

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：34513

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K20197

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎に対する栄養管理と降圧剤投与の有効性とメカニズム

研究課題名(英文) Effects and Mechanisms of Nutrition Management and Antihypertensive drug administration for Nonalcoholic Steatohepatitis

研究代表者

橋本 沙幸 (Hashimoto, Sayuki)

神戸松蔭女子学院大学・人間科学部・講師

研究者番号：90707530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：病理評価では、バルサルタン群は中心静脈域の脂肪滴が小さくなり、ヒドララジン群は類洞が見られ、中心静脈付近から細胞が回復した。門脈域では、バルサルタン群は正常細胞が多く確認され、ヒドララジン群は脂肪滴が多く見られた。脂質染色では、コントロール群で繊維化が密ではない部位において大脂肪滴がