

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860550

研究課題名(和文) NASH病態におけるエンドトキシン-脂質代謝障害の検討

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms for NASH pathogenesis associated with endotoxin-induced disorder of lipid metabolism

研究代表者

今城 健人 (IMAJO, kento)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：30600192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々が以前に報告した腸管由来エンドトキシン(ET)に対する肝臓での過剰応答により誘導される炎症性サイトカインが肝内炎症を惹起するだけでなく、肝細胞の脂質排泄のkey factorであるmicrosomal triglyceride transfer protein (MTTP)を抑制することで肝内に遊離脂肪酸(FFA)の蓄積を来し、肝障害及び肝線維化を進展させるという機序を解明している。炎症性サイトカインが肝細胞においてMTTPを抑制することをin vivo・in vitroで証明し、また肝細胞特異的にMTTPを抑制することで肝内FFA蓄積及び肝障害増悪を証明している。

研究成果の概要(英文)：Gut derived endotoxin (ET) is the one of the major pathogenesis of the development of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). We have recently demonstrated the hyper responsibility to ET in the fatty liver by increasing the expression of CD14 which is the co-receptor for ET by increase in leptin, promoting the chronic steatohepatitis even under the low-dose ET exposure in high-fat diet (HFD)-fed obese mice. However, to investigate the role of ET in human NASH pathogenesis, we must use lower dose of ET, which does not lead to liver disorder, even in HFD-fed obese mice. In this research, we found that the very low dose ET decreased hepatic microsomal triglyceride transfer protein (MTTP), key factor of lipid metabolism, led to excess accumulation of free fatty acid (FFA), result in development of NASH pathogenesis, even advanced liver fibrosis.

研究分野：肝臓一般

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 NASH 病態進展機序の解明 エンドトキシン 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) は動脈硬化や慢性腎臓病のように慢性持続性の炎症によるものと考えられ、その原因は多因子であり軽微な異常反応が多段階に継続して形成されると考えられる。Endotoxin(ET)-脂肪肝炎の分野に関しては、肥満者では腸管内における細菌の異常増殖が生じ、ET の絶対量増加による炎症が NASH 進展に関与すると信じられてきた(Miele L, et al. Hepatology 2009)。しかし、門脈中 ET 量は肥満者においてもせいぜい健康者の二倍程度でありこの現象のみでは NASH 病態を説明することはできない。ここで我々は脂肪肝では ET に対する反応性が正常肝とは異なるという仮説を立て、高脂肪食飼育下脂肪肝モデルマウスを用いて検討したところ、肥満に伴う脂肪肝ではレプチン-STAT3 シグナルを介して肝クッパー細胞に LPS 共受容体である CD14 を高発現させ、正常肝に比べて ET 反応性を亢進することを示した(文献 1)。即ち、正常肝では炎症を起こさない程度の低量 ET(0.25mg/kg)に対しても脂肪肝では過剰な炎症が惹起されることで肝障害をきたし、NASH 病態進展を来すことを報告した。Host 側の因子に着目した ET 過剰応答機序はこれまで報告がなされておらず、新規性が高くかつ独創的であるとされ、Cell Metabolism の Editorial にも取り上げられている。また、メタボリック症候群は肝臓のみならず全身性の炎症性疾患であり、我々が提唱した機序は肝臓のみならず多臓器に及ぶ ET 過剰応答性炎症の機序を説明できる可能性があり、極めて斬新かつ先鋭的であるとされ、多岐にわたる学会で優秀演題賞を受賞している(酸化ストレスと肝研究会 2011. 味の素アワード 2012)。

2. 研究の目的

上記のように、NASH の一つの機序として ET 感受性亢進が関与することは疑いようがない。しかし、ヒト肝臓で曝露される ET 量は我々のマウスモデルに比し極めて微量であり、生理的ヒト NASH 病態を説明するにはさらに微量の ET(超微量 ET)を用いた検討が必要である。超微量 ET ではいかに脂肪肝での過剰応答が生じたとしても肝障害をきたすほどの炎症は生じない。即ち、ヒトの生体では ET 過剰応答による炎症性 cytokine 増加以外にもさらなる病態進展因子が存在すると思われるが、未だ解明されていない。我々はこの進展機序として、炎症性 cytokine が肝における脂質排泄障害を来し、肝内に遊離脂肪酸(FFA)の蓄積を来し、肝障害を増悪させるという極めて独創的な NASH 病態進展機序を示すことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) *In vivo* において、普通食及び高脂肪食飼育下 C57BL/6J マウス(WT マウス)への超微量 ET 短期投与実験により、肝内でどのような脂質代謝障害が生じるかを検討すると共に長期投与を行い、脂肪肝病態が増悪するかを検討した。さらに *in vitro* において、肝細胞の cell line である HepG2 細胞を用いて炎症性 cytokine 添加による脂質代謝障害を検討した。また、超微量 ET が我々の提唱する ET 感受性亢進機序に伴い病態進展を来すのかを検討した。具体的には、マクロファージ特異的レプチン受容体ノックアウトマウス(LysM-cre Lepr^{fl/fl} マウス)に高脂肪食を投与した後、超微量 ET を投与することで上記仮説を検討した。

