

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19341

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎進展機序におけるmicroRNA-27bの関与の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of microRNA-27b for the development of NASH

研究代表者

今城 健人 (IMAJO, Kento)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：30600192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂肪肝におけるエンドトキシン過剰応答により誘導される肝内炎症が脂質代謝障害に関与するmicroRNA-27b(mir-27b)を上昇させることで脂質排泄・代謝障害を来し、肝内に余剰な遊離脂肪酸(FFA)の蓄積を来すことで肝障害を進展させるという極めて独創的なNASH病態進展機序を解明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have clarified that hepatic inflammation induced by hyper responsivity to endotoxin in fatty liver causes lipid excretion and metabolic disturbance by elevating microRNA - 27b (mir-27b), resulting in lipid metabolism disorder and accumulation of free fatty acid (FFA) which causes the development of NASH.

研究分野：Hepatology

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎

1. 研究開始当初の背景

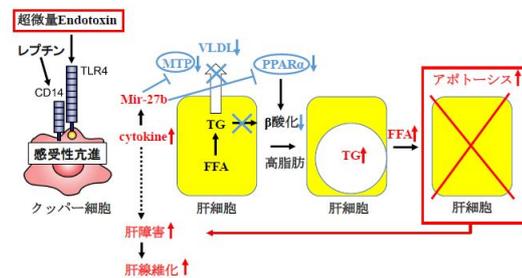
Nonalcoholic steatohepatitis (NASH)は動脈硬化や慢性腎臓病のように慢性持続性の炎症によるものと考えられ、その原因は多因子であり軽微な異常反応が多段階に継続して形成されると考えられる。Endotoxin(ET)-脂肪肝炎の分野に関しては、肥満者では腸管内における細菌の異常増殖が生じ、ETの絶対量増加による炎症がNASH進展に關与すると信じられてきた。しかし、門脈中ET量は肥満者においてもせいぜい健常者の二倍程度でありこの現象のみではNASH病態を説明することはできない。ここで我々は脂肪肝では正常肝に比べてET反応性を亢進することを示した(Imajo K. Cell metab 2012)。Host側の因子に着目したET過剰応答機序はこれまで報告がなされておらず、新規性が高くかつ独創的であるとされ、Cell MetabolismのEditorialにも取り上げられている。また、メタボリック症候群は肝臓のみならず全身性の炎症性疾患であり、我々が提唱した機序は肝臓のみならず多臓器に及ぶET過剰応答性炎症の機序を説明できる可能性があり、極めて斬新かつ先鋭的であるとされ、多岐にわたる学会で優秀演題賞を受賞している。しかし、ヒト肝臓で曝露されるET量は我々のマウスモデルに比し極めて微量であり、生理的ヒトNASH病態を説明するにはさらに微量のETを用いた検討が必要である。微量ETではいかに脂肪肝での過剰応答が生じたとしても肝障害をきたすほどの炎症は生じない。即ち、ヒトの生体ではET過剰応答による炎症性cytokine増加以外にもさらなる病態進展因子が存在すると考えるが、未だ解明されていない。我々はこの病態進展にはmicroRNAが関与すると考える。microRNAは20-15bpのRNAで遺伝子発現の制御に重要な働きをしていることが近年明らかとなっている。我々は高脂肪食飼育下脂肪肝モデルマウスに投与しても肝障害を来さない微量ET(0.005 mg/kg)を投与した後、microRNAのmicroarrayによる肝の網羅的解析を行ったところ、mir-27bが著明に亢進していた。事実、健常者、単純性脂肪肝(NAFI)患者及びNASH患者のヒト肝生検組織を用いたmiRNAの網羅的解析の結果からもmir-27bは健常者よりもNAFI、NAFIよりもNASHでその発現が亢進していた。さらなるmir-27bの機能解析のため、マウスから単離した初代肝細胞にmir-27bを過剰発現させると、著明な脂肪蓄積と同時にMTP(Microsomal Triacylglyceride transfer protein)やPPARの低下とSREBP1cの亢進を示した。この結果は以前に我々がヒトNASH病態への関与を指摘したMTPの発現低下

(Fujita K. Hepatology 2009)がmir-27bによって起こる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

