

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462011

研究課題名(和文) SREBP発現における十二指腸空腸バイパスの意義—NAFLD治療の新たな選択肢—

研究課題名(英文) Duodenal jejunal bypass improves non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in diet induced NASH model rats

研究代表者

内藤 剛 (Naitoh, Takeshi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50291258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでの実験で食事誘発性NASHモデルを作成することに成功した。このモデルを用いて十二指腸空腸バイパス術(DJB)を施行した。その結果体重増加が抑制されNASH改善効果を認めた。DJB群では血漿中の胆汁酸が高値であったほか胆汁酸の核内受容体であるfarnesoid X receptor (FXR)とその下流の転写因子small heterodimer partner (SHP) のmRNA発現が肝において高値であった。また有意差を認めなかったもののSREBP 1cの発現の低下が示唆された。その機序として胆汁酸上昇に伴うSREBPを含むさまざまな代謝酵素発現調節機構の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously developed diet-induced NASH rat model. In this model, we performed the duodena-jejunal bypass (DJB) as a metabolic surgery and confirmed that NASH of the rat was improved dramatically. In the DJB group, the serum bile acids were elevated and expression of FXR, which is the nuclear receptor of the bile acids, was up-regulated in the liver. FXR is known to regulate the expression of the several enzymes related to metabolism, such as gluconeogenesis or lipogenesis. SREBP1c regulates the expression of the lipogenic enzymes and it is regulated by FXR as well. In this model, the level of SREBP was down-regulated in the DJB model, but not reached to the significant level comparing to the control group. However, we can conclude that NASH can be improved by the DJB and bile acids elevation and following cascade is strongly related to this mechanism.

研究分野：減量手術

キーワード：NASH 減量手術 胆汁酸 SREBP FXR 十二指腸空腸バイパス術 Metabolic Surgery

1. 研究開始当初の背景

病的肥満に対する減量手術は体重減少効果のみならず、併存する糖尿病などの代謝疾患を劇的に改善することが報告されている。さらにこの効果は体重減少が起こる前から発現することから、体重減少によらない直接的な効果と考えられている。

減量手術の代謝疾患改善効果は、胃の縮小のみの手術よりも、バイパス術を伴った吸収抑制手術を付加した手術において高いことから、これまでも代謝改善効果発現機序の本体はバイパス術にあると考え、バイパス術の主体である十二指腸空腸吻合術の糖代謝改善効果を研究し報告してきた。

一方、肥満人口の増加に伴って、非アルコール性脂肪性肝疾患 non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) が世界的に増加しており、なかでも進行性の炎症と線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎 non-alcoholic steatohepatitis (NASH) は肝硬変や肝細胞癌の発生母地として深刻な病態である。NASH の有効な治療法は現在確立されていない。

近年ではこの減量手術が糖尿病と同様に NASH に対しても高い改善効果があることが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では減量手術における NASH 改善効果が、糖尿病に対する効果と同様、十二指腸空腸バイパス術によるものと考え、十二指腸空腸バイパス術の NASH 改善効果を検討することを目的とした。さらにその効果発現機序として脂質代謝酵素の転写調節因子である、SREBP の発現およびそれを調節する胆汁酸シグナルに着目して明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NASH モデルラットの作成

雄性の Sprague-Dawley (SD) ラットを使用した。肥満、インスリン抵抗性を伴ういわゆる「メタボリックシンドローム」を背景とした NASH の病態を再現するため、この SD ラットにファストフードを模した Fast food diet (FFD) を給餌した。FFD の構成は既報を参考に高脂質 (40% kcal, その内、飽和脂肪酸を 94% 含む)、高フルクトース (21% kcal)、高コレステロール (1% weight) とした。SD ラットを 5 週齢で購入し、上記 FFD または対照として通常食を 12 週間与えた。飼育 12 週で犠死させ、全肝および門脈血、下大静脈血を採取した。

(2) 十二指腸空腸バイパス術

(Duodenal-jejunal Bypass: DJB)

