

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月22日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790650

研究課題名（和文） 非アルコール性脂肪肝炎の病態進展にレニン・アンギオテンシン系が及ぼす影響

研究課題名（英文） Involvement of renin-angiotensin system for the development of NASH

研究代表者

廣瀬 享 (HIROSE AKIRA)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：30457395

研究成果の概要（和文）：これまで我々は、NASHの肝線維化進展にはレニン・アンギオテンシン系との関連が重要であることを報告してきた。アンギオテンシン I 型受容体（AT1）を高血圧治療薬アンギオテンシン II 受容体拮抗剤（ARB）にて抑制することにより NASH の肝線維化進展を抑制できる。今回の我々の検討から、肝臓における ARB による活性化 AT1 の抑制は、心筋細胞などと異なり機械的刺激を抑制することによる作用ではなく、AGE-RAGE 系の細胞内シグナル伝達の抑制が NASH 線維化進展抑制の中心的役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We reported that renin-angiotensin system is important for progression of hepatic fibrosis in NASH. Angiotensin type 1 receptor blocker (ARB) attenuates progression of hepatic fibrosis in NASH by inhibition of angiotensin type 1 receptor (AT1) activity. We clarified, in this study, that attenuation of AT1 receptor activity by ARB was not related to the inhibition of mechanical activation of AT1 receptor unlike heart muscle cells, and inhibition of the signal transduction of AGE-RAGE system in hepatic stellate cells by ARB was central role for the attenuation of development of NASH.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：NASH

## 1. 研究開始当初の背景

近年の肥満やメタボリック症候群患者の増加に伴い、非アルコール性脂肪肝障害（NAFLD）患者や、その進行性の病態である非アルコール性脂肪肝炎（NASH）患者数は増加の一途を辿っている。NASHの発症

機序として現在のところ、Day CPらが提唱している Two Hit Theory が支持されている。すなわち、肝臓に脂肪化（first hit）が起こり、それに引き続き炎症、線維化の原因となる要因（second hit）が加わることで、単純性脂肪肝から NASH 発症に至るというもの

である。治療的観点からこの論理を考えた場合、肝の脂肪化を抑制することのみならず、肝の炎症、線維化を抑制することが、NASHの病態進展には重要であると言える。近年、腎臓、肺、心臓、大動脈の線維化進展にレニン・アンジオテンシン系 (RA系) の関与の重要性が指摘されるようになってきた (Ruiz-Ortega M, Curr Hypertens Rep 2003)。肝疾患においても、C型慢性肝炎や実験動物の慢性肝疾患に対し、アンジオテンシン II タイプ 1 レセプターブロッカー (ARB) がその線維化を抑制することが証明されるようになり、RA系の関与の重要性が明らかとなってきた。そこで、私はNASHの線維化進展に対しても、RA系が強く関与している可能性を考えこれまで検討を行ってきた。そして、高血圧治療薬アンジオテンシン II 受容体拮抗剤 (ARB) には、実験動物NASHの肝線維化進展を抑制する効果があることを明らかにすると共に、ARB が肝の脂肪化進展にも重要な役割を果たしていることを明らかにした (HEPATOLOGY, 2007)。しかし、RA系およびアンジオテンシン II 受容体 (AT1) からの肝細胞内シグナルによるNASHの肝線維化抑制、肝脂肪化抑制効果におけるメカニズムの詳細については未だ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

NASH肝での線維化進展にRA系の関与が重要であることが明らかとなってきたが、必ずしも血中のアンジオテンシン II 濃度の上昇を必要としないことから、肝臓内部でのRA系の活性化状態の存在が考えられる。しかし、アンジオテンシノーゲン、AT1 receptor、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) の遺伝子発現量には影響がないことから、別のメカニズムの存在が想定される。近年、心筋細胞や動脈におけるAT1活性化のメカニズムとして、AT1の機械的刺激による作用が知られるようになってきた。このため、肝臓でも同様に、脂肪化に伴う肝細胞の膨化による肝類洞、Kupffer細胞、肝星細胞の機械的刺激によるAT1 receptorの活性化が惹起されている可能性が考えられる。このため、今回の研究では、AT1 receptorの活性化状態、および、レセプターからの伝達シグナルの活性化状態について検討を行うとともに、ARB投与前後のAT1 receptorからの細胞内シグナル伝達因子 (PKC, ERK など) の遺伝子発現量、その活性化とROS産生抑制のメカニズム解析を行い、肝線維化メカニズムの解明につなげたいと考えた。

