

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390161

研究課題名(和文)高脂肪食による肝炎・線維化進展予防の分子メカニズムと非侵襲的バイオマーカーの開発

研究課題名(英文)Molecular mechanism for prevention of high-fat and -cholesterol-induced fibrotic steatohepatitis and development of the non-invasive biomarker

研究代表者

那須 民江 (NASU, Tamie)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：10020794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪・高コレステロール(HFC)食は雄SHRSP5/Dmcrの方が、系統元のSHRSPより重篤な肝線維化を引き起こし、UGT活性およびCARとPXRの低下の差異が原因であった。HFC食による線維化は雌の方が雌より著明で、原因はUGT、CAR、PXRの発現への影響の差異であった。EPAはTNFからp50/p65系の上昇を抑制し、HFCによる肝炎を予防した。HFC食はカスパーゼ3/7活性を低下させ、壊死細胞数と線維化を誘導した。血清のK18Asp396値はこれらと高い正の相関関係を示し、非侵襲的バイオマーカーとなる。HFC摂取により、肝臓のコール酸/デオキシコール酸比は著しく低下した。

研究成果の概要(英文)：High-fat and-cholesterol diet (HFC) induced hepatic fibrosis greater in SHRSP5/Dmcr than SHRSP. This was due to greater suppression of UGT, CAR and PXR in the former than the latter. The fibrosis area was greater in males than females. The UGT activity and expressions of CAR and PXR, were not suppressed by HFC diet in females, while significantly suppressed in males, suggesting this enzyme and its nuclea receptors excreting bile acid may be one of important role in the sex differences in the histopathological finding. EPA prevented inflammation by inhibiting increase of p65/p50, however, did not influence fibrosis development.

HFC diet mainly induced necrosis in the liver by decrease in caspase 3/7 activity. Serum K18Asp396 levels were positively correlated with hepatocyte necrosis and fibrosis, suggesting that the levels may be a good noninvasive biomarker of these findings. According to HFC-diet feeding, ratio of cholic acid/chenodeoxycholic acid (CDCA) significantly decreased.

研究分野：環境毒性学・健康科学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：SHRSP5/Dmcrラット 高脂肪・高コレステロール食 肝炎 線維化 エイコサペンタエン酸 ウルソデオキシコール酸 バイオマーカー 胆汁酸

### 1. 研究開始当初の背景

我が国における非アルコール性肝疾患 (NAFLD) は第3の肝臓病といわれ、成人の約8%にみられる。その中で、単純性脂肪肝 (NAFL) ではなく、非アルコール性肝炎 (NASH) は、肝炎のみにとどまらず、線維症や肝硬変・肝がんに至る悪性の肝臓病である。しかし、高脂肪食だけでこれらの病態を表現できるモデル動物がなかったため、進展メカニズムの詳細は不明であった。我々は SHRSP5/Dmcr に高脂肪・高コレステロール (HFC) 食を与えると、2週間で脂肪肝・肝炎、8週間で線維症、14週間で架橋形成をした線維症を呈することを明らかにした。即ち、この系統ラットでは HFC 食を与えるのみで、NASH の発症・進展を一望できる NASH 進展モデルラットとなることが明らかとなった。即ち、この動物を用いることにより、NASH 進展のメカニズムと、予防対策を考案することが可能となった。

### 2. 研究の目的

この研究では、SHRSP5/Dmcr 雄に HFC 食を与え、(1)SHRSP5/Dmcr とその系統元の SHRSP との HFC 食感受性の違い、(2)HFC による脂肪性肝炎と線維症進展の性差、(3)肝炎や線維化の非侵襲的バイオマーカーの確立、(4)エイコサペンタエン酸とウルソデオキシコール酸 (UDCA) による HFC 郵送性肝炎の予防効果、(5)HFC 摂食後の胆汁酸種の動態、を解析することが、目的である。