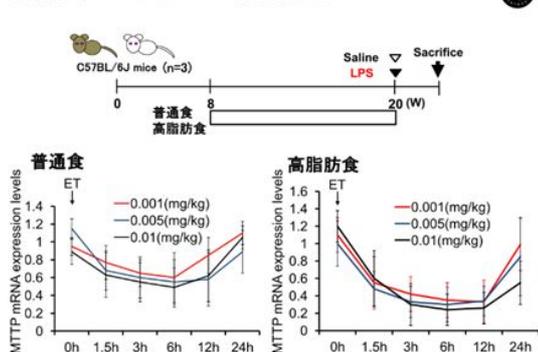
(2) 脂質排泄の key factor である MTTP の肝細胞特異的ノックアウトマウス(Alb-cre MTTP^{fl/fl} マウス)を作成し、高脂肪食で飼育することで脂肪肝病態が増悪するかを検討した。

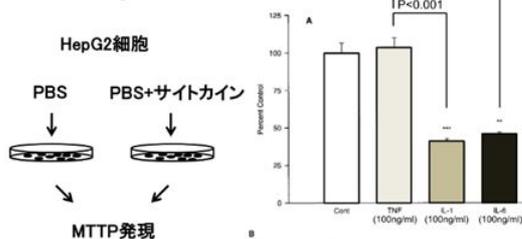
(3) ヒト NASH 患者の肝組織における検討により脂質排泄の key factor である MTTP の遺伝子発現が単純性脂肪肝に比し低下していることは既に我々が報告している(文献 2)。そこで今回、ヒト NASH では単純性脂肪肝に比し肝臓中の FFA が上昇しているか否かについて肝生検検体を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 下図のように、*in vivo* において超微量 ET (lipopolysaccharide; LPS) の一回投与でも普通食及び高脂肪飼育 WT マウスの肝 MTTP を著明に低下させた。また高脂肪飼育 WT マウスへ超微量 ET を 8 週間連日投与すると PBS を投与した同マウスに比し FFA が増加し有意に肝障害が増悪した。*In vitro* において、HepG2 細胞では炎症性 cytokine(TNF, IL-1, IL-6)添加により MTTP 発現が低下するとともに細胞内脂肪蓄積を誘導した。

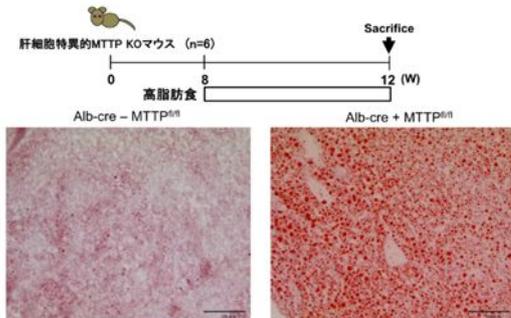
超微量 ET による MTTP 発現低下: *In vivo*



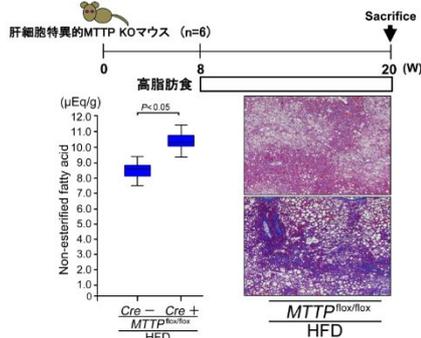


さらに、高脂肪食により飼育したマクロファージ特異的レプチン受容体ノックアウトマウスへの超微量 ET 投与では肝 MTTTP 発現低下がコントロールに比し有意に抑制された。(2) 下図のように、肝細胞特異的 MTTTP ノックアウトマウスは高脂肪飼育によりコントロールに比し有意に肝内脂肪蓄積が増加し、さらには肝障害を増悪させ、肝内 FFA 増加と共に肝線維化が惹起された。

肝細胞特異的MTTPノックアウトマウス:
脂肪蓄積評価: oil red染色

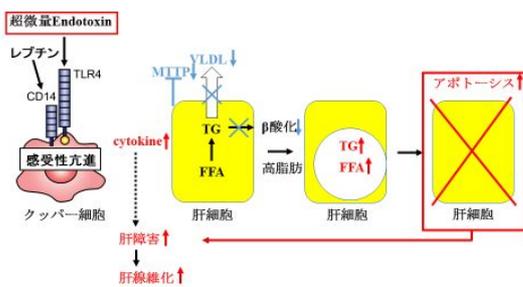


肝細胞特異的MTTPノックアウトマウス:
FFA蓄積及び線維化評価



(3) ヒト NASH 検体を用いることにより、血清及び肝組織中の FFA は単純性脂肪肝に比し有意に高いことが示された。これらの検討により、下図のように、超微量 ET が ET 感受性亢進に伴い炎症性 cytokine 上昇を来し、脂質排泄の key factor である MTTTP を低下させることで肝臓内に FFA を蓄積させ、アポトーシスを介して肝障害-肝線維化を増悪させる可能性が示唆された。

