

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500846

研究課題名(和文) 過栄養性脂肪肝の病態生理学的メカニズムの解明と活性酸素によるDNA障害の関与

研究課題名(英文) The clarification of pathophysiological mechanism for over-nutritional fatty liver and the involvement of DNA damage by oxygen radical

研究代表者

加隈 哲也 (Kakuma, Tetsuya)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：80343359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食を負荷したラットの脾臓を摘出すると、肝臓で炎症誘発性サイトカインの発現が亢進し、酸化ストレスマーカーである8-oxoGや4-HNEが有意に上昇、脾臓摘出6ヶ月では肝臓の線維化が観察され、過栄養性脂肪肝から脂肪性肝炎への進展を助長することを見出した。さらに、過栄養性脂肪肝から脂肪性肝炎への進展は脾臓由来の炎症抑制性サイトカインであるIL-10の低下が主病態であり、IL-10の投与によって抑制しうることを証明した。

研究成果の概要(英文)：In liver of splenectomy-treated diet induced obese rats, the expression of the pro inflammatory cytokines induced and the oxystress-induced markers, 8-oxoG and 4-HNE, increased significantly. At 6 months after splenectomy, fibrotic changes were observed in the liver of rats. This result indicates that the loss of spleen contributes to the progression of hepatic steatosis to steatohepatitis in obese rats. These splenectomy-induced changes were inhibited by systemic administration of IL-10. We demonstrated that the spleen-derived IL-10 has a key molecule for the progression of hepatic steatosis to steatohepatitis.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学、応用健康科学

キーワード：脂肪肝 脾臓摘出 炎症性サイトカイン 脂肪性肝炎 IL-10

## 1. 研究開始当初の背景

生体内の活性酸素は、通常の代謝活動によっても生じている。特に、糖尿病や肥満でも早期より脂肪組織の中で活性酸素種や過酸化水素といった酸化ストレスが増加していることが報告されており、酸化ストレスの増加は肥満脂肪組織の中心的病態と考えられている。

活性酸素は様々な作用を生体にもたらすが、その中でも、DNA の酸化は突然変異や発癌を引き起こす原因となる。DNA の酸化的障害の中でもグアニン残基の酸化により生じる 8-オキソ (ヒドロキシ) グアニンは DNA 複製の過程で通常のシトシン残基との対合のほかに、アデニンとも誤って対合するため、高頻度で G:C→T:A トランスバージョンを引き起こす。また、この 8-オキソ体は DNA 中のグアニン残基の直接酸化によるもののほかに、ヌクレオチドプール中のグアニンヌクレオチドの酸化からも生じる。生体には、この 8-オキソグアニンや 8-オキソ-dGTP に対する修復酵素が存在しており、私は大学院時代に、8-オキソ-dGTPase のクローニングと機能解析を行ってきた。8-オキソ-dGTPase は肝臓に高発現していることを報告したが、なぜ肝臓での発現が高いのか、十分な検討はなされておらず、また突然変異の制御に寄与していること以外、代謝動態への関与は全く不明であった。

現在、8-オキソグアニンの産生が糖尿病患者やモデル動物において増加していることが報告されている。最近、この 8-オキソグアニンが高脂肪食負荷マウスの肝臓で増加していること、その増加量と修復酵素の発現とに相関があることなどが報告された。このような背景から、8-オキソグアニンによる DNA 障害とその修復機構に注目し、過栄養性脂肪肝から脂肪性肝炎への進展、そして発癌にいたるまでの過程を検証したいと考えた。

## 2. 研究の目的

この研究では、酸化ストレスによる DNA 障害と過栄養性脂肪肝の発症・進展における病態生理学的メカニズムについて、ひいては肥満症関連病態との関係も明らかにしたいと考えていた。しかし、基本的コンセプトが全く同じである論文：「8-Oxoguanine DNA Glycosylase (OGG1) Deficiency Increases Susceptibility to Obesity and Metabolic Dysfunction. Sampath H et.al.」が 2012 年に PLoS One 誌に報告されたため、少々方針を変えることにした。