### 3. 研究の方法

動物は1群6匹とし、どの実験においても10週齢の雄 SHRSP5/Dmcr ラットを用いた。系統差の研究にはさらに雄 SHRSP、性差の研究には雌の SHRSP5/Dmcr ラットを用いた。予防のための研究には、エイコサペンタエン酸 (EPA、1mg/kg/day) とウルソデオキシコール酸 (UDCA) 0.1%、0.3% を HFC 食に混入して投与した。それぞれの試験食は2、8および14週間与えた。解剖前日から絶食し、ペントバルビタール麻酔 (70mg/kg) 後、解剖して血液と肝臓を摘出した。血液は血清を分離し、肝臓は病理用に一部をカットして、ホルマリン固定した。血清と残りの肝臓は使用まで -80℃ で保存した。遺伝子発現解析には定量リアルタイム PCR 法と Western Blot 法を用いた。血清 K18Asp396 は M30-Apoptosense ELISA キットで、カスパーゼ 3/7 と 8、9 の測定は Caspase-Glo assay キットで、肝臓の胆汁酸は Suzuki らの方法で測定した。

### 4. 研究成果

#### (1)HFC 食による肝炎・線維症進展の系統差

肝臓の脂肪化と炎症には SHRSP5/Dmcr とその系統元の SHRSP ラット 2 系統間に差は見られなかった。しかし、線維化の程度は SHRSP5/Dmcr > SHRSP であった。これらの結果は肝の線維化進展に対して著しい系統間の差が認められることを示す。この違いは毒性の高い胆汁酸の違いにあると想定し、この合成と排泄に関わる遺伝子発現を検討した。胆

汁酸合成酵素には 2 系統間差が認められなかったが、HFC 食摂食後のグルクロン酸抱合酵素 (UGT) 活性の低下は SHRSP5/Dmcr > SHRSP であり。これを制御する CAR と PXR も同様な影響を受けていた。加えて、胆汁酸種を測定したところ、SHRSP5/Dmcr ではケノデオキシコール酸 (CDCA) の蓄積がコール酸 (CA) の蓄積に比べて著しく、CA/CDCA 比が著しく低下していたが、SHRSP では変化がなかった。従って、HFC 食摂食後の上記 2 系統間の線維化進展の差異は、胆汁酸抱合活性 (UGT) の低下に起因し、これが CDCA の著しい上昇を招き、SHRSP5/Dmcr の重篤な線維化進展に繋がったと解された。

#### (2)HFC 食による肝炎・線維症進展の性差

ヒトの NASH には性差がみられるので、その原因解明のために、雌の SHRSP5/Dmcr に HFC 食を与え、雄との進展度の差異を検討した。HFC 食による脂肪の蓄積、パルーニング、炎症細胞の浸潤には性差が認められなかったが、大脂肪滴は明らかに雄 > 雌であった。壊死細胞スコアも明らかに雄の方が大きく、2 週目および 8 週目の雌肝臓の壊死細胞スコアは雄の 1/4 以下であった。線維化も雄の方が雌より強かった。雌ラットの血漿エストロジオールを測定した。性周期をマッチさせてないが、HFC 食群のエストロジオール値は対照群より明らかに低かった。対照群は 2、8、14 週目いずれも発情期の午前中、発情期、発情間期、発情休止期の動物がいたが、HFC 群は発情前期の午前中が 1 匹もいなかった。HFC14 週目の群は発情間期が 1 匹いたのみで、残りはすべて発情期と推察された。発情期が長くなっているかもしれない、今後エストロジオールの合成系への HFC 食の影響解析をする予定である。

雄ラットで大脂肪滴や線維化進展の原因は胆汁酸合成・排泄に関わる酵素やトランスポーターが関わっていることが判明したので、これらの遺伝子発現を検討した。大きな性差が認められたのは、胆汁酸の解毒に関わる UGT とその制御核内受容体 (CAR, PXR) であった。即ち、雄では HFC 食によりこれらの酵素・核内受容体は著しく低下するが、雌では低下は認められなかった。従って、この性差が病理的变化の差異に関連していると考えられる。一方、胆汁酸合成酵素発現には性差は殆ど認められなかった。

#### (3)HFC 食による肝炎・線維症進展の EPA および UDCA による予防

HFC 食に EPA あるいは UDCA を添加した餌を SHRSP5/Dmcr ラットに摂食させ、肝炎・線維化進展への予防効果とそのメカニズムを、肝機能値、病理、肝臓毒の強い胆汁酸の合成・排泄にかかわる遺伝子発現を解析した。HFC 食は 2 週間で SHRSP5/Dmcr ラット肝臓の脂肪化と炎症を促進させ、8 週間では線維化を促進した。EPA は、2 週目における TNF 上昇抑制、

