

平成21年5月1日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～ 2008
 課題番号：19590301
 研究課題名 (和文)：消化管および肝臓におけるアルコール依存的炎症性障害の
 分子機構の解明と予防法の開発
 研究課題名 (英文)：Elucidation of molecular mechanisms for alcohol-dependent
 inflammatory disorders in digestive tract and liver and
 development of their preventive methods
 研究代表者：青山 俊文 (AOYAMA TOSHIFUMI)
 信州大学・医学系研究科・教授
 研究者番号：50231105

研究成果の概要：

アルコール性肝障害は我が国において増加の一途を辿っているが、その病態や新規治療法に関する知見は少ない。我々はヒトでのアルコール性肝障害に類似した病像を呈する PPAR α ノックアウトマウスを用い、その病態を解析した。本マウスでは酸化ストレス産生亢進に伴い肝炎・肝線維化が生じていた。脂肪肝の治療薬であるポリエンフォスファチジルコリン (PPC) は、酸化ストレス産生亢進を緩和することにより本マウスでの肝炎を軽減させた。これらの結果はアルコール性肝障害における酸化ストレスの重要性とともに、PPC の新規治療薬としての可能性を示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：アルコール・酸化ストレス・レシチン・肝障害・炎症・NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

PPAR α ノックアウトマウスはヒトでのアルコール性肝障害と類似した病像を呈するが、その発生機構は不明である。

2. 研究の目的

(1) 本マウスを用いて、アルコール性肝障害の発症機構を炎症性サイトカイン、酸化ストレス、門脈内エンドトキシン血症などの観点から解析する。

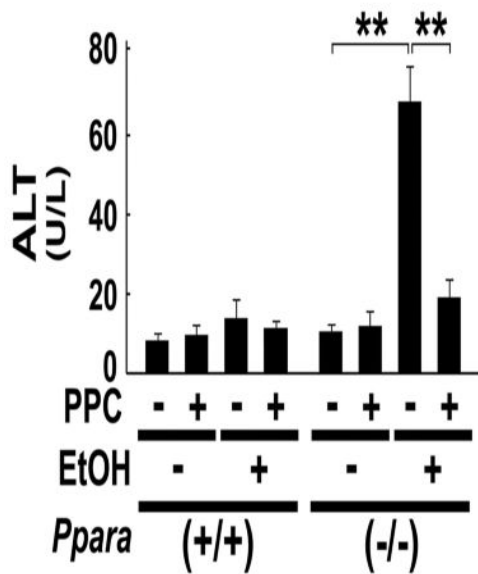
(2) 本マウスを用いて、アルコール性肝障害の予防法の開発に努める。

3. 研究の方法

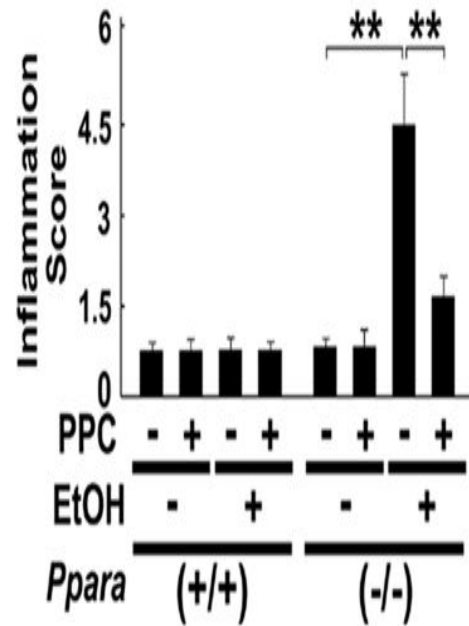
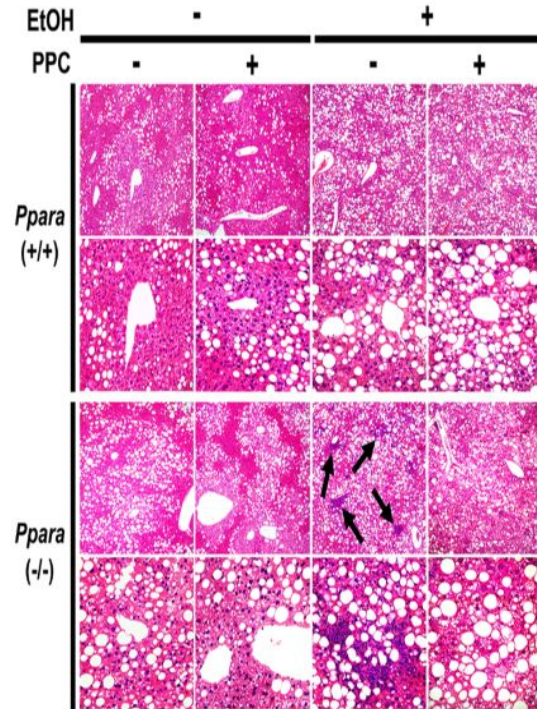
- (1) 8週齢・オスの野性型 (+/+)・PPAR α ノックアウト (-/-) マウスをコントロール群・4%エタノール投与群に分け、6ヶ月間飼育した。
- (2) 6ヶ月後に肝臓を採取し、病理組織学的検査に供した。また肝臓の遺伝子発現を定量PCR法、イムノブロット法にて解析した。
- (3) 細胞膜保護作用を有するとされるポリエンフォスファチジルコリン (PPC) を4%エタノール含有食に混合し、その効果を調べた。

