

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 24 日現在

機関番号：34509

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12715

研究課題名(和文) 長鎖脂肪酸受容体 GPR120/FFAR4 を介したNASH 形成機序

研究課題名(英文) The mechanism of NASH development via long chain fatty acid receptor GPR120/FFAR4.

研究代表者

小畑 友紀雄(OBATA, TOKIO)

神戸学院大学・薬学部・講師

研究者番号：80625244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の進展における長鎖脂肪酸受容体GPR120/FFAR4の関与を検討した。NASH病態は、超高脂肪コリン欠乏メチオニン低減飼料(CDAHFD)を用いた。NASHモデルマウスにおいて、肝細胞障害、肝臓への脂肪沈着、炎症および線維化が有意に増加したが、GPR120/FFAR4のアゴニストであるDHAの投与により抑制された。GPR120/FFAR4ノックアウトマウスでは、CDAHFD摂取による肝障害、および炎症をさらに増悪した。以上より、DHAはNASHの病態進展を抑制し、NASH病態の進展にはGPR120/FFAR4が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the involvement of long chain fatty acid receptor GPR120/FFAR4 in the progression of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). We used choline-deficient and 0.1% methionine added high-fat diet (CDAHFD) in order to produce NASH pathology. In CDAHFD-induced NASH model mice, the liver cell injury, hepatic fat deposit, hepatic inflammation and fibrosis markers significantly increased, but these were suppressed by administration of DHA, an agonist of GPR120/FFAR4. On the other hand, GPR120/FFAR4 knockout mice further exacerbated hepatocyte damage and inflammation by CDAHFD-induced. These findings suggested that GPR120/FFAR4 is involved in the development of NASH and DHA suppresses its progression.

研究分野：臨床薬学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH) GPR120/FFAR4 DHA fatty acid

1. 研究開始当初の背景

脂肪性肝疾患は肝細胞に主に中性脂肪が沈着して肝障害を起こす疾患の総称である。その病因からアルコール性と非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) に大きく二つに分類され、NAFLD は、肥満、糖尿病、高血圧、脂質異常症などを合併する割合が高く、メタボリックシンドロームの肝臓における表現型と考えられている。また、NAFLD は、病態の進行がほとんど見られない非アルコール性脂肪肝と、肝硬変や肝臓がんにまで病態が進行する非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に分類され、世界的な肥満の増加に伴い我が国でも罹患者が増加している。

NASH の病態は、肝臓の脂肪変性、炎症浸潤、肝細胞の障害や線維化などが特徴とされ、10 年間で約 2 割が肝硬変に進展し、さらに 5 年間でその約 1 割に肝臓がんが発症するとの疫学データがあるが、現在まで NASH の発症要因および肝硬変や肝臓がんにも進行する機序についてはほとんどわかっていない。また、線維化を伴う NASH 患者は生命予後が悪いこともわかってきた。

NASH 病態の形成機序については現在のところまだ明らかになっていない。これまで、

Day らが提唱している“2 ヒット仮説”が最も支持されてきた (Mayo Clin., 1998)。これは、肥満や糖尿病などによって肝臓内に脂肪が蓄積して脂肪肝が起こり (ファーストヒット)、脂質代謝異常となった脂肪肝は炎症性サイトカインや酸化ストレスなどのセカンドヒットによって脂肪性肝炎へと移行するという仮説である。しかし、最近では、脂肪変性や炎症の進行過程が 2 段階に連続的に生じるのではなく、食事因子や脂肪組織由来の炎症性サイトカインなども含め、多くの因子が平行して生じてくるという“多重並行ヒット仮説”が Tilg らによって提唱され、支持されている (Hepatology, 2010)。

メタボリックシンドロームや慢性炎症性疾患とのかわかりが注目されている因子の一つとして、長鎖脂肪酸受容体 GPR120/FFAR4 がある。

GPR120/FFAR4 は、G 蛋白質共役型受容体の一つで、脂肪細胞、腸管などにおいて高く発現しており、glucagon-like peptide-1 (GLP-1) の分泌を介したインスリン抵抗性改善作用 (Nat. Med., 2005) を示すこと、n3 系脂肪酸 (ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA)) をリガンドとすること、そしてそれらの刺激によって広範囲に抗炎症作用を示すこと (Cell, 2010) が報告されている。

