

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月17日現在

機関番号：10107
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23790758
研究課題名（和文） 腸肝軸におけるTLRシグナル乖離と腸内細菌の変化がもたらすNAFLD病態の解析
研究課題名（英文） Investigation of pathogenesis of NAFLD in disturbance of hepatic and intestinal Toll-like receptor signal and alternation of microbiota
研究代表者 澤田 康司（SAWADA KOJI） 旭川医科大学・大学病院・特任助教 研究者番号：80548660

研究成果の概要（和文）：本研究では高脂肪食負荷マウスを用いて、肝・腸管におけるTLRの発現と抗生剤投与による発現変化、脂肪酸負荷による発現変化を検討した。炎症を伴わないNAFLDの状態では肝TLR発現が亢進、腸管では発現低下していた。抗生剤投与で、脂肪肝の改善と肝TLRの発現低下を認め、脂肪酸負荷によるin vitroの実験より、肝TLRの発現亢進は脂肪酸が寄与していた。NASHの前段階である炎症を伴わないNAFLDの時期より脂肪酸によるTLRの発現亢進を介した前炎症状態にあることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the expression of TLRs in gut-liver axis in high fat fed mice. The expression of TLRs was already upregulated in NAFLD liver without inflammation, but downregulated in small intestine. Antibiotics treatment improved steatosis and TLR expression in the liver. Fatty acids upregulated TLRs expression in Kupffer cell and hepatocyte models. In the development of the pro-inflammatory state of NAFLD, fatty acids trigger the expressions of TLRs, which contribute to the induction of inflammatory cytokines through TLR signals by the intestinal microbiota.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,300,000	690,000	2,990,000

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：NAFLD、Toll-like receptor (TLR)、脂肪酸、前炎症状態、腸肝軸

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣の欧米化により世界的に肥満患者が増加し、それに伴い肥満・代謝異常と腸内細菌との関連性が注目され報告されてい

る。また、肥満の増加により、肥満を背景にしたNAFLDも増加しており、病態に関しては様々な方面からの検討がされている。中でも、肝臓は経門脈的、経胆道的に病原微生物

の暴露にさらされており、自然免疫の働きが重要であるとされている。

細胞表面やエンドソーム内に発現している膜蛋白である Toll-like receptors (TLRs)は、病原微生物の構成成分を認識し自然免疫を誘導する。TLRs と NAFLD との関連についてノックアウトマウスを用いて様々な報告がなされ TLR2、TLR4、TLR9 と NASH との関連が示唆されている。

これらのことから、NASH/NAFLD と腸肝軸における TLRs シグナルの関与が考えられるが、過食・肥満・高脂肪食がどのように TLRs シグナルに変化を及ぼすかは不明である。

## 2. 研究の目的

(1) 高脂肪食投与における肝・腸管での TLRs の発現変化を解析する。

(2) 腸内細菌と TLRs の発現の関連、病態へ及ぼす影響を明らかにする。

(3) TLRs 発現変化のメカニズムを解析する。

## 3. 研究の方法

(1) 16 週間の高脂肪食負荷で NAFLD モデルマウスを作製して、肝・腸管における TLRs の発現を定量的 real time PCR 法で解析する。

(2) 腸内細菌との関連を検討するために、抗生剤を投与し、脂肪肝の程度、肝・腸管での TLRs の発現変化を解析する。

(3) 脂肪酸負荷による TLRs の発現変化を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) 高脂肪食負荷マウスでは高脂肪食投与後 16 週目で体重及び血清 ALT 値の有意な増加を認めた。肝病理組織像では、高脂肪食投与後 8 週目で小脂肪滴の沈着を認め、16 週目で高度の脂肪沈着を認めたが、明らかな炎症細胞浸潤の増加や肝線維化は認めなかった。肝組織における TLRs の発現は高脂肪食投与後 4 週目、8 週目では発現に変化は認めなかったが、脂肪肝形成時期である 16 週目で細菌構成成分を認識する TLR2, TLR4, TLR5, TLR9 の発現が高脂肪食負荷マウスで亢進していた (図 1)。更にエフェクター分子である IL-1 $\beta$ , TNF も 16 週目で発現が亢進し、TLR シグナルの mediator である pIRAK1 の発現も亢進していた。一方、腸管組織における TLRs の発現は、高脂肪食投与 16 週目で肝組織とは逆に有意に低下しており、IL-1 $\beta$ , TNF、pIRAK1 の発現も低下していた。

