

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11073

研究課題名（和文）HDLを介した肝内コレステロール搬出に基づく非アルコール性脂肪肝炎の予防戦略

研究課題名（英文）Prevention strategy for non-alcoholic steatohepatitis based on hepatic cholesterol efflux by HDL

研究代表者

篠畑 綾子（Shinohata, Ryoko）

岡山大学・保健学域・助教

研究者番号：70335587

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：高脂肪・高コレステロール飼料（HFC）で飼育したラットでは脂肪肝と肝線維化が確認され、血清HDL-コレステロールが顕著に増加した。肝臓ではコレステロール蓄積が見られ、HDL生成に関与するABCA1の発現が増加したため、HDLが肝臓に蓄積したコレステロールの搬出に関与している可能を示唆された。しかし、この動物実験の結果は細胞培養実験では再現できておらず、さらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回のラットの実験では、肝臓にコレステロール蓄積が起きると、肝ABCA1発現が増加し、血清HDL-コレステロールが増加するメカニズムが推定された。このHDL-コレステロールの増加が単純性脂肪肝から脂肪肝炎への移行に対し防御的に働いているかどうかを今後明らかにすることができれば、NASHの予防や治療法の確立に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：A high-fat/high-cholesterol (HFC) diet induced fatty liver and hepatic fibrosis in rats, and their serum HDL-cholesterol levels increased significantly. Cholesterol accumulation was occurred in the liver, and the hepatic expression of ABCA1, which is involved in HDL biosynthesis, was increased, suggesting that HDL may be involved in the export of cholesterol accumulated in the liver. However, we could not obtain similar results in cell culture experiments to support the findings in animal experiments.

研究分野：臨床化学

キーワード：HDL コレステロール 非アルコール性脂肪肝炎 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患は世界的に見ても頻度の高い肝疾患であり、日本では成人人口の約 30%にのぼると言われる。その多くは肥満やインスリン抵抗性などの生活習慣病と関連しており、罹患率は年々増加している。脂肪が肝臓内に沈着する単純性脂肪肝は、何らかの刺激が加わることで炎症性の線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) へと移行し、さらに NASH は肝硬変や肝がんへと進展する。従って、単純性脂肪肝から NASH への移行メカニズムを解明し、NASH への進展を阻止することは重要な課題である。近年、非アルコール性脂肪性肝疾患におけるコレステロールの細胞内蓄積が細胞傷害性を有しており、肝臓における炎症反応を誘発するトリガーの一つになっていることが報告された。このことから、単純性脂肪肝から NASH へ至る過程で、肝細胞へのコレステロール蓄積が重要なメカニズムを担っており、その予防は NASH 発症リスクの低減につながるかもしれない。

2. 研究の目的

この研究では善玉コレステロールとして知られる高密度リポ蛋白質 (HDL) のコレステロール搬出能に着目し、HDL が肝臓におけるコレステロール搬出に関与するかどうかを明らかにしていく。さらに、肝内コレステロール蓄積によって引き起こされる HDL の量や質、機能の変化が、NASH への進展を予測するバイオマーカーとなりうるか、その可能性を検討する。肝臓における HDL のコレステロール搬出機能を明らかにすることにより、NASH 発症の予防戦略に向けた基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

8 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラット (チャールスリバー) を体重が等しくなるよう 4 群 (各群 n=5) に分け、各群に通常飼料 (MF)、高脂肪飼料 (HF: 68% MF, 30% パーム油, 2% コール酸)、高コレステロール飼料 (HC: 95.5% MF, 2% コール酸, 2.5% コレステロール)、高脂肪・高コレステロール飼料 (HFC: 68% MF, 27.5% パーム油, 2% コール酸, 2.5% コレステロール) をそれぞれ与えて自由摂食・自由飲水で飼育した。また、飼料に含まれるコール酸の影響を確認するために、コール酸飼料 (CA: 98% MF, 2% コール酸) で飼育した群 (n=5) を一部の検討に加えた。18 週齢目に 12 時間の絶食後、麻酔下で血液と肝臓を採取した。体重、飼料、飲水量は 1 週毎に記録した。本研究は岡山大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