臨床研究では、DHA や EPA の NASH の病態改善に対しては効果が認められない報告が多い。例えば、NASH 患者に、DHA と EPA の合剤を 15-18 ヶ月間投与した際に、肝臓の脂肪蓄積は減少したが、線維化は改善しなかった (Hepatology, 2014)、n3 系脂肪酸の 6 カ月または 12 カ月の投与で、肝臓

の脂肪蓄積は抑制したが、NASH 病態の総合評価の 1 つとして用いられる NAFLD activity score (肝臓の脂肪化、小葉内炎症、風船様変性の状態をスコア化し、組み合わせたもの) の改善は見られなかった (J. Hepatol., 2015、Clin. Nutr., 2015)。

NASH または NAFLD 患者に対して EPA エチルエステル体の 12 カ月投与で、脂肪肝および線維化のいずれも改善しなかった (Gastroenterology, 2014) といった報告がある。しかしながら、いずれも投与量や投与期間の検討が今後必要とされるとの前向きな考察も多い。

以上のように、DHA などの n3 系脂肪酸の投与により、脂肪蓄積の改善は認められるが、肝の線維化を抑制するといった報告はまだなく、NASH 病態の進展を抑制する機序はまだ明らかにされていない。一方で、GPR120/FFAR4 は、ヒト小児 NASH 患者の肝臓組織において、発現を認め、長期間の DHA の投与により、その発現は有意に増加し、脂肪肝や炎症を改善するとの報告もある (PLoS One, 2014)。

また、GPR120/FFAR4 ノックアウトマウスは、通常飼育飼料では野生型 (WT) マウスと体重に差がなかったが、高脂肪食 (60% 脂肪) の負荷によって肥満、インスリン抵抗性、脂肪肝および肝機能異常を示すこと、n3 系脂肪酸の投与が WT では抗炎症、全身性のインスリン感受性上昇を起こすのに対し、GPR120/FFAR4 ノックアウトマウスでは見られなかったことが連携研究員の平澤らによる報告 (Nature, 2012) で明らかとなり、NASH の病態進展には GPR120/FFAR4 が関与していることが多いに期待できる。以上のことから GPR120/FFAR4 に着目した。

2. 研究の目的

NASH は脂肪肝から肝硬変、最終的には肝臓がんにも進行する肝疾患であり、患者数が急増している。現在、有効な治療法は確立されておらず、早急な対策が望まれている。一方 GPR120/FFAR4 は DHA などの長鎖脂肪酸により活性化され、抗炎症作用やインクレチン分泌促進を介したインスリン抵抗性改善作用を有することが知られている。そこで本研究は、GPR120/FFAR4 が NASH 病態進展のリスクファクターであるという仮説をたて、GPR120/FFAR4 ノックアウトマウスを用いて証明する。これらの基盤研究を遂行することによって、GPR120/FFAR4 を標的とした新たな NASH 治療戦略および創薬開発研究が前進することが期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、NASH 病態形成機構における GPR120/FFAR4 の関与について明らかにするため、まず、NASH モデルマウスを

作製した。次にそのモデルマウスを用いて、GPR120/FFAR4 のアゴニストである DHA を経口投与し、NASH 病態形成への影響を検討した。次に、GPR120/FFAR4 ノックアウトマウスを用いて、NASH 病態形成過程における影響を検討した。

(1) 動物は 5 週齢の C57B/6J 雄性マウス (日本 SLC) および GPR120/FFAR4 ノックアウト雄性マウスを用いた。

(2) 飼料は、通常飼育飼料として、MF 飼料 (オリエンタル酵母社、MF) を、NASH 病態の作製には、超高脂肪コリン欠乏・メチオニン低減飼料 (A06071302 メチオニン 0.1% 含有、60 Kcal% 脂肪: リサーチダイエツト社、CDAHFD) を用いた。摂取期間は 2 週間とした。

(3) DHA は 97% エチルエステル体 (備前化成) を用い、MF または CDAHFD の摂取を開始した 1 週間後の時点から、1 日 1 回 50 μ L/ 日を 1 週間、ゾンデにて強制経口投与した。