4. 研究成果

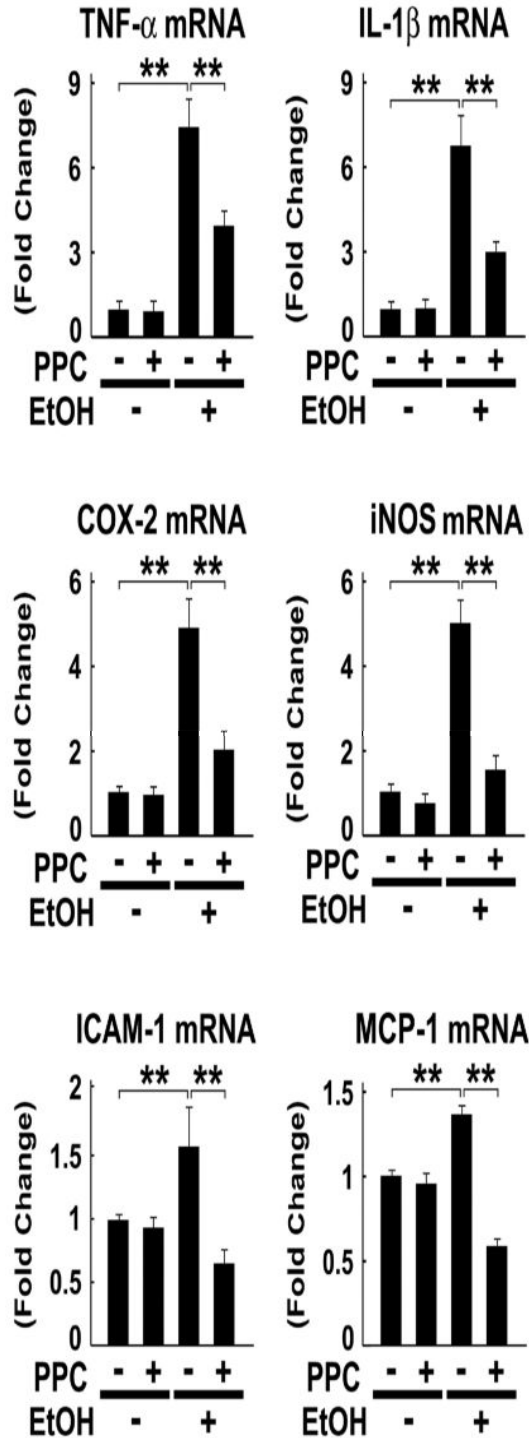
- (1) 野生型マウス (+/+) では4%エタノール含有食を6ヶ月間投与しても肝臓に大きな変化が見られなかった。一方、PPAR α ノックアウトマウス (-/-) では肝機能異常 (ALT 上昇) が見られ、組織学的にも肝炎、肝細胞傷害が認められた。PPCはこれらの変化を有意に抑制した。



