

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 25 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460174

研究課題名(和文)ニコチン酸(ビタミンB3)の作用から脂肪肝治療の新たな標的分子を解明する

研究課題名(英文) Mechanism of amelioration of steatohepatitis with niacin (vitamin B3): the pursuit of novel target genes for the treatment of NASH

研究代表者

原 眞純 (Hara, Massumi)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：70420213

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)：MSG投与による肥満・脂肪肝・脂肪肝炎モデルマウス(MSGマウス)に対してニコチン酸を投与したところ、脂肪肝の発症を完全に抑制し、完成した脂肪肝をほぼ正常な組織所見にまで改善させた。脂肪肝抑制のメカニズムとして、ニコチン酸の作用機序からは肝臓への脂肪酸動員と食後高脂血症の抑制が予測された。絶食・再摂食試験を行ったところ、ニコチン酸投与群では食後の遊離脂肪酸とTGが低下しており、少なくとも機序の一部であることが明らかになった。マイクロアレイ解析では、様々なパスウェイの関与が考えられたが、特にアポリポ蛋白A-IVと、PNPLA3がニコチン酸によって大きく変化していることが示された。

研究成果の概要(英文)：ICR mouse neonatally administered monosodium glutamate (MSG) shows obesity, insulin resistance, and is a murine model of steatohepatitis. In this study, we analysed the effect of nicotinic acid on steatohepatitis of MSG-treated obese mice. After 12 weeks of treatment of niacin, MSG-treated mice showed less weight of body and liver. Histopathological analyses showed markedly prevention of steatohepatitis. NAFLD activity scores (NAS) of niacin and vehicle groups were 0.0, 5.2, respectively. Niacin also dramatically ameliorated accomplished steatohepatitis. Niacin treatment ameliorated dyslipidemia; atherogenic LDL fraction was disappeared in fasting plasma, and elevations of postprandial NEFA and triglycerides were suppressed. Microarray analyses showed that the genes of apolipoprotein A-IV and patatin-like phospholipase domain containing 3 (PNPLA3) were changed in expression with the treatment of niacin.

研究分野：Metabolism

キーワード：Niacin NASH PNPLA3 apoA-IV

1. 研究開始当初の背景

脂肪肝は肥満、インスリン抵抗性、脂質異常症などの栄養障害を基礎に発生し、その頻度は健診受診者の10-30%にもものぼる。このうち10%程度は炎症や線維化をきたして脂肪肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis:NASH)に進展し、肝硬変や肝細胞癌の母地としてウイルス性肝炎に代わって重要な位置を占めつつある。脂肪肝からNASHへの移行には、肝臓への脂肪蓄積(1st hit)と酸化ストレス(2nd hit)が関与するという"Two hit theory"が唱えられてきたが、1st hit と2nd hitを明確に区別することは困難であり、多くの因子が同時に影響するmulti parallel hits theoryも唱えられているところである。このように、NASHの病態については依然不明な点が多い。肝臓に蓄積する脂肪は、脂肪酸とグリセリンによるエステルであるトリグリセリド(TG)である。TGの蓄積は、NASHの1st hitとされるが、炎症性メディエーターに変化する脂肪酸を反応性の低いTGに変換する防御反応と考えることもできる。さらに、2nd hitである酸化ストレスを惹起するメカニズムも不明である。つまり、NASHについては進展を促進する要因、進行度を判断する基準、治療法のいずれも確立していないと言える。

疾患の病態解明や治療の開発には動物モデルによる研究が不可欠であるが、マウスは肝臓の炎症や線維化をきたしにくく、適切なNASHモデルが存在しないとされてきた。われわれは、グルタミン酸ナトリウム(MSG)を新生仔期に投与した肥満マウスモデルについて、脂質異常や脂肪肝炎の発症を確認し、報告してきた(Nakanishi Y, Tsuneyama K, et al. J Autoimmunity 2008;30:42-50 Hara M, Kurano M, Kikuchi K, Tsuneyama K, Tsukamoto K, et al. 2011年日本動脈硬化学会総会)。MSGは摂食中枢である視床下部、延髄孤束核周辺を化学的に障害し、レプチン抵抗性を生じさ

せ、いわば中枢神経特異的レプチン受容体ノックダウン様の作用を有する。

ニコチン酸(ビタミン B3)はエネルギー代謝に必須のビタミンであるが、薬剤として摂取することで血中TG低下、HDLコレステロール上昇などの脂質改善作用を示すことから高脂血症治療薬として用いられてきた。われわれの検討では、ニコチン酸の投与により、脂肪肝が劇的に改善するとともに、食後の遊離脂肪酸が低下していた。これは、従来報告されていた脂肪組織からの脂肪酸の遊離だけでなく、食後に吸収されたカイロミクロンに含まれるトリグリセリドが加水分解を受けて生じる(spillover)脂肪酸も、ニコチン酸によって減少することを示唆する。また、血中のトリグリセリドは空腹時、食後ともに低下しており、肝臓からのTG分泌と、カイロミクロンの産生にもニコチン酸が作用している可能性が考えられた。肝臓でのTG産生(DGAT2)抑制に対するニコチン酸の作用は、培養細胞による検討で、遺伝子発現を介さずに活性が低下することが報告されているが、分子レベルでのメカニズムは不明のままである。リポ蛋白からのspilloverへの効果についても、ほとんど明らかになっていない。肝臓での合成を抑制してTGの蓄積を減少させることができるのは自明であるが、これがNASHの病態を改善するとは限らない。DGAT2のノックアウトマウスは肝臓でのTG含量は少ないが致死的であり、同様にTG合成を抑制するstearoyl-CoA desaturase-1(SCD-1)のマウスでは、肝臓脂肪重量は減少するが、炎症や肝細胞障害が強くなることや(Li ZZ et al. J Biol Chem 2009;284:5637-5644)、DGAT2の肝臓での過剰発現はTG含量を増やすが、肝臓でのインスリン抵抗性は減る(Monetti M, et al. Cell Metabolism 2007;6:69-78)という報告もある。TGの産生は、脂肪酸の過剰がアラキドン酸な

どの炎症メディエーターの増加に向かうことを防ぐ働きがあり、肝臓へのTGの蓄積は、脂肪酸を反応性の低いTGに変換する防御作用であると考えられる。単にTG合成を抑制するだけでは、肝細胞障害や線維化につながる炎症をかえって惹起する可能性がある。栄養素であるとともに様々な生体反応のメディエーターである脂肪酸の代謝の研究が重要である所以である。

2. 研究の目的

本研究は、MSG投与による通常食で発症する脂肪肝・脂肪肝炎に対するニコチン酸の効果を検証し、作用メカニズムの解析を通じて脂肪肝治療のための標的分子を解明することにある。

3. 研究の方法

1) MSG投与マウス脂肪肝の発症に対するニコチン酸の効果の検証

既に0.5%混餌投与で脂肪肝発症抑制効果を証明していたため、より低用量での効果を検証するために、0.1%混餌投与を5週齢から16週齢まで行った。

2) 発症後の脂肪肝への治療効果の検証

脂肪肝・脂肪肝炎が発症していることが確認されている12週齢より、0.1%混餌投与でニコチン酸投与を行い、脂肪肝への治療効果を確認した。

3) ニコチン酸の作用メカニズムの解明

a) 絶食・再摂食試験

MSG投与マウスを3日間馴化させた後に12時間の絶食と再摂食を行い、血中の遊離脂肪酸とTG値を測定した。

b) 肝臓のTG合成への影響

Tyloxapol静注後の血中TGの上昇から、肝臓からのTG分泌に対するニコチン酸の効果を検証した。

4) マイクロアレイ解析

ニコチン酸が脂肪酸動員と肝臓でのTG合成に作用していることが示されたことをふまえ、関与する遺伝子標的探索のため、マイク

ロアレイ解析を行った。MSGを投与しないコントロール(C)、ニコチン酸を投与しないMSGマウス(V)、ニコチン酸を投与したMSGマウス(N)の3群について、プール検体を用いてDNA-CHIP社に依頼してマイクロアレイ解析を行った。

4. 研究成果

1) MSG投与マウス脂肪肝の発症に対するニコチン酸の効果の検証

0.1%ニコチン酸の混餌投与を5週後から行うことで、16週後の脂肪肝の発症を検討したところ、0.5%混餌投与とほぼ同等に体重及び肝重量の低下、肉眼上また組織所見上の明らかな脂肪肝発症抑制効果を認めることを確認し得た。ニコチン酸投与群のNAFLD activity score (NAS)の平均は0点であり、脂肪肝の発症を完全に抑制していた。0.1%投与では、随時血糖の上昇も軽度であった。

2) 発症後の脂肪肝への治療効果の検証

0.1%ニコチン酸を12週齢のMSG投与マウスに投与し、12週間後の24週で比較したところ、体重及び肝重量は投与群で有意に低く、肝臓の肉眼的・組織所見での脂肪肝も著明に改善していた。投与群のNASの平均は0点であり、脂肪肝をほぼ完全に治療し得るとの結果が得られた。

3) ニコチン酸の作用メカニズムの解明

a) 絶食・再摂食試験

MSG投与マウスを3日間馴化させた後に12時間の絶食と再摂食を行ったところ、ニコチン酸投与群で再摂食後の血中遊離脂肪酸とトリグリセライド(TG)が有意に低値であった。

b) 肝臓のTG合成への影響

Tyloxapol静注後の血中TGの上昇により肝臓からのTG分泌を検討したところ、ニコチン酸投与群でTG合成が有意に低下していることが明らかになった。

4) マイクロアレイ解析

a) Pathway解析

MSG 投与の有無(V 群と C 群)での比較では、Cell cycle、Inflammatory Response、Osteoblasts、Focal Adhesion、Fatty acid biosynthesis、G1 to S cell cycle control、Pentose phosphate pathway などの遺伝子群で有意な差異が認められた。そのうち、ニコチン酸投与によって変化した遺伝子を検討するために、V 群と N 群を比較したところ、Cell cycle、Inflammatory Response、Osteoblasts、Focal Adhesion、Fatty acid biosynthesis などの pathway が変化していることが明らかになった。

b) 遺伝子解析

個々の遺伝子の変化を検討すると、ニコチン酸で特に顕著な変化を認めた遺伝子として、Apoa4、Adpn、MTHFD1L、Pklrなどが挙げてきた。Apoa4はアポリポ蛋白A-IVをコードする遺伝子であり、高TG血症の発症に重要な役割を果たしていると考えられている。また、Adpnは、patatin-like phospholipase domain containing 3(PNPLA3)をコードしている遺伝子である。PNPLA3は、その多型が脂肪肝と関係していることが報告されているが、遺伝子の調節と脂肪肝の関係はまだ完全には解明されていない重要な遺伝子である。当施設の新築移転などで実験施設の利用がやや遅れ、詳しい検討については現在も行っている途中であるが、PNPLA3の発現をRT-PCRで評価し、PNPLA3のsiRNAを用いてMSGマウスの脂肪肝の発症抑制、治療効果を検討する実験を進めているところである。

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 3 件)

1. Kikuchi K, Tsuneyama K, Yamada H, Kajiyama Y, Matsumoto K, Tsunashima H, Yamashita R, Takai A, Negishi M, Hara M, Moritoki Y, Miyakawa H.

Splenic lymph follicles generate IgM producing

B cells in primary biliary cirrhosis.

Hepatol Res 44:E253-56, 2014 (査読あり)

2. Takai A, Kikuchi K, Kajiyama Y, Sugiura A, Negishi M, Tsunashima H, Yamada H, Matsumoto K, Tsuneyama K, Moritoki Y, Hara M, Miyakawa H.

Serological and Histological Examination of a Noalcoholic Steatohepatitis Mouse Model Created via the Administration of Monosodium Glutamate.

International Scholarly Research Notices Volume 2014, Article ID 725351, 7 pages (査読あり)

3. Tsunashima H, Tsuneyama K, Moritoki Y, Hara M, Kikuchi K.

Accumulated myeloid-derived suppressor cells demonstrate distinct phenotypes and functions in two non-alcoholic steatohepatitis mouse models.

Hepatobiliary Surg Nutr. 2015 Oct;4(5):313-9(査読あり)

[学会発表](計 4 件)

1. Hara M, Kurano M, Tsuneyama K, Kikuchi K, Takai A, Matsushima T, Tsukamoto K.

Nicotinic Acid Prevents and Restores Steatohepatitis Together with Amelioration of Postprandial Dyslipidemia.

ATVB 2014, May 1-3, 2014, Toronto, Canada

2. 蔵野 信, 原 眞純, 常山幸一, 迫田秀之, 野尻卓宏, 塚本和久, 矢富 裕

スフィンゴシン 1-リン酸経路を介した、糖代謝の恒常性維持における肝臓の役割

第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 2014 年 5 月 24 日 大阪

3. 蔵野 信, 原 眞純, 常山 幸一, 矢富 裕, 塚本 和久.

肝臓-胆汁間のコレステロールハンドリングの糖代謝への影響.

第 52 回 日本臨床分子医学会 年次学術集会. 2015.4.10 京都.

4. 蔵野 信, 原 眞純, 矢富 裕, 塚本 和久.
肝細胞のコレステロール増加経路による糖

代謝修飾の相違 .

第 59 回 日本糖尿病学会年次学術集会 .
2016.5.21 . 京都 .

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原 眞純 (HARA, Masumi)
帝京大学医学部 教授
研究者番号 : 70420213

(2)研究分担者

菊池 健太郎 (KIKUCHI, Kentaro)
帝京大学医学部 准教授
研究者番号 : 60297158

(3)連携研究者

(4)研究協力者

常山 幸一 (TSUNEYAMA, Koichi)
徳島大学医学部 教授

塚本 和久 (TSUKAMOTO, Kazuhisa)
帝京大学医学部 教授

蔵野 信 (KURANO, Makoto)
東京大学医学部 講師