8週目の $\gamma$ -GTPとTNF- $\alpha$ /アディポネクチン比の上昇抑制と大脂肪滴を抑制し、炎症を抑える効果があることが示された。このメカニズムとして、EPAはHFC食によるNF- $\kappa$ B(p50/p65)の発現上昇を抑制することが明らかにされた。一方HFC食により肝臓毒の胆汁酸合成に関わるCYP7A1の発現が誘導されるが、排泄に関わるBSEPは低下し、胆汁酸の蓄積が予想されたが、EPAはこれらの発現に影響を与えなかった。一方、EPAは線維化進展の指標であるTGF $\beta$ とSMAのHFC食による発現誘導を抑制した。しかし、線維化を抑制することはなかった。

雄 SHRSP5/Dmcr ラット (1群6匹) を4群に分け、コントロール食、HFC食にUDCAを0、0.1%あるいは0.3%含有した餌を与え、8週間摂食させた。それぞれ試験食の摂食が終了した時点で、ラットを解剖し、肝臓と血液を採取した。病理標本を作成し、脂肪化、炎症、細胞変性、線維化を顕微鏡で観察し、線維化の進展へのUDCA添加の効果を検討した。HFC食は体重には影響を与えなかったが、UDCAの投与も体重には影響を与えなかった。HFC食は明らかに肝臓重量および肝臓/体重比の増加をさせた。一方、UDCAは量-反的にこれらの増加を抑制した。HFC食はAST、ALTおよび $\gamma$ -GTP値を上昇させたが、UDCAの投与は $\gamma$ -GTPの増加のみ抑制した。HE染色の結果を見ると、HFC食は肝臓の脂肪滴(小脂肪滴、大脂肪滴)の沈着を増大させ、炎症細胞浸潤も増加させた。また、明らかに線維化面積を増大させた。一方、UDCAの投与は脂肪滴と線維化面積を減少させた。このメカニズムとして、胆汁酸合成系に関わる遺伝子の発現を検討した。CYP7A1の発現には影響を与えないが、CYP27A1の発現はウルソンによって低下傾向であり、さらに解析を継続する必要がある。また、今までの研究において、HFC食による線維化には、UGTなどの胆汁酸の解毒に関わる酵素およびそれを制御する核内受容体(CAR, PXR)の発現が重要であることが判明しているため、これらを解析する必要性がある。

以上をまとめると、EPAはHFC食による炎症を抑えるが、UDCAは炎症というより、脂肪沈着と線維症を予防することが判明した。

#### (4)HFC食による肝炎・線維症進展の非侵襲的バイオマーカー

肝臓と血清のサイトケラチン18(K18)はカスパーゼにより断片化すると、新しいエピトープのAsp396が出来、これはM30抗体により認識される。肝臓と血清のK18Asp396を測定した。HFC食はアポトーシスより壊死細胞数を増加させ、これはミトコンドリア障害とカスパーゼ3/7活性の低下に起因すると解された。カスパーゼ8と9も3/7と同様の動態を示した。また血清のM30抗体で認識されるK18Asp396の値が壊死や線維化と高い正の相関関係を示すことが明らかとなった(Table 1)。即ち、血清のK18Asp396が壊

死や線維化の非侵襲的バイオマーカーとなることが示唆された。しかし、当初想定されたアポトーシスの発現が低かったため、このバイオマーカーの関連性は有意性はあるが、さらに検討を要する。

Table 1 Correlations among histopathological findings, caspase activities and necrosis matters

	Serum		Liver	
	K19Asp396(U/L)		K18Asp396(U/mg)	
	<i>r</i>	<i>P</i> value	<i>r</i>	<i>P</i> value
Apoptosis cell count	0.599	<0.001	-0.131	0.439
Necrosis score	0.796	<0.001	-0.51	0.001
Fibrosis area (%)	0.711	<0.001	-0.448	0.002
Caspase 8(RLU)	-0.49	0.002	0.792	<0.001
Caspase 9(RLU)	-0.461	0.004	0.792	<0.001
Caspase 3/7(RLU)	-0.389	0.017	0.718	<0.001

