

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：82626

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21273

研究課題名(和文) NASH発症メカニズムの解明 - ミトコンドリア障害はどのように寄与するか? -

研究課題名(英文) Contribution of mitochondrial injury to non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

佐藤 智之 (Sato, Tomoyuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：10909774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、非アルコール性脂肪肝炎(以下、NASH)発症に対する肝ミトコンドリア障害の寄与を示すことを目的とし、マウスに高脂肪を基盤としたNASH誘導食を給餌するNASHモデルを用いた実験を実施した。その結果、肝ミトコンドリアはNASH発症よりも前の時点で障害されていることが示唆された。この結果を踏まえ、NASH誘導食の給餌と並行してミトコンドリア障害の阻害剤を投与したところ、肝臓への脂肪蓄積は抑制されなかった一方で炎症応答は抑制された。以上の結果から、ミトコンドリア障害がNASHにおいて特に炎症の惹起に関与してい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

過剰な脂質摂取は脂肪組織のみならず肝臓への脂質の蓄積を引き起こす。肝臓に脂質が過剰に蓄積した非アルコール性脂肪肝の罹患率は本邦で30%を超える。非アルコール性脂肪肝炎(以下、NASH)は、非アルコール性脂肪肝が進行して肝臓が傷害され炎症が引き起こされた状態を指し、さらに進行すると肝臓の線維化から肝硬変・肝がんに至ることから、その予防・治療法の確立が求められている。本研究成果は、NASHの発症機構にミトコンドリア障害が関わっていることを示唆したものであり、ミトコンドリアの品質をターゲットとした治療法や予防法が有効である可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：To clarify the involvement of mitochondrial injury in non-alcoholic steatohepatitis(NASH) pathology, we investigated liver mitochondrial function in two dietary NASH mouse models. As a result, increased susceptibility of isolated liver mitochondria to mitochondrial permeability transition(MPT) indicated that liver mitochondria were injured at the early stage of NASH. Pharmacological inhibition of MPT partially suppressed inflammatory response but not lipid accumulation in the liver. This result indicates that MPT is involved in hepatic inflammation rather than steatosis.

研究分野：毒性学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の1つである非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、過栄養などの生活習慣と遺伝的要因が原因となって肝臓に脂肪が蓄積する疾患であり、国内患者は 1,000 万人ともいわれている。NAFLD は単純脂肪肝と進行性のものに大別され、進行性のものは Kupffer 細胞などによる免疫応答の異常な活性化によって非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) へと進み、将来的には肝硬変、肝がんに進む。しかしながら、NASH の発症メカニズムを詳細に理解できていないため、NASH に対する治療薬や予防法は現状存在しない。これまでに、NAFLD から NASH への進展に伴うミトコンドリアの形態異常やミトコンドリア由来の酸化ストレスなどが報告されてきた (Meex and Blaak, Mol Nutr Food Res, 2021)。ミトコンドリアは脂肪酸酸化を担うことから、過栄養状態では過剰な脂肪酸がミトコンドリアに流入することで機能が障害されると考えられるが、詳細な分子メカニズムは不明である。一方、ミトコンドリアの機能異常の一種であるミトコンドリア膜透過性遷移 (MPT) は、膜透過性の異常な亢進によりミトコンドリア内部の分子やイオンが細胞質中に漏出する現象であるが、NASH との関連性については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝的要因と環境要因によって NASH を発症する NASH モデルマウスや培養細胞を用いることにより、NASH の発症における MPT の関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では NASH モデルマウスを用いて、MPT の障害が NASH の発症を抑制する可能性を評価した。なお、用いたマウスはすべて雄性の C57B6J マウスである。

(1) マウス NASH モデルにおける肝ミトコンドリアの変化

マウスに高脂肪食を負荷することにより NASH を発症させる。用いた高脂肪食は、高脂肪高シヨ糖高コレステロール食 (F2HFHSD (オリエンタル酵母) を基調に、コレステロール 2% とラードを添加し 60% kcal fat に調整) コリン欠乏高脂肪食 (Research Diet 社) の 2 種である。MPT 誘導の有無をウエスタンブロット法による細胞質画分のシトクロム C の検出により評価するとともに、肝臓への脂質蓄積と線維化状態を、脂肪の定量と組織染色 (HE 染色、Sirius red 染色) により評価した。また、肝臓よりミトコンドリアを単離し、カルシウムイオン (25 μ M) の添加によって引き起こされる吸光度の低下幅を指標として MPT 感受性を評価した。以上の評価を、餌では投与開始から 8, 12, 16 週目に、餌では 1, 3, 6 週目に行った。タイムポイントは同種の餌を用いた過去の報告に基づいて設定した。