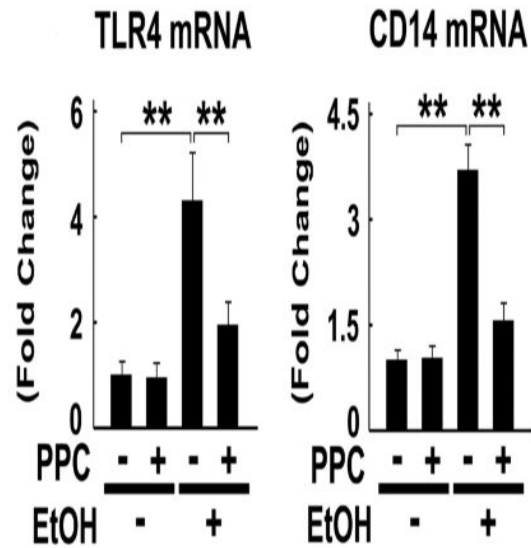
H E 染色、→は炎症細胞浸潤。



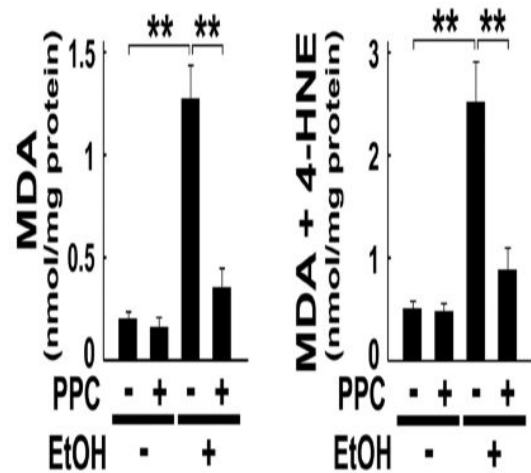
(2) エタノールを6ヶ月間投与した PPAR α ノックアウトマウスの肝臓では、炎症性サイトカイン・ケモカインの著明な発現増加が見られたが、PPCはその増加を有意に抑制した。



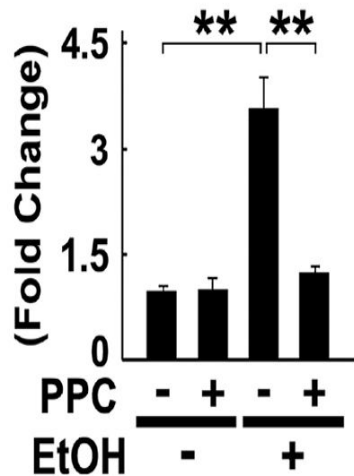
(3) エタノールを6ヶ月間投与した PPAR α ノックアウトマウスの肝臓では、TLR4 様受容体 4 とその関連分子 CD14 の著明な発現増加が見られたが、PPCはその増加を有意に抑制した。



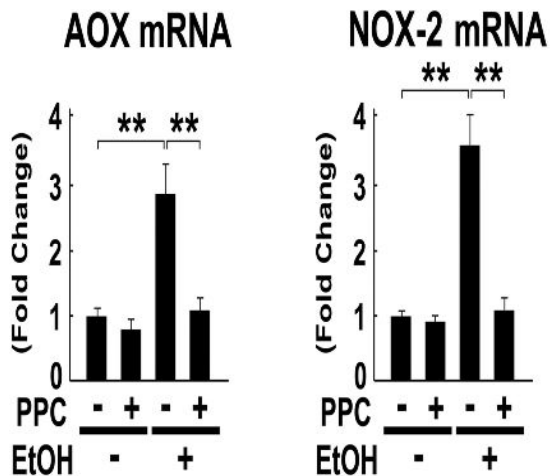
(4) エタノールを6ヶ月間投与した PPAR α ノックアウトマウスの肝臓では、酸化ストレスにより産生される過酸化脂質 (MDA、4-HNE) の増加が見られたが、PPCはその増加を有意に抑制した。