肥満症の中心的病態である過栄養性脂肪肝の発症・進展における病態生理学的メカニズムについて、脾臓を中心に、種々の炎症サイトカインの動態とともに検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 過栄養性脂肪肝から脂肪性肝炎への進展における脾臓の役割について

① 8 週齢の雄 SD ラットに 60% 高脂肪食を 4 週間投与後、脾臓摘出モデルを作成し、脂肪肝発症メカニズムと脂肪性肝炎への進展について、生化学的、病理学的検討を行った。  
② 同様に作成した高脂肪食負荷ラットを用いて、脾臓の全摘出、半摘出モデルを作成し、残存脾臓量による検討を行った。

(2) 過栄養性脂肪肝の発症・進展における脾臓由来 IL-10 の役割について

① 22-25g の雄 C57BL6J マウスに 60% 高脂肪食を 8 週間投与し、炎症性サイトカインの発現を検討した。その後脾臓摘出モデルを作成し、脾臓摘出時の生体変化を生理学的、生化学的、病理学的に検討した。  
② 同様に作成した高脂肪食負荷マウスを用いて、脾臓摘出時さらに IL-10 補充時の肝臓変化を検討した。  
③ 次いで IL-10 遺伝子欠損マウスに高脂肪食負荷したのち、脾臓摘出時また IL-10 補充時の肝臓変化を調べた。

(3) 摂食リズム異常による脂肪肝の発症について

① 8 週齢の雄 C57BL6J マウスに普通食と 60% 高脂肪食をそれぞれ暗期のみ (pm7:00-am7:00) に摂食させ、その摂食量を定量化し、同量と同週齢の別マウスに明期のみ (am7:00-pm7:00) に摂食させるペアフェッドを 6 週間行い、体重変化と生化学的、病理学的検討を行った。

(4) 遺伝性肥満糖尿病モデルマウスにおけるチアゾリジン誘導体の脂肪肝への影響について

① 8-14 週齢の雄 KKAY マウスに、ピオグリタゾン を 15mg/kg/日、50mg/kg/日 で 4 週間経口投与し、脂肪肝の程度と糖脂質代謝、PPAR $\gamma$  と脂肪合成系遺伝子の発現を検討した。  
② 14 週齢の雄 KKAY マウスに、ピオグリタゾン を 15mg/kg/日 で 2 週間経口投与と腹腔内投与をし、生理学的変化と脂肪肝の程度、ならびに脂肪合成系遺伝子の発現を検討した。  
③ 19 週齢の雄 KKAY マウスに、ピオグリタゾン を 15mg/kg/日 で 5 日間腹腔内投与し、生理学的変化と脂肪肝の程度、ならびに脂肪合成系遺伝子の発現を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 過栄養性脂肪肝から脂肪性肝炎への進展における脾臓の役割について

① 60% 高脂肪食負荷ラットでは、体重増加とともに、LDL コレステロール、血清中性脂肪値ならびに遊離脂肪酸の有意な上昇を認め、肝臓内中性脂肪値、ALT の上昇とともに明らかな脂肪肝を呈するが、脾臓を摘出すると、脂質異常や脂肪肝の程度はさらに増悪し、摘出 6 ヶ月では肝臓への脂肪沈着のみならず、

肝細胞のバルーンリングと線維化が観察された(図1)。

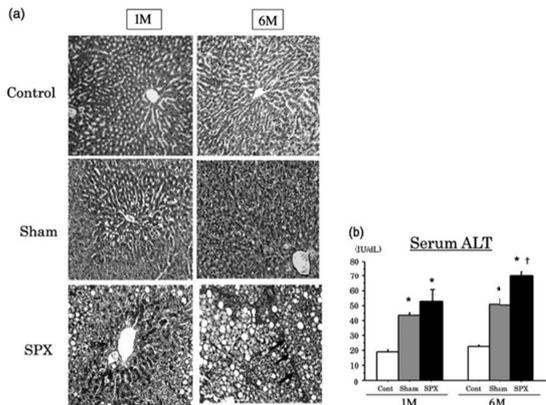


図1、銀染色による線維化の同定(高脂肪食負荷(sham)後、脾臓摘出すると(SPX)と、脂肪肝の悪化と線維化が観察される)

