

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460797

研究課題名(和文) 3系統ラットを用いた非アルコール性脂肪性肝炎進展メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) A study to clarify the mechanism of non-alcoholic steatohepatitis using 3 different strains of rats fed with high fat and cholesterol diet

研究代表者

内藤 久雄 (NAITO, Hisao)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：90547556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪・コレステロール飼料(HFC)負荷により、肝炎・線維化に進展するラット(SHRSP5/Dmcr)及びその系統元と比較することにより、肝炎・線維化進展メカニズムの解析を行った。特に、コレステロールの異化産物である胆汁酸に着目し、解析した。その結果、胆管側へ胆汁酸を排出する輸送体の発現低下により、肝臓内に胆汁酸(ケノデオキシコール酸)が蓄積し、壊死・線維化へ進展することが示唆された。さらに、胆汁酸の解毒(水溶性化)に関するグルクロン酸抱合の活性低下及びそれらを制御している核内受容体の発現低下により、肝臓内の胆汁酸排泄遅延をもたらすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：High-fat and -cholesterol diet (HFC) induced fibrotic steatohepatitis in stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP) 5/Dmcr, the fifth substrain from SHRSP. This study aimed to clarify bile acid (BA) kinetic differences in HFC-induced fibrosis between SHRSP5/Dmcr and the mother strains. HFC decreased bile salt export pump and increased BA concentrations in the liver, especially chenodeoxycholic acid (CDCA) which is toxicity. Furthermore, decreases of constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, and UDP-glucuronosyltransferase activity were more prominent about fibrotic development. The greater progression of fibrosis induced by HFC may be due to greater suppression of UDP-glucuronosyltransferase activity detoxifying toxicants, such as hydrophobic BAs; e.g. CDCA.

研究分野：衛生学

キーワード：NASH 肝線維化 コレステロール 胆汁酸 グルクロン酸抱合 高血圧 生活習慣病

## 1. 研究開始当初の背景

近年、我が国では食生活の欧米化による肥満人口が増加し、メタボリックシンドロームの予防が重要視されている。この1つの表現型である非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、今まで病態の進展がない良性疾患と考えられていたが、その中に肝炎・線維化・肝硬変へ進展する非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) がある。NASH は、飲酒歴がないにもかかわらずアルコール性肝障害に類似した進展を示す症例として、1980 年 Ludwig らにより報告・命名されたが、近年患者数は増加傾向であり、予防・治療法の確立が急務である。しかし、脂肪肝から肝炎・線維化への進展メカニズムはまだ十分には明らかとなっておらず、その原因として病態を短期間に把握できる適切なモデル動物が存在しなかったことがあげられる。

申請者の研究室では、High Fat and cholesterol (HFC) 飼料を摂取させることにより、2 週間で脂肪の蓄積と肝炎、8 週間で重度の線維化、14 週間で肝硬変へ進展するモデル動物 (Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat (SHRSP)5/Dmcr) を開発し (Kitamori et al, 2011)、肝炎・線維化進展メカニズムの解明を行っている。これまでに、脂質代謝、抗炎症作用に關与するペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR) の発現量低下、炎症の指標である IL-6、腫瘍壊死因子 (TNF) や NF- $\kappa$ B の上昇と線維化の指標である星細胞の活性化が炎症・線維症への引き金となっていることが判明した (Moriya et al, 2012, Jia et al 2012)。SHRSP5/Dmcr は SHRSP に HFC を摂取させ、血中総コレステロール (TC) が高値を示す兄妹を継代的に交配させて確立した亜系統である。申請者は先行研究において、コレステロール動態に着目し、SHRSP5/Dmcr と系統元の SHRSP に HFC を摂取させ、肝炎・線維化進展の違いを解析した。その結果、コレステロールの異化産物である胆汁酸に着目し、胆汁酸の異化・排出・解毒経路に關連する遺伝子・蛋白発現の解析を行い、胆汁酸の肝臓内蓄積が肝炎・線維化進展に關連していることを明らかにした。しかしながら、肝炎・線維化進展に關しては、SHRSP5/Dmcr が SHRSP よりも、肝細胞のバルーニング、大脂肪的の蓄積、肝線維化進展が重度ではあったが、両系統とも肝線維化進展を認めた。また、ほかの先行研究により、SHRSP の系統元である Wistar Kyoto Rats (WKY) では、肝線維化を認めなかったことが報告されている。

## 2. 研究の目的

この研究では SHRSP の系統元であり、HFC 負荷により線維化を発症しない Wistar Kyoto Rats (WKY) を加え、HFC 負荷した 3 系統ラットのコレステロールから胆汁酸生成経路や排泄に關連する薬物代謝關連酵素及び抱合 (解毒) に關連する遺伝子・蛋白群を測定し