## 3. 研究の方法

NASH肝において、AT1 receptor 下流のシグナルカスケードにおけるキー因子であるERK、PKCの活性化が確認された (未発表

データ)。肝臓内においても、脂肪化に伴う肝細胞の膨化などによる肝類洞、Kupffer細胞、肝星細胞の機械的刺激によるAT1 receptorの活性化が惹起されている可能性が考えられる。このため、経時的な肝細胞の脂肪化進展過程に伴う、肝星細胞上のAT1 receptor 活性化状態の変化について検討を行う。さらに、正常肝細胞から分離・培養した肝星細胞に対し、機械的刺激を与えることによる細胞の活性化状態の変化について検討を行う。

Reactive oxygen species (ROS) はNASHの炎症、線維化進展に重要であることが知られており、私もARBによりその産生が抑制される事を報告した (HEPATOLOGY, 2007)。しかし、線維化抑制機序における詳細なメカニズムは未だに不明である。このため、ROS発生におけるAT1 receptorからの細胞内シグナル伝達因子 (PKC, ERK など) の活性化状態と、ROS産生抑制のメカニズム解析を行い、肝線維化メカニズムについて明らかにする。NASHモデルマウスに対し、グルタチオン、ビタミンEなどのROS消去系の投与を行うことで、肝星細胞上のAT1 receptorの活性化状態が抑制されることを確認しているため (未発表データ)、次は、正常マウスから分離培養した肝星細胞に対し、過酸化水素などのROSを混合培養することで、AT1 receptorの活性化が起こることを確認する。

## 4. 研究成果

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の線維化進展においてレニン・アンジオテンシン系 (RA系) の関与の重要性が明らかになっており、これまで私は、高血圧治療薬アンジオテンシン II 受容体拮抗剤 (ARB) が肝星細胞の活性化抑制を介してNASHの肝線維化進展を抑制する効果があることを、実験動物を用いて明らかにした (HEPATOLOGY, 2007)。

NASHの肝線維化進展における肝星細胞活性化に対するRA系の影響を検討する目的で、アンジオテンシン II (ATII) による直接作用による肝星細胞の活性化について検討を行ったが、ATII投与による肝星細胞の活性化の直接作用は認められなかった。さらに、心筋細胞や動脈において報告がある、アンジオテンシン II 受容体 (AT1) に対する機械的刺激による活性化メカニズムについても検討したが、肝臓におけるAT1に関しては機械的刺激による活性化メカニズムは明らかではなかった。

ARBによる肝星細胞活性化抑制を介したNASH肝線維化抑制は明らかであることから、AT1からの肝細胞内へのシグナル伝達について検討を行ったところ、NASHにおけるPKCのリン酸化とARB投与による脱リン酸化が観察され、ARBによる肝星細胞の活性化

