

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670365

研究課題名(和文) 脂肪性肝炎と遊離コレステロール毒性：新規調節因子の探索的研究

研究課題名(英文) The role and molecular mechanisms of free-cholesterol toxicity in steatohepatitis

研究代表者

岡崎 佐智子 (OKAZAKI, Sachiko)

東京大学・医学部附属病院・病院診療医

研究者番号：30648720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、食生活の欧米化に伴い、脂肪肝は増加傾向にある。脂肪肝とは中性脂肪(TG)やコレステロールエステル(CE)などの中性脂質が肝細胞に蓄積する病態である。脂肪肝の脂肪性肝炎への進展において遊離コレステロール(FC)の役割が注目されている。申請者は肝臓でのCEを水解するリパーゼの過剰発現がFCの増加と同時に致死的肝炎を来す、という新たな発見をした。FC蓄積による肝炎の発症機序として、インフラマソーム、特にIL-6経路の関与が推察され、さらに検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：Fatty liver has been recognized not only as a complication of metabolic syndrome but also as a causative factor of steatohepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. However, the mechanism how fatty liver progresses to steatohepatitis is not fully understood. Our study was aimed at elucidating the role of lipases in fatty liver and suggested that increased hydrolysis of cholesterol ester and production of free cholesterol in liver may promote inflammation in fatty liver. The exact molecular mechanism is under further investigation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：コレステロール リパーゼ 非アルコール性脂肪性肝炎

1. 研究開始当初の背景

(1) 脂肪肝は、食生活の欧米化に伴い近年著しい増加傾向にある。脂肪肝はその病態がメタボリックシンドロームと深い因果関係にあるだけでなく、脂肪肝から、脂肪性肝炎、肝硬変、肝癌へと進展することから、その制御は重要な医療課題である。

(2) では、脂肪肝はどのような契機で脂肪性肝炎に進展するのか？ 脂肪肝には、中性脂肪 (TG) やコレステロールエステル (CE) などの中性脂質が肝細胞に蓄積するが、いずれかの脂質成分が炎症を惹起するのか？ 脂肪性肝炎の患者では、単純性脂肪肝に比し、肝臓内 FC 含量が増加していることがリポミクス解析から明らかとなっている (Puri *P et al. Hepatology* 2007)。また、肝臓内 FC の蓄積が脂肪性肝炎を引き起こす可能性が細胞 / 動物モデルで示唆されている (Mari *M et al. Cell Metabolism* 2006): この報告では、CE が蓄積している肝臓に炎症刺激 (TNF- α など) を加えると、細胞内 FC が増加して肝炎が惹起されるが、興味深いことに、TG が蓄積している肝臓に同様の炎症刺激を加えても、肝炎は惹起されない。これらから、FC の蓄積が脂肪肝の原因となる可能性が示唆される。

(3) しかし、これまでの報告では、肝炎を引き起こす FC の産生源は明らかでない。CE の水解が FC の増加を来し肝炎を引き起こす可能性も考えられるが、直接的な証拠はない。申請者らはこれまで脂肪組織やマクロファージにおけるリパーゼの研究を行い、新規リパーゼの同定 (Okazaki *H et al. Diabetes* 2006, Okazaki *H et al. J Biol Chem* 2008) などを進めてきた。その研究背景から、リパーゼによる CE 加水分解とその結果として産生される FC が脂肪性肝炎を引き起こす可能性を考えた。

(4) そこで、CE を水解するリパーゼを脂肪肝モデルマウスの肝臓に過剰発現した。ここではリパーゼとして、TG、CE 両方の水解活性を有するホルモン感受性リパーゼ (HSL) を選択した。すると、TG が蓄積する脂肪肝モデル (sucrose 食モデル) では、リパーゼの過剰発現により脂肪肝の改善 (TG 含量減少) をみとめた以外は糖脂質代謝に大きな影響はなかったが、CE が蓄積する脂肪肝モデルである Paigen 食モデルにおいては、リパーゼの過剰発現により、脂肪肝の改善 (CE 含量の減少) に伴い、著しい FC 含量の増加と致死的な肝炎を来した。

(5) では、FC はどのように脂肪性肝炎を惹起するのか？ FC 毒性によるアポトーシスは、古くから良く知られた現象であり、そのメカニズムとして、小胞体 (ER) への FC 蓄積による ER ストレス (Feng *B et al. Nat Cell Biol* 2003) が示唆されてきたが、上述の Mari らはミトコンドリアへの FC 蓄積によるミトコンドリア障害とアポトーシスを示唆しており、その分子機構は完全には明らかではない。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、様々な食餌による脂肪肝モデルマウスとそのリパーゼの役割に注目し、*in vivo* モデル系を確立する。さらに、FC 毒性による脂肪性肝炎の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* モデルの確立

脂肪肝モデルとして、C57BL/6J マウスの雄を 8 週齢で購入後、1 週間の順応期間の後に、脂肪肝を来す種々の特殊食を投与した。マウスは 12 時間ごと明暗周期 (9-21 時: 明期、21-9 時: 暗期)、24 時間の恒常環境で飼育され、実験のため絶食とするとき以外は自由摂食、

自由飲水とした。

組み換えアデノウイルスは、既報のプロトコル (Okazaki H *et al.* *J Biol Chem* 2002) に従って作成し、過剰発現による、肝臓内の TG/CE リパーゼ活性上昇も確認した。

申請者は、Paigen 食 (1.25% コレステロール、0.5% コール酸、15% ココアバター) 投与下の C57BL/6J マウスは、肝細胞内に著しい CE 蓄積を認めること、この Paigen 食マウスに HSL の過剰発現を行うと、致死性肝炎を来すことを見出した (図 1)。そこで、Paigen 食のどの成分が肝炎を惹起したかについて検討を行った。

