

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16238

研究課題名(和文)新規NASH誘導モデルマウスを用いたGPR43によるNASH発症抑制の検討

研究課題名(英文) Examination of suppression of NASH onset by GPR43 using a novel NASH model mouse

研究代表者

花谷 聡子(hanatani, satoko)

熊本大学・病院・特任助教

研究者番号：60814762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：C57BL/6マウスにGTG(gold-thiogluco)0.2mg/kgを腹腔内投与して過食を誘発し、高脂肪高シヨ糖食(HF/HSD)による飼育を行うことによって新規NASH誘導モデルマウスを作成することが出来た。また、短鎖脂肪酸の肝臓への作用を検討した。過食肥満モデルマウスとしてKK-Ayを、NAFLDのin vitroモデルとしてパルミチン酸とオレイン酸を投与したHepG2細胞を用いて酢酸の効果を検討したが、脂質代謝マーカーなどに明らかな変化は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は、肝硬変や肝癌の発生母地となるため、肥満人口増加に伴うNASH有病率増加が世界的な大きな課題となっており、ヒトNASHの病態を再現する適切なモデル動物の作成がNASHの病態把握、治療法開発に重要である。本研究では新たなNASH誘導モデルマウス作成の可能性が示された。一方、腸内細菌叢は食物繊維の分解による短鎖脂肪酸産生を介し宿主のエネルギー代謝に影響することが判明し、メタボリックシンドローム治療の新たなターゲットとして注目されている。本研究では酢酸の肝臓における脂質代謝への作用は明らかではなかったが、さらなる研究による短鎖脂肪酸の作用機序の解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：A new NASH-induced model mouse was created by intraperitoneally administering 0.2 mg / kg of GTG gold-thiogluco to C57BL / 6 mice and breeding them on a high-fat high-sucrose diet. We also investigated the effects of short-chain fatty acids on the liver. The effects of acetic acid were examined using KK-Ay as an overeating obesity model mouse and HepG2 cells administered with palmitic acid and oleic acid as an in vitro model of NAFLD, but no obvious changes were observed in lipid metabolism markers.

研究分野：代謝

キーワード：短鎖脂肪酸 脂肪肝 NASH

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、メタボリックシンドロームの肝臓での表現型であり肝硬変や肝癌の発生源となるため、肥満人口増加に伴う NASH 有病率増加が世界的な大きな課題となっている。NASH はインスリン抵抗性、酸化ストレス、炎症、栄養因子、遺伝因子など様々な因子が複合的に肝臓に作用し形成される。しかし、NASH の発症や進展の機序について決定的な因子は明らかとなっていない。また、ヒト NASH の病態を再現する適切なモデル動物が得られていない、または作成に長期間を要することから、NASH の病態把握、治療法開発が困難な状況である。

一方、腸内細菌叢は食物繊維の分解による短鎖脂肪酸産生を介し宿主のエネルギー代謝に影響することが判明し、メタボリックシンドローム治療の新たなターゲットとして注目されている。短鎖脂肪酸の受容体である G 蛋白質共役受容体 (GPR43) は、腸管と脂肪組織に多く発現し、腸管では GLP-1 分泌を促進、脂肪組織では脂肪蓄積の抑制に作用することが示され、エネルギー恒常性維持に関与する鍵分子である可能性が提唱されている。また、GPR43 は免疫細胞にも多く発現しており、腸管内の免疫応答や炎症性腸疾患の病態にも関与している。しかし、GPR43 を介したエネルギー代謝や免疫応答の制御が、NASH をはじめとしたメタボリックシンドロームの病態にどのように関与しているのかは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、新規 NASH 誘導モデルマウスを作成し、NASH の発症機序の一部として短鎖脂肪酸の関与を明らかにすることによって NASH の新規治療法開発に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

新規 NASH 誘導モデルの作成

6 週齢の雄性 C57BL/6 マウスに GTG (gold-thiogluose) 0.2mg/kg を腹腔内投与し食欲中枢を破壊することで過食を誘発し、さらに高脂肪高シヨ糖食 (HF/HSD) による飼育を行うことによって作成する。肥満、インスリン抵抗性に加え、肝における脂肪沈着、肝細胞の風船様腫大、炎症と線維化の出現を認めた場合 NASH 発症と判断した。

