

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04935

研究課題名(和文)閉経女性における過食肥満の誘発、脂肪性肝炎の発症と肝発癌のリスク増大の病態解明

研究課題名(英文) Pathophysiological mechanism for the high incidence of overeating-induced obesity, NASH and hepatic carcinogenesis in post-menopausal women

研究代表者

山本 雅一 (Yamamoto, Masakazu)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：60220498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：p62:Nrf2遺伝子二重欠損(DKO)マウスはヒトNASHに類似した表現型を呈する。DKOマウスにおけるNASHの表現型に関する性差を検討した。8週齢では、ともに正常な組織像であった。30週齢のDKOマウスでは脂肪沈着、線維化が生じていたのに対し、マウスでは脂肪沈着はと比較し軽度であり、線維化は認められなかった。50週齢ではにおいても大滴性の脂肪沈着を認めたが、炎症・線維化はと比較し軽度であった。DKOマウスにおけるNASH肝病変はマウスと比較し軽度であった。これには女性ホルモンによる過食肥満の抑制、LPSによる肝炎症応答の抑制が重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：DKO mice represent a phenotype similar to human NASH. This study investigated sex differences in the phenotypes in the mice. Both male and female mice at 8 weeks showed normal liver histology. At 30 weeks, while the livers of male mice became fatty and fibrotic, those of female mice showed only minimal changes of steatosis and no fibrosis. Even for the female mice at 50 weeks, while the large lipid droplets were found, only minimal changes of fatty and fibrotic changes were observed in the livers. The magnitude of NASH histological changes was found to be weaker in female than in male mice. The results importantly suggest that female hormones may attenuate NASH pathophysiology by inhibiting overeating obesity and LPS-induced inflammatory responses.

研究分野：肝臓外科学

キーワード：脂肪性肝炎 肝癌 女性ホルモン 転写因子 臓器連環

### 1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化により肥満人口が増加する現代社会において、肥満や生活習慣病を背景に、肝機能異常を呈する非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH: Non-alcoholic steatohepatitis) 罹患者が増加している。NASH は、明らかな飲酒歴がないにも関わらず、肝臓に脂肪沈着を呈し、さらに炎症、線維化が加わった疾患であり、肝硬変および肝癌へと進展していく重大な疾患である。NASH の罹患者には性差があり、女性は男性と比べ壮年期までは低く、40 歳代以降の閉経後に急激に高くなることが知られている。これには女性ホルモンの分泌低下が影響していると考えられているが、その詳細な機序は明らかでない。

### 2. 研究の目的

我々の先行研究より、*p62:Nrf2* 遺伝子二重欠損 (double knockout: DKO) マウスは過食による肥満とインスリン抵抗性を呈し、NASH を自然発症し、ヒト NASH と類似した表現型を示す有用な動物モデルであることを報告してきた。しかし、これまでの成果はオスマウスを解析した研究であり、メスマウスについての解析は行われていない。そこで本研究では、DKO マウスの NASH 病態を性差の観点から解析し、女性ホルモンの果たす役割について検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウスの作製: 野生型 (WT) C57BL/6J マウスを Charles River から入手した。*p62-KO* および *Nrf2-KO* マウスを作製し、*p62:Nrf2* 二重ノックアウトマウスは、これらの突然変異マウスを交配することによって産生された。分析前に、これらのマウスを C57BL/6J マウスと 10 代以上交配させ、正常に生育した繁殖可能な子孫を産生した。

(2) 血中エストロジオール濃度の測定: DKO メスマウス (8, 30, 50 週齢)、DKO オスマウス (8 週齢) を用いて DKO マウスのエストロジオール (E2) 濃度の性差、週齢による変化を解析した。E2 濃度の測定は LC-MS/MS 法により行った。

(3) マウスから肝臓を摘出し、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定し、パラフィンにて包埋した。薄切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色と Sirius red (SR) 染色を行った。NASH の組織学的評価を定量的に行うために、SAF (Steatosis, Activity, Fibrosis) スコアを用いた。HE 染色の標本で脂肪化 (0~3 点) 活動性 (0~4 点) を評価し、SR 染色の標本で線維化 (0~4 点) を評価した。

(4) 炎症性サイトカイン発現の測定: Fast

SYBR® Green Master Mix, CFX384 Touch™ リアルタイム PCR 増幅システム (Bio-Rad) を用いて real-time PCR を行った。House keeping 遺伝子の *GAPDH* を内部標準とし、各サンプルの mRNA 量を補正してデータ化した。

(5) CT による内臓脂肪量、筋肉量の測定: マウスを 10%ネプタール注射液で麻酔し、スキャンした。肝臓と尾骨との間の連続 5 mm スライス画像を取得し、ソフトウェアを用いた定量的評価に使用した。内臓脂肪および皮下脂肪を区別し、定量的に評価した。

(6) 腸内細菌叢: 8, 30 週齢のマウスから新鮮便を採取して急速冷凍した。糞便試料からの DNA 抽出および 16S rRNA 遺伝子 *V4* 領域のアンプリコンライブラリーを使用した次世代シーケンス解析を実施した。

(7) Kupffer 細胞の解析: 肝臓より Kupffer 細胞を単離し、M1 型 (炎症型) および M2 型 (抗炎症型) を評価した。表面マーカーとして F4/80 で標識した。次に、M1 型の表面マーカーである CD11b、M2 型の表面マーカーである CD206 で標識した。測定にはフローサイトメーターを用いた。

(8) 統計解析: 全てのデータは平均値 ± 標準誤差 (mean ± SE) で示した。有意差検定には、t 検定と 1 元配置分散分析を行い、 $P < 0.05$  を有意とした。

### 4. 研究成果

(1) 血中エストロジオール濃度: DKO メスマウスの血中エストロジオール濃度は、8 週齢でオスマウスと比較し有意に高値であった。また、50 週齢では低下していた。

(2) NASH 肝病理組織: 8 週齢時点では、DKO オスマウス、メスマウスともに正常な組織像であった。30 週齢では、DKO オスマウスでは大滴性の脂肪沈着、炎症、線維化が生じていた。一方、メスマウスは、脂肪沈着はオスと比較し軽度であり、線維化は認めなかった。50 週齢では、メスマウスにおいても脂肪沈着を認めたが、炎症、線維化はオスマウスと比較し軽度であった。SAF scoring について、メスマウスでは、30 週齢時点では脂肪化、炎症、線維化がオスマウスと比較し低値であり、炎症、線維化については、50 週齢時点でもオスと比較し低値であった (図 1)。

(3) 肝における炎症性サイトカイン発現: *TNF- $\alpha$* 、*IL-1 $\beta$*  の mRNA 発現量を測定した。DKO オスマウスは 8 週齢から WT と比べ増加しているのに対し、メスマウスは 8 週齢では WT と同程度であり、30 週齢以降

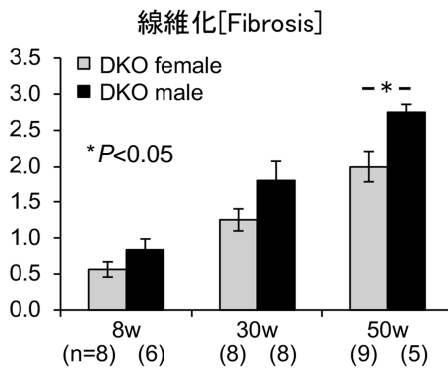
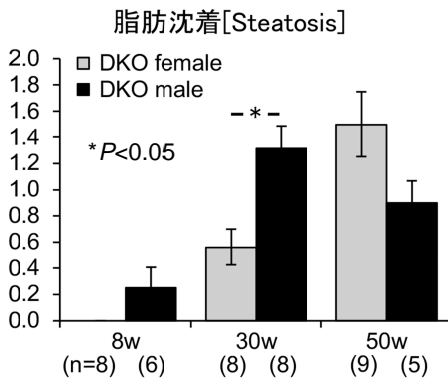
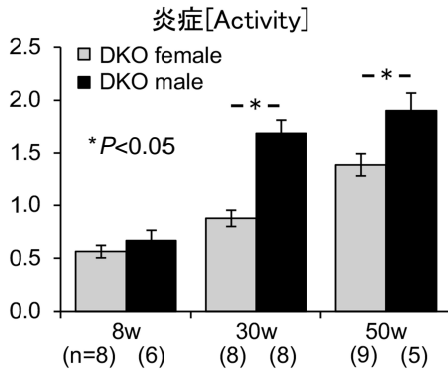