(2) MPT の障害が NASH の発症に与える影響

(1) の結果を踏まえ、MPT が誘導されるタイミングに合わせて MPT 誘導酵素シクロフィリン D の阻害剤 NIM811 を投与し、その後の NASH の発症に与える影響を検証した。

(3) 高脂肪食が肝ミトコンドリアに与える影響

NASH モデルで観測される肝ミトコンドリアの変化の要因を詳細に分析するため、NASH 発症に至らない条件として、通常の高脂肪食を雄性マウスに 11 週間投与し、肝ミトコンドリアの機能を調べた。

4. 研究成果

(1) 雄性マウスに高脂肪食を摂餌させて NASH を誘導する既存の NASH モデルを用い、NASH 発症過程におけるミトコンドリアの変化を調べた。高脂肪高シヨ糖・高コレステロールを含む食餌では、8 週目で肝細胞の脂肪変性と炎症応答、12 週目で線維化応答が認められた。採材したいずれのタイムポイントでも、ミトコンドリアの機能は障害されていたが、MPT は観測されなかった。一方でコリン欠乏高脂肪食 (以下 CDAHFD) を与えたマウスでは、1 週間の投与で肝傷害マーカーの軽微な上昇 (50 IU/L 程度) 肝臓への脂肪滴の蓄積と炎症応答ならびに線維化応答が観測された (図 1A、C)。また、肝臓より単離したミトコンドリア画分の MPT 感受性が上昇していた (図 1B) ことから、ミトコンドリア機能が低下しているこ

図 1A 肝組織像 (HE 染色)

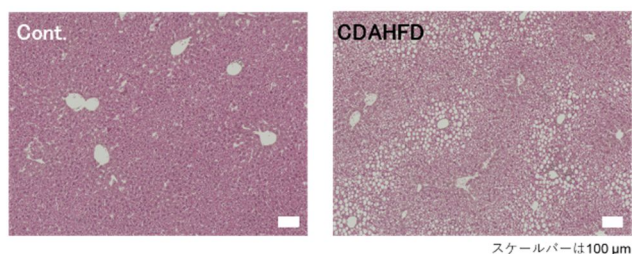


図 1B 肝ミトコンドリアの MPT 感受性

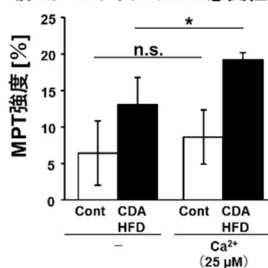
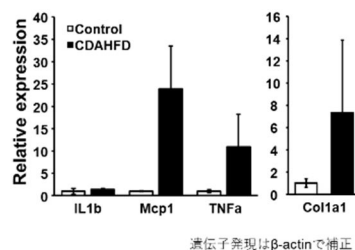


図 1C 肝臓の各種遺伝子発現



遺伝子発現は β -actin で補正

とが示唆された。ただし、MPTの有無について、細胞質へのシトクロムC(以下Cyt C)の漏出を指標として評価する予定だったが、細胞質画分とTotal lysateともにCyt Cが減少するという想定外の結果(図1D)だったため、MPT誘導の有無は判断できなかった。

(2)(1)の結果を踏まえ、本研究で用いるNASHモデル餌としてCDAHFDを採用した。さきの検討では1週間投与によるMPTの誘導については明確な結論を得られなかったが、肝ミトコンドリア機能の低下は明らかであったため、予定通りNASHの関与を調べる検討に進んだ。CDAHFDを1週間与えると同時にMPT阻害剤であるNIM811(10 mg/kg)を腹腔内投与した。NIM811を投与しない群には溶媒(10% DMSO in コーンオイル)を同量投与した。予備検討にてNIM811投与による肝MPT阻害効果が2日間は十分に持続することを確認したため、NIM811の投与はDay0,2,4の3回とした。その結果、阻害剤非投与群で観測される肝傷害に抑制傾向が見られたが、肝臓への脂質蓄積には抑制が認められなかった(図2A,B)。さらに、炎症応答を担うケモカインの一部(Mcp1)の発現がNIM811投与によって抑制される傾向が見られた(図2C)。以上を総合すると、MPTはNASHにおける肝への脂肪蓄積よりも炎症応答に強く関わっていることが示唆された。