過食肥満モデルマウスにおける短鎖脂肪酸投与の肝臓への作用の検討

新規 NASH モデルマウス作製に長期間を要したため、過食肥満モデルマウスである KK-Ay を用いて短鎖脂肪酸の経口投与の影響を評価した。6 週齢の雄性 KK-Ay マウスに 0.6% 酢酸塩溶液を飲水として用いることによつて酢酸塩の経口投与を 16 週間行った。その後、肝臓における脂質代謝や酸化ストレスなどに関連する因子の mRNA 発現量を real time PCR 法にて解析した。

培養肝細胞における短鎖脂肪酸の直接的作用の検討

ヒト肝モデル細胞としてヒト肝ガン由来細胞株である HepG2 細胞を用いた。HepG2 細胞は NAFLD の in vitro モデルとして使用され、パルミチン酸とオレイン酸を投与することによって脂肪蓄積が誘導されることが報告されている。0.4mM パルミチン酸ナトリウムと 0.2mM オレイン酸ナトリウムを通常培地に加えて 24 時間培養し、NAFLD モデルとして使用した。短鎖脂肪酸投与群

にはパルミチン酸ナトリウム、オレイン酸ナトリウムと同時に 1mM 酢酸ナトリウムを投与し 24 時間培養した。脂質代謝や酸化ストレスなどに関連する因子の mRNA 発現量を real time PCR 法にて解析した。

4. 研究成果

新規 NASH 誘導モデルの作成

当初は GTG 投与 24 週間後に評価を行っていたが、個体によっては NASH 発症を認めなかったため、48 週間後まで期間を延長し評価した。GTG 投与後に HF/HSD を用いて飼育した群 (HF/HSD 群) は、GTG 投与後に通常食にて飼育した群 (NC 群) と比較して有意な体重増加、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR (空腹時血糖と血中インスリン値から算出) の上昇を認めた。肝臓の HE 染色では、HF/HSD 群において脂肪沈着が著明であり、風船様腫大や壊死を認めた。HF/HSD 群では、Azan 染色で青色に染色される線維化を認め、炎症マーカー (TNF、MCP1) や線維化マーカー (TGF β 1、Col1a1) の mRNA 発現の著明な上昇を認めた。また、これらの所見は NC 群では認められなかった。

以上より、GTG 投与後に HF/HSD を用いて飼育することによって、新規の NASH 誘導モデルマウスを作成することが出来た。しかし、作成に長期間を要したため短鎖脂肪酸の NASH への関与を検討する実験に使用するに至らなかった。作成期間を短縮し、安定して作成できる条件の検討が今後の課題である。

KK-Ay マウスにおける酢酸塩投与の肝臓への作用の検討

Ac 群、非投与群ともに肝臓に脂肪沈着を認めたが、明らかな NASH 発症は確認出来ず、過食による脂肪肝のモデルであると考えられた。酢酸塩投与群では非投与群と比較して明らかな体重の変化は認めず、肝重量も両群に有意な差は認めなかった。脂質代謝関連マーカー (SREBP1c、CD36、PPAR、ACOX) や酸化ストレスマーカー (iNOS、p47phox、gp91phox) の mRNA 発現量に明らかな差は認めなかった。

以上より、過食脂肪肝モデルマウスである KK-Ay マウスでは、酢酸塩経口投与による脂肪肝への明らかな影響は認めなかった。今後は、より通常のヒトの肥満に近い DIO マウス (高脂肪食により肥満を誘発) での評価や、酪酸などの他の短鎖脂肪酸を用いた評価を検討している。

HepG2 細胞における酢酸の直接的作用の検討

0.4mM パルミチン酸ナトリウムと 0.2mM オレイン酸ナトリウムに加えて酢酸塩を投与した群では酢酸塩非投与群と比較して、炎症マーカー (MCP-1) や酸化ストレスマーカー (gp91phox)、小胞体ストレスマーカー (CHOP、ATF4) の mRNA 発現量に明らかな差は認めなかった。ATGL の mRNA 発現量のみ酢酸投与群で有意に低下を認めたが、他の脂質代謝関連マーカー (SREBP1c、PPAR、ACOX、ACS2、HSL) の mRNA 発現量に明らかな差は認めなかった。

以上より、パルミチン酸とオレイン酸を投与した HepG2 細胞において、酢酸による直接的な作用は認めなかった。HepG2 はがん細胞由来であることから、通常の肝細胞とは代謝動態が異なる可能性も考えられる。今後は、primary hepatocytes を用いた評価も検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------