図 1 : DKO マウスの SAF scoring

に増加した。コラーゲンの前駆体である *1-procollagen*、線維化の促進に関わる *TGF-β* の mRNA 発現量を測定した。DKO オスマウスは 30 週齢で線維化マーカー発現量が増加していたが、メスマウスでは 30 週齢でも増加は認めなかった。

(4) 血中の LPS 濃度 : 8 週齢時点での性差は認めなかった。30 週齢においては、DKO オスマウス、メスマウスで LPS が増加する傾向が見られた。

(5) 体重、摂餌量の変動 : 体重、摂餌量ともに、DKO オスマウスは若齢時から加齢とともに増加するのに対し、DKO メスマウスは、若齢時では WT と同程度であり、30 週齢以降に急激に増加した。

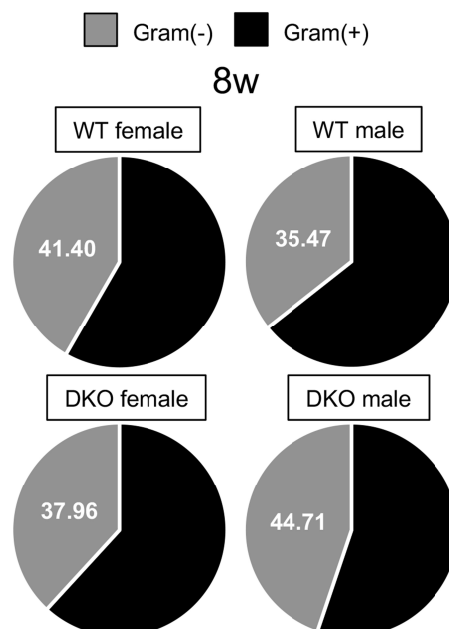
(6) 内臓脂肪量、骨格筋量 : DKO オスマウスでは、若齢時から体重あたりの内臓脂肪量、骨格筋量が徐々に増加した。一方 DKO

メスマウスでは、30 週齢で内臓脂肪量のみが急激に増加したため、体重あたりの骨格筋量は低値となった。

(7) 糖負荷試験 : DKO オスマウス、メスマウスともに、30 週齢時点でグルコース投与後 2 時間値が低下せず、耐糖能異常を示していた。DKO メスマウスにおける空腹時血糖値とインスリン値は、30 週齢時点でオスと比較し有意に低値であった。インスリン抵抗性を示す HOMA-IR も 30 週齢時点で DKO メスマウスはオスマウスと比較し低値であり、インスリン抵抗性は呈さないことが示唆された。

(8) 腸内細菌叢の変化 : 8 週齢では、DKO オスマウス、メスマウスともに、WT と比較し明らかな差は認めず、性差も見られなかった。30 週齢では、DKO オスマウスは WT オスマウスと比較しグラム陰性菌が顕著に増加していたが、メスマウスは DKO と WT で明らかな差は認めなかった(図 2)。科レベルの解析では、DKO マウスでは 8 週齢、30 週齢ともに、WT と比較し、グラム陰性菌の *Porphyromonadaceae* 科と *Paraprevotella* 科が増加しており、一方、グラム陽性菌の *Ruminococcaceae* 科と *Lachnospiraceae* 科が減少していたが、性差は認めなかった。

(9) Kupffer 細胞表現型の性差 : 炎症の惹起に関わるマクロファージには、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインの分泌を促す「炎症型」と言われる M1 型と、IL-10 などの抗炎症性サイトカインを分泌する「抗炎症型」の M2 型の 2 つに大別でき、これは肝臓に存在するマクロファージの一種である Kupffer 細胞も同様である。M1 型には細胞表面マーカーである CD11b が、M2 型には CD206 が発現していること