同様に、60%高脂肪食負荷ラットでは、肝臓において炎症誘発性サイトカインであるTNF $\alpha$ やIL-1 $\beta$ の発現が上昇するが、脾臓摘出6ヶ月では、同サイトカインの発現がさらに上昇していた。一方で、脂肪合成系遺伝子であるSREBP1やFASは高脂肪食負荷で上昇するが、脾臓摘出6ヶ月には有意に低下していた(コントロール群よりは有意に高い)。また脂肪燃焼系遺伝子であるCPT1も高脂肪食負荷で有意に上昇、脾臓摘出6ヶ月目には有意に低下していた(コントロール群よりは有意に高い)。

②60%高脂肪食負荷ラットの脾臓全摘出モデル、半摘出モデルを作成したところ、血清中性脂肪値、遊離脂肪酸、肝臓内中性脂肪値、ALTはコントロールに比べ、半摘出、全摘出の順に上昇しており、それに同調して脂肪肝の程度が増悪していた(図2)。また肝臓において、炎症誘発性サイトカインであるTNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1の発現、マクロファージのマーカーであるCD68、酸化ストレスマーカーである8-oxoGや4-HNEが残存脾臓量に反比例して増加していた。

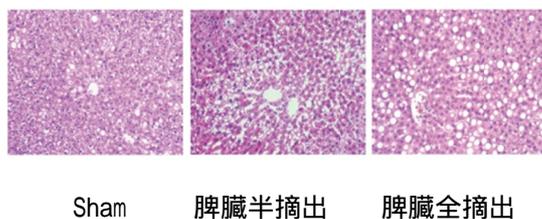


図2、肝臓のHE染色(残存脾臓量に反比例して、脂肪肝の悪化が観察される)

まとめ: 脾臓摘出は肝臓における炎症性サイトカインの発現亢進、酸化ストレスの増加を介して、過栄養性脂肪肝から脂肪性肝炎への進展を助長する。炎症性サイトカインのマスターレギュレーターであり、解剖学的に肝臓

と密接に関わっている脾臓は、肥満症の中心的病態である過栄養性脂肪肝の発症・進展を制御する重要な器官であると考えられた。

(2) 過栄養性脂肪肝の発症・進展における脾臓由来IL-10の役割について

①高脂肪食負荷マウスでは、脾臓内のTNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1、IL-10はいずれも有意に低下していたが、血中のTNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1は変化なく、IL-10のみ有意に低下していた。この結果は脾臓由来のIL-10が高脂肪食負荷マウスにおける代謝動態の変化に寄与している可能性を示すものである。同マウスの脾臓摘出モデルを作成し sham 群と比較したところ、高脂肪食負荷+脾臓摘出マウスでは、摂食量、体重、脂肪量は有意に低下していたが、血清中性脂肪値、遊離脂肪酸、ALTの有意な上昇を認めた。同モデルでは、脂肪肝の悪化とともに、肝臓内TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1、IL-10の上昇を認めたが、IL-10(炎症抑制)/TNF $\alpha$ (炎症誘発)の比は低下していた。またKupffer細胞を含めて、肝臓内にF4/80陽性細胞が有意に増加していた。

②高脂肪食負荷+脾臓摘出マウスで脂肪肝の悪化、種々の炎症性サイトカインの上昇、IL-10/TNF $\alpha$ 比の低下、F4/80陽性細胞の増加を認め、IPGTTでは糖代謝の更なる悪化を認めた。一方で、同モデルマウスにIL-10を投与すると、上記病態は全て高脂肪食負荷のレベルに改善した。

