

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09022

研究課題名(和文) 脂肪性肝炎の代謝病態におけるリポドラフト構造変化と機能的役割の解明

研究課題名(英文) Palmitic acid elicits insulin resistance and oxidative cell injury through clusterization of lipid rafts in murine hepatocytes.

研究代表者

内山 明 (Uchiyama, Akira)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60529254

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)：本研究では、遊離脂肪酸負荷による肝細胞リポドラフト(LR)の形態変化と酸化ストレス応答・インスリン抵抗性(IR)について検討した。パルミチン酸(PA)は肝細胞に脂肪沈着を惹起し、LRのクラスター化はコントロール群に比べPA群で有意に亢進していた。また酸化ストレス応答の亢進および細胞死を認めた。一方、cholesterol oxidase(CHOX)処置により、LRのクラスター化およびROS産生は低下した。また、PA群ではIRが惹起されたが、CHOXの前処置で生じなくなった。PA負荷によるLRの形態変化は、インスリンシグナル伝達を負に制御し、酸化ストレス応答の亢進および肝細胞死に関与していた。

研究成果の概要(英文)：In isolated hepatocytes, incubation with palmitic acid (PA) resulted in accumulation of lipid droplets in cytosol. Under confocal microscopy, cells expressing clustered lipid rafts were significantly increased by PA. Addition of cholesterol oxidase (CHOX), which disrupts lipid rafts, to the cultures for 1hr reversed PA-induced clusters. pIRS-1 and -2 and pAkt in response to insulin stimulation were significantly attenuated under PA compared to controls. By contrast, CHOX significantly ameliorated PA induced-insulin resistance. PA alone did not increase ROS, however, low dose of tert-butylhydroperoxide (TBH) obviously caused cell death in PA-pretreated cells. Interestingly, pre-treatment with CHOX significantly prevented increases in ROS and cell death caused by PA plus TBH. PA elicits hepatic insulin resistance and sensitization to oxidative cell injury through clusterization of lipid rafts in isolated hepatocytes.

研究分野：慢性肝疾患

キーワード：リポドラフト インスリン抵抗性 NASH

1. 研究開始当初の背景

近年、メタボリックシンドロームに伴う肝病変としての非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) が注目されている。非アルコール性脂肪性肝疾患 (Nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) はメタボリックシンドロームの肝臓での表現型であり、本邦では1,200-3,600万人が NAFLD に罹患していると推定される。従ってわが国でも非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) を背景とした肝硬変・肝癌患者の増加が予想され、今後重要な問題となることが予想される。一方、NAFLD/NASH に対する治療としては、食事療法・運動療法をはじめとしたダイエット以外の有効な治療法は無く、その治療選択も少ない。

NASH の発症プロセスにおいては、肝脂肪化に伴う脂肪酸酸化やミトコンドリア機能異常などに起因する活性酸素種 (ROS) の増大が重要であると考えられている。近年、Tilg らが 2010 年に提唱した、multiple parallel hits 仮説は、NASH の発症機序として注目されている。脂肪組織や腸内細菌産物の質的・量的変化が、肝臓内 Toll-like receptor (TLR) やケモカイン受容体を介した炎症性サイトカイン・ケモカインの過剰産生に關与することが報告されている。

コレステロールとスフィンゴ脂質に富む細胞膜の構成領域であるリポドラフトには多くのシグナル伝達物質が会合し、好中球やマクロファージの遊走・貪食・ラジカル産生のプロセスに重要な役割を果たしていることが報告されている。リポドラフトがインスリンレセプターの足場を形成し、そこに含まれる脂質組成の変化がインスリン受容体の細胞膜上での形態を変化させ、インスリン抵抗性をもたらすことが脂肪細胞を用いて示されている。さらにリポドラフトの変化に伴い、TNF α ・CCLX などの pro-inflammatory cytokine の産生が促進されることを血管内マクロファージを用いた実験系で報告されている。(Iwabuchi, Atherosclerosis, 2011) さらに LPS (リポ多糖、エンドトキシン) の受容体である TLR4 が、肝マクロファージ細胞膜上のリポドラフトに局在していることが報告されている。以前より、当研究グループでは、糖尿病・高脂血症を自然発症するインスリン抵抗性マウスモデルである KK-Ay マウスを用い脂肪性肝炎の炎症・線維化が増悪・進展しやすく (Okumura K, Hepatol Res. 2006)、肝再生が障害されていることを見出してきた (Aoyama T, Hepatology. 2009)。また、マウス単離培養肝細胞において遊離脂肪酸負荷による酸化ストレス応答性が亢進することを明らかにした (Kon K, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010)。研究分担研究者である Iwabuchi らは、リポドラフトの変化に伴い、TNF α ・CCLX などの pro-inflammatory cytokine の産生促進する