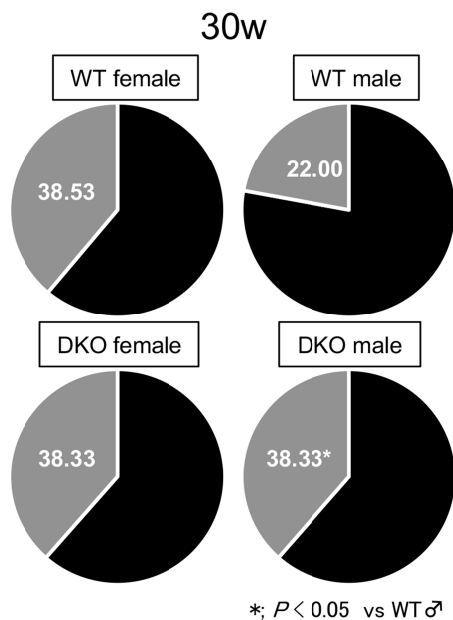


図 2 : 腸内細菌叢の変化

を用いてこの 2 種の識別を行った。DKO オスマウスとメスマウスの Kupffer 細胞の CD11b 発現量 (蛍光強度) をフローサイトメトリーにて解析すると、オスマウスでより高値であり、M1 型が増加していることが示唆された。

(10) 考察 : DKO マウスの NASH 病態 (肝脂肪沈着、炎症、線維化) は、オスと比べメスで軽度であった。肥満病態 (体重、摂餌量) は、オスマウスでは若齢時から徐々に体重と摂餌量が増加していくのに対し、メスマウスでは 30 週齢以降に急激に増加した。一方、耐糖能、腸内細菌叢、腸管透過性、血中 LPS 濃度に関しては明らかな性差は認めなかった。これらの結果より、DKO メスマウスでは、オスマウスと比べ過食肥満および LPS による炎症が軽度であることが明らかとなった。この背景として、女性ホルモンが過食抑制や、炎症抑制に働いていることが考えられる (図 3)。

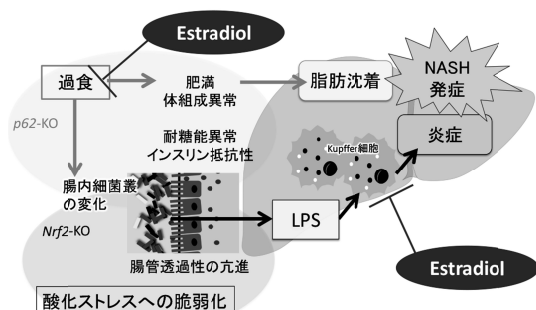


図 3 : 研究成果のまとめ

## 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 22 件)

- (1) Akiyama K, Warabi E, Okada K, Shoda J. Deletion of both p62 and Nrf2 spontaneously leads to development of nonalcoholic steatohepatitis. *Experimental Animals* 2018, In press. (査読有)
- (2) Shida T, Akiyama K, Oh S, Sawai A, Isobe T, Okamoto Y, Ishige K, Mizokami Y, Yamagata K, Onizawa K, Tanaka H, Iijima H, Shoda J. Skeletal muscle mass to visceral fat area ratio is an important determinant affecting pathophysiology of NAFLD. *J Gastroenterol* 53: 535-547, 2018. (査読有)
- (3) Shoda J, Matsuda A, Shida T, Yamamoto M, Nagino M, Tsuyuguchi T, Yasaka T, Tazuma S, Uchiyama K, Unno M, Ohkohchi N, Nakanuma Y, Kuno A, Narimatsu H. *Wisteria floribunda* Agglutinin-Sialylated Mucin Core Polypeptide 1 is a Sensitive Biomarker for Biliary Tract Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A Multicenter Study. *J Gastroenterol* 52: 218-28, 2017. (査読有)
- (4) Okano Y, Kuramochi H, Nakajima G, Katagiri S, Yamamoto M. Elevated levels of mRNAs encoding dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase are associated with improved survival of patients with hepatocellular carcinoma treated with S-1. *Oncol let* 14:930-936, 2017. (査読有)
- (5) Komine S, Akiyama K, Warabi E, Oh S, Kuga K, Ishige K, Togashi S, Yanagawa T, Shoda J. Exercise training enhances *in vivo* clearance of endotoxin and attenuates inflammatory responses by potentiating Kupffer cell phagocytosis *Sci Rep* 2017; 7: 11977. 10.1038/s41598-017-12358-8 (査読有)
- (6) Oh S, Komine S, Warabi E, Akiyama K, Ishii A, Ishige K, Mizokami Y, Kuga K, Horie M, Miwa Y, Iwawaki T, Yamamoto M, Shoda J. Nuclear factor (erythroid derived 2)-like 2 activator increases exercise endurance capability via redox-modulation of skeletal muscles. *Sci Rep* 2017; 7: 12902. 10.1038/s41598-017-12926-y (査読有)
- (7) Oh S, So R, Shida T, Matsuo T, Kim B, Akiyama K, Isobe T, Okamoto Y, Tanaka K, Shoda J. High-Intensity Aerobic Exercise Improves Both Hepatic Fat Content and Stiffness in Sedentary Obese Men with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Study. *Sci Rep* 2017; 7:43029. (査読有)
- (8) 片桐 聡, 倉持英和, 向山美々, 濱野美枝, 石多猛志, 毛利俊彦, 今西 啓, 平井栄一, 鬼澤俊輔, 太田正穂, 中村 努, 有泉俊二, 古川徹, 中野雅行, 新井田達雄, 山本雅二. 術前化学療法が奏効し根治切除が可能となった肝内転移・リンパ節転移陽性細胆管細胞癌の 1 症例. *Liver*