(4) 実験グループ

・ NASH モデルマウスにおける DHA の影響

マウスはランダムに各群 6 匹ずつ 4 群に分けた (MF のみ、MF + DHA、CDAHFD のみ、CDAHFD + DHA の 4 群)。

・ GPR120/FFAR4 の欠損による影響

マウスはランダムに各群 6 匹ずつ 4 群に分けた (WT に MF、GPR120/FFAR4 ノックアウトに MF、WT に CDAHFD、GPR120/FFAR4 ノックアウトに CDAHFD をそれぞれ摂取させた 4 群)。

(5) 血清中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) およびアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) の測定には、酵素法を用いた。

(6) 肝臓の組織学的検討には、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色、およびマッソン・トリクローム染色を用いた。

(7) F4/80、 α 平滑筋アクチン (α -SMA) の発現は蛍光免疫染色法を用いて評価した。

(8) 各 mRNA の発現は、qPCR 法を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) NASH モデルマウスにおける病態の確認

肝機能値 (血清 ALT 値 および AST 値) は MF 群に比べ、CDAHFD 群で有意な増加を示した。炎症マーカーである F4/80、TNF α 、線維化の指標である collagen type

1 および TGF β の mRNA 発現も有意に増加した。肝臓組織のヘマトキシリンエオジン染色、マッソントリクローム染色を用いた組織学的検討の結果、MF 群に比べ CDAHFD 群で大滴性脂肪滴の沈着、肝細胞の炎症および微細な線維化がみられた。

これらの結果から、CDAHFD の 2 週間摂取で NASH 病態の初期の段階が形成されていると考えられた。

(2) NASH モデルマウスにおける DHA 投与による影響

MF または CDAHFD を 2 週間摂取させ、DHA を、CDAHFD の 1 週間摂取後から、1 日 1 回 1 週間強制経口投与したマウスにおいて、CDAHFD の 2 週間摂取によって血清 AST 値および ALT 値は有意に上昇した。また、肝臓において、炎症性マーカーである F4/80、腫瘍壊死因子 (TNF α)、および線維化の指標である collagen type 1、TGF β の mRNA 発現も有意に増加した。

これに対し、DHA を摂取させたことによって、上昇した血清 AST 値および ALT 値は有意に抑制された。また、有意に上昇した F4/80 および TNF α の mRNA は、DHA 投与によってその上昇が抑制される傾向が見られた。

一方、肝臓の組織学的検討において、MF 群で認められなかった大滴性脂肪滴の沈着、肝細胞の炎症および微細な線維化が CDAHFD 群で認められた。

以上の結果から、GPR120/FFAR4 のアゴニストである DHA の投与は、NASH の病態 (肝機能、肝臓の炎症、脂肪化、線維化) の進行を抑制することがわかり、NASH の進展過程において GPR120/FFAR4 が関与している可能性が示された。

(3) GPR120/FFAR4 ノックアウトによる影響

WT、GPR120KO の両群で、血清 ALT 値および AST 値は MF 群に比べ CDAHFD 群で有意な増加を示し、肝臓への脂肪沈着、炎症ならびに微細な線維化が見られた。しかしながら、CDAHFD 群における WT および GPR120KO 間では、血清 ALT 値、AST 値、肝臓への脂肪沈着、ならび線維化の状態に差は見られなかった。

一方、マクロファージのマーカーである F4/80 の肝臓における発現を蛍光免疫染色で確認したところ、王冠様構造 (細胞死に陥った脂肪細胞を炎症促進性 M1 マクロファージがとり囲み、貪食・処理する特徴的な組織学的構造で、内部で慢性炎症が起こり線維化へ繋がるとされる) の発現が、MF 群に比べ CDAHFD 群で有意な増加を認めたが、CDAHFD を摂取させた GPR120KO では WT に比べ、さらに有意な増加を示した。また、TNF α の mRNA 発現においても同様

に、MF 群に比べ CDAHFD 群で有意な増加を認めたと、CDAHFD を摂食させた GPR120KO で WT に比べ、さらに有意な増加を示した。

線維化マーカーである collagen type 1 および TGF- β については、MF 群に比べ CDAHFD 群で有意な増加を認めたと、CDAHFD 群の WT と GPR120KO の間における有意な差は認められなかった。

