

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10583

研究課題名(和文) 脂肪細胞形質転換に起因した非アルコール性脂肪性肝炎発症と予防の分子メカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidation of Molecular Mechanisms of Nonalcoholic Steatohepatitis Development and Prevention Caused by Adipocyte Transformation

研究代表者

那須 民江 (NASU, Tamie)

中部大学・生命健康科学部・客員教授

研究者番号：10020794

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)：SHRラットを用いて、高脂肪(HFC)食による肝臓の脂肪蓄積が降圧剤の介入によって改善される機序を解析した。HFC2週目では肝臓に小脂肪滴が、8週目では大脂肪滴が観察されたが、これらの所見は降圧剤によって軽減した。プロテオーム解析により、降圧剤介入がHFC摂取との影響を抑制したのとして、Fatty acid-binding proteinのadipocyteがあげられた。降圧剤は検討した脂質代謝に関連する核内受容体の遺伝子発現を増大させたが、降圧剤はHFC食による核内受容体の変化に影響を与えなかった。降圧剤による脂肪蓄積予防効果は、肝細胞内ではなく、脂肪細胞に強く出ているのかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高血圧がNASHの誘導要因として挙げられている。この予防の一つとして、血圧を下げる 것이重要になる。今回の研究結果から、降圧剤のヒドラジンは脂質恒常性の因子である核内受容体のアゴニストであり、降圧作用のみならず脂質の改善にもつながるといふ新事実が発見された。またNASH進展に対しては肝細胞というより脂肪細胞の分化に関わる因子に働き、その作用を抑制することが有力となってきたが、機序の解明には更なる研究が望まれる。このように降圧剤という薬物が降圧作用のみならず脂肪細胞にも作用することが明らかとなり、健康教育に有用な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：SHR rats were used to analyze the mechanism by which fat accumulation in the liver caused by a high-fat (HFC) diet is ameliorated by antihypertensive intervention. Small fat droplets were observed in the liver at 2 weeks of HFC and large fat droplets at 8 weeks, but these findings were reduced by antihypertensive drugs. Proteomic analysis revealed that the fatty acid-binding protein adipocyte was the one that suppressed the effect of antihypertensive intervention on HFC intake. Antihypertensive drugs increased gene expression of nuclear receptors related to lipid metabolism examined, but antihypertensive drugs had no effect on changes in nuclear receptors induced by HFC diet. The effect of antihypertensive drugs in preventing lipid accumulation may be stronger in adipocytes than in hepatocytes.

研究分野：環境毒性学、健康科学

キーワード：高血圧 降圧剤 高脂肪/高コレステロール食 トリグリセライド コレステロール オイルレッド染色
プロテオーム 核内受容体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

我が国では食生活の欧米化と運動不足に伴いメタボリックシンドロームの肝臓表現型の非アルコール性脂肪性肝疾患/非アルコール性脂肪性肝炎 (NAFLD/NASH) が急増し、注目されている。検診では男性約 32%、女性約 9%が NAFL/NASH であり、これらのうち NASH は 20~30%を占める。諸外国では肥満者に多いが、わが国では非肥満 NASH も多い。疫学的には高コレステロール摂取や高血圧等がリスクとされている。性差がみられ、男性の方が女性より罹患率は高い。

著者はこれまでに 2 週間で肝炎と脂肪の蓄積、8 週間で大脂肪滴と線維化に進展し、14 週間では架橋を形成した線維化が観察される「NASH モデル動物」を開発した¹⁻⁷⁾。このモデル動物を用いて、炎症や線維症、性差のメカニズムを解析した。しかし、このモデル動物に高脂肪/高コレステロール食 (HFC) を使用しているのにも関わらず、その餌の脂肪が肝臓の脂肪蓄積にどのように関わっているか、解明してこなかった。

NASH 進展過程では脂肪 (脂肪酸やコレステロール) を大量摂取することにより、肝臓に余剰エネルギーを脂肪滴の形で貯蔵する。早期には小脂肪滴 (脂肪細胞の分化) が蓄積し、やがて大脂肪滴 (脂肪細胞の肥大化) に進展し、酸化ストレスを蓄積し、炎症や線維症を発症する。これに伴い、TNF α やアディポカインが産生し、インスリンの情報伝達を阻害してインスリン抵抗性を増して NASH 進展に繋がる。