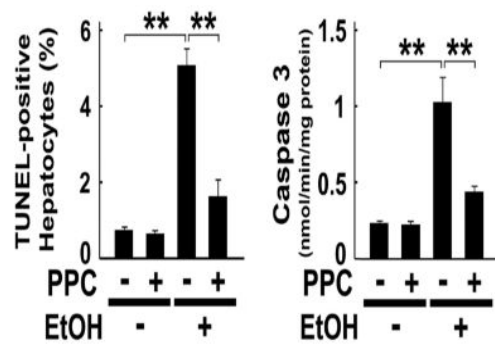
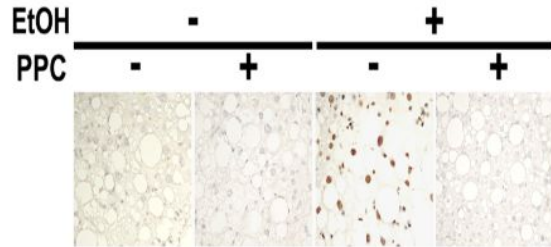
(5) 酸化ストレス産生・消去酵素の発現をさらに調べたところ、PPCによる過酸化脂質減少作用は、酸化ストレスを産生するサイトクローム P450 2E1、アシルCoA オキシダーゼ(AOX)、NADPH オキシダーゼ (NOX) の発現抑制に関連していることが判明した。これが PPC の肝庇護作用の中核であると考えられた。



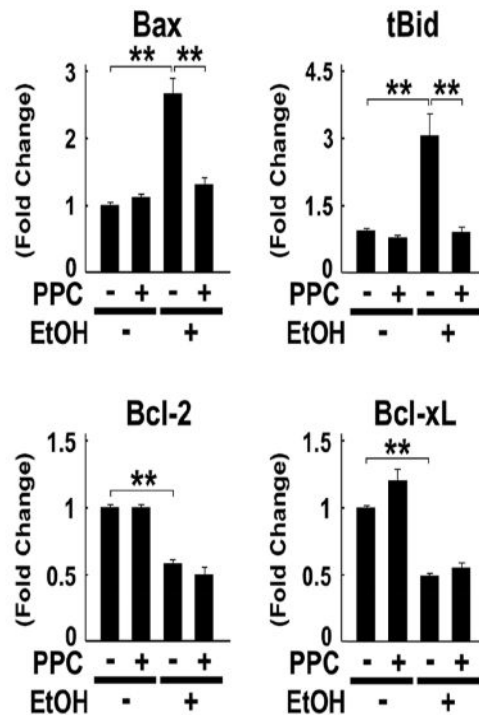
CYP2E1 の発現



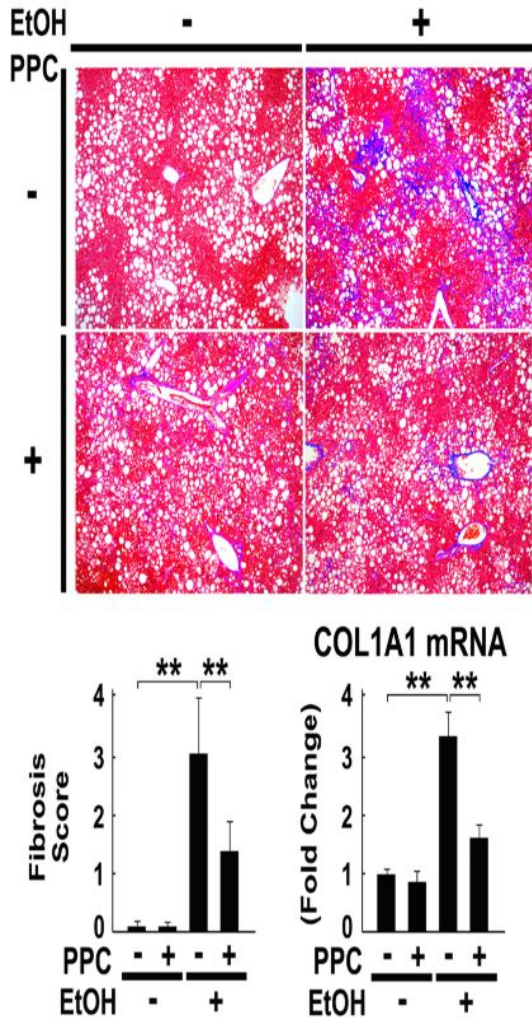
(6) PPC はアポトーシス促進因子である Bax, tBid の発現を抑制することにより、アルコール摂取による肝細胞アポトーシス、caspase 3 の上昇を抑制した。アポトーシス阻害因子である Bcl-2 や Bcl-xL の発現は増加させなかった。



