った 30-60g の飲酒者といった分類不能者も増加している。

アルコール性肝障害は脂肪肝から肝硬変へ進展する疾患で、アルコール自体やその代謝産物であるアセトアルデヒドによる影響が考えられている。また、アルコールは慢性膵炎や腸炎の原因となり、膵外分泌能低下による消化不良からの低栄養状態や腸管からのエンドトキシン、腸管細菌叢の変化も認められることが報告されている。

我々は、膵機能が低下している糖尿病モデルマウスである *Stelic animal model* (STAMTM) マウスに高脂肪食を投与すると、高脂肪食群 (STAM-F) では、通常食群 (STAM-C) と比較し、18 週齢で有意に肝線維化や肝腫瘍形成を認め、肝遺伝子発現の検索では *serine palmitoyltransferase long chain base subunit 3* (*sptlc3*) が有意に亢進していることを明らかにした (Oncol Rep. 33:1657-66, 2015.)。また、実臨床においても、*Sptlc3* は NASH 肝発癌のバイオマーカーとなり得ることを明らかにした (Mol Clin Oncol. 16:55, 2022.)。STAMTM マウスは生後 2 日目に膵にストレプトゾチンを接種し、膵機能を低下させた脂肪肝モデルマウスで、短期間に肝線維化や発癌を認めるマウスである。膵内分泌能だけでなく、外分泌能も低下していることが報告されているが、(Pancreas. 2000; 21: 421-6.)、膵外分泌能と発癌との関連は明らかではない。

以上より、アルコールは肝、膵、腸管などに同時に作用し、膵外分泌機能低下と消化吸収不良を引き起こし、肝疾患の進行をもたらすと予想されるが、肝、膵、腸管を同時に評価した報告はこれまでにない。

2. 研究の目的

エタノールの長期摂取は、肝障害のみならず膵や腸管機能も低下させるため、膵機能と脂肪肝、肝発癌には密接な関係があることが示唆されるが、その機序については十分に解明されていない。本研究では、膵機能が低下したモデル動物にエタノールと高脂肪食を摂取させることで、肝線維化、肝発癌が促進されるのか、また消化酵素を同時に摂取させることで、肝線維化、肝発癌が抑制されるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物の概要

雄性 C57BL/6J マウスに生後 2 日目に 200 μ g のストレプトゾチン (STZ) を皮下に単回投与し、膵機能を低下させた STAMTM マウスに 5 週齢から (a) 通常食、(b) 通常食 + エタノール、(c) 高脂肪食、(d) 高脂肪食 + エタノールを投与し、14 週齢に解剖し、採血、臓器 (肝、膵) および腸管の摘出を行った。高脂肪食は HFD32 を使用し、エタノールは 10% エタノールを自由飲水させた。また、高脂肪食に消化酵素 (パンクレリパーゼ) を混入して投与した (e 群)。摘出した肝臓は、重量測定後に直ちに切り分け、一部は 10% 中性ホルマリンに浸漬し、残りは液体窒素で急速凍結し、-80℃ で保存した。以後、保存検体から total RNA を抽出した。飼育期間中、食餌摂取量、体重測定を測定した。摘出した腸管、膵は長さもしくは重量を測定したのち、10% 中性ホルマリンに浸漬した。

(2) 血液生化学検査および肝臓組織学的検査

解剖時の採血にて AST、ALT、総ビリルビンを測定した。肝臓は組織切片を作成し、肝内の脂肪面積率、線維化面積率を測定した。また、発癌の有無を確認した。

(3) 肝組織の炎症性サイトカインの評価

肝臓から total RNA を抽出し、線維化関連分子である TGF- β 、collagen、matrix metalloproteinase (MMP)、tissue inhibitor of metalloprotease (TIMP) の発現をリアルタイム PCR (RT-PCR) で解析した。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食とアルコール摂取が STAMTM マウスに及ぼす影響

14 週における STAMTM マウスの生存率は (a) 100%、(b) 100% に対し、(c) 50%、(d) 50% であった。飼育期間中の STAMTM マウスの体重増加率は (a)、(b)、(c)、(d) 群でそれぞれ 27%、38%、54%、48% であったが、4 群間に統計学的な有意差はなかった。(c)、(d) 群は (a) 群と比較し、肝重量は有意に高値であったが、(a) と (b) 群、(c) と (d) 群に有意差はなかった。膵重量、腸管長は 4 群間に統計学的な有意差はなかった。

