

令和元年6月20日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08734

研究課題名(和文) 生体異物代謝を機軸とした非アルコール性脂肪肝炎発症機構の解明

研究課題名(英文) Evaluating the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis from the viewpoint of xenobiotic metabolism

研究代表者

田中 直樹 (TANAKA, Naoki)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：80419374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アリルヒドロカーボン受容体(AhR)はダイオキシンなどの生体異物に応答するための受容体として知られているが、生体での生理的役割は不明な点が多い。本研究では、高コレステロール食をAhR欠損マウスに投与すると容易に脂肪肝炎(NASH)を発症することを確定した。またその機構として、肝細胞の脂質代謝、免疫系・炎症の制御へのAhRの関与が示唆された。本研究により、AhRの新たな生体防御機能、すなわち食事の過剰なコレステロールによる脂肪肝炎(NASH)発症から肝臓を防御する役割を発見できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AhRは線虫や魚類など様々な動物種で保存されていることから、生体異物の受容体だけでなく、生命の恒常性維持のために根源的な役割を果たしていると推測されてきた。本研究支援により、肝臓へのコレステロール毒性を緩和させるという、AhRの新たな生理機能を見出すことができた。今後も肝細胞と免疫細胞のAhRに注目して研究を進めていく予定で、将来的には研究成果がNASH治療法の開発につながれば、と考えている。

研究成果の概要(英文)：Aryl hydrocarbon receptor (AhR) is involved in metabolism of xenobiotics, such as dioxin. However, the physiological roles of AhR in whole body remains unclear. This study confirmed that a high-cholesterol diet easily induced non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in AhR-disrupted mice. Several comprehensive analyses revealed the major contribution of AhR to regulating hepatic lipid metabolism and immune/inflammatory response. These results demonstrate a novel function of AhR, which protects livers from NASH caused by excessive cholesterol consumption.

研究分野：肝臓病学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 核内受容体 メタボロミクス コレステロール毒性

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) とは

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は日本国民の約 200 万人が罹患し、急増している慢性肝疾患である。ウイルス性肝炎と同様に肝硬変・肝癌へと進行するため、NASH の病態把握と治療法の開発は焦眉の急である。肥満・糖尿病・脂質異常症などの代謝異常だけでなくトリクロロエチレンなどの化学物質暴露でも NASH を発症することがあり、NASH 発症メカニズムの多様性・複雑性が示唆される。NASH 研究における現時点での最大の障壁は、ヒトの NASH 病理像を忠実に反映するマウスモデルが存在しないことである。高脂肪食をマウスに投与した場合、脂肪肝は生じるものの、肝細胞の風船状膨化変性や類洞周囲の線維化など NASH に特徴的な病理所見は生じない。そして NASH の発生に重要とされている酸化ストレス増大や炎症シグナル亢進もごく軽度である。これらの要因があいまって、診断治療法の確立や新規治療薬の開発が進んでいないのが現状である。

### (2) 生体異物受容体としての $\alpha$ 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体と NASH

研究代表者は 10 年以上にわたり、 $\alpha$  型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR $\alpha$ ) ノックアウトマウスや患者肝組織を用いて、NASH における PPAR $\alpha$  の役割を明らかにしてきた。生体異物受容体の性質を併せ持つ PPAR $\alpha$  は毒性の強い極長鎖脂肪酸と結合して活性化し、脂肪酸分解酵素を強力に誘導する。興味深いことに、NASH の原因となりうるトリクロロエチレンやフタル酸エステルなどの化学物質も PPAR $\alpha$  を活性化させ、PPAR $\alpha$  はシトクローム P450 などの薬物・毒物代謝酵素を誘導する。これらの生体異物は酸化ストレスを増大させ、炎症を惹起する。生体異物代謝の観点から PPAR $\alpha$  と NASH の関連を考察すると、PPAR $\alpha$  は食餌中の脂肪酸や化学物質の分解・無毒化を促進し、酸化ストレスや炎症性サイトカインの増大を緩和することにより、NASH 発症を抑制すると考えられた。

