

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17418

研究課題名（和文）NAFLDとサルコペニアの病態関連メカニズムと治療標的分子の探索

研究課題名（英文）Pathomechanisms of NAFLD and Sarcopenia: Exploring Therapeutic Target Molecules

研究代表者

長谷部 拓夢（Hasebe, Takumu）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：10596282

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）：本研究では、食餌誘導性非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）マウスモデルにより、肝臓と骨格筋の病態変化の相関を調べることを目的とした。加齢性サルコペニアの関与による骨格筋変化をみるため、実験には若齢マウスと高齢マウスを用いた。高齢マウスにおいては経時的な筋力の増加が高脂肪食摂餌によって乏しくなった。いずれの群でも高脂肪食により肝炎が惹起されたが、肝炎に伴う線維化は年齢に依存せず生じた。高齢マウスでは高脂肪食負荷により病理学的な筋組織の変性を認め、筋肉は年齢により肥満・脂肪肝の影響をより強く受けることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により肥満・脂肪肝においては年齢によらず肝線維化を来すが、筋肉の変化は高齢者において、より来しやすくなることが示唆された。NAFLDの病態進展は未解明な点が多いが、年齢によらず長期間NAFLDの病態を呈していることが肝線維化悪化に寄与していると考えられた。NAFLDと筋肉の分子生物学的連関は十分捉えられていないが、年齢や肥満・脂肪肝などが複合的に作用していることが示唆された。この成果により、NAFLD病態メカニズムの一部を明らかにできた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate the correlation between hepatic and skeletal muscle pathological alterations in a mouse model of diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). To examine the impact of age-related sarcopenia on skeletal muscle changes, both young and aged mice were included in the experiment.

In the aged mice, the administration of a high-fat diet resulted in a diminished rate of muscle strength improvement over time. It was observed that the high-fat diet induced hepatitis in both the young and aged groups. However, the fibrosis associated with hepatitis was found to be unrelated to age. Notably, the aged mice exhibited pathological degeneration of muscle tissue due to the high-fat diet, indicating that the effects of obesity and fatty liver on muscle are more pronounced with advancing age.

研究分野：肝臓病学

キーワード：NAFLD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は肥満人口の増加やウイルス性肝疾患制御の発展により、肝疾患診療の中で占める患者人口が増加している。NAFLD の治療は肝硬変・肝線維化の進展予防が重要であり、病態解明と早期の治療介入が必要になる。

NAFLD は糖尿病、腸内細菌叢の変化などの環境要因と PNPLA3 遺伝子多型など遺伝的要因が複雑に関連して病態進展をもたらすが、特定の治療標的が未だ同定されていない。それゆえ NAFLD の治療は食事・運動療法を中心とした生活習慣の改善が唯一有効な治療である。

一方、骨格筋は運動器として機能するだけでなく、グルコースやアミノ酸・アンモニアに関わる代謝臓器、マイオカイン分泌に関わる内分泌臓器として肝臓と密接に関連することが指摘されている (肝・筋連関)。骨格筋減少症として定義されるサルコペニアは肝癌術後の予後因子となること、肝硬変の予後にサルコペニア進展が有意な予後不良因子であることが報告されている。肝硬変などの肝疾患進展に伴うサルコペニアの発生は、グリコーゲン貯蔵量の減少による栄養障害や分岐鎖アミノ酸・Insulin-like growth factor (IGF) の減少、テストステロン低下、慢性炎症、アンモニアの増加などが原因として考えられる。

臨床的に NAFLD とサルコペニアの関連は明らかにされているが、その詳細な分子機構は不明である。しかし、骨格筋は糖代謝の重要な臓器であり、NAFLD の病態進展にインスリン抵抗性の悪化が関わることから、サルコペニアがエネルギー代謝の異常を介して NAFLD の病態進展に関与することが推察される。

2. 研究の目的

NAFLD に対する薬物治療の効果は限定的で、食事・運動療法以上に効果が得られる治療薬はない。一方、運動療法は特にサルコペニアが伴う場合は継続が容易でない。そこで、本研究では「NAFLD において肝と骨格筋で起こるどのような相互作用が病態進展に関与するか?」という疑問について探求することを目的とした。

NAFLD と骨格筋の病態連関が明らかになることで、骨格筋に介入することで肝疾患を治療するという概念をもたらし、肝疾患に対する治療の幅を広げることが期待できると考えた。

3. 研究の方法

NAFLD と筋肉の変化を確認するため、加齢性の筋力低下について注目した。加齢に食事性の因子が加わったことによる影響を評価するため、マウスを若年群と加齢群に分けて実験を遂行した。