採取したラットの肝臓は、脂質蓄積、遺伝子発現 (リアルタイム PCR) および蛋白質発現 (ウエスタンブロッティング) を評価し、組織標本観察を行った。血液は血清を分離後、生化学検査 (AST, ALT, 血糖など)、リポ蛋白質詳細分析 (ゲルろ過 HPLC)、HDL サブクラス分析 (イオン交換クロマトグラフィ)、HDL 機能分析 (抗酸化、抗炎症能) などを実施した。

(2) 細胞培養実験

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞 (JCRB 細胞バンク) の細胞培養液に脂肪酸 (オレイン酸, パルミチン酸)、酸化 LDL, 水溶性コレステロール (コレステロール-メチル-β-シクロデキストリン) などを添加して、HepG2 細胞内への脂肪蓄積を誘導した。一定期間培養後、培養上清のリポ蛋白質をゲル濾過 HPLC で分析し、細胞培養中に出現する HDL の量を評価した。また、HepG2 細胞のホモジネートを作製し、SR-BI (scavenger receptor class B type I) および ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) など、主に HDL 代謝やコレステロール代謝に関連する蛋白質について、遺伝子発現をリアルタイム PCR 法、蛋白質発現をウエスタンブロッティング法で調べた。

4. 研究成果

(1) 動物実験

HF 群および HFC 群はコントロール群 (MF 飼料群) に比べ、飼料摂取量が少なく体重が低値であった。HC 群では飼料摂取量に差は見られなかったが、体重が低値傾向であった。肝臓重量 (g/体重) は HC 群と HFC 群はコントロール群に比べ有意に増加しており、脂肪肝の状態が確認された。肝臓に蓄積したトリグリセリド量とリン脂質量は 4 群間に差は見られなかったが、コレステロール蓄積量は HC 群と HFC 群がコントロール群よりも多く、また、HFC 群は HC 群よりも有意にコレステロールが蓄積していた (図 1)。HFC 群ではマッソントリクローム染色で肝線維化も観察され、血清 ALT 値も HC 群よ