### (3) もう一つの生体異物受容体：アрилハイドロカーボン受容体

アрилハイドロカーボン受容体 (AhR) は PPAR $\alpha$  とは別種の代表的な生体異物受容体である。AhR はダイオキシンなどの外来異物の毒性を仲介する因子として知られてきたが、哺乳動物だけでなく線虫や魚類など広範な動物種に保存され、発生初期から多くの組織で発現することから、ダイオキシン毒性以外の生理的役割を持つと推測されてきた。脂質代謝に関しては AhR 活性化による脂肪酸トランスポーターの誘導が報告されているが、毒性の高い極長鎖脂肪酸や飽和脂肪酸により AhR が活性化しないことが予備実験で判明し、AhR を介した脂肪酸毒性緩和作用は限定的であると予想された。そこで研究代表者は、脂肪酸以外の NASH 原因候補脂質としてのコレステロールと AhR の関連に着目した。

### (4) AhR とコレステロール代謝

以前から高コレステロール食により生体異物代謝が誘導されることが知られており、コレステロール代謝・生体異物代謝間のクロストークが推測されていた。確かに過剰なコレステロールを生体異物と認識し、その毒性を軽減するメカニズムが生体内に備わっている可能性は想定されるものの、そのような観点からの研究はなされてこなかった。2015 年に動脈硬化の進行と AhR 遺伝子多型との関連が報告されたが、コレステロール代謝への AhR の関与や NASH における AhR の役割は未解明であった。

### (5) 本研究の着想： AhR 欠損マウスに NASH が発症するメカニズムとは

上記の背景から、研究代表者は AhR がコレステロール毒性に関連しているのではないかと予想し、野生型マウス (WT) と AhR 欠損マウス (AhR-KO) に高コレステロール食を 8~10 週間投与したところ、AhR-KO だけに 100% の確率で NASH が出現した。その病理所見はヒト NASH 患者の病理像に酷似しており、極めて高い再現性と類似性を考えると、高コレステロール食投与 AhR-KO の実験系は既存のものより優れた NASH マウスモデルとなる可能性が示唆された。本マウスでの NASH 発症メカニズムを多角的に解析することにより、AhR の新たな機能の提唱、AhR という新しい観点からの NASH の病態把握、さらに AhR を標的とした新規治療法の創出につながる可能性があると考えた。

## 2. 研究の目的

### AhR-KO で見られた高コレステロール食誘発性 NASH の発症機構を解明する。

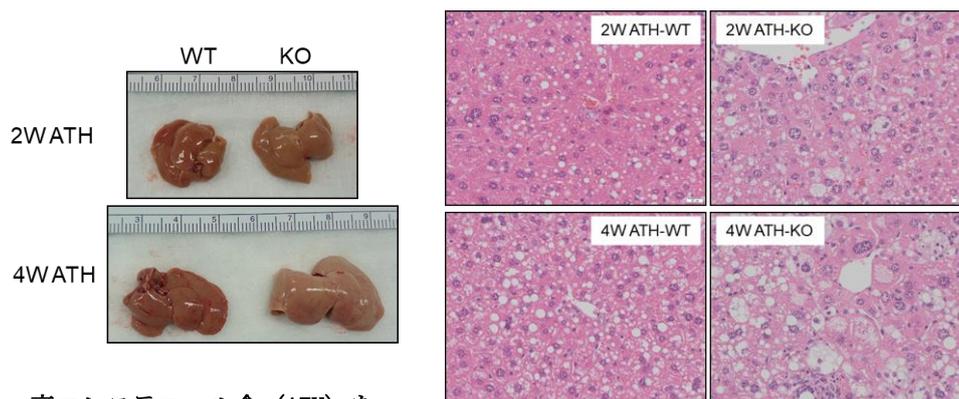
## 3. 研究の方法

- (1) 高コレステロール食の短期間投与にて現象の再現性を確認する。
- (2) オミックス技術を用いて、NASH 発症に関連する代謝物・遺伝子を同定する。
- (3) アデノウイルスを用いて、肝細胞の AhR が NASH 発症に関連しているか調べる。