- Cancer 23:11-15, 2017. (査読無)
- (9) 有泉俊二, 山本雅二. 肝臓 肝解剖と肝門部処理の要点. 臨床外科 72:164-169, 2017. (査読無)
- (10) 有泉俊二, 山本雅二. 混合型肝癌の外科治療成績-細胆管細胞癌、肝内胆管癌との比較-肝胆膵 74:779-787, 2017. (査読無)
- (11) 正田純一. 日本胆道学会認定指導医養成講座 胆石の自然史 第 52 回日本胆道学会学術集会記録 胆道 31:187-195, 2017. (査読有)
- (12) Midorikawa Y, Takayama T, Higaki T, Nakayama H, Yamamoto M, Ariizumi S, Shimada K, Kokudo N, Tsuji S, Tsuchida K, Kurosaki M, Izumi N. Early hepatocellular carcinoma as a signaling lesion for subsequent malignancy. Jap J Clin Oncol 46:1102-1107, 2016. (査読有)
- (13) Higuchi R, Yazawa T, Uemura S, Yamamoto M. Anterior approach for perihilar cholangiocarcinoma (with video). J Surgical Res 202:71-76, 2016. (査読有)
- (14) Higuchi R, Ota T, Yazawa T, Kajiyama H, Araida T, Furukawa T, Yoshikawa T, Takasaki K, Yamamoto M. Improved surgical outcomes for hilar cholangiocarcinoma: changes in surgical procedures and related outcomes based on 40 years of Experience at a single institution. Surgery Today 46:74-83, 2016. (査読有)
- (15) Kogiso T, Hashimoto E, Ito T, Hara T, Ikarashi Y, Kodama K, Tani ai M, Torii N, Yoshinaga K, Morita A S, Takahashi Y, Tanaka J, Sakai S, Yamamoto M, Tokushige K. Successful treatment of ascites using a Denver peritoneovenous shunt in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and Budd-Chiari syndrome. Internal Medicine 55:2957-2963, 2016. (査読有)
- (16) 有泉俊二, 小寺由人, 山本雅二. 肝内胆管癌切除後の補助化学療法. 外科 78:163-167, 2016. (査読無)
- (17) 川本徹, 山本雅二, 正田純一. HER family: 肝内胆管癌の potential drug targets. 肝胆膵 72:107-114, 2016. (査読無)
- (18) 正田純一. 総胆管結石 特集: 結石症の診断と治療 医学と薬学 73:1491-95, 2016. (査読無)
- (19) Ariizumi S, Yamamoto M. Intrahepatic cholangiocarcinoma and cholangiolocellular carcinoma in cirrhosis and chronic viral hepatitis. Surgery Today 45:682-687, 2015. (査読有)
- (20) Jigjidsuren C, Michele G, Yamamoto M, Tsiiregzen E-A, Erdenebileg T, Chinbold E, Puntsagdulam N. Impact of Glissonean Pedicle Approach for Centrally Located Hepatocellular Carcinoma in Mongolia. International Surgery. 100:268-274, 2015. (査読有)
- (21) Kogiso T, Tokushige K, Hashimoto E, Tani ai M, Torii N, Omori A, Kotera Y, Egawa H, Yamamoto M, Nagata M, Shiratori K. Primary hyperoxaluria complicated with liver cirrhosis: A case report. Hepatol Res 45:1251-1255, 2015. (査読有)