③IL-10遺伝子欠損マウスに高脂肪食を負荷すると、野生型マウスに高脂肪食を負荷したレベルより脂肪肝の程度は強いが、脾臓摘出による悪化は観察されず、同マウスにIL-10を投与すると野生型マウスに高脂肪食を負荷したレベルにまで改善した。肝臓内TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1、IL-10、IL-10/TNF $\alpha$ の比、F4/80陽性細胞の動態は、すべて肝臓変化に同調していた(図3)。また高脂肪食負荷したIL-10遺伝子欠損マウスの脾臓を摘出しても、IPGTTでの糖代謝悪化は認めず、同マウスにIL-10を投与すると糖代謝の改善が観察された。

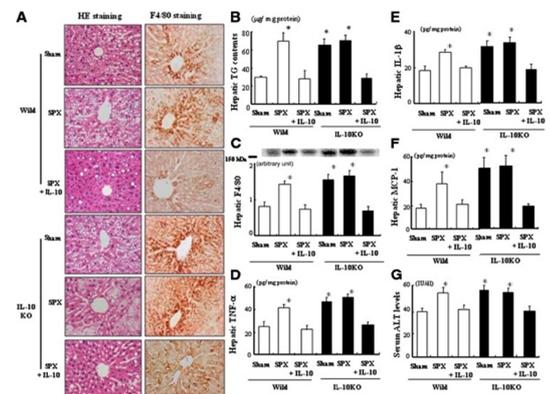


図3、脾臓由来のIL-10が高脂肪食負荷マウスにおける代謝動態の変化に寄与している可能性を示す。

図 3、野生型 C57BL6J と IL-10KO マウスの脾臓摘出時と IL-10 投与時の肝臓病理、ならびに炎症性サイトカインの変化

まとめ：これら一連の結果と(1)での成果から、脾臓摘出は過栄養性脂肪肝から脂肪性肝炎への進展を助長するが、それらは脾臓由来の IL-10 の低下により引き起こされていることが判明した。以上、脾臓は、肥満症の中心的病態である過栄養性脂肪肝の発症・進展を制御する重要な器官であることが確認され、中でも、脾臓由来の IL-10 がその中心的役割を担っていることが判明した。

(3) 摂食リズム異常による脂肪肝の発症について

① 普通食の暗期摂食群と明期摂食群、ならびに 60%高脂肪食の暗期摂食群と明期摂食群の摂取カロリーはペアフェッドのため同一である。この状況下で 6 週間観察したが、普通食ならびに高脂肪食どちらにおいても、暗期摂食群に対し明期摂食群では、有意な体重増加を認めた。この際、普通食明期摂食群と高脂肪食暗期摂食群に有意な体重差は観察されなかった。同モデルにおいて、高脂肪食群では白色脂肪組織の肥大化、褐色脂肪組織の白色脂肪化が観察され、特に高脂肪食明期摂食群でその程度が最も大きかった。一方で、体重変化と同様に、普通食明期摂食群でも高脂肪食暗期摂食群と同等の白色脂肪組織の肥大化、褐色脂肪組織の白色脂肪化が観察された。UCP1 発現は褐色脂肪組織の変化と完全に同調していた。耐糖能は普通食明期摂食群と普通食暗期摂食群との間に有意な差は観察されなかったが、普通食明期摂食群ではレプチン抵抗性を示していた。しかし肝臓重量は普通食明期摂食群で増加なく、肝臓病理でも脂肪肝は呈していなかった。同時に 8-oxoG、OGG1 の有意な変化は観察されなかった。

まとめ：活動性が低い時間帯に食事を摂ると脂肪量が増加することが報告されている。その程度と脂肪肝の発症について検討した。活動性の低い明期に普通食を摂食したマウスは高脂肪食を活動期である暗期に摂食したマウスと比較して体重差を認めなかった。この結果は摂食リズムの乱れがあると、高脂肪食摂取と同等の体重増加になることを意味している。今回の実験で与えた摂食リズム障害のレベル(期間や栄養成分)では、レプチン抵抗性はきたすが、脂肪肝を発症するほどではなく、8-oxoG、OGG1 の有意な変化は観察されなかった。