することを計画した。

しかし、SHRSP は対照群の餌では、脳梗塞を発症することが多く、対照群にばらつきが大きくなったため、SHRSP の系統元である SHR を追加した。

## 3. 研究の方法

10 週齢の SHRSP5/Dmcr、SHRSP、WKY に 8 週間コントロール飼料又は HFC 負荷 (各群 6 匹) し、前日午後から絶食後解剖し、血液及び肝臓サンプルを採取する。肝臓の一部は 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定後、H. E. 染色及びエラスチカワンギーンソン (EVG) 染色を行った。この時、SHRSP のコントロール飼料摂取群で脳梗塞が多発したため、SHRSP のコントロール群を追加し、さらに SHRSP の系統元の SHR を追加した。病理組織的变化では SHRSP5/Dmcr と SHRSP では病理組織所見では炎症・壊死・線維化が同様に認められたため、まず (1) SHRSP5/Dmcr と SHRSP の 2 群間での解析を胆汁酸合成・排出・解毒に關連する遺伝子・蛋白について行った。同時に肝臓内胆汁酸の測定 (液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC/MS/MS)) を連携研究者の元でも行った。その後、脳梗塞が多発した SHRSP を除き、(2) SHRSP5/Dmcr、SHR、WKY の 3 群での解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) SHRSP5/Dmcr と SHRSP の HFC 負荷による差異

線維化面積は SHRSP5/Dmcr は約 22% に対し、SHRSP では約 7% と有意に少なかったが、線維化が密集している付近での壊死、炎症などは同様に認められた。また、バルーニング、大脂肪滴については SHRSP5/Dmcr で顕著であった。

胆汁酸合成・排出・解毒に關する遺伝子・蛋白発現では、胆汁酸合成關連蛋白 (Cyp7a1、Cyp7b1、Cyp8b1、Cyp27a1) に關しては大きな違いは認められなかった。一方、胆汁酸を胆管側に排出する輸送体 Bile salt export pump (Bsep) の蛋白発現は差が認められなかったが、血中 (類洞) 側に排出する輸送体 Multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3) は、SHRSP5/Dmcr で有意に蛋白発現が増加していた。Mrp3 は肝臓内短銃残の増加により発現が亢進することが報告されている。胆汁酸排出・解毒を制御する核内受容体 PXR、CAR の発現が HFC 負荷により SHRSP5/Dmcr で顕著に減少していた。これらの因子は胆汁酸の解毒 (硫酸抱合、グルクロン酸抱合) に關与しており、硫酸抱合に關連のある SULT2A1 の発現は、両系統ともに減少していたが、グルクロン酸抱合に關連する UGT 活性については、SHRSP5/Dmcr でのみ減少しており、このことが重度な肝線維化進展に關与していることが示唆された。特に、UGT の isoform の mRNA の発現を解析したところ、コレステロールから生成される一次胆汁酸の 1 つである

ケノデオキシコール酸 (CDCA) を基質とする Ugt1a3 の発現が SHRSP5/Dmcr で減少していた。

そこで、肝臓内胆汁酸濃度を測定したところ、SHRSP5/Dmcr では CDCA が増加し、もう一つの 1 次胆汁酸であるコール酸 (CA) は対照群と差がなかった。すなわち、CDCA/CA 比が増加しており、これはヒトにおいて肝硬変患者の血中濃度で認められる現象と類似している。一方、SHRSP では、CDCA/CA 比の変化は認められていない。

以上のことから、重度な肝線維化進展には肝臓内 CDCA の増加により、胆汁酸の毒性が強くなり、壊死・線維化進展し、UGT1A3 などの活性低下がさらに重度な進展に関与していることが示唆された。

(2)SHRSP5/Dmcr, SHR, WKY の HFC 負荷による差異

肝線維化面積は、SHRSP5/Dmcr が約 22%、SHR が約 7%、WKY が 1% 未満であった。SHR では、SHRSP と同程度の線維化が認められたが、線維化密集部位付近の広範な壊死層などは一切認められず、肝細胞のパルーニング、大脂肪滴なども少なかった。

胆汁酸合成・排出・解毒に関する遺伝子・蛋白発現では、胆汁酸合成関連遺伝子のうち、律速酵素である Cyp7a1 は WKY に比べ、SHR、SHRSP5/Dmcr の発現が亢進していた (系統差あり) が、HFC 負荷による増加は認められなかった。これは、Cyp7a1 の半減期が短いことにより、前日から絶食していたことが影響していた可能性があり、今後の検討課題となった。次に Cyp7b1 も WKY に比べ、SHR、SHRSP5/Dmcr で発現が亢進しており、さらに SHRSP5/Dmcr では HFC 負荷によりその発現が増加していた。一方、Cyp8b1、Cyp27a1 は 3 系統とも発現が抑制されていた。胆汁酸の胆管外排出輸送体 Bsep は HFC 負荷により、3 系統とも蛋白発現は低下した。一方、血中側排出輸送体 Mrp3 は HFC 負荷により SHRSP5/Dmcr で蛋白発現が亢進し、SHR ではわずかに発現が認められたが、WKY では発現を検出できなかった。胆汁酸解毒に関する閥内受容体 PXR、CAR は SHR、SHRSP5/Dmcr では蛋白発現は低下したが、WKY では変化が認められなかった。