図1D シトクロムC(Cyt C)の漏出

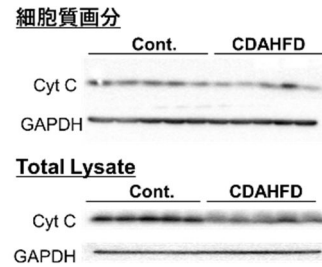


図2A 肝傷害マーカー

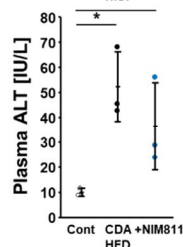


図2B 肝脂質

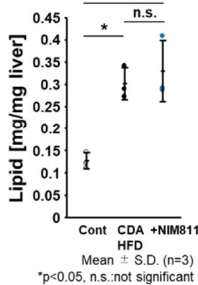
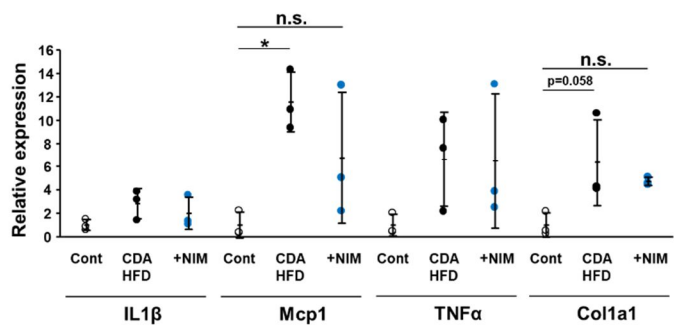


図2C 肝臓の各種遺伝子発現



いずれもControl餌("Cont")、コリン欠乏高脂肪食("CDAHFD") CDAHFD+NIM811("+NIM811")の3群

Mean ± S.D. (n=3) *p<0.05, n.s.:not significant

(3)つぎに、高脂肪食が肝ミトコンドリアに及ぼす影響をより詳細に調べるため、雄性マウスにLardを0または30%含む餌を11週間投与(各群n=4)し、肝ミトコンドリアを採取した。このとき、予備的な検討よりMPT感受性には時刻差があることを見出していたことから、明期前半(ZT2; ZT0-12が明期)と暗期前半(ZT14; ZT12-24(0)が暗期)の2時刻でn=2ずつに分けて採取した。その結果、Lard30%群で体重上昇、精巢上体脂肪重量の上昇、肝重量の低下が見られた。しかし、肝傷害マーカーであるPlasma ALT値は全群で正常(10 IU/L未満)であり、肝臓に脂肪滴は観察されなかった(図3B)。このとき、肝ミトコンドリアのMPT感受性を解析したところ、ZT2においてLard30%群で感受性の低下傾向が見られ(図3C、ZT2においてp=0.0501)、n数が少なく有意な差には至っていないものの、高脂肪食摂取により肝ミトコンドリアの傷害感受性が低下したことが示唆された。この結果が(1)のCDAHFDの1週間投与で得られた結果(図1B)とは逆であることを踏まえ、高脂肪食摂取によって肝ミトコンドリアの傷害感受性は低下するものの、過剰な脂質あるいは別の刺激が加わることによってミトコンドリア機能が障害され、脂肪肝へ進展する可能性が考えられる。ただし、ミトコンドリア機能障害と肝臓への脂質蓄積の因果関係については、ミトコンドリアでの酸化能の低下が関与していると考えられるものの、今回の検討ではそれらの時間的前後関係も

図3A 各種臓器の重量

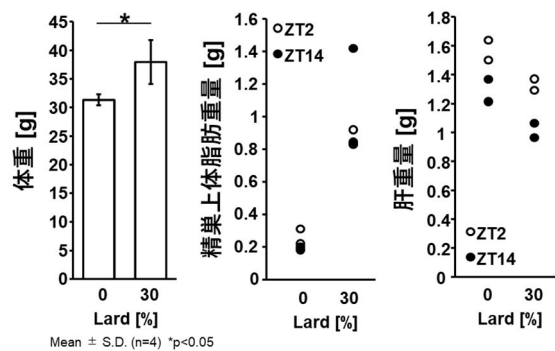


図3B 肝組織像(HE染色)

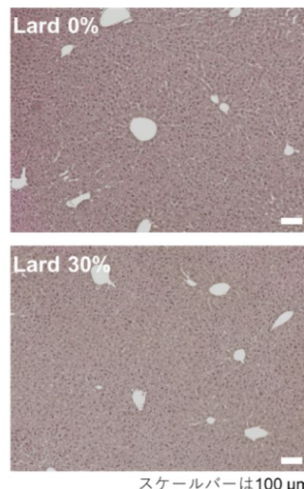
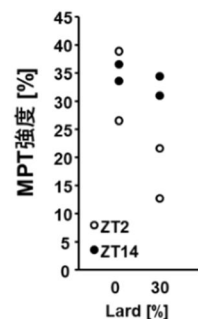


図3C MPT感受性



Lard: p=0.08
ZT: p=0.08
Lard*ZT: p=0.17
Lard(ZT2): p=0.0501

スケールバーは100 μm

含めて解明には至っていない。

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 佐藤智之
2. 発表標題 Circadian fluctuation of mitochondrial sensitivity to permeability transition in mice
3. 学会等名 第29回日本時間生物学会学術大会
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
---------	---------