(2) 血液生化学検査および肝、膵、腸管組織の評価

STAMTM マウスにおける血液検査 (AST、ALT、総ビリルビン) の比較では、4 群間に統計学的な有意差はなかった。

背景肝と脂肪滴の面積率の比較では、(d)群が(a)群や(b)群と比して有意に脂肪化率が高く、(c)群との比較では脂肪化率が高い傾向にあった (図 1A、2A)。肝線維化率は(d)群で高い傾向にあったが、4 群間に統計学的な有意差はなかった (図 1B、2B)。肝組織中の線維化関連分子の発現を検討したが、4 群間に統計学的な有意差はなかった。

膵、腸管の病理組織も比較したが、4 群間に統計学的な炎症の差はなかった。

肝発癌については、(c)群の 80%、(d)群の 40%にみられたが、腫瘍面積は(d)群で大きい傾向にあった。

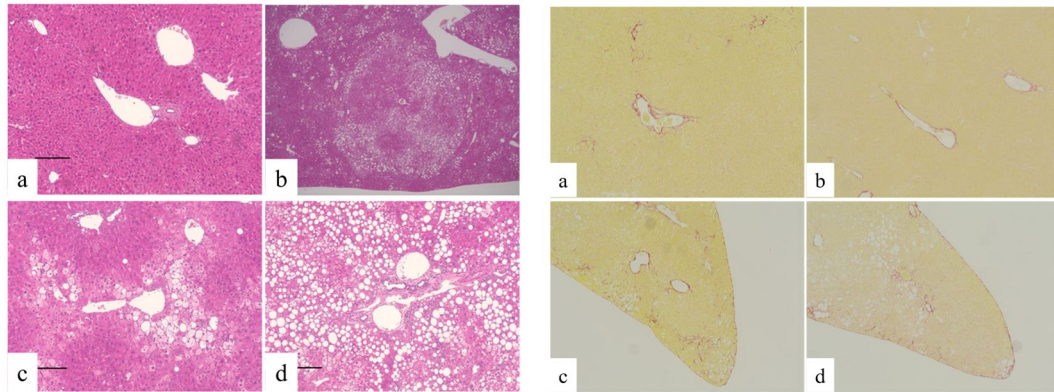


図 1. STAMTM マウスに対するエタノールの影響 (左 1A : HE × 200、右 1B : Sirius red × 100)
a: 通常食、b: 通常食 + エタノール、c: 高脂肪食、d: 高脂肪食 + エタノール

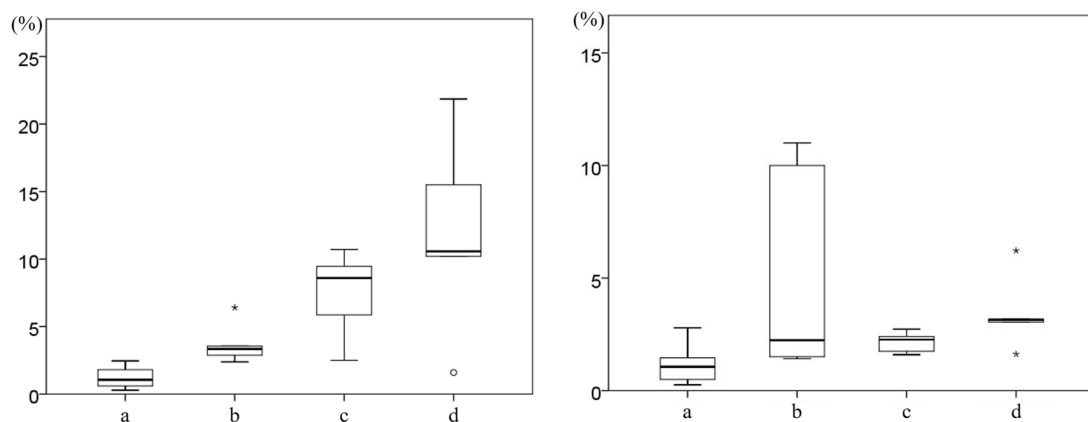


図 2. 脂肪化面積率 (左 2A) と線維化面積率 (右 2B)
a: 通常食、b: 通常食 + エタノール、c: 高脂肪食、d: 高脂肪食 + エタノール

(4) 高脂肪食と消化酵素が STAMTM マウスに及ぼす影響

14 週における高脂肪食と消化酵素を投与した STAMTM マウスの生存率は 50%であった。体重増加率は 36%で、(c)群と比較し、肝重量、膵重量、腸管長、血液生化学検査、脂肪滴の面積率、線維化、肝組織中の線維化関連分子の発現に統計学的な有意差はなかった。また、生存例の 50%に腫瘍もみられた。