1) NAFLD マウスモデルの作成

NAFLD マウスモデルとして 14 週間の高果糖高脂肪食 (HFHFD) 負荷を行った。このマウスは食餌負荷開始週齢を 6 週齢 (若年群; Young mice) と 30 週齢 (高齢群; Aged mice) に設定し、各群 5 匹を対象とした。14 週間の食餌負荷中に各マウスに対して 2 週間に 1 回の握力測定と体重測定を実施した。食餌負荷終了時点でマウスの血清、肝臓、大腿の筋肉を採取し、続く実験に用いた。

2) NAFLD マウス筋肉の機能的変化の評価

筋肉の機能的変化を検討するため、マウス飼育中の握力変化について、握力計を用いて検討した。握力計にはスマート型ラット・マウス用握力測定装置 MK-380Si を用いて、各測定のタイミングで 1 匹あたり 10 回の測定を平均し、その時点の握力とした。

3) 肝臓と筋肉の病態変化の評価

NAFLD モデルマウスの肝病態変化の評価を行うため、血清 ALT により肝臓の炎症を評価した。肝組織の炎症や脂肪化を HE 染色の炎症細胞浸潤像や脂肪化領域の割合を測定することにより評価した。肝線維化は Sirius red 染色による線維化領域を測定することで評価した。筋肉の病理組織学的変化は、ヘマトキシリン・エオジン染色により評価した。

4. 研究成果

1) 加齢と食事性脂肪化により起こる筋力の変化

14 週間の HFHFD 負荷により、通常食と比較してマウスは肥満になった。経過中の握力の推移を開始時点からの変動で示す (図 1)。Young mice では経過に伴って筋力の増加が見られ、筋力は食事内容によって差は出なかった。これに対して Aged mice では成長に伴って筋力が増強するものの、HFHFD 摂餌群ではその増強がわずかに留まった。この結果から、高齢マウスにおいては HFHFD による肥満・脂肪肝が筋力に影響を及ぼすことが示唆された。

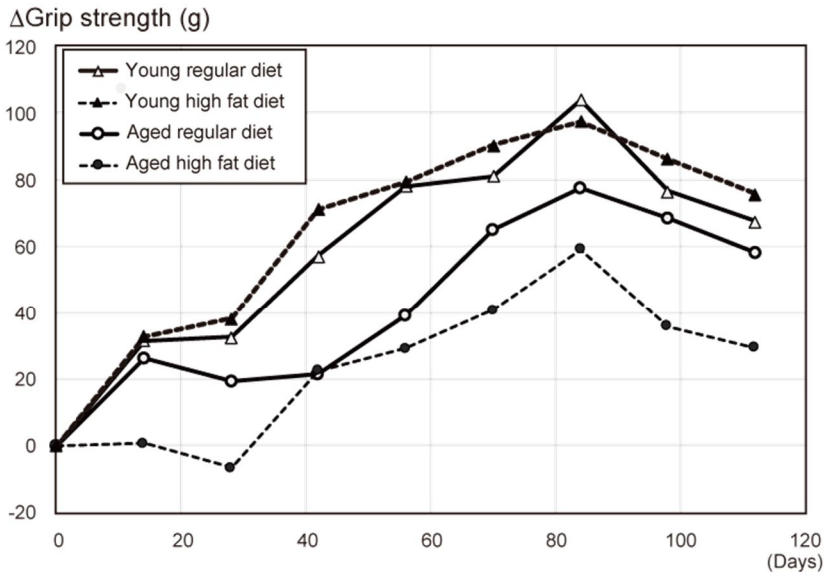


図 1. マウス握力の変化

2) マウスの肝臓の肝炎・脂肪化・肝線維化の変化

マウスの肝組織で HE 染色像と Sirius red 染色像の代表部分と脂肪化領域の割合 (Lipidized area) および線維化領域の面積 (Fibrotic area)、血清 ALT の結果を提示する (図 2)。Aged mice の通常食群を 1、HFHFD 群を 2、Young mice の通常食群を 3、HFHFD 群を 4 とした。いずれの群においても炎症細胞浸潤はわずかに留まった。HFHFD 負荷マウスでは肝組織の脂肪化が見られており、2 では大滴性脂肪化を呈しているが、4 では小滴性脂肪化を呈した。Sirius red 染色で赤く染色される肝内線維化は HFHFD 負荷群において見られるものの軽微な pericellular fibrosis に留まり、肝硬変に至るような小葉間架橋像といった高度の線維化像は呈さなかった。Aged mice では通常食群(1)でも軽度の pericellular fibrosis を呈しており、加齢性肝線維化の存在が示唆された。

脂肪化領域は大球性脂肪化を反映して 2 で強く認められた。線維化領域は Aged mice と同様に Young mice においても顕著に見られ、年齢によって脂肪肝から受ける影響は少ないことが示唆された。

マウス血清 ALT による肝炎の評価では、Aged mice において HFHFD 負荷が顕著に肝炎を惹起しており、Young mice においても通常食群と比較して有意に炎症が起きていることがわかった。