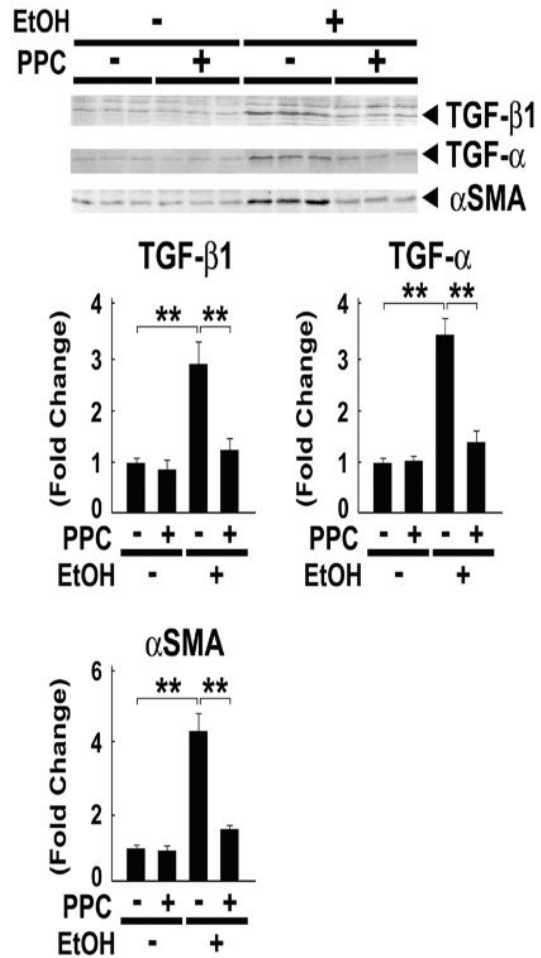
TUNEL 染色 (上段) と caspase 3 活性 TUNEL 染色ではエタノール投与にてアポトーシスに陥った肝細胞の核が茶色に染色されている。



(7) PPCはTGF- β 、 α 平滑筋アクチン(α SMA)の発現を抑制することにより、アルコール摂取による肝線維化、コラーゲン(COL1A1)の発現を抑制した。



上段はAzan-Mallory染色。
線維成分が青く染色される。



(8) アルコール性肝障害に対する PPC の効果は今までも報告が散見されるが、その詳細な分子機構は不明であった。本研究では、PPC の抗酸化剤としての分子薬理機構を初めて明らかにすることができた。

(9) PPC の抗酸化作用の分子機構は酸化ストレス産生系酵素の発現亢進の是正であり、既存の抗酸化剤であるビタミン E や S-アデノシルメチオニンのそれとは全く異なっていた。

(10) 現在、PPC は脂肪肝に対する保険適応がある。C 型慢性肝炎や非アルコール性脂肪肝もアルコール性肝炎と同様、酸化ストレスの関与が報告されている。本研究で得られた結果は、これら酸化ストレスに関連した慢性肝疾患に対する PPC の有用性を示唆するものであり、今後の臨床応用が期待される。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (1件)

①Okiyama W, Tanaka N, Nakajima T, Tanaka E, Kiyosawa K, Gonzalez F J, Aoyama T: Polyene phosphatidylcholine prevents alcoholic liver disease in PPAR α -null mice through attenuation of increases in oxidative stress. 査読あり J Hepatol (in press)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青山 俊文 (AOYAMA TOSHIFUMI)
信州大学・医学系研究科・教授
研究者番号：50231105

(2) 研究分担者

田中 直樹 (TANAKA NAOKI)
信州大学・医学系研究科・助教
研究者番号：80419374

(3) 連携研究者

なし