超微量ETIによる脂質排泄障害を介したNASH進展機序



<引用文献>

(1) Imajo K, et al. Hyperresponsivity to low-dose endotoxin during progression to nonalcoholic steatohepatitis is regulated by leptin-mediated signaling. *Cell Metab.* 2012; 16(1): 44-54.
(2) Fujita K, et al. Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. *Hepatology.* 2009; 50(3): 772-80.

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 5 件)

Imajo K, Honda M, Kessoku T, Ogawa Y, Saito S, Nakajima A. LDL-migration index (LDL-MI), an indicator of small dense low-density lipoprotein (sdLDL), is higher in non-alcoholic steatohepatitis than in non-alcoholic fatty liver: a multicenter cross-sectional study. *PLoS One.* 2014 Dec 26;9(12):e115403. 査読あり. doi: 10.1371/journal.pone.0115403.

Imajo K, Ogawa Y, Saito S, Nakajima A. Oral choline tolerance test as a novel noninvasive method for predicting nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol.* 2014 Feb;49(2):295-304. 査読あり. doi: 10.1007/s00535-013-0776-3.

Imajo K, Ogawa Y, Nakajima A. Microbiota and nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Immunopathol.* 2014; 36(1): 115-32. 査読あり. doi: 10.1007/s00281-013-0404-6.

Imajo K, Ogawa Y, Nakajima A. Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Int J Mol Sci.* 2013; 4; 14(11): 21833-57. 査読あり. doi: 10.3390/ijms141121833.

Imajo K, Ogawa Y, Saito S, Nakajima A. Soluble CD14 Levels Reflect Liver Inflammation in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *PLoS One.* 2013; 8(6): e65211. 査読あり. doi: 10.1371/journal.pone.0065211.

〔学会発表〕(計 5 件)

結束貴臣, 今城健人. エンドトキシンによる肝細胞の自然免疫応答において、microRNA-27b を介した NASH 進展メカニズムの解明. 第 51 回日本肝臓学会総会. パネルディスカッション, ホテル日航熊本 5F 阿蘇 A(熊本県・熊本市), 2015, 5.22.

本多靖, 今城健人. 微量エンドトキシンは肝 MTTTP 抑制による脂質排泄障害を介して脂肪肝病態進展に関与する. 第 101 回日本消化器病学会総会. ワークシ

ヨップ, 仙台国際センター展示棟 1F 会議室 3 (宮城県・仙台市), 2015, 4.23.
結束貴臣, 今城健人. mir27b の発現制御による肝臓から脂肪組織への蓄積脂肪の再分配の破綻による NASH 発症新規メカニズム. 第 11 回酸化ストレスと肝疾患研究会. 一般演題, ホテルレオパレス博多 (福岡県・福岡市), 2015, 02.14.
今城健人. 微量エンドトキシンは肝 MTTP 抑制による脂質排泄障害を介して脂肪肝炎病態進展に關与する. 第 100 回日本消化器病学会総会. シンポジウム, 東京国際フォーラム D ブロック 5 階 ホール D5 (東京都・品川区), 2014, 4.24.
今城健人. 脂肪性肝炎における肥満誘導性エンドトキシン感受性亢進機序の解明. 第 10 回宮崎サイエンスキャンプ. 招聘講演, シーガイアコンベンションセンター (宮崎県・宮崎市), 2014, 2.16.

〔図書〕(計 6 件)

今城健人, 日総研出版, 消化器看護, 2015, 75.
今城健人, アークメディア出版, NAFLD/NASH; 肝発癌に至る病態と対策, 2014, 379.
今城健人, ニューサイエンス社出版, 細胞, 2014, 46.
今城健人, 文光堂出版, NASH・アルコール性肝障害の診療を極める, 2013, 43.
今城健人, アークメディア出版, メタボ肝癌, 2013, 49.
今城健人, 横浜市立大学医学会出版, 横浜医学, 2013, 64.

〔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

<http://ycuhepabiligi.wix.com/home>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今城 健人 (IMAJO, KENTO)
横浜市立大学・附属病院・助教
研究者番号: 30600192

(2) 研究協力者

中島 淳 (NAKAJIMA, ATSUSHI)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 30326037

斉藤 聡 (SAITO, SATORU)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号: 00275041

小川 裕二 (OGAWA, YUJI)
横浜市立大学・附属病院・指導診療医
研究者番号: 20644959