前述と同様に FFD で 12 週間飼育した SD ラットに、DJB (n=10) または sham 手術 (n=6) を行った。手術手順は以下の通りである。まず幽門輪のやや肛門側で十二指腸を切離し、肛門側断端を閉鎖した。Treitz 靭帯から 30cm

肛門側の空腸を切離し、その肛門側断端を十二指腸の口側断端と端々吻合した。空腸の口側断端は、十二指腸-空腸吻合部から 15cm 肛門側の遠位空腸に端側吻合した。これらの操作により、小腸は食物のみの通る alimentary limb (AL; 15cm)、胆汁膵液のみの通る biliopancreatic limb (BPL; 30cm)、両者が混じり合う common channel (CC; 約 45cm) の 3 つの部分に分けられることとなる。一方 sham 手術では、DJB と同部位で十二指腸を切離後に再吻合し、また Treitz 靭帯から 30cm 肛門側の部位で同様に空腸の切離再吻合を行った。食事負荷試験とインスリン負荷試験をそれぞれ術後 13、14 週目に施行した。術後 16 週目に犠死せしめ、血液生化学検査や組織学的検査を施行した。

(3) 定量 PCR

肝組織から total RNA を抽出し、RNA 濃度を測定した。cDNA を合成し、real-time PCR を行った。各遺伝子のプライマー配列は National Center for Biotechnology Information (NCBI) より提供されているアプリケーション上で作製した。

(4) 胆汁酸濃度測定

血漿中の胆汁酸濃度を Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry 法にて測定した。総胆汁酸濃度および各胆汁酸分画、さらにはそれぞれの胆汁酸のタウリン抱合型およびグリシン抱合型の濃度も測定した。

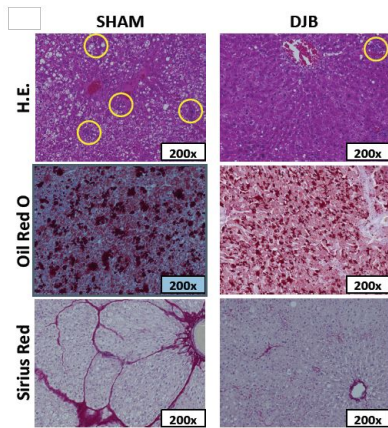
4. 研究成果

(1) FFD 摂取による NASH モデルの作成

FFD 飼育 12 週後のラットにおいて、肝は肉眼的に著明に腫大しており、また著しい脂肪肝であった。病理組織所見では、FFD 群において小～大滴性の脂肪変性が観察され、小葉内には小型類円型の炎症細胞 (リンパ球) が集簇する炎症巣が多数認められた。また、障害された肝細胞の所見である風船様変性も著明に見られた。線維化は門脈域を中心としたものであり NASH と診断し得る結果であった。NAFLD/NASH の病理診断基準である NAFLD Activity Score (NAS) は、通常食群が 0 点であったのに対し、FFD 群は 5.1 ± 0.37 点であり NASH と診断し得る結果であった。

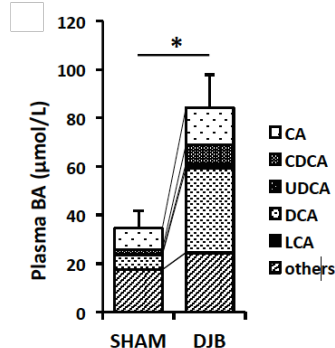
(2) DJB 術後の肝組織変化

術後 16 週目の肝は DJB 施行群で有意に重量が減少しており組織所見でも著明な NASH の改善効果を認めた。NAFLD Activity Score (NAS) は sham 群と DJB 群でそれぞれ 5.14 ± 0.24 vs 2.43 ± 0.45 ($p < 0.01$) であり、DJB 群で有意に低値であった。また Sirius Red 染色の赤領域を画像定量して得られた線維化面積は、sham 群と DJB 群でそれぞれ 9.3 ± 0.66 v.s. 3.5 ± 0.31 % であり、DJB 群において有意に低値であった。