こと (Kiyonagi T, Atherosclerosis, 2011)。さらに LPS (リポ多糖、エンドトキシン) の受容体である TLR4 が、肝マクロファージ細胞膜上のリポドラフトに局在していることを報告している (Wong SW et al, J Biol Chem. 2009)。

2. 研究の目的

近年、わが国の全人口の約 1% (100 万人) が非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に罹患していると推測されており、肝硬変・肝細胞癌に進行する疾患として注目されている。

NASH の発症における multiple parallel hits として肝脂肪化・インスリン抵抗性・酸化ストレス応答性の亢進が、リポドラフトと深く関わっている可能性が考えられる。

本研究では、リポドラフトを中心に NASH 病態進展のメカニズムの解明を目標とし、「肝細胞におけるリポドラフトの形態変化と細胞死・酸化ストレス応答について検討」「リポドラフトの変性と肝インスリン抵抗性の関与」を明らかにする。

これらの結果を踏まえて NASH 発症メカニズム (multiple parallel hits) を明らかにし新たな治療ターゲットの確立を目指す。本研究では動物モデルおよび培養細胞を用いて NASH 発症のメカニズムの解析を行った。

3. 研究の方法

C57BL/6J 雄性マウスより単離した初代培養肝細胞の系を用いた。collagenase 比重遠心法を用いて C57BL/6j 雄性マウスから単離した初代培養肝細胞を用いた。単離した肝細胞は 10% FBS を添加した Waymouth's Medium で培養し実験に供した。初代培養肝細胞は、飽和脂肪酸 (palmitic acid; PA 0.6 mM) を培養液中に添加し 6 時間 CO $_2$ インキュベーターで培養した。その後培養液は、KRH medium に変更し実験を行った。

PA 添加後の肝細胞内脂肪沈着を検討するために、Oil Red O で染色し、脂肪を可視化し、マイクロプレートリーダーを用いて定量した。リポドラフト除去剤として cholesterol oxidase (CHOX; 0.1U) を用いた。PA 添加後の肝細胞に CHOX を前処置 (1 時間) し、細胞膜上のリポドラフト除去され PA+CHOX 群を作成した。

ROS の産生および細胞死の計測のために、肝細胞の培養液中に 30 μ M の propidium iodide (PI, Sigma, St. Louis, MO) 添加し、蛍光増強をマイクロプレートリーダーで経時的に測定し、ネクロシスを評価した。また 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H2DCF, Molecular Probe, Eugene, OR) にて染色し、蛍光増強を同様にマイクロプレートリーダーで経時的に測定し、ROS の産生を判定した

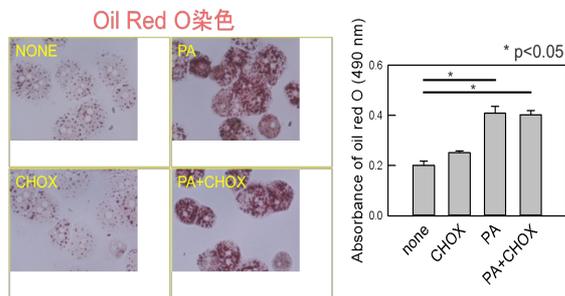
リポドラフト内を可視化するために、リポドラフトの一部であるスフィンゴ糖脂質のガングリオシド GM1 を、ALEXA488 ラベル化コレラトキシン B で免疫細胞染色を行い、リポドラフトの形態変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察しリポドラフトの形態変化を評価しクラスター化率を算出した。

リポドラフトの形態変化と肝インスリンシグナルを評価するために、一部の肝細胞はインスリン (1 ng/ml) 刺激 15 分後の IRS-1、IRS-2 のチロシンリン酸化 (pIRS-1、pIRS-2) を ELISA 法、Akt のリン酸化 (pAKT) を western blot で測定し検討した。