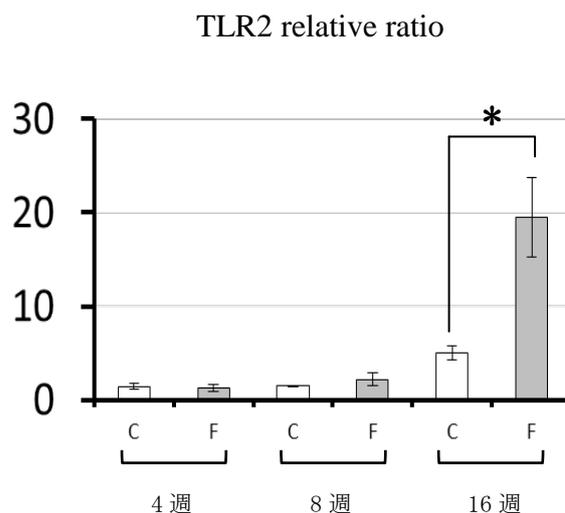


図 1 : 肝臓における TLR2 の発現変化

(C: コントロール食群、F: 高脂肪食群、  
\*: p<0.05)

(2) 抗生剤投与を高脂肪食負荷 8 週目から開始し、16 週目まで投与したところ、高脂肪食投与下においても体重増加、肝脂肪化(図 2)、血清 ALT 上昇の抑制が見られ、肝 TLR シグナルの上昇抑制も認められた。しかし、腸管においては発現変化に乏しかった。

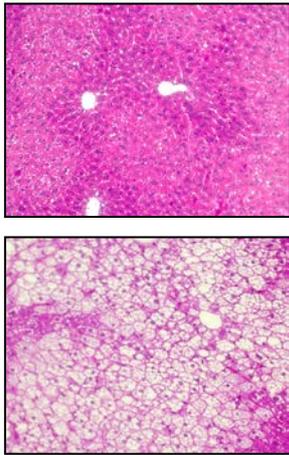


図 2: 16 週時の肝組織像  
上段; 高脂肪食+抗生剤群、下段; 高脂肪食群(HE 染色 200 倍)

(3) 抗生剤投与モデルにおいて、体重増加や肝脂肪化の抑制を認めたため、脂肪酸に着目し、*in vitro* の実験を行い、脂肪酸負荷によって肝細胞、Kupffer 細胞における TLRs の発現が亢進することを明らかにした。

(4) 以上から、高脂肪食負荷マウスにおいては炎症を伴わない NAFLD の時期から TLRs の発現が亢進し、前炎症状態にあることが明らかとなった。また、この前炎症状態は脂肪酸により誘導されている可能性が示唆された。

## 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 1 件)

澤田 康司、大竹 孝明、長谷部 拓夢、阿部 真美、鈴木 康秋、大平 賀子、高後 裕、高脂肪食負荷 NAFLD マウスの腸肝軸 Toll-like receptor の経時的発現変化と脂肪酸の関与の検討. アルコールと医学生物学. 31:108-112, 2012.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 澤田 康司、大竹 孝明、長谷部 拓夢、阿部 真美、鈴木 康秋、大平 賀子、高後 裕、高脂肪食負荷 NAFLD マウスの腸肝軸 Toll-like receptor の経時的発現変化と脂肪酸の関与の検討 (優秀演題)、第 31 回アルコール医学生物学研究会、2012 年 1 月 28 日、金沢
- ② Koji Sawada, Takaaki Ohtake, Takumu Hasebe, Masami Abe, Yasuaki Suzuki, Masumi Ohhira, Yutaka Kohgo. Fatty acid contributes to the discrepancy of hepatic and intestinal Toll-like receptor signal pathways in non-alcoholic fatty liver disease modeled mice. ISALPDC, 2011, October 21, Fukuoka, Japan
- ③ 澤田 康司、大竹 孝明、長谷部 拓夢、阿部 真美、鈴木 康秋、大平 賀子、高後 裕、高脂肪食・脂肪酸負荷の肝臓 TLR5 の発現変化と病態形成に対する関与—マウス NAFLD モデル、初代培養細胞、継代細胞による検討、JDDW 2011 2011 年 10 月 21 日、福岡

- ④ 澤田 康司、大竹 孝明、長谷部 拓夢、  
中嶋 駿介、阿部 真美、鈴木 康秋、  
大平 賀子、高後 裕、NAFLD 病態形  
成時の腸肝軸 Toll-like receptor 発現乖離  
における脂肪酸の重要性、第 47 回日本肝  
臓学会総会、2011 年 6 月 3 日、東京

[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]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

澤田 康司 (SAWADA KOJI)

旭川医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：80548660

(2) 研究分担者 なし  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし  
( )

研究者番号：