上記のように、mir-27bは脂質代謝障害を来す可能性がある。SREBP1cは脂肪酸流入を、またMTPやPPARは脂質排泄を律速しており、中でもET-mir-27bにより誘導されるMTP低下は毒性の低い中性脂肪蓄積の物理的限界を招き、その結果として肝細胞内に細胞毒性の強いエステル化されないfree fatty acid(FFA)蓄積に繋がることから推察される。即ち、mir-27bにより誘導されるFFAがさらなるNASH病態進展因子であると考えられる(Fig. 1)。本研究では我々の発見した脂肪肝でのET過剰応答がもたらす炎症を契機として上昇したmir-27bによる肝障害進展機序を解明することを目的とする。

Fig. 1
超微量ETからmir-27bの脂質代謝障害を介したNASH進展機序



3. 研究の方法

- (1) 微量ETの脂肪肝炎症病態進展への関与；脂肪肝においても肝障害を来さない程度の微量ETがNASH病態への関与を検討する。即ち、脂肪肝マウスに対しヒトの生理的な濃度に近い微量ETを投与することで脂肪肝炎症病態が進展するかを検討する。
- (2) 微量ETのmir-27bへの関与；脂肪肝においても肝障害を来さない程度の微量ETによるmir-27b発現への影響を検討する。即ち脂肪肝マウスに対しヒトの生理的濃度に近い微量ETを投与しmir-27bの発現を検討する。また、微量ETによるmir-27b発現亢進機序を解明する。
- (3) mir-27bの脂肪肝炎症病態進展への関与；脂肪肝におけるmir-27bの過剰発現によるNASH病態進展への関与を検討する。即ち、高脂肪食負荷をした肝細胞特異的mir-27b過剰発現マウスを作成し、肝細胞における持続的なmir-27bの過剰発現がNASH病態進展へつながるかを検討する。
- (4) ヒトNASHにおけるmir-27b発現及、血中ET定量及び肝内FFA量の検討；我々の提唱する機序がヒトでも矛盾がないことを示すため、ヒト検体を用いて肝臓におけるmir-27bの発現が血中ETや肝内FFAと相関を示すかを検討する。

4. 研究成果

(1)高脂肪食下で飼育した脂肪肝モデルマウスに対して微量 ET(0.01 mg/kg; 脂肪肝モデルマウスに単回投与しても肝障害を来さない量)を28日間連日腹腔内に投与したところ、単回投与では肝障害を起こさなくても連日投与では顕著な肝内炎症及び線維化、肝内中性脂肪(TG)及び脂肪酸(FA)の蓄積を認めた。即ち、微量 ET の直接的な影響以外の脂肪肝炎病態進展因子が関与したことが予想される。

(2) 上記と同量の微量 ET を1回投与した後、miRNAのmicroarrayによる肝の網羅的解析を行い、microRNA-27b(mir-27b)が著明に亢進していることを発見した。即ち、微量 ET は肝においてmir-27b発現を増加させる可能性が示唆された。

(3) mir-27bの機能解析のため、肝細胞特異的mir-27bトランスジェニックマウスを作製し、普通食(BD)で飼育したところ、コントロールに比し肝臓内に著明な脂肪化を呈したが、高脂肪食で飼育するとさらに著明な脂肪化のみならず肝内炎症、アポトーシス、肝線維化を来していた。即ち、肝細胞に特異的なmir-27bの発現が脂肪肝炎病態進展に関与することが示唆された。さらにはBD飼育下B6マウスにmir-27bを投与すると、著明な脂肪蓄積と同時に脂質排泄のkey factorであるmicrosomal triglyceride transfer protein (MTP)や脂質酸化のkey factorであるPPAR

の低下及び脂質合成のkey factorであるSREBP1cの亢進を示した。この結果は以前に我々がヒトNASH病態への関与を指摘したMTPの発現低下(Fujita et al, Hepatology, 2009)がmir-27bによって起こるという極めて新規性の高い結果であった。さらにはmir-27bのmimicを投与することにより普通食飼育下マウスでは著明な脂肪肝を、高脂肪食飼育下マウスでは線維化進展を認めており、トランスジェニックマウスの結果と一致していた。また、高脂肪食飼育下肝細胞特異的TLR4KOマウス(Alb-cre TLR4fl/flマウス)に対する微量 ET 投与による肝mir-27b発現が抑制されることを確認した。