4. 研究成果

パルミチン酸負荷と肝脂肪化

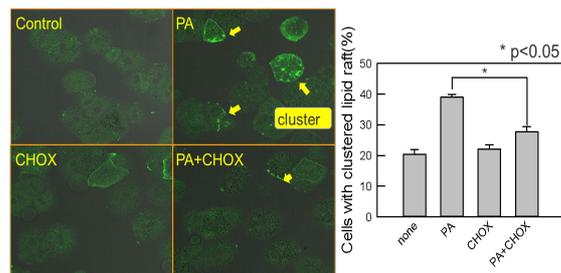
単離培養した肝細胞に、パルミチン酸 (PA 群; 0.6 mM) を培養液中に 6 時間添加すると肝細胞内に oil red O で染色される脂肪滴の沈着が有意に惹起された。 ($p < 0.01$) さらにリポドラフト除去剤である CHOX を処置しても PA に誘導された肝細胞内の脂肪滴に変化を認めなかった。



(Figure 1; PA 負荷により肝脂肪化を惹起するが、リポドラフト除去剤である CHOX は、肝細胞内の脂肪化には影響を与えないことを示した。)

肝リポドラフトの形態変化の検討

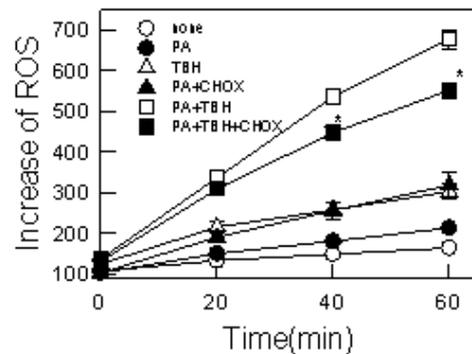
さらに、肝細胞膜上のリポドラフトの形態変化を検討するために、GM1 の免疫細胞染色でリポドラフトの形態変化を検討したところ、Control 群 (対照群) の $23.5 \pm 4.7\%$ でクラスター化を認めたが、PA 添加群では、肝細胞膜上のクラスター化率は $36.8 \pm 2.5\%$ と control 群に比べ有意に増加していた ($p < 0.05$)。つまり、PA 添加により肝細胞膜上のリポドラフトの形態変化が惹起されることが明らかとなった。(Figure 2)



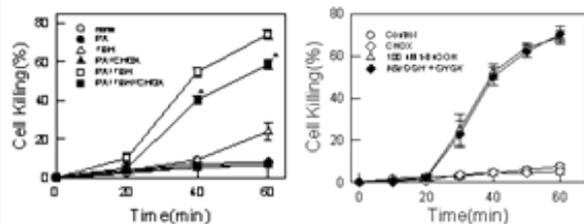
一方、PA 添加後の肝細胞に CHOX を処置することによりリポドラフトのクラスター化率は有意に低下しており、CHOX は PA 添加により生じた肝リポドラフトの形態変化の抑制効果を有していることが示唆された。

リポドラフトの変化と酸化ストレス応答

酸化ストレス応答を検討するために、極低濃度の TBH (酸化ストレス誘導) を各群に投与して ROS の産生と細胞死について検討した。極低濃度の TBH 単独投与では、ROS の産生は軽微であった。また PA 単独群も同様に ROS の産生は軽微であった。一方、PA 群に極低濃度の TBH を添加することで (PA+TBH) ROS の産生は、グラフで示したように有意に惹起された。一方、PA 添加後にリポドラフト除去剤である CHOX を前処置することで、ROS の産生は有意に抑制された。つまり、リポドラフトの形態変化が、PA 負荷後の酸化ストレス応答の亢進を減弱することを示した。



さらにリポドラフトの形態変化とネクロシスの検討では、PA 単独群では、細胞死は誘導されないが、極低濃度の TBH 添加により $75.5 \pm 8.6\%$ と有意にネクロシスが生じた ($p < 0.01$)。一方、CHOX 前処置することで、ネクロシスは有意に抑制された (PA+TBH+CHOX 群; $p < 0.05$ vs PA+TBH 群) また、高濃度の TBH 添加の検討では、CHOX 前処置の効果は認めなかった。

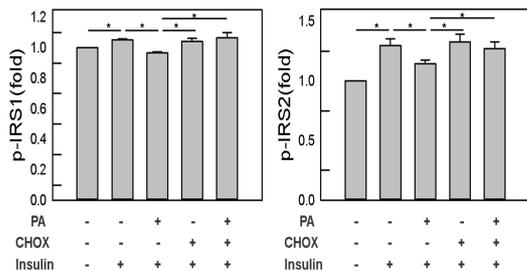


この結果より、PA 添加により誘導された肝脂肪化とリポドラフトの形態変化が、酸化ストレス応答の亢進と酸化ストレス誘導ネクロシスに關与することを明らかにした。

インスリンシグナル伝達

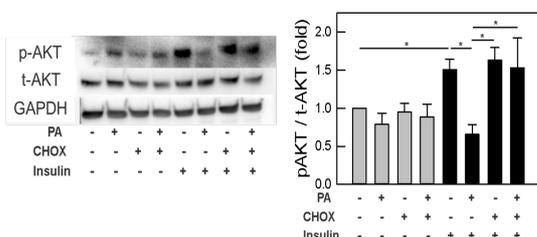
インスリン刺激後の、インスリンシグナル伝達経路である IRS-1 および IRS2 チロシンリン酸化および、Akt / AKT のリン酸化を検討した。