我々が開発したモデル動物は高血圧動物である。降圧剤を介入して、肝障害進展がどのように抑えられるか興味がある。Yuan らは末梢細動脈の血管平滑筋に直接作用し、血管を拡張することが主作用であるヒドララジンを用いて、線維症の抑制作用を検討した。その結果、この降圧剤は線維化を増殖する因子を阻害し、HFC による線維症を抑制することを報告している⁸⁾。しかしこの降圧剤の脂肪蓄積の抑制のメカニズムについては検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、NASH 進展の脂肪細胞の小脂肪滴、大脂肪滴への分化のメカニズムと降圧剤ヒドララジンの抑制効果について、病理的变化、プロテオーム解析および脂質の恒常性に関わる核内受容体等の 3 つの側面から説明する。

3. 研究の方法

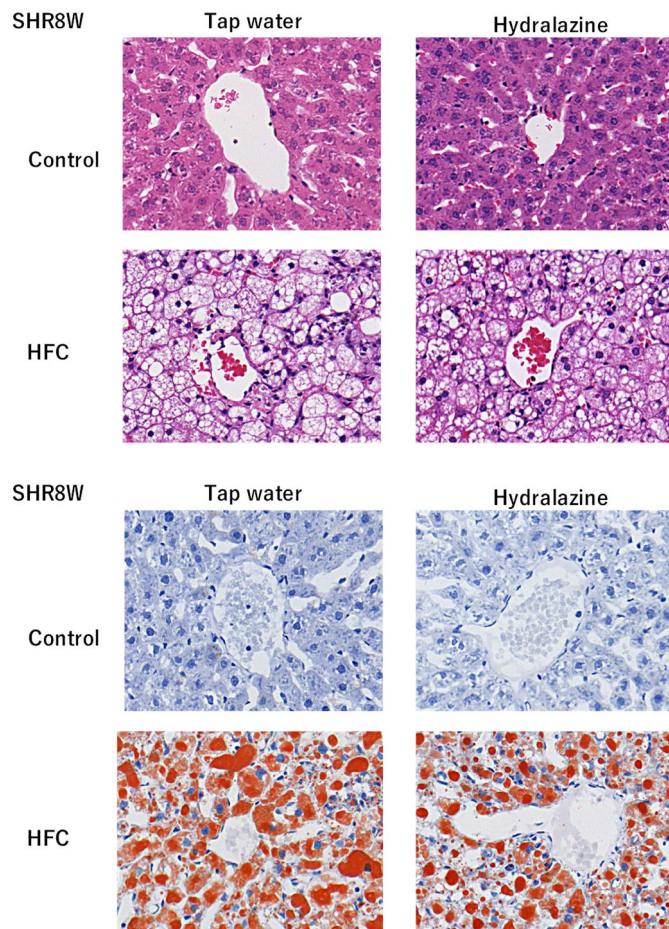
SHR 雄ラットを購入し、コントロール群、コントロール+ヒドララジン群、HFC 群、HFC + ヒドララジン群の 4 群に分けた。ヒドララジンは HFC 食摂取開始の 2 週間前から水に溶かして飲料水として投与し、ある程度血圧を下げておいた⁸⁾。ヒドララジンの投与量は飲水量から算出した。HFC 食摂取開始から 2 週目と 8 週目に各群 6 匹のラットを麻酔下にて解剖し、血液と肝臓を採取した。血液は血清を分離して、使用時まで-80°Cで保存した。肝臓の一部は 4%パラホルムアルデヒド溶液にて固定した。残りの肝臓は-80°Cで使用時まで保存した。8 週目の解剖時の血圧は、コントロール群が 220mmHg に対し、ヒドララジン群は 160mmHg まで下がっていた。

H&E 染色とオイルレッド染色は専門業者に委託した。

凍結肝臓サンプルを RIPA Buffer を用いてホモジネートを作成した。100 μ g protein/100 μ L のサンプルから、アルキル化・酵素処理などを行い精製し、0.1%トリフルオロ酢酸溶液に溶解させ、nano LC-MS/MS Orbitrap Fusion で測定した。測定後、各群 4 サンプルのうち大きく外れたデータを除き、各群 3 匹でプロテオーム解析を行った。