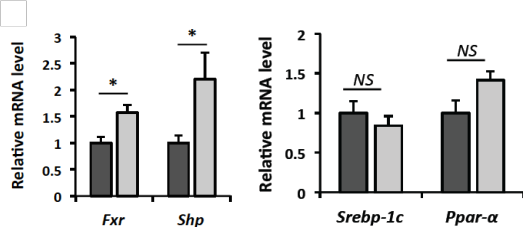
(3) DJB 術後の胆汁酸濃度変化と胆汁酸シグナルの変化

DJB 群では sham 群に比較し、血中胆汁酸濃度の有意な上昇を認めた。さらに胆汁酸分画においては CDCA および DCA の著明な上昇を認めた。



CDCA および DCA は胆汁酸の核内受容体である farnesoid X receptor (FXR) の強力なリガンドとして知られている。FXR はその下流の転写因子である small heterodimer partner (SHP) を介して脂質代謝や糖代謝に関わるさまざまな酵素の発現を調節している。脂肪酸合成を促進する転写因子, sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c), 脂肪酸の酸化を促進する転写因子, peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- α) もこの調節を受けている。

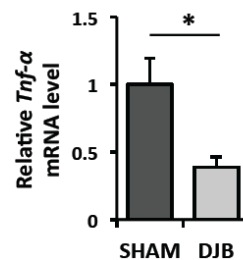
肝組織を用いた定量 PCR では、DJB 群では有意に FXR および SHP の上昇を認めた。SREBP-1c および PPAR- α は有意ではなかったが DJB 術後に SREBP-1c は低下、PPAR- α は上昇を認めた。



このことは DJB により血中胆汁酸濃度、特に CDCA や DCA の上昇を招き、その結果肝細胞における FXR の発現亢進を惹起することに伴い、SREBP や PPAR- α などの脂質代謝に関与する因子の発現が調節を受けていることを示唆

している。これらの結果は脂質代謝の改善をもたらす変化を示しており、DJB の NAFLD の改善効果を示唆するものと解釈された。

また NASH の成因にはセカンドヒットとして炎症性サイトカインの関与が重要であるが、DJB 群においては tumor necrosis factor alpha (TNF- α) の mRNA の発現が有意に低値であった。また同時に NF- κ B やその標的因子であり炎症細胞の走化因子として働く interferon-inducible protein-10 (IP-10) や monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の mRNA 発現量が有意に低値であった。FXR のシグナルは肝炎における NF- κ B 活性を抑制することが報告されており、これらの結果も胆汁酸シグナルの抗炎症効果と捉えることができる。



以上の結果から、肥満とインスリン抵抗性を背景とした新規 NASH モデルラットにおいて、DJB は NASH を改善した。その機序の一つとして、胆汁酸シグナルの活性化が関与しているものと考えられた。また胆汁酸シグナルにおいては SREBP-1c などの脂質代謝酵素転写調節因子の関与とともに胆汁酸の抗炎症作用が重要であると考えられた。

ただし、本研究においては DJB による血中胆汁酸濃度の上昇の機序に関しては十分な検討ができておらず、今後の重要な課題と考えている。

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)

[雑誌論文](計2件)

Miyachi T, Nagao M, Shibata C, Kitahara Y, Tanaka N, Watanabe K, Tsuchiya T, Motoi F, Naitoh T, Unno M. Biliopancreatic limb plays an important role in metabolic improvement after duodenal-jejunal bypass in a rat model of diabetes. Surgery 159 (5): 1360-1371, 2016. 査読あり。

土屋堯裕, 内藤 剛, 海野倫明. 肥満症外科治療の現状と展望 肥満症外科治療の基礎 効果メカニズム. 肥満研究 21 (1): 27-35, 2015. 査読なし。

[学会発表](計10件)

土屋堯裕, 長尾宗紀, 田中直樹, 渡辺和宏, 井本博文, 大沼 忍, 水間正道, 坂

田直昭,大塚英郎,森川孝則,武者宏昭,林 洋毅,中川 圭,元井冬彦,内藤 剛,海野倫明. Duodenal-jejunal bypass の NASH 改善効果の検証. 第 116 回日本外科学会定期学術集会. 2016/04/16,大阪 (大阪国際会議場).