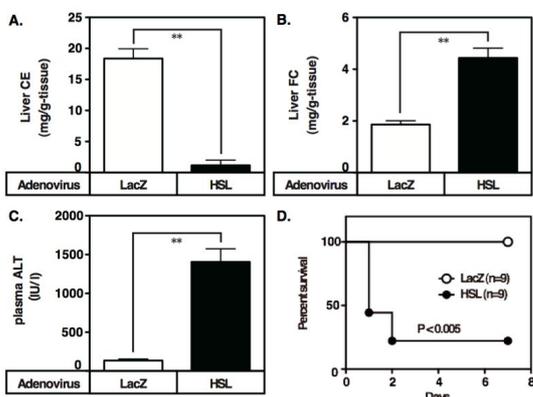


図1 Paigen食の脂肪肝におけるHSLの過剰発現—FC蓄積と致死性の肝炎

マウスに MF 食(オリエンタル酵母工業社、東京)、 コール酸単独食 (CA 食; MF に コール酸 0.5% を添加)、 コレステロール単独食 (Chol 食; MF に 1.25% コレステロールを添加)、 コレステロール + コール酸食 (CA+Chol 食; 1.25% コレステロール食 + 0.5% コール酸) を投与して、Paigen 食と同様の検討を行った (図 2)。

最初に、特殊食の投与期間についての予備的検討を、タイムコースで検討した。MF 食と比べて、Chol 食、CA+Chol 食では、投与 3 日後、7 日後、14 日後では、いずれも有意な肝臓内総コレステロール含量の増加を認め、その効果は 3 日間の投与でほぼ最大であった (MF 食: 2.2 ± 0.1 mg/g-liver, Chol 食 3 日目: 9.2 ± 1.2 mg/g-liver, CA+Chol 食 3 日目: 16.1 ± 0.6 mg/g-liver)。よって、

肝臓内総コレステロール含有量が一番高値であった 3 日間負荷で以下の実験を行うこととした。これらの特殊食を 3 日間投与後、頸静脈より、 2.5×10^{11} particles/body の組み換えアデノウイルス (HSL あるいは LacZ) を注射した。

(2) 分子メカニズムの検討

遊離コレステロールによる炎症惹起のメカニズムとして、ER ストレス、ミトコンドリア毒性とアポトーシスの他、マクロファージにおけるインフラマソームの活性化が着目されている。上記で確立したモデルを利用して、HSL 過剰発現による致死性肝炎の分子メカニズムを検討した。

4. 研究成果

(1) Paigen 食での HSL 過剰発現による著明な肝炎は、CA+Chol 食モデルに HSL 過剰発現の組み合わせによってのみ、再現された (図 2)。CA 食や Chol 食では致死性肝炎は来さなかったため、コール酸により、胆汁酸を介したコレステロール排泄経路が阻害されることにより、細胞内に FC の異常蓄積を来し、これにより致死性肝炎が引き起こされたと考えられた。

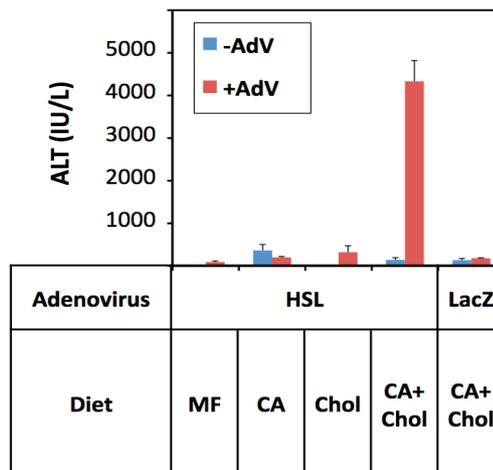


図2 HSL過剰発現による肝炎

(2) このモデルを用いて、FC 蓄積による肝炎の発症機序について、検討を進めた。FC に

よる細胞毒性の発症機序として最近注目されるインフラマソームなどにも着目し検討した。その結果、CA+Chol 食モデルにおいてのみ、HSL 過剰発現すると、LacZ 過剰発現群と比較して、著明な血中 ALT 増加 (HSL : 4333 ± 486.8 IU/L, LacZ : 142 ± 52.90 IU/L ; p<0.001) に伴って、IL-1、IL-6 がそれぞれ 3.7 倍、5.7 倍に増加、一方で、TNF- α の増加は認めなかった。

FC 蓄積性肝炎の発症機序として、インフラマソーム経路、IL-6 の関与が推察され、更に検討を進めている。

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)

[学会発表](計5件)

岡崎佐智子「肝臓ホルモン感受性リパーゼ過剰発現による遊離コレステロール蓄積性肝炎の発症機序」第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2014年7月10日、京王プラザホテル(東京、新宿区)

岡崎佐智子「コレステロールエステル蓄積型脂肪肝におけるリパーゼ過剰発現は肝炎を来す」第56回日本糖尿病学会年次学術集会、2013年5月18日、テトリアくまもとビル(熊本県、熊本市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡崎佐智子 (OKAZAKI, Sachiko)
東京大学・医学部附属病院・病院診療医
研究者番号 : 3 0 6 4 8 7 2 0

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

岡崎啓明 (OKAZAKI, Hiroaki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 8 0 6 1 0 2 1 1

高梨幹生 (TAKANASHI, Mikio)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号 : 7 0 6 1 0 7 9 9

高瀬暁 (TAKASE, Satoru)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 8 0 5 0 8 0 9 4

久保田みどり (KUBOTA, Midori)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号 : 2 0 3 8 3 8 0 4