肝臓の全 RNA を凍結肝臓組織から抽出した。RNA を cDNA に逆転写した。全ての mRNA レベルは、サーモフィッシャークオンタムスタジオ 3 リアルタイム PCR 装置上の SYBR qPCR ミックスを用いたリアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) によって決定した。mRNA レベルを 18S リボソーム RNA (18S rRNA) レベルに標準化し、対照食を給餌したラットの mRNA レベルに対する比率として表した。

図 1 HFC8 週間後のラット肝臓の H&E 染色 (上) とオイルレッド染色 (下)



4. 研究成果

すでに報告した事実に一致して、HFC2週目では肝臓に小脂肪滴が、8週目では大脂肪滴やバルーニング及び繊維症が観察された。しかしこれらの所見は降圧剤によって軽減した。オイルレッド染色法で比較すると、HFC2週間投与群では鮮紅色の小脂肪滴が観察されたが、降圧剤はこの小脂肪滴を減少させた。一方8週目のコントロール食ではこの拡大では分かりにくい、ヒドララジンの赤い脂肪滴はヒドララジン群では減少していた。コントロール食群では肝臓のトリグリセライドの量がヒドララジン群より低下していたので⁷⁾、この生化学的分析結果と一致する。HFC群では薄い赤色の比較的大きな脂肪滴として染色されたが、HFC + 降圧剤群は鮮紅色の比較的小さな脂肪滴として染色された (図1)。オイルレッドは極性の低い中性脂肪やコレステロールを染色するため、既報論文⁸⁾ではヒドララジン投与が肝臓のトリグリセライドを減少させているので、オイルレッド染色の結果はヒドララジンによるトリグリセライドの減

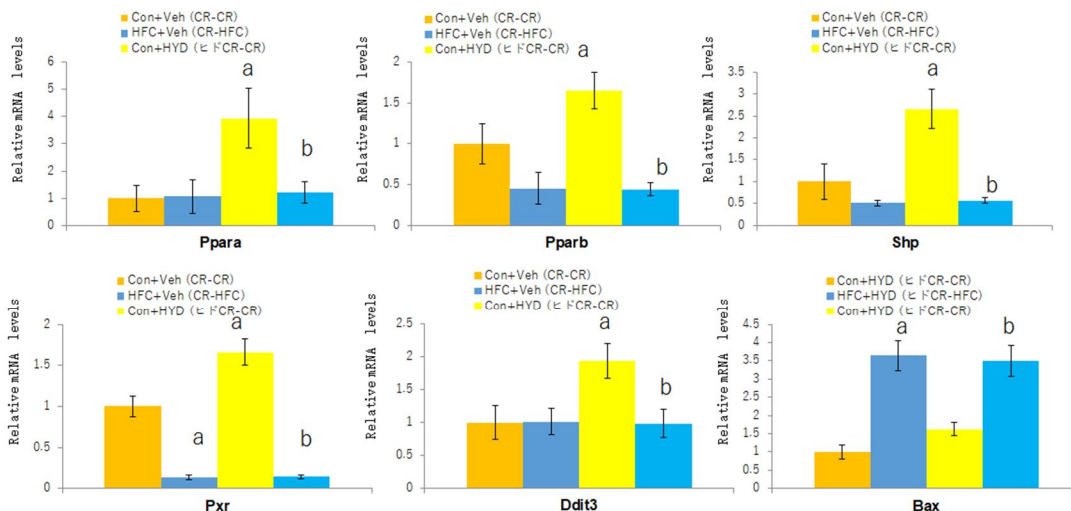


図2 脂質関連遺伝子発現

橙、コントロール食；濃い青、HFC食；黄、コントロール食+ヒドララジン；薄い青、HFC食+ヒドララジン
a,kコントロール食との間に有意差あり；b,コントロール食+ヒドララジンとの間に有意差あり