抑制には PKC が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

一方、NASH の肝線維化進展には終末糖化産物 (AGE) からの活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の産生が重要であることが報告されており、PKC のリン酸化による AGE 受容体 (RAGE) シグナルの活性化が NASH の肝線維化進展に影響を与えている可能性が示唆されている。そこで、RAGE 発現を検討したところ、NASH では RAGE 発現が増加し ARB 投与にて抑制されているなど、ARB による NASH 肝線維化には AGE-RAGE 系の活性化抑制が重要であることが明らかとなった。現在、RAGE ノックアウトマウスを久留米大学医学部との共同研究のもと入手し、NASH の肝線維化進展における ARB の AGE-RAGE 系への影響とシグナル伝達の詳細について検討中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Masuda K, Ono M, Fukumoto M, Hirose A, Munekage K, Ochi T, Okamoto N, Akagi N, Ogawa Y, Saibara T: Usefulness of Technetium-99m-2-methoxy-isobutyl-isonitrile liver scintigraphy for evaluating disease activity of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*, 査読有, 42:273-279, 2012. doi:10.1111/j.1872-034X.2011.00923.x
- ② Ono M, Ochi T, Munekage K, Ogasawara M, Hirose A, Nozaki Y, Takahashi M, Okamoto N, Saibara T. Angiotensinogen gene haplotype is associated with the prevalence of Japanese non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res*, 査読有 41:1223-1229, 2011. DOI:10.1111/j.1872-034X.2011.00883.x
- ③ Ogasawara M, Hirose A, Ono M, Aritake K, Nozaki Y, Takahashi M, Okamoto N, Sakamoto S, Iwasaki S, Asanuma T, Taniguchi T, Urade Y, Onishi S, Saibara T, Oben JA: A novel and comprehensive mouse model of human non-alcoholic steatohepatitis with the full range of dysmetabolic and histological abnormalities induced by gold thioglucose and a high-fat diet. *Liver Int*, 査読有, 31:542-551, 2011. DOI:10.1111/j.1478-3231.2010.02443.X
- ④ Asanuma T, Ono M, Kubota K, Hirose A, Hayashi Y, Saibara T, Inanami O, Ogawa Y, Enzan H, Onishi S, Kuwabara M, Oben

JA: Super paramagnetic iron Oxide MRI shows defective Kupffer cell uptake function in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, 査読有, 59:258-266, 2010. DOI:10.1136/gut.2009.176651

[学会発表] (計 7 件)

- ① 小野正文: 750GTT 糖負荷テストから見た NASH 患者における耐糖能異常の特徴と治療への展望. 第 39 回日本肝臓学会西部会. ワークショップ「NASH 治療の現状と問題点」, 2011.12.10. 岡山(岡山コンベンションセンター)
- ② 小野正文: 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の罹患率調査-最新の多施設データによる検討-. 第 96 回日本消化器病学会四国支部例会. 第 107 回日本消化器内視鏡学会四国地方会. 合同シンポジウム, 2011.11.27. 愛媛(松山市総合コミュニティセンター)
- ③ 小野正文: NASH 発症における PNPLA3 (adiponutrin) 遺伝子の ER ストレスへの役割について. 第 15 回日本肝臓学会大会. (JDDW 2011) シンポジウム「NASH 発症の分子機構と治療標的」, 2011.10.20. 福岡(福岡国際会議場)
- ④ 小笠原光成: Gold-thioglucose と高脂肪食を用いた新しい NASH モデル動物の開発. 第 53 回日本消化器病学会大会 (JDDW). ポスター, 2011.10.20 福岡(福岡国際会議場)
- ⑤ 宗景玄祐: エストロゲンによる非アルコール性脂肪性肝疾患と高尿酸血症に対する影響について. 第 47 回日本肝臓学会総会. 一般演題, 2011.6.2. 東京(ホテルグランパシフィック LE DAIBA)
- ⑥ 小野正文: Gold-thioglucose と高脂肪食を用いた NASH 患者類似の NASH モデルマウスの作成. 第 97 回日本消化器病学会総会. ワークショップ「Steatohepatitis (脂肪肝炎) の病態~その多様性と相同性~」, 2011.5.13. 東京(京王プラザホテル)
- ⑦ Ono M: Three single nucleotide polymorphisms haplotype of angiotensinogen gene associated with the prevalence of Japanese NASH. 46th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. Poster, Berlin Germany, 2011.3.30-4.3

[図書] (計 1 件)

- ① 小笠原光成, 廣瀬亨, 他: 非アルコール性脂肪性肝疾患における血清尿酸値, 沖田極編, 第 6 回「酸化ストレスと肝」研

研究会 記録 酸化ストレスと肝疾患＜第 6 卷＞2010, 91-94, メディカルレビューン.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 亨 (HIROSE AKIRA)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：30457395