まとめ

STAMTM マウスは高脂肪食投与にて早期に脂肪肝から肝線維化、肝発癌を認めることから、非アルコール性脂肪肝モデルマウスとして報告されている。今回、STAMTM マウスに高脂肪食に加えてエタノールを投与すると、肝脂肪化や線維化、肝発癌が促進される可能性が示唆された。非 B 非 C 型肝炎が実臨床で増加し、肥満を有する 60g/day に満たないアルコール摂取者といった分類不能例も増加しており、膵機能低下している状態にエタノールが加わることで、肝脂肪化や線維化、肝発癌が促進される可能性が示唆され、実臨床における肝癌増加の一因となっている可能性が考えられた。今後は短い飼育期間においてアルコールの影響を検討する必要がある。一方、消化酵素の投与による肝脂肪化、線維化、肝発癌の抑制効果は確認されなかったため、研究手法の再検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mawatari S, Tamai T, Kumagai K, Saisyoji A, Muromachi K, Toyodome A, Taniyama O, Sakae H, Ijuin S, Tabu K, Oda K, Hiramine Y, Moriuchi A, Sakurai K, Kanmura S, Ido A.	4. 巻 14 (24)
2. 論文標題 Clinical Effect of Lenvatinib Re-Administration after Transcatheter Arterial Chemoembolization in Patients with Intermediate Stage Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 6139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14246139.	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 Mawatari S, Kumagai K, Oda K, Tabu K, Ijuin S, Fujisaki K, Tashima S, Inada Y, Uto H, Saisyoji A, Hiramine Y, Hashiguchi M, Tamai T, Hori T, Taniyama O, Toyodome A, Sakae H, Kure T, Sakurai K, Moriuchi A, Kanmura S, Ido A.	4. 巻 17(1)
2. 論文標題 Features of patients who developed hepatocellular carcinoma after direct-acting antiviral treatment for hepatitis C Virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0262267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0262267. eCollection 2022.	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 Ijuin S, Oda K, Mawatari S, Taniyama O, Toyodome A, Sakae H, Tabu K, Kumagai K, Kanmura S, Tamai T, Moriuchi A, Uto H, Ido A.	4. 巻 16(2)
2. 論文標題 Serine palmitoyltransferase long chain subunit 3 is associated with hepatocellular carcinoma in patients with NAFLD	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2021.2488. Epub 2021 Dec 28.	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Seiichi Mawatari, Tsutomu Tamai, Akiko Saisyoji, Ai Toyodome, Oki Taniyama, Haruka Sakae, Sho Ijuin, Kazuaki Tabu, Kohei Oda, Kotaro Kumagai, Yasunari Hiramine, Akihiro Moriuchi, Kazuhiro Sakurai, Akio Ido	
2. 発表標題 Clinical effect of Lenvatinib-TACE therapy in patients with BCLC-intermediate stage hepatocellular carcinoma	
3. 学会等名 APASL2022（国際学会）	
4. 発表年 2022年	

1. 発表者名 小田耕平、馬渡誠一、井戸章雄
2. 発表標題 NAFLD or MAFLD-予後改善に向けて MAFLD肝癌患者における抗酸化力の臨床的意義
3. 学会等名 日本肝臓学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊集院 翔, 小田 耕平, 上村 修司, 坂江 遥, 田中 啓仁, 川畑 活人, 小牧 祐雅, 熊谷 公太郎, 馬渡 誠一, 田ノ上 史郎, 井戸 章雄
2. 発表標題 炎症性腸疾患患者における肝合併症に関する検討
3. 学会等名 日本消化器病学会九州支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Oda K, Mawatari S, Taniyama O, Toyodome A, Ijyuin S, Sakae H, Tabu K, Kumagai K, Ido.
2. 発表標題 The Association between Sarcopenia and Oxidative Stress in Patients with Hepatocellular Carcinoma.
3. 学会等名 APASL2022 (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

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