#### 4. 研究成果

##### (1) 高コレステロール食を短期間投与しても、AhR-KO で NASH が生じる

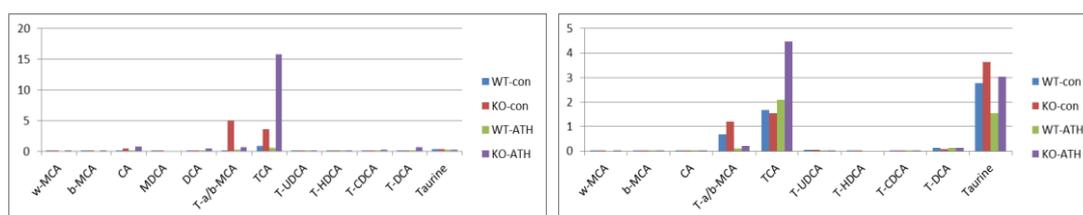
マウスに高コレステロール食を長期投与すると、様々な副次変化や代償性変化、そして加齢に伴う変化が加味されてしまう。そこでこの現象が高コレステロール食による直接的作用で生じるのか、さらに短期間の高コレステロール食投与でも AhR-KO に NASH が生じるか、再現性の確認を試みた。WT・AhR-KO それぞれに 2・4 週間の通常食、あるいは高コレステロール食を投与し、その表現型を解析した。どちらの期間の高コレステロール食投与でも、AhR-KO だけに血清 ALT、AST (肝傷害マーカー) の著明な上昇を認めた。高コレステロール食投与 AhR-KO では肝臓の腫大と白色化を認め、光学顕微鏡での観察にて肝小葉内の炎症細胞浸潤、肝細胞の風船状膨化変性、大滴性脂肪沈着を認め、NASH の初期像として矛盾しない所見であった (図 1)。定量 PCR 法にて肝組織の遺伝子発現を解析したところ、炎症性サイトカイン・線維化促進因子の増加が高コレステロール食投与 AhR-KO だけで確認され、血液生化学検査や肝組織像の裏付けができた。



【図 1】 高コレステロール食 (ATH) を 2、4 週間投与しても、AhR-KO で NASH が生じた。左、肝臓の外観：右、肝組織の HE 染色。

##### (2) AhR-KO の NASH における胆汁酸の変化 (バイロミクス)

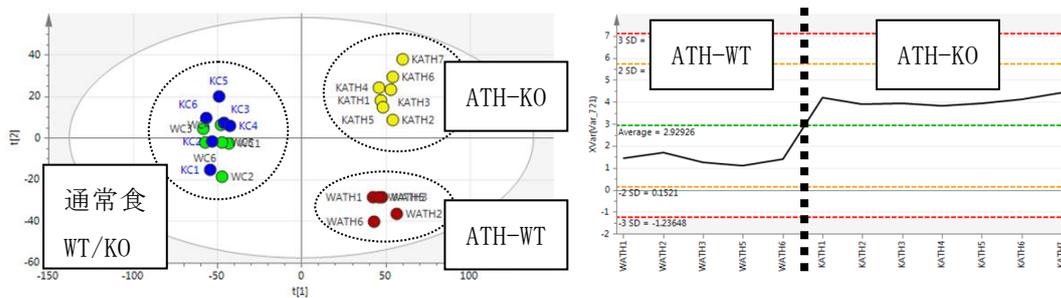
胆汁酸は近年脚光を浴びている生理活性物質である。食事中脂質によって胆汁酸代謝が大きく変化し、疎水性胆汁酸が肝細胞傷害に関連することが報告されている。上述の血清、肝組織を用いて胆汁酸の網羅解析 (バイロミクス) を行ったところ、AhR-KO の NASH で有意に増加していたのはタウロコール酸 (TCA) であった (図 2)。しかし TCA 自身は比較的肝毒性が弱く肝細胞傷害の結果として上昇することが知られているので、TCA の上昇は NASH 発症の原因というよりは、NASH の結果であると考えられた。