#### (5)HFC食による肝炎・線維症進展と胆汁酸

肝臓の21種類胆汁酸を測定した。その結果、HFC食摂取により、CA/CDCA比が低下し、この比は血清ALT値、大脂肪滴スコアおよび線維化面積と負の相関関係、即ちCDCAがこれらの指標と正の相関関係を示した(Figure 1)。これらの結果は、CDCAの蓄積がHFC食による肝炎、脂肪化、線維化に関連していることが判明した。一方、殆どの胆汁酸種のグリシン/タウリン抱合比は逆に増えることが判明した。ラットでは通常タウリン抱合体が主要抱合体であるが、HFC食を与えるとグリシン抱合体が主要抱合体となる。ウルソUDCAはALT、大脂肪滴スコア、線維症と負の相関関係を示し、肝臓毒性を予防すると考えられた。

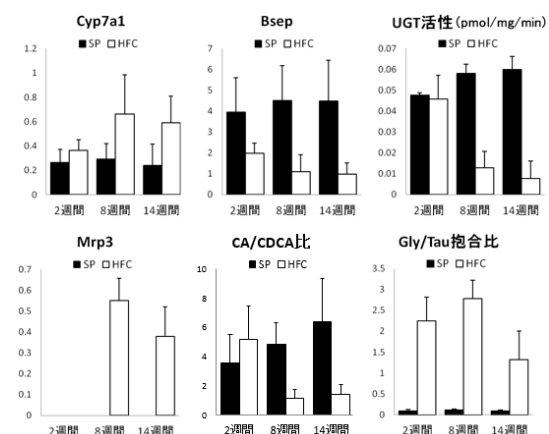


Figure 1 HFC食摂取時の胆汁酸合成・排泄に関わる蛋白と胆汁酸コル酸(CA)やケノデオキシコル酸(CDCA)の合成の遺伝子発現の増加に伴い、胆汁酸合成は上昇し、排泄(Bsep)や解毒(UGT)に関わる遺伝子発現が低下する(特にCDCAが蓄積する)。Mrp3は上昇する。また、通常タウリン抱合される胆汁酸はHFC摂取後グリシン抱合が主体となる。このようにして毒性の高い胆汁酸が蓄積し、肝炎や線維症に進展する。SPは対照群

## 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 9 件)

Jia X, Suzuki Y, Naito H, Yetti H, Kitamori K, Hayashi Y, Kaneko R, Nomura M, Yamori Y, Zaitzu K, Kato M, Ishii A, Nakajima T. A Possible role of chenodeoxycholic acid and glycine-conjugated bile acids in fibrotic steatohepatitis in a dietary rat model. *Dig Dis Sci*. 査読有、2014. DOI:10.1007/s10620-014-3028-3.

Yetti H, Naito H, Jia X, Shindo M, Taki H, Tamada H, Kitamori K, Hayashi Y, Ikeda K, Yamori Y, Nakajima T. High-fat-cholesterol diet-induced mainly necrosis fibrotic steatohepatitis rats by suppressing caspase activity. *Life Sciences*. 査読有、No4.93(18-19):673-680.2013. DOI.10.1016/j.lfs.2013.09.013.

Jia X, Naito H, Yetti H, Tamada H, Kitamori K, Hayashi Y, Wang D, Yanagiba Y, Wang J, Ikeda K, Yamori Y, Nakajima T. Dysregulated bile acid synthesis, metabolism and excretion in a high fat-cholesterol diet-induced fibrotic steatohepatitis in rats. *Digestive Diseases Sciences*. 査読有、58(8):2212-22.2013. DOI.10.1007/s10620-013-2747-1.

Suzuki Y, Kaneko R, Nomura M, Naito H, Kitamori K, Nakajima T, Ogawa T, Hattori H, Seno H, Ishii A. Simple and rapid quantitation of 21 bile acids in rat serum and liver by UPLC-MS-MS: effect of high fat diet on glycine conjugates of rat bile acids. *Nagoya J Med Sci*. 査読有、75(1-2): 57-71.2013. PMID: 23544269

Jia X, Naito H, Yetti H, Tamada H, Kitamori K, Hayashi Y, Yamagishi N, Wang D, Yanagiba Y, Ito Y, Wang J, Tanaka N, Ikeda K, Yamori Y, Nakajima T. The modulation of hepatic adenosine triphosphate and inflammation by eicosapentaenoic acid during severe fibrotic progression in the SHRSP5/Dmcr rat model. *Life Sci*. 査読有、90(23-24):934-943,2012. DOI.10.1016/j.lfs.2012.04.029.