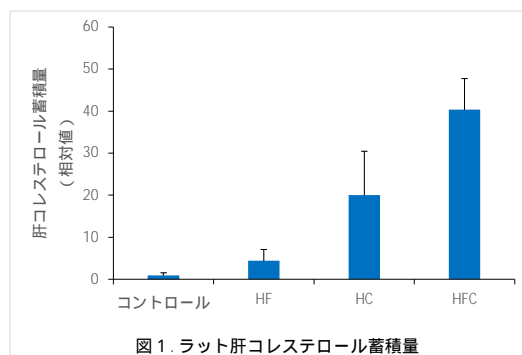


図 1. ラット肝コレステロール蓄積量

りも増加傾向であったことから、肝障害の程度が HFC 群の方が大きく、非アルコール性脂肪肝炎に近い病態が確認できた。

血清総コレステロールはコントロール群に比べ、HC 群と HFC 群で有意な増加が見られたが、HDL-コレステロールは予想に反して HC 群で減少し、HFC 群で増加していた (図 2)。HFC 群では大型 HDL が増加しており、増加したコレステロールは遊離コレステロールがメインであった。大型 HDL に含まれるアポ E は HFC 群で増加し、HC 群で減少していた。HDL が有する抗酸化能 (パラオキソナーゼ活性) は、コントロール群に比べ HC 群と HFC 群で有意に低下し、HC 群と HFC 群では差は見られなかった。また、HDL 上に存在し炎症と関連する血清 PAF-AH (platelet-activating factor acetylhydrolase) の活性値は肝線維化が見られた HFC 群でのみ有意に増加していた。炎症や線維化に関連する蛋白の mRNA 発現を詳細に調べたところ、Kupffer 細胞の活性化指標である TNF (tumor necrosis factor- α) や F4/80 はコントロール群に比べ脂肪肝が生じた HC 群と HFC 群で mRNA 発現が増加していたが、HC 群と HFC 群では差がみられなかった。星細胞の活性化指標である SMA (α -smooth muscle actin) は HC 群と HFC 群で mRNA 発現が増加していたが、HC 群と HFC 群では差がみられなかった。一方、線維化の指標である COL1A1 (collagen, type I, alpha 1) と MMP2 (matrix metalloproteinase-2) は肝線維化が見られた HFC 群でのみ mRNA 発現が増加していた。TGF (transforming growth factor- β) と MMP9 (matrix metalloproteinase-9) は HC 群と HFC 群で mRNA 発現が増加していた。COL1A1 の mRNA 発現量は血清 PAF-AH と有意な正の相関がみられた。

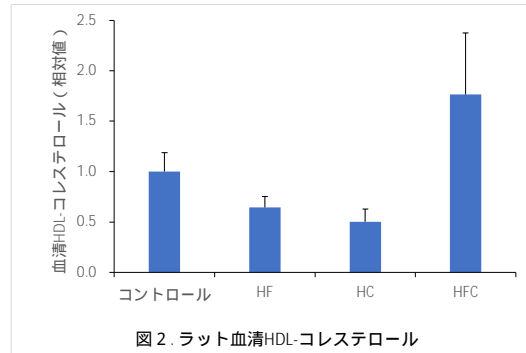


図 2. ラット血清HDL-コレステロール

肝臓の脂肪蓄積が HDL 代謝へ影響しているかを探るため、肝臓の HDL 関連蛋白質の遺伝子発現を調べた。コントロール群と比較すると、脂肪蓄積が見られた HC 群と HFC 群で HDL 内のコレステロールを肝細胞内へ取り込む HDL 受容体 (SR-BI)、肝臓での VLDL 生成に深く関与する MTP (microsomal triglyceride transfer protein)、SR-BI の発現調節を担う HNF4 (hepatocyte nuclear factor 4 α) などの遺伝子発現が低下し、細胞から HDL へのコレステロール搬出に関与する ABCG1 (ATP-binding cassette transporter G1) は増加していた。蛋白質レベルの解析でも、SR-BI はコントロール群に比べて HC 群と HFC 群で有意に低下していたが、HC 群と HFC 群の間には差は見られなかった。一方、ABCG1 と同様に細胞内のコレステロール搬出を担う ABCA1 の遺伝子発現は、コントロール群、HC 群、HF 群の間で差はなく、HFC 群のみで増加しており、ウエスタンブロッティングでも HFC 群で蛋白質の発現が増加していることが確認された。

(2) 細胞培養実験

培養肝細胞に脂肪蓄積を引き起こすために、脂肪酸 (パルミチン酸またはオレイン酸) を添加 (0 ~ 0.8mM) した培養液で HepG2 細胞を培養すると、細胞内トリグリセライドが有意に増加した。パルミチン酸添加培地では細胞内コレステロール蓄積が増加傾向であったが統計学に有意ではなかった。培養液に出現する HDL は脂肪酸添加培地で減少傾向にあり、予想と異なる結果であった。LDL や酸化 LDL を培地に添加した場合は、細胞内脂質蓄積量に変動は見られなかった。一方、水溶性コレステロール添加培地 (0 ~ 250 μ g/mL) で培養した場合は、濃度依存性に細胞内コレステロール蓄積が増加し (図 3)、培養上清に出現する大型 HDL が増加する傾向にあった。細胞外へのコレステロール搬出に関わる ABCA1 や HDL 受容体として機能する SR-BI はコレステロール蓄積が生じた HepG2 細胞において遺伝子発現が増加する傾向がみられたが有意ではなかった。