(4) 非アルコール性脂肪肝炎(NASH)患者において、肝組織中のmir-27b mRNA発現、血中ET活性及び肝内FFA、特にパルミチン酸は単純性脂肪肝(NAFL)に比し有意に高いことが示された。さらに血中ET活性はmir-27b mRNA発現と有意な正の相関を示した。また、NASH患者における糞便のメタ解析を行い、NASH患者では特定の腸内細菌の異常、特にFaecalibacteriumが減少することを示した。また、Faecalibacteriumは腸管壁のバリアに関与しており、Faecalibacteriumが低下することで腸管透過性が亢進し、血中ET活性が亢進することが示された。

これらのまとめにより、NASH患者では腸管内

のFaecalibacteriumが低下することにより腸管透過性が亢進し、血中にETがなだれ込む。ETは肝臓に炎症を起こすのみならず、TLR4経路を介して肝mir-27bを活性化する。Mir-27bは肝脂質代謝を障害し、肝内炎症や肝線維化を亢進することが予想された。

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9件)

1. Identification of core gene networks and hub genes associated with progression of non-alcoholic fatty liver disease by RNA sequencing. Hotta K, Kikuchi M, Kitamoto T, Kitamoto A, Ogawa Y, Honda Y, Kessoku T, Kobayashi K, Yoneda M, Imajo K, Tomeno W, Nakaya A, Suzuki Y, Saito S, Nakajima A. Hepatol Res. 2017 Feb 20. 査読あり.

2. Pemafibrate, a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha modulator, improves the pathogenesis in a rodent model of nonalcoholic steatohepatitis. Honda Y, Kessoku T, Ogawa Y, Tomeno W, Imajo K, Fujita K, Yoneda M, Takizawa T, Saito S, Nagashima Y, Nakajima A. Sci Rep. 2017 Feb 14;7:42477. 査読あり.

3. Resveratrol ameliorates fibrosis and inflammation in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. Kessoku T, Imajo K, Honda Y, Kato T, Ogawa Y, Tomeno W, Kato S, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Nagashima Y, Saito S, Wada K, Nakajima A. Sci Rep. 2016 Feb 25;6:22251. 査読あり.

3. Characteristics of non-obese non-alcoholic fatty liver disease: Effect of genetic and environmental factors. Honda Y, Yoneda M, Kessoku T, Ogawa Y, Tomeno W, Imajo K, Mawatari H, Fujita K, Hyogo H, Ueno T, Chayama K, Saito S, Nakajima A, Hotta K. Hepatol Res. 2016 Sep;46(10):1011-8. 査読あり.

4. The Selective SGLT2 Inhibitor Ipragliflozin Has a Therapeutic Effect on Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice. Honda Y, Imajo K, Kato T, Kessoku T, Ogawa Y, Tomeno W, Kato S, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Saito S, Nakajima A. PLoS One. 2016 Jan 5;11(1):e0146337. 査読あり.

5. Magnetic Resonance Imaging More Accurately Classifies Steatosis and Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Than Transient Elastography. Imajo K, Kessoku T, Honda Y, Tomeno W, Ogawa Y, Mawatari H, Fujita