- (22) Kogiso T, Tokushige K, Hashimoto E, Tani ai M, Omori A, Kotera Y, Egawa H, Yamamoto M, Shiratori K. Mycophenolate mofetil may induce prolonged severe anemia during pegylated-interferon/ribavirin/simeprevir therapy in liver transplant recipients. Clin J Gastroenterol 8:156-161, 2015. (査読有)
- 〔学会発表〕(計7件)
- (1) 有泉俊二, 小寺由人, 山下信吾, 大森亜紀子, 加藤孝章, 根本 慧, 片桐聡, 江川裕人, 中野雅行, 山本雅二. 混合型肝癌と細胞肝細胞癌はそれぞれが原発性肝癌である. 第 22 回日本外科病理学会学術集会. 2017年11月10-11日, 栃木県民文化センター, 栃木, 宇都宮市.
- (2) 五十嵐悠一, 小木曾智美, 小林睦季, 児玉和久, 谷合麻紀子, 鳥居信之, 橋本悦子, 江川裕人, 山本雅二. 当院におけるアルコール性及び非アルコール性脂肪性肝疾患に対する肝移植後経過の検討. 第 103 回日本消化器病学会学術集会. 2017年4月20-22日, 京王プラザホテル, 東京, 新宿.
- (3) 有泉俊二, 梁 静, 小寺由人, 大森亜紀子, 山下信吾, 根本 慧, 高橋 豊, 片桐 聡, 江川裕人, 山本雅二. 糖尿病関連肝細胞癌の切除成績は良好である. 第 15 回日本消化器外科学会大会. 2017年10月12-14日, 福岡国際センター, 福岡, 博多.
- (4) 長岡亜実, 秋山健太郎, 藤栄治, 正田純一. *p62:Nrf2* 遺伝子二重欠損 (DKO) マウスは と比較して非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の肝病変は軽度である. 第 21 回日本肝臓学会大会. 2017年10月12-14日, 福岡国際センター, 福岡, 博多.
- (5) 小峰昇一, 秋山健太郎, 藤栄治, 正田純一. 継続的運動は DHEA 産生増加を介して, Kupffer 細胞 (KC) 貪食能の向上による LPS に対する生体クリアランス増大と炎症応答の低下を誘導する. 第 21 回日本肝臓学会大会. 2017年10月12-14日, 福岡国際センター, 福岡, 博多.
- (6) 秋山健太郎, 藤栄治, 正田純一. NASH 自然発症マウスにおける腸内細菌叢と腸管上皮バリア機能の異常. 第 21 回日本肝臓学会大会. 2017年10月12-14日, 福岡国際センター, 福岡, 博多.
- (7) Junichi Shoda. Update of Gallstones. 6th A-PHPBA June 7-10th, 2017, Kanagawa, Yokohama.

〔図書〕(計4件)

- (1) 有泉俊二, 山本雅二. 111. 肝・胆・膵 / 肝切除術 グリソン鞘一括処理時の出血. 消化器外科手術 起死回生の一手. 218-223, メディカルビュー社, 2017.
- (2) 有泉俊二, 山本雅二. Focus 肝機能評価肝胆膵高難度外科手術. 4.,75-76, 医学書院, 2016.
- (3) 正田純一.胆嚢結石症, 総胆管結石症(内科)今日の治療指針 2017 山口 徹, 北原光夫 総編集 医学書院(東京) pp.肝・胆・膵疾患 37-39, 2016.
- (4) Ariizumi S, Yamamoto M. Surgical Management of Hepatocellular Carcinoma in Japan. Modern Gastrointestinal Oncology 162-174, Elsevier, 2015.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 雅一 (YAMAMOTO Masakazu)  
東京女子医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 60220498

### (2) 研究分担者

橋本 悦子 (HASHIMOTO Etsuko)  
東京女子医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 40130273

有泉 俊一 (ARIIZUMI Syunichi)  
東京女子医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 40277158

徳重 克年 (TOKUSHIGE Katsutoshi)  
東京女子医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 60188729

正田 純一 (SHODA Junichi)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号: 90241827