少を示していると考えられる。このように降圧剤は脂質肥大化に関わり、HFCによるNASHの進展を軽減させる可能性がある。

プロテオーム解析の結果を主成分分析から各群の傾向を見たところ、HFC食のNASH進展への影響に対する降圧剤効果は小さかった。降圧剤介入効果が見られたものとして、マクロファージや線維芽細胞で合成が行われる α 2-マクログロブリンが(0.12倍)、Collagen alpha-1(I) chain(0.38倍)、Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 (PLOD2)と呼ばれるプロコラーゲン生成に関与するマーカー(0.01倍未満)が挙げられた。これらは降圧剤による肝線維化抑制効果の先行研究の結果⁸⁾と一致していた。また、Wnt/GSK-3 β / β -cateninの炎症シグナル系を軽減するCdc42-interacting protein 4 蛋白発現がHFC摂取によりコントロール群に比べ0.01未満と抑制されていたが、降圧剤投与によりその抑制が解除されていた。脂質合成関連については、Fatty acid synthaseはHFCにより0.33倍、降圧剤では0.35倍と降圧剤の影響は認められなかった。一方、Fatty acid-binding proteinのadipocyteでは、HFCにより62倍に増加したものが降圧剤により15.8倍に抑制されていた。同epidermalもHFCにより9.1倍、降圧剤投与群では8倍増加、同liverではHFCにより0.2倍、降圧剤では0.31倍と低下を示したことから、降圧剤による予防効果は、肝細胞内ではなく脂肪細胞に強く出ていると考えられた。

降圧剤ヒドララジンは脂質の恒常性に関わるPparやaPparb、コレステロールの代謝(胆汁酸合成)に関わるShp、胆汁酸の排泄に関わるPxr、の遺伝子発現を増大させた。一方、HFC食はコレステロールの調節因子LXR α とアポトーシス調節因子のBaxの発現量を増大させた。しかし、胆汁酸の排泄に関わるPxrの発現は低下させた。しかし、降圧剤ヒドララジンはHFC食によるLxraやBaxの発現増大やPxrの低下に影響を与えることが無かった。これらの結果は、降圧剤はPparaを活性化して高血圧時の脂質(特にトリグリセライド)を軽減するが、高脂肪食(HFC)でもたらされる降圧剤の脂質の改善は軽微であり、高脂肪食でもたらされるLxra、PxrやBaxの遺伝子発現に変化には影響を与えることがないことを示す。ヒドララジンがPPAR α のアゴニストであることが明らかとなった。

これらの研究を通じて、降圧剤ヒドララジンは降圧作用のみならず、HFC食でもたらされる脂肪の肥大化を改善するが、その作用は肝細胞より脂肪細胞の肥大化に関連する

遺伝子に起因するかもしれない。

<引用文献>

Kitamori K, Naito H, Tamada H, Kobayashi M, Miyazawa D, Yasui Y, Sonoda K, Tsuchikura S, Yasui N, Ikeda K, Moriya T, Yamori Y, Nakajima T. Development of novel rat model for high-fat and high-cholesterol diet-induced steatohepatitis and severe fibrosis progression in SHRSP5/Dmcr. *Environ Health Prev Med* 17(3):173-82, 2012

Jia X, Naito H, Yetti H, Tamada H, Kitamori K, Hayashi Y, Yamagishi N, Wang D, Yanagiba Y, Ito Y, Wang J, Tanaka N, Ikeda K, Yamori Y, Nakajima T. The modulation of hepatic adenosine triphosphate and inflammation by eicosapentaenoic acid during severe fibrotic progression in the SHRSP5/Dmcr rat model. *J. Life Sci.* 90(23-24):934, 2012

Jia X, Naito H, Yetti H, Tamada H, Kitamori K, Hayashi Y, Wang D, Yanagiba Y, Wang J, Ikeda K, Yamori Y, Nakajima T. Dysregulated bile acid synthesis, metabolism and excretion in a high fat-cholesterol diet-induced fibrotic steatohepatitis in rats. *Dig Dis Sci* 58(8):2212-22, 2013

Yetti H, Naito H, Jia X, Shindo M, Taki H, Tamada H, Kitamori K, Hayashi Y, Ikeda K, Yamori Y, Nakajima T. High-fat-cholesterol diet mainly induced necrosis in fibrotic steatohepatitis rat by suppressing caspase activity. *Life Sci* 93(18-19):673-80, 2013

Yetti H, Naito H, Yuan Y, Jia X, Hayashi Y, Tamada H, Kitamori K, Ikeda K, Yamori Y, Nakajima T. Bile acid detoxifying enzymes limit susceptibility to liver fibrosis in female SHRSP5/Dmcr rats fed with a high-fat-cholesterol diet. *PLoS One* 13(2):e0192863, 2018