Ito Y, Nakamura T, Yanagiba Y, Ramdhan DH, Yamagishi N, Naito H, Kamijima M, Gonzalez FJ, Nakajima T. Plasticizers may activate human hepatic peroxisome proliferator-activated receptor less than that of a mouse but may activate constitutive androstane receptor in liver. *PPAR Res*.2012. 査

読有、

2012824:1-11.2012.DOI.10.1155/2012/201284.

Moriya T, Kitamori K, Naito H, Yanagiba Y, Ito Y, Yamagishi N, Tamada H, Jia XF, Tsuchikura S, Ikeda K, Yamori Y, Nakajima T. Simultaneous changes in high-fat and high-cholesterol diet-induced steatohepatitis and severe fibrosis and those underlying molecular mechanisms in novel SHRSP5/Dmcr rat. *Environ Health Prev Med*, 査読有、17(6): 444-456.2012. DOI.10.1007/s12199-012-0273-y.

Kitamori K, Naito H, Tamada H, Kobayashi M, Miyazawa D, Yasui Y, Sonoda K, Tsuchikura S, Yasui N, Ikeda K, Moriya T, Yamori Y, Nakajima T. Development of novel rat model for high-fat and high-cholesterol diet-induced steatohepatitis and severe fibrosis progression in SHRSP5/Dmcr. *Environ Health Prev Med*. 査読有、17(3):173-182.2012. DOI.201210.1007/s12199-011-0235-9.

北森一哉、那須民江.SHRSP5/Dmcr の非アルコール性脂肪性肝疾患モデルとしての可能性. SHR 等疾患モデル共同研究会 News Letter No.37. 査読無、2011.

[学会発表](計 11 件)

那須民江、非アルコール性脂肪性肝疾患モデル (SHRSP5/Dmcr) の病態メカニズム、消費生活科学研究所講演会、2013.12.21、金城学院大学 (愛知県)

那須民江、高血圧は高コレステロール食による非アルコール性脂肪性肝疾患進展のリスクとなるか、第 72 回日本公衆衛生学会総会、2013.10.23-25、三重県総合文化センター (三重県)

北森一哉、SHRSP5/Dmcr の食事による非アルコール性脂肪性肝疾患モデルとしての検討、第 49 回高血圧関連疾患モデル学会、2013.9.6-7、日本大学会館 (東京都)

内藤久雄、高脂肪・高コレステロール食による胆汁酸動態に関わる遺伝子変化と肝線維症進展 (ポスター)、第 49 回高血圧関連疾患モデル学会、2013.9.6-7、日本大学会館 (東京都)

那須民江、高脂肪・コレステロール食による胆汁酸の蓄積と肝臓の脂肪化・炎症・線維症進展、第 49 回高血圧関連疾患モデル学会、2013.9.6-7、日本大学会館 (東京都)

北森一哉、非アルコール性脂肪性肝疾患に関する脂肪酸とコレステロールの影響、日本食品化学学会 第 19 回総会・学術大会、2013.8.29-30、金城学院大学 (愛知県)

那須民江、特定健診・特定保健指導の現状と課題について、第 86 回日本産業衛生学会総会、2013.5.14-17、愛媛ひめぎんホー

ル(愛媛県)

Xiaofang Jia, Chenodeoxycholic acid and total glycine-conjugated bile acids correlate to steatohepatitis and fibrosis caused by a high

fat-cholesterol diet in rats、第 83 回日本衛生学会学術総会、2013.3.24-26、金沢大学(石川県)

内藤久雄、高脂肪・コレステロール食により誘導される SHRSP6/Dmcr ラット肝障害の性差、第 83 回日本衛生学会学術総会、

2013.3.24-26、金沢大学(石川県)

内藤久雄、高脂肪食摂取による 2 系統ラットの肝線維化進展の差は胆汁酸組成の変化が関連する、第 83 回日本衛生学会学術総会、2013.3.24-26、金沢大学(石川県)

玉田葉月、非アルコール性脂肪性肝炎モデル動物 SHRSP5/Dmcr における脂肪の蓄積と摂取の関連、第 83 回日本衛生学会学術総会、2013.3.24-26、金沢大学(石川県)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

那須 民江 (NASU, Tamie)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：10020794

### (2)研究分担者

石井 晃 (ISHII, Akira)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30252175

内藤 久雄 (NAITO, Hisao)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90547556

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：