PA 添加群では、インスリン刺激後の IRS-1, IRS-2 のチロシンリン酸化は低下していた。(Figure 4)



また、その下流シグナルである AKT のリン酸化も低下しており、PA 添加によりインスリンシグナル伝達障害が惹起された。しかし、CHOX 処置により、PA 添加により惹起されたインスリンシグナル伝達障害は、有意に改善してした。PA 添加により生じたリポドラフトの形態変化がインスリンシグナル伝達障害を惹起したと考えられた。

(Figure 5)



まとめ

遊離脂肪酸であるパルミチン酸は、肝細胞に脂肪滴の沈着のみならず、肝細胞膜上のリポドラフトの形態変化を誘導した。リポドラフトの形態変化は、肝臓における酸化ストレス応答の亢進を惹起し、酸化ストレス誘導性の細胞死に関与していた。

さらにパルミチン酸に起因したリポドラフトの形態変化は、肝細胞のインスリン刺激後に生じるインスリンシグナル伝達を負に制御し、肝インスリン抵抗性の発症に関与していた。

これらの事象より、遊離脂肪酸負荷により生じた肝細胞膜上のリポドラフトの形態変化は、肝脂肪化・炎症・インスリン抵抗性を背景とする NASH の病態形成として重要な役割を果たしていると考えられた。

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)

Fukushima H, Yamashina S, Arakawa A, Taniguchi G, Aoyama T, Uchiyama A, Kon K, Ikejima K, Watanabe S. Formation of p62-positive inclusion body is associated with macrophage polarization in non-alcoholic fatty liver disease. 査読有, Hepatol Res. 2018 Feb 23. doi: 10.1111/hepr.13071.

Aoyama T, Takada H, Uchiyama A, Kon K, Yamashina S, Ikejima K, Ban H, Watanabe S. A Customized Online Nutrition Guidance System Is Effective for Treating Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Supporting Continuity of Diet Therapy at Home: A Pilot Study. Intern Med. 査読有, 2017;56(13):1651-1656. doi: 10.2169/internalmedicine.56.8187.

Kon K, Ikejima K, Morinaga M, Kusama H, Arai K, Aoyama T, Uchiyama A, Yamashina S, Watanabe S. L-carnitine prevents metabolic steatohepatitis in obese diabetic KK-Ay mice. Hepatol Res. 査読有, 2017 Mar;47(3): E44-E54. doi: 10.1111/hepr.12720.

[学会発表](計05件)

内山 明、池嶋 健一、渡辺純夫、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の病態形成におけるリポドラフトの役割、第52回日本肝臓学会総会、2016

Akira Uchiyama, Kenichi Ikejima, Kazuyoshi Kon Tomonori Aoyama, Shunhei Yamashina, Sumio Watanabe, Palmitic acid elicits insulin resistance and oxidative cell injury through clusterization of lipid rafts in murine hepatocytes, 米国肝臓学会議

内山 明、今 一義、新井 久美子、多田昌弘、北川 隆太、石塚 敬、青山 友則、山科 俊平、池嶋 健一、リポドラフトの形態変化と脂肪性肝炎の発症進展機序の解明、アルコール医学生物学学術集、2018

内山 明、今 一義、新井 久美子、青山 友則、山科 俊平、池嶋 健一、肝インスリン抵抗性と酸化ストレス応答におけるリポドラフトの役割、第18回日本抗加齢医学会総会、2018

[図書](計0件)

[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

<https://www.juntendo.ac.jp/hospital/clinic/shokaki/about/hepatology.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

内山 明 (UCHIYAMA AKIRA)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：60529254

(2)研究分担者

池嶋 健一 (IKEJIMA KENICHI)
順天堂大学 消化器内科 教授
研究者番号：20317382

(3)研究分担者

岩淵 和久 (IWABUCHI KAZUHISA)
順天堂大学 医療看護学部 教授
研究者番号：10184897