【図 2】 胆汁酸の網羅解析。高コレステロール食 (ATH) 4 週投与の AhR-KO にて、TCA が血中 (左)、肝臓中 (右) で上昇していた。クロマトグラフィーの area under the curve 値を表示。

##### (3) AhR-KO の NASH における代謝物の変化 (メタボロミクス)

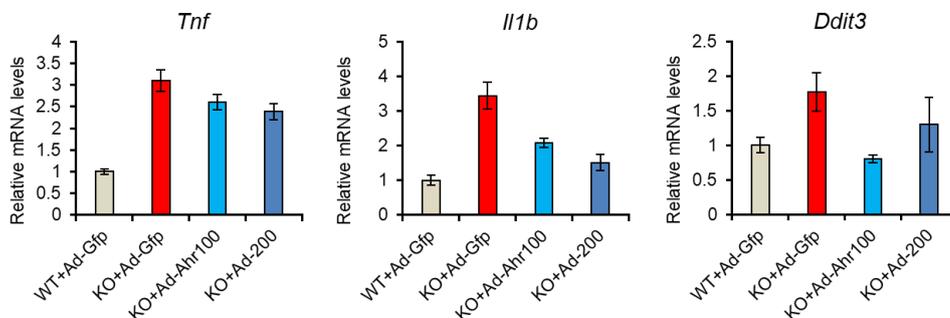
胆汁酸以外で、どのような代謝変化が AhR-KO の NASH で生じているか、肝組織を用いて代謝物の網羅解析 (メタボロミクス) を行った。通常食または高コレステロール食を投与した WT・AhR-KO の 4 群で主成分分析を行うと、NASH では代謝物プロファイルが大きく異なっていた (図 3 左)。高コレステロール食投与 WT・AhR-KO の 2 群比較から、プロファイルの差異を決定付ける代謝物を見出したが、標品の化学合成が極めて困難であり、研究期間中に同定できなかった。



【図3】 肝組織のメタボロミクス解析。(左) 高コレステロール食 (ATH) 投与の AhR-KO は、他の 3 群と異なる代謝物プロファイルを示した。(右) ATH 投与 KO の NASH で著明に増加している代謝物。黒実線が肝臓中濃度を示す。

#### (4) AhR-KO の NASH 発症における、肝細胞の AhR の役割

AhR は肝細胞、免疫細胞、腸管上皮細胞など様々な細胞に発現している。次に、肝細胞の AhR 欠損が NASH に関与しているのかを明確にしたいと考え、海外共同研究機関 (米国国立衛生研究所) で AhR を定常量発現するアデノウイルスを作成して頂いた。アデノウイルス実験の準備として、5 日間の高コレステロール食投与でも AhR-KO だけに血清 ALT、AST (肝傷害マーカー) の著明な上昇、Tnf, Cc12 などの炎症性サイトカイン・ケモカインの上昇、肝小葉内の炎症細胞浸潤と肝細胞への脂肪滴蓄積が生じることを確認でき、NASH の超初期像として矛盾しない所見であった。AhR アデノウイルスを AhR-KO マウスに投与し、肝細胞の AhR を回復させつつ高コレステロール食を投与し、炎症性サイトカイン・ケモカインの発現上昇が緩和するか、調べた。アデノウイルス注射 AhR-KO NASH 群では、肝細胞の AhR 回復に伴い Tnf, I11b, Ddit3 の改善傾向が認められ、肝細胞の AhR が NASH の発症に関与している可能性が示唆された。しかし注射後 1 週間以上経過すると、アデノウイルスに対する免疫が著明に賦活化されてしまい、高コレステロール食 2 週投与の実験では確定的なデータが得られなかった。これらの結果から、肝細胞の AhR の役割を確定させるためには、免疫系への影響がさらに少ないアデノ随伴ウイルスを用いた AhR 強制発現系、肝細胞特異的 AhR-KO の樹立が必要と考えられた。