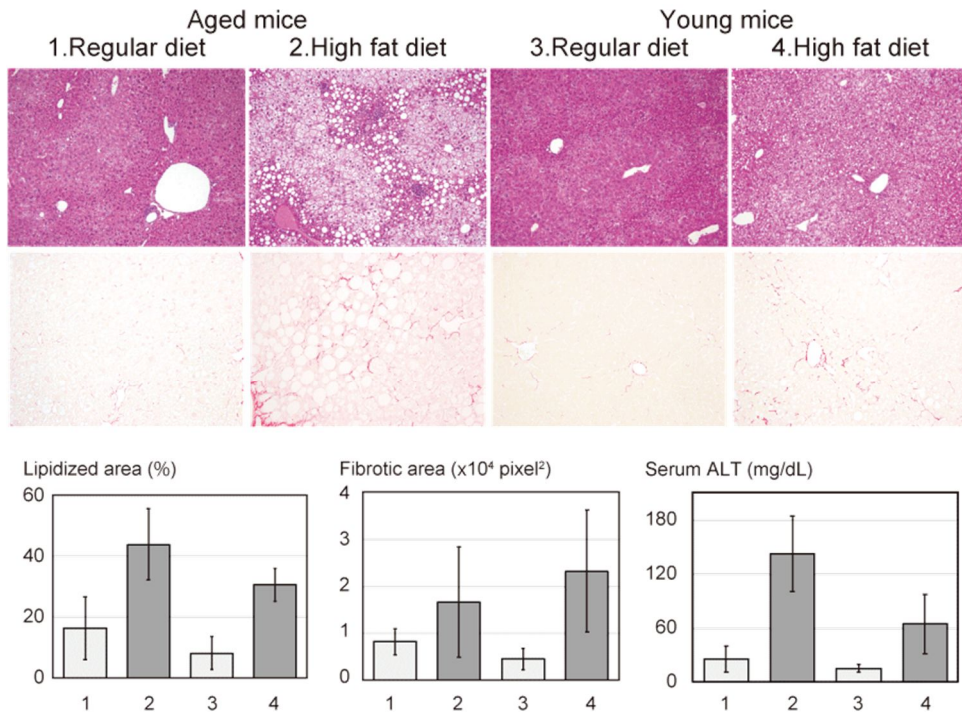


図 2. マウス肝の病態変化

3) マウスの筋肉に起こる変化

筋組織の HE 染色像の代表部分を提示する (図 3)。筋組織は通常食群において Aged mice と Young mice に明らかな差は認められなかった。Young mice の HFHFD 負荷群においても有意な変化は見られていない。これに対して Aged mice の HFHFD 負荷群では筋組織内に空胞変性が認められた (矢印)。成果 1) で示したように、Aged mice の HFHFD 負荷群では筋力が増えにくいという機能的な問題も合わせて考えると、高齢マウスにおいては HFHFD による肥満・脂肪肝の影響をより強く受ける根拠になっていることが示唆された。

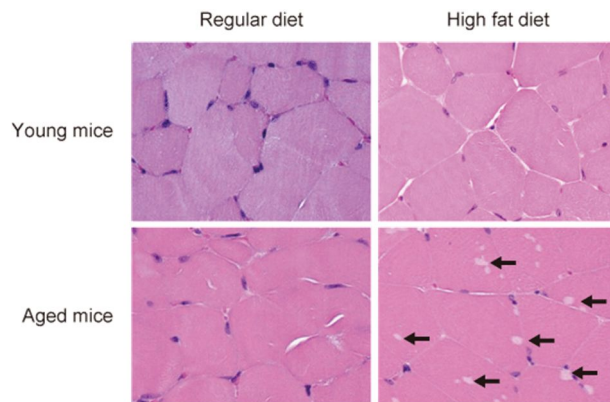


図 3. マウス筋肉の組織学的変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Sawada Koji, Saitho Yoshinori, Hayashi Hidemi, Hasebe Takumu, Nakajima Shunsuke, Ikuta Katsuya, Fujiya Mikihiro, Okumura Toshikatsu	4. 巻 3
2. 論文標題 Skeletal muscle mass is associated with toxicity, treatment tolerability, and additional or subsequent therapies in patients with hepatocellular carcinoma receiving sorafenib treatment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 329 ~ 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12167	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 Sawada Koji, Hayashi Hidemi, Nakajima Shunsuke, Hasebe Takumu, Fujiya Mikihiro, Okumura Toshikatsu	4. 巻 35
2. 論文標題 Non alcoholic fatty liver disease is a potential risk factor for liver injury caused by immune checkpoint inhibitor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1042 ~ 1048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14889	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takumu Hasebe
2. 発表標題 Exploring the causes of iron overload in a diet-induced mouse model of fatty liver disease.
3. 学会等名 UEG week virtual 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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