(4) 遺伝性肥満糖尿病モデルマウスにおけるチアゾリジン誘導体の脂肪肝への影響について

① 8 週齢でも 14 週齢でも遺伝性肥満糖尿病

モデル KKAy マウスにピオグリタゾンを経口投与すると、脂肪肝は悪化した。しかしピオグリタゾン経口投与では明らかにインスリン抵抗性改善作用を示し、糖脂質代謝は改善していた。一方で、15mg/kg/日投与より 50mg/kg/日投与の方が、インスリン抵抗性改善作用は強く、脂肪肝の悪化は軽度であった。肝臓 PPAR $\gamma$  の発現量は、野生型マウスに比べ、約 3 倍に増加していたが、ピオグリタゾン経口投与による更なる発現増加は観察されなかった。一方、脂肪合成系遺伝子である GPAT、ACC1 の遺伝子発現が有意に増加していた。

② 14 週齢の雄 KKAy マウスに、ピオグリタゾンを 15mg/kg/日で 2 週間経口投与すると、糖脂質代謝は改善するものの、脂肪肝の悪化と内臓脂肪の増加が顕著であった。一方、ピオグリタゾンを 15mg/kg/日で 2 週間腹腔内投与すると、糖脂質代謝の改善はより強く、脂肪肝は悪化せず、内臓脂肪の増加は観察されなかった。両投与方法ともにアディポネクチンは増加するが、増加の程度は腹腔内投与の方が 2 倍程度高かった。また腹腔内投与では GPAT の上昇は認めしたが、ACC1 の発現には変化がなかった。追加実験で、再度同様の処理を実施したところ、腹腔内投与では oil-red O 染色で明らかな脂肪肝改善を認めた(図 4)。

経口 cont 経口 Pio 腹腔内 cont 腹腔内 Pio

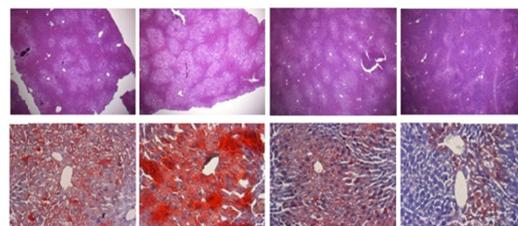


図 4、KKAy マウスにピオグリタゾンを経口ならびに腹腔内に 2 週間投与した際の肝臓所見(上: HE 染色、下: Oil-red O 染色)

③ 19 週齢の雄 KKAy マウスに、ピオグリタゾンを 15mg/kg/日で 5 日間腹腔内投与したところ、糖脂質代謝の改善、アディポネクチンの増加はより強く、脂肪肝は明らかに改善していた。

まとめ：チアゾリジン誘導体(ピオグリタゾン)はインスリン抵抗性改善作用、抗酸化作用を有しているにもかかわらず、遺伝性肥満糖尿病マウス(ob/obマウス、db/dbマウス、KKAyマウス)で脂肪肝が悪化してしまうメカニズムを検討した。ピオグリタゾンは脂肪合成に必須な転写因子 PPAR $\gamma$  のリガンドであり、その発現は通常脂肪組織に局限し、肝臓での発現は極めて低い。KKAy マウスでは肝臓内 PPAR $\gamma$  の発現が異所性に高発現しており、ピオグリタゾンの経口投与では肝臓内 PPAR $\gamma$  を介した内因性脂肪合成の亢進の結果、脂肪肝

が悪化することが確認された。一方でピオグリタゾンの腹腔内投与では内臓脂肪から皮下脂肪への脂肪分布の変化とともにアディポネクチンの上昇を認め、脂肪肝は改善した。ピオグリタゾンによる脂肪肝の悪化改善には脂肪組織と肝臓でのPPAR $\gamma$ の発現量と作用のバランスが規定していることが示唆された。

#### 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7件、全て査読あり)

① Gotoh K, Inoue M, Masaki T, Chiba S, Shiraishi K, Shimasaki T, Matsuoka K, Ando H, Fujiwara K, Fukunaga N, Aoki K, Nawata T, Katsuragi I, Kakuma T, Seike M, Yoshimatsu H. Obesity-related chronic kidney disease is associated with spleen-derived IL-10. *Nephrol Dial Transplant*. 2013, 28: 1120-1130.