Naito H, Yoshikawa-Bando Y, Yuan Y, Hashimoto S, Kitamori K, Yatsuya H, Nakajima T. High-fat and high-cholesterol diet decreases phosphorylated inositol-requiring kinase-1 and inhibits autophagy process in rat liver. *Sci Rep* 9(1):12514, 2019

Yuan Y, Naito H, Jia X, Kitamori K, Nakajima T. Combination of Hypertension Along with a High Fat and Cholesterol Diet Induces Severe Hepatic Inflammation in Rats via a Signaling Network Comprising NF- κ B, MAPK, and Nrf2 Pathways. *Nutrients* 9(9):1018, 2017

Yuan Y, Naito H, Kitamori K, Hashimoto S, Asano T, Nakajima T. The antihypertensive agent hydralazine reduced extracellular matrix synthesis and liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis exacerbated by hypertension. *PLoS One* 15(12):e0243846, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 2件）

1. 著者名 橋本 沙幸, 内藤 久雄, 那須 民江	4. 巻 4(14)
2. 論文標題 非アルコール性脂肪性肝炎の予防・治療に対する脂質と血圧管理の重要性について	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 プレジジョンメディカル	6. 最初と最後の頁 91-96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 橋本 沙幸, 内藤 久雄, 那須 民江	4. 巻 47(1)
2. 論文標題 非アルコール性脂肪性肝炎に対する食事介入と降圧剤投与の有効性とメカニズム	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 メディカル・サイエンス・ダイジェスト	6. 最初と最後の頁 64-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Asano Tomomi, Taki Kentaro, Kitamori Kazuya, Naito Hisao, Nakajima Tamie, Tsuchihashi Hitoshi, Ishii Akira, Zaito Kei.	4. 巻 6
2. 論文標題 One-Pot Extraction and Quantification Method for Bile Acids in the Rat Liver by Capillary Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 8588 ~ 8597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.1c00403	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 -

1. 著者名 Yuan Yuan, Naito Hisao, Kitamori Kazuya, Hashimoto Sayuki, Asano Tomomi, Nakajima Tamie	4. 巻 15
2. 論文標題 The antihypertensive agent hydralazine reduced extracellular matrix synthesis and liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis exacerbated by hypertension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0243846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0243846	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 Naito Hisao, Yoshikawa-Bando Yuki, Yuan Yuan, Hashimoto Sayuki, Kitamori Kazuya, Yatsuya Hiroshi, Nakajima Tamie	4. 巻 9
2. 論文標題 High-fat and high-cholesterol diet decreases phosphorylated inositol-requiring kinase-1 and inhibits autophagy process in rat liver	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12514 ~ 12522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48973-w	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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 内藤 久雄, 山口 央輝, 橋本 沙幸, 浅野 友美, 北森 一哉, 那須 民江
2. 発表標題 プロテオーム解析を用いた降圧剤による肝炎・肝線維化抑制因子の探索
3. 学会等名 第92回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内藤 久雄, 山口 央輝, 北森 一哉, 那須 民江
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎モデルラットを用いたプロテオーム解析
3. 学会等名 第94回日本産業衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内藤 久雄, 袁 媛, 北森 一哉, 橋本 沙幸, 浅野 友美, 那須 民江
2. 発表標題 高脂肪食摂取SHRにおける降圧剤投与と肝線維化進展抑制効果
3. 学会等名 第56回高血圧関連疾患モデル学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内藤 久雄, 北森 一哉, 橋本 沙幸, 浅野 友美, 八谷 寛, 那須 民江
2. 発表標題 ウルソデオキシコール酸添加による高脂肪食誘導性肝炎・線維化の軽減作用
3. 学会等名 第93回日本産業衛生学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内藤 久雄, 袁 媛, 北森 一哉, 橋本 沙幸, 浅野 友美, 八谷 寛, 那須 民江
2. 発表標題 降圧剤ヒドララジンは高脂肪食摂取した高血圧ラットの肝線維化を抑制する
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2020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	北森 一哉 (KITAMORI Kazuya) (80387597)	金城学院大学・生活環境学部・教授 (33905)	
研究分担者	内藤 久雄 (NAITO Hisao) (90547556)	金城学院大学・生活環境学部・教授 (33905)	

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