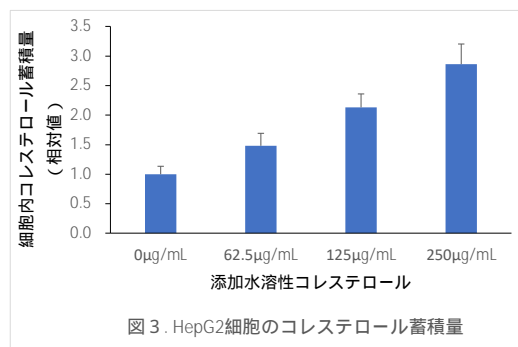


図 3. HepG2細胞のコレステロール蓄積量

以上の結果をまとめると、脂肪肝と肝線維化が起きた HFC 摂取ラットでは肝臓のコレステロール蓄積が生じ、大型の HDL が増加した。また、肝臓では細胞内コレステロールを HDL へ搬出する機能を有する ABCA1 の遺伝子発現と蛋白質発現が増加したことから、HDL が肝臓に蓄積したコレステロールの搬出に関与している可能性が示唆された。一方、HC 摂取ラットでは脂肪肝は生じたが肝線維化は見られず、血清 HDL-コレステロールが減少した。したがって、ラットモデルにおける単純性脂肪肝から NASH への進展には飼料に含まれるコレステロールと脂肪の相乗作用が必要であり、肝臓におけるコレステロール蓄積が重要であると推測される。また、

HDL上に存在するPAF-AHは肝線維化が生じたHFC摂取ラットで活性値が著しく上昇したことから、PAF-AHが肝線維化の新たなバイオマーカーとなる可能性が示唆された。HepG2細胞を用いた細胞培養実験では、細胞内にコレステロール蓄積を引き起こすことはできたがラットの動物実験で見られた遺伝子・蛋白質発現の変動を再現することは出来なかった。培養液への脂肪酸とコレステロールの同時添加や、ラット肝細胞の初代培養の実施が、今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shinohata R, Shibakura M, Arai Y, Watanabe S, Hirohata S, Usui S	4. 巻 197
2. 論文標題 A high-fat/high-cholesterol diet, but not high-cholesterol alone, increases free cholesterol and apoE-rich HDL serum levels in rats and upregulates hepatic ABCA1 expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 49～58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biochi.2022.01.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinohata R, Shiga Y, Miura SI, Hirohata S, Shibakura M, Ueno-Iio T, Watanabe S, Arai Y, Usui S	4. 巻 510
2. 論文標題 Low plasma apolipoprotein E-rich high-density lipoprotein levels in patients with metabolic syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 531-536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cca.2020.08.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kumazaki S, Nakamura M, Sasaki S, Tagashira R, Maruyama N, Sato I, Yamamoto S, Ran S, Usui S, Shinohata R, Ohtsuki T, Hirohata S, Kitamori K, Mori M, Yamori Y, Watanabe S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Bile Acid Metabolism is an Intermediary Factor between Non-Alcoholic Steatohepatitis and Ischemic Heart Disease in SHRSP5/Dmcr Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Nutrition & Food Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35248/2155-9600.19.9.763	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shinohata R, Shibakura M, Ueno-Iio T, Arai U, Watanabe S, Hirohata S, Okazaki M, Usui S.
2. 発表標題 Analysis of Serum HDL Subclass in Mouse Obesity Models by Cation-Exchange Chromatography.
3. 学会等名 71st AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo.（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinohata R, Watanabe S, Hirohata S, Nakajima K, Okazaki M, Usui S.
2. 発表標題 Analysis of serum HDL subclass from rats with non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat and high-cholesterol diet
3. 学会等名 70th AACC Annual Scientific Meeting and Clinical Lab Expo (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	臼井 真一 (Usui Shinichi) (50346417)	鳥取大学・医学部・教授 (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関