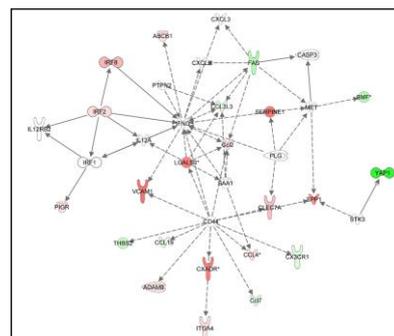


【図4】 高コレステロール食 (ATH) 投与の AhR-KO では、炎症性サイトカイン (Tnf, I11b)、小胞体ストレスマーカー (Ddit3) の発現が上昇する (NASH 発症)。ATH 投与 KO に AhR 発現アデノウイルス (Ad-Ahr) を注射すると、肝細胞の AhR 回復に伴い Tnf, I11b, Ddit3 の上昇が緩和された。

#### (5) AhR-KO の NASH における遺伝子変化 (トランスクリプトミクス)

最終年度では、AhR 強制発現系や臓器特異的 AhR-KO を準備しながら、AhR-KO での NASH 発生メカニズムの解析を進めた。AhR-KO での NASH で最も大きく変動している経路は何か、マイクロアレイ解析を行った。高コレステロール食投与 AhR-KO では、炎症や MAPK シグナルなどの経路、CD44 を中心とした免疫系が活性化していることが判明した (図 5)。AhR-KO に生じる NASH 発症機構として、肝細胞の AhR 欠損による肝脂肪沈着に加え、免疫系の過剰応答が関与している可能性が考えられた。

【図5】 高コレステロール食 (ATH) 誘導性 AhR-KO NASH で亢進している経路の一例



## (6) NEXT STEP

本研究支援により、AhR の新たな生理作用、すなわち食事中コレステロールによる NASH から肝臓を防御する役割を見出すことができた。一方、オミックス解析により、AhR の多岐にわたる複雑な役割も垣間見ることになった。今後は、肝細胞あるいは免疫細胞特異的 AhR-KO で同様に NASH が生じるか、AhR-KO で賦活化される CD44 経路は肝臓に蓄積するコレステロール、あるいは腸内細菌や腸内代謝物に反応しているのか、免疫系にも注目して研究を進めていきたいと考えている。これらの解析で有用な知見が得られれば、NASH に対する臓器特異的 AhR 作動薬の開発にも応用できるかもしれない。AhR は線虫や魚類などの動物種にも保存され、発生初期から多くの組織で発現することから、ダイオキシンの毒性発現以外の、もっと根源的な生理的役割があるものと推測される。今後も AhR と病態に関する研究を進めていきたいと考えている。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：青山 俊文

ローマ字氏名： (AOYAMA, Toshifumi)

所属研究機関名： 信州大学

部局名： 学術研究院医学系

職名： 教授

研究者番号 (8 桁)： 50231105

研究分担者氏名：中畷 岳郎

ローマ字氏名： (NAKAJIMA, Takero)

所属研究機関名： 信州大学

部局名： 学術研究院医学系

職名： 助教

研究者番号 (8 桁)： 30581011

#### (2) 研究協力者

研究協力者氏名： Frank J. Gonzalez

ローマ字氏名： (Gonzalez, Frank j)

研究協力者氏名： 高橋 昌悟

ローマ字氏名： (TAKAHASHI, Shogo)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。