- K, Yoneda M, Taguri M, Hyogo H, Sumida Y, Ono M, Eguchi Y, Inoue T, Yamanaka T, Wada K, Saito S, Nakajima A. Gastroenterology. 2016 Mar;150(3):626-637. 査読あり.
6. Are platelets count useful for detecting the grade of steatosis? Imajo K, Yoneda M, Nakajima A. Hepat Mon. 2015 May 23;15(5):e28957. 査読あり.
7. Deficiency of iNOS-derived NO accelerates lipid accumulation-independent liver fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis mouse model. Nozaki Y, Fujita K, Wada K, Yoneda M, Kessoku T, Shinohara Y, Imajo K, Ogawa Y, Nakamura M, Saito S, Masaki N, Nagashima Y, Terauchi Y, Nakajima A. BMC Gastroenterol. 2015 Apr 1;15:42. 査読あり.
8. Targeted-bisulfite sequence analysis of the methylation of CpG islands in genes encoding PNPLA3, SAMM50, and PARVB of patients with non-alcoholic fatty liver disease. Kitamoto T, Kitamoto A, Ogawa Y, Honda Y, Imajo K, Saito S, Yoneda M, Nakamura T, Nakajima A, Hotta K. J Hepatol. 2015 Aug;63(2):494-502. 査読あり.
9. Non-alcoholic fatty liver disease comorbid with major depressive disorder: The pathological features and poor therapeutic efficacy. Tomeno W, Kawashima K, Yoneda M, Saito S, Ogawa Y, Honda Y, Kessoku T, Imajo K, Mawatari H, Fujita K, Saito S, Hirayasu Y, Nakajima A. J Gastroenterol Hepatol. 2015 Jun;30(6):1009-14. 査読あり.
〔学会発表〕(計8件)
1. 結束貴臣、本多靖、小川祐二、留野涉、今城健人、馬渡弘典、藤田浩司、米田正人、斉藤聡、酒井英子、水口裕之、和田孝一郎、中島淳。mir27bの発現制御による肝臓から脂肪組織への蓄積脂肪の再分配の破綻によるNASH発症新規メカニズム。第11回酸化ストレス研究会，ヒルトン博多シーホーク(福岡)，2015，2。
2. Kessoku T, Honda Y, Ogawa Y, Tomeno W, Imajo K, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Saito S, Wada K, Eguchi Y, Nakajima A: MICRO RNA-27B PROMOTES NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS THROUGH THE INHIBITION OF PPAR AND MTTP IN VIVO ANIMAL STUDY. EASL Monothematic Conference: Microbiota, Metabolism and NAFLD, Innsbruck Austria, February 26-28, 2015.
3. 今城健人、斉藤聡、中島淳：非アルコール性脂肪肝疾患の病変診断はMRI単独で可能か。第41回日本肝臓学会西部会 パネ

- ルディスカッション3 非侵襲的肝繊維化診断法の進歩 2015年12月3日 名古屋国際会議場(愛知)
4. 結束貴臣、今城健人、中島淳。エンドトキシンによる肝細胞の自然免疫応答において，microRNA 27b を介した NASH 進展メカニズムの解明。第51回日本肝臓学会総会パネルディスカッション3 Modern Immunology からみた肝病態，ホテル日航熊本(熊本)，2015，5。
5. 結束貴臣、今城健人、中島淳。microRNA-27bの臓器相関が及ぼすNASH進展メカニズムの解明。2015年度日本消化器関連学会週間(JDDW 2015)パネルディスカッション5(肝臓学会・消化器病学会・消化器外科学会)肝臓をめぐる臓器相関の病態に迫る，グランドプリンスホテル新高輪(東京)，2015，10。
6. kessoku Takaomi, Kento Imajo, Atsushi Nakajima. Overexpression of microRNA27b develop the steatosis and insulin resistance in mice model. 2015年度日本消化器関連学会週間(JDDW 2015)(第19回日本肝臓学会)International Poster Session(JDDW). Liver: NAFLD, グランドプリンスホテル新高輪(東京)，2015，10。
7. Imajo K, Honda Y, Kessoku T, Tomeno W, Ogawa Y, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Saito S, Nakajima A: MAGNETIC RESONANCE IMAGING MORE ACCURATELY CLASSIFIES STEATOSIS AND LIVER FIBROSIS IN NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE THAN TRANSIENT ELASTOGRAPHY. Presentations: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis Fatty liver disease Clinical 15 April 2016, The International Liver Congress 2016, EASL Barcelona Spain.
8. 今城健人、斉藤聡、中島淳：慢性肝疾患における肝硬度の不均一性を検討する。第41回日本肝臓学会東部会 一般演題(口演) 14 肝線維化(1)。2016年12月8日。京王プラザホテル(東京)
6. 研究組織
(1)研究代表者
今城健人(IMAJO, Kento)
横浜市立大学・附属病院・助教
研究者番号：30600192
- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
なし