これらの結果より、GPR120/FFAR4 の欠損は CDAHFD を 2 週間摂取させたマウスの肝臓における炎症反応を悪化させることが明らかとなった。

GPR120/FFAR4 の炎症抑制に関するメカニズムについては、これまでに、DHA や EPA などの n3 系遊離脂肪酸の投与による GPR120/FFAR4 の活性化が、一般に炎症のメカニズムに関与しているとされる Toll 様受容体および TNF- β のシグナル経路を強力に抑制することで抗炎症作用を示すことが Oh らによって報告されている (Cell, 2010)。今回の我々の検討でも、CDAHFD 誘発 NASH モデルマウスにおいて、悪化した肝機能 (血清 ALT 値、AST 値) や肝臓の線維化が DHA の投与によって有意に抑制され、肝臓の脂肪化および炎症を抑制する傾向が示された。これらのことから、NASH 病態の進展において DHA 投与による GPR120/FFAR4 の活性化が関与していることが示唆された。また、GPR120/FFAR4 をノックアウトすることによって CDAHFD 負荷により悪化した肝臓の炎症が、さらに増悪したことから、NASH 病態における肝臓の炎症に関して GPR120/FFAR4 の発現が抑制的に関わっていることが示唆された。

一方で、肝臓の線維化に関して、今回検討した collagen type 1 および TGF- β では、GPR120/FFAR4 のノックアウトによる増悪は見られなかった。肝臓の線維化は NASH 病態の進展における重要なファクターの 1 つであり、CDAHFD 摂取期間の長さなど、異なる条件での検討や、他の線維化指標を用いた更なる検討も必要であると考えられる。

以上、本研究では、GPR120/FFAR4 のアゴニストである DHA の投与により、NASH の病態進行を抑制すること、ならびに、GPR120/FFAR4 をノックアウトさせることで、CDAHFD 負荷による肝細胞障害、および炎症をさらに増悪することが示された。これらのことから、NASH の病態進展における GPR120/FFAR4 の関与が示唆された。今後、この GPR120/FFAR4 をターゲットとした新薬の検討など、NASH に対する新たな治療戦略に向けた研究につながることを期待したい。

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 1 件)

Nakamoto K, Obata T, Hirasawa A, Ih Kim K, Ryang Kim S, Tokuyama S. A Future Perspective on the Involvement of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid in the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease / Nonalcoholic Steatohepatitis. YAKUGAKU ZASSHI. 2016; 136(4): 583-9.

〔学会発表〕(計 4 件)

宮城景, 中本賀寿夫, 原田慎一, 小畑友紀雄, 森本泰子, 金啓二, 金守良, 平澤明, 徳山尚吾. NASH 形成過程における長鎖脂肪酸受容体 GPR120/FFAR4 シグナルの関与. 第 127 回日本薬理学会近畿部会 2015. 6. 24. 岐阜.

宮城景, 中本賀寿夫, 小畑友紀雄, 原田慎一, 森本泰子, 平澤明, 金啓二, 金守良, 徳山尚吾. NASH の病態進行における長鎖脂肪酸受容体 GPR120/FFAR4 の関与. 日本薬学会 136 回年会 2016. 3. 27 ~ 29. 横浜.

中本賀寿夫, 島田幸季, 小畑友紀雄, 原田慎一, 森本泰子, 徳山尚吾. コリン欠乏メチオニン低減超高脂肪食により惹起される NAFLD の脂肪組織炎症および線維化に対する DHA 投与の効果. 第 129 回日本薬理学会近畿部会 2016. 6. 24. 広島.

中本賀寿夫, 島田幸季, 原田慎一, 森本泰子, 平澤明, 徳山尚吾. GPR120/FFAR4 アゴニストは白色脂肪細胞による炎症を抑制し、非アルコール性脂肪性肝炎を阻止する. 第 130 回日本薬理学会近畿部会 2016. 11. 19. 京都.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

該当なし

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
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小畑友紀雄 (OBATA Tokio)
神戸学院大学、薬学部、講師、
臨床薬学研究室、研究者番号： 80625244

(2)研究分担者

徳山尚吾 (TOKUYAMA Shogo)
神戸学院大学、薬学部、教授、
臨床薬学研究室、研究者番号： 70225358

中本賀寿夫 (NAKAMOTO Kazuo)
神戸学院大学、薬学部、講師、
臨床薬学研究室、研究者番号： 30432636

(3)連携研究者

平澤 明 (HIRASAWA Akira)
京都大学、大学院・薬学研究科、准教授、
研究者番号： 70242633