肝臓内胆汁酸の測定 (液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC/MS/MS)) を連携研究者の元で計画していたが、機器が故障したため、新しい LC/MS/MS を用い、新たに胆汁酸の測定法の開発を行っているため、この 3 系統の肝臓内胆汁酸濃度については今度の研究課題である。

以上の点から、肝線維化進展には胆汁酸の肝臓内蓄積が重要であることが示唆されたが、WKY では線維化進展を認めなかった原因の探索が重要と考えられた。WKY は正常血圧ラットである点も考慮し、今後は高血圧の関与についても検討しておく予定である。

## 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 6 件)

Naito H, Jia X, Yetti H, Yanagiba Y, Tamada H, Kitamori K, Hayashi Y, Wang D, Kato M, Ishii A, Nakajima T. Importance of detoxifying enzymes in differentiating fibrotic development between SHRSP5/Dmcr and SHRSP rats. Environ Health Prev Med. 2016 May 21. in press. 査読有

Tamada H, Naito H, Kitamori K, Hayashi Y, Yamagishi N, Kato M, Nakajima T. Efficacy of Dietary Lipid Control in Healing High-Fat and High-Cholesterol Diet-Induced Fibrotic Steatohepatitis in Rats. PLoS One. 2016 Jan 4;11(1):e0145939. 査読有

Nakajima T, Naito H. Mechanism Analysis and Prevention of Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. Nihon Eiseigaku Zasshi. 2015;70(3):197-204. Japanese. 査読有

Jia X, Suzuki Y, Naito H, Yetti H, Kitamori K, Hayashi Y, Kaneko R, Nomura M, Yamori Y, Zaitso 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. 2014 Jul;59(7):1490-501. 査読有

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 mainly induced necrosis in fibrotic steatohepatitis rat by suppressing caspase activity. Life Sci. 2013 Nov 4;93(18-19):673-80. 査読有

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. Dig Dis Sci. 2013 Aug;58(8):2212-22. 査読有

[学会発表](計 10 件)

内藤久雄、吉川由貴、北森一哉、那須民江。高脂肪食摂取による肝炎・線維症進展におけるオートファジーの関与。第 51 回高血圧関

連疾患モデル学会(大阪) 2015年10月

北森一哉、宮澤大介、内藤久雄、土倉覚、安井菜穂美、池田克巳、家森幸男、那須民江。非アルコール性脂肪性肝疾患におけるコレステロール摂取の影響と肝臓脂肪酸組成の変化。第51回高血圧関連疾患モデル学会(大阪) 2015年10月

内藤久雄、滝仁志、橋本沙幸、賈小芳、新藤守孝、北森一哉、玉田葉月、那須民江。コレステロールの量依存的に誘発される肝炎・肝線維症。日本産業衛生学会第43回産業中毒・生物学的モニタリング研究会(愛知) 2015年10月

内藤久雄、賈小芳、Yetti Husna、北森一哉、林由美、加藤昌志、那須民江。血圧が高脂肪食摂取による肝線維化進展に影響を与えるかもしれない。第85回日本衛生学会学術総会(和歌山) 2015年3月

玉田葉月、内藤久雄、北森一哉、Yetti Husna、那須民江。非アルコール性脂肪性肝炎に対する脂質コントロールの影響。第84回日本衛生学会学術総会(岡山) 2014年5月

内藤久雄、Yetti Husna、賈小芳、玉田葉月、北森一哉、林由美、加藤昌志、那須民江。高脂肪食摂取による肝臓線維化進展の性差の原因は胆汁酸動態の差異にある。第84回日本衛生学会学術総会(岡山) 2014年5月

北森一哉、宮澤大介、内藤久雄、玉田葉月、土倉覚、安井菜穂美、池田克巳、家森幸男、那須民江。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(名古屋) 2013年8月

那須民江、賈小芳、内藤久雄、石井晃、Yetti Husna、北森一哉、玉田葉月。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(東京) 2013年9月

内藤久雄、Xiaofang Jia, Yetti Husna、北森一哉、玉田葉月、家森幸男、那須民江。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。第49回高血圧関連疾患モデル学会(東京) 2013年9月

北森一哉、内藤久雄、玉田葉月、土倉覚、安井菜穂美、池田克己、家森幸男、那須民江。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(東京) 2013年9月

〔図書〕(計1件)

Jia X, Naito H, Kitamori K, Nakajima T. Foods and dDietary Supplements in the Prevention and Treatment of Disease in Older Adults, Chapter 9. Elsevier ISBN:978-0-12-418680-4. 2015, 13

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/lecture/public-health/index.html>

<http://www.fujita-hu.ac.jp/teacher/medicine/na/n-hisao/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内藤 久雄 (NAITO, Hisao)  
藤田保健衛生大学・医学部・講師  
研究者番号: 90547556

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

那須 民江 (NAKAJIMA, Tamie)  
中部大学・生命健康科学部・教授  
研究者番号: 10020794

石井 晃 (ISHII, Akira)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 30252175

北森 一哉 (KITAMORI, Kazuya)  
金城学院大学・生活環境学部・准教授  
研究者番号: 80387597