② Gotoh K, Inoue M, Shiraishi K, Masaki T, Chiba S, Mitsutomi K, Shimasaki T, Ando H, Fujiwara K, Katsuragi I, Kakuma T, Seike M, Sakata T, Yoshimatsu H. Spleen-derived interleukin-10 downregulates the severity of high-fat diet-induced non-alcoholic Fatty pancreas disease. *PLoS One*. 2012, 7: e53154.

③ Gotoh K, Inoue M, Masaki T, Chiba S, Shimasaki T, Ando H, Fujiwara K, Katsuragi I, Kakuma T, Seike M, Sakata T, Yoshimatsu H. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced inflammation in white adipose tissue and liver. *Diabetes*. 2012, 61: 1994-2003.

④ Oribe J, Kakuma T, Haranaka M, Okamoto K, Seike M, Yoshimatsu H. Intraperitoneal administration attenuates thiazolidinediones-induced hepatic steatosis in KKAY mice with increased hepatic peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\gamma$  mRNA expression. *Obes Res Clin Prac*. 2012, 6: e249-261.

⑤ Inoue M, Gotoh K, Seike M, Masaki T, Honda K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Role of spleen in the development of steatohepatitis in high-fat-diet-induced obese rats. *Exp Biol Med*. 2012, 237: 461-470.

⑥ Gotoh K, Inoue M, Masaki T, Chiba S, Shimasaki T, Ando H, Fujiwara K, Katsuragi I, Kakuma T, Seike M, Sakata T, Yoshimatsu H. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced hypothalamic inflammation. *J Neurochem*. 2012, 120: 752-764.

⑦ Inoue M, Gotoh K, Seike M, Masaki T, Oribe J, Honda K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Involvement of remnant spleen volume on the progression of steatohepatitis in diet-induced obese rats after a splenectomy. *Hepato Res*. 2012, 42: 203-212.

[学会発表] (計4件)

① 加隈哲也. 2型糖尿病治療における血糖と体重の良好なコントロールの両立を目指して. 第51回日本糖尿病学会九州地方会 2013, 11.8-9.那覇

② 後藤孔郎, 正木孝幸, 千葉政一, 嶋崎貴信, 安藤久恵, 藤原貴為, 加隈哲也, 清家正隆, 柴田洋孝. 肥満に伴う非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の発症における脾臓由来 IL-10 の役割. 第34回日本肥満学会 2013, 10.11-12.東京

③ 後藤孔郎, 井上恵, 白石賢太郎, 安藤久恵, 嶋崎貴信, 正木孝幸, 千葉政一, 藤原貴為, 清家正隆, 加隈哲也. 肥満に伴う肝の脂肪化, 炎症性変化およびインスリン抵抗性における脾臓の役割. 第86回日本内分泌学会総会 2013, 4.25-27.仙台

④ 後藤孔郎, 井上恵, 正木孝幸, 千葉政一, 嶋崎貴信, 安藤久恵, 藤原貴為, 葛城功, 加隈哲也, 清家正隆, 坂田利家, 吉松博信. 肥満に伴う視床下部内の慢性炎症における脾臓由来 IL-10 の役割. 第55回日本糖尿病学会総会 2012, 5.17-19.横浜

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他] 特になし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

加隈 哲也 (KAKUMA TETSUYA)

大分大学・医学部・講師

研究者番号: 8 0 3 4 3 3 5 9

(2)研究分担者

清家 正隆 (SEIKE MASATAKA)

大分大学・医学部・助教

研究者番号: 4 0 2 5 3 7 9 4

正木 孝幸 (MASAKI TAKAYUKI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号: 0 0 4 2 3 7 1 5