Naitoh T, Tanaka N, Imoto H, Tsuchiya T, Nagao M, Musha H, Ohnuma S, Morikawa T, Motoi F, Unno M. Is Sleeve Bypass as a Metabolic Surgery Really Necessary for Japanese Obese DM patient? Society of Laparoscopic Surgery Asia-American Multispecialty Summit 2016. 2016/02/18, Honolulu, USA.

内藤 剛,田中直樹,長尾宗紀,渡辺和宏,井本博文,宮地智洋,土屋堯裕,大沼 忍,阿部友哉,武者宏昭,森川孝則,林 洋毅,中川 圭,元井冬彦,海野倫明.スリーブバイパス術の糖尿病改善効果と今後の方向性. 第 28 回日本内視鏡外科学会総会. 2015/12/10,大阪 (大阪国際会議場).

土屋堯裕,長尾宗紀,田中直樹,渡辺和宏,宮地智洋,河野えみ子,小野智之,林 洋毅,坂田直昭,大沼 忍,森川孝則,中川 圭,武者宏昭,元井冬彦,内藤 剛,海野倫明.十二指腸空腸バイパス手術後ラットにおける血中胆汁酸上昇と NASH 改善効果の検討. 第 57 回日本消化器病学会大会. 2015/10/09,東京(グランドプリンスホテル新高輪・高輪).

Naitoh T, Tanaka N, Nagao M, Imoto H, Miyachi T, Tsuchiya T, Kono E, Unno M. Mechanism of anti-diabetic effect of the metabolic surgery. 8th Asia Oceania Conference on Obesity. 2015/10/03,名古屋(名古屋国際会議場).

土屋堯裕,元井冬彦,内藤 剛,海野倫明.十二指腸空腸バイパス手術後ラットにおける血中胆汁酸上昇と NASH 改善効果の検討. 第 51 回日本胆道学会学術集会. 2015/09/17,宇都宮(ホテル東日本宇都宮).

Tsuchiya T, Nagao M, Tanaka N, Imoto H, Miyachi T, Kono E, Musha H, Motoi F, Naitoh T, Unno M. Duodenal-jejunal bypass improves non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in a diet-induced rat model. 20th World Congress of International Federation for the Surgery of Obesity & Metabolic disorders. 2015/08/26, Vienna, Austria.

宮地智洋,内藤 剛,長尾宗紀,田中直樹,渡辺和宏,土屋堯裕,河野えみ子,元井冬彦,片寄 友,海野倫明.十二指腸空腸バイパスにおける biliopancreatic limb の機

能:Metabolic surgery の機序解明にむけた新知見. 第 70 回日本消化器外科学会総会. 2015/07/17,浜松(アクトシティ浜松,他).

内藤 剛,田中直樹,宮地智洋,井本博文,土屋堯裕,河野えみ子,長尾宗紀,武者宏昭,中川 圭,森川孝則,元井冬彦,片寄 友,海野 倫明.糖尿病合併重症肥満患者に対するスリーブバイパス術の効果. 第 52 回日本外科代謝栄養学会学術集会. 2015/07/02,東京(品川区民会館きゅりあん).

内藤 剛,生澤史江,井本博文,宮地智洋,土屋堯裕,河野えみ子,田中直樹,長尾宗紀,海野倫明. Metabolic Surgery の作用機序-基礎的実験の結果から-. 第 33 回日本肥満症治療学会学術集会. 2015/06/27,幕張(幕張国際研修センター).

〔図書〕(計 1 件)

宮地智洋,内藤 剛,田中直樹,海野倫明.減量手術の有効性における FXR, TGR5 を介した胆汁酸シグナルの役割. 診断と治療社,門脇 孝編 糖尿病学 2015. 2015: pp66-73.

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 剛(Naitoh Takeshi)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 50291258

(2) 研究分担者

柴田 近(Shibata Chikashi)
東北医科薬科大学・医学部・教授
研究者番号: 30270804

田中 直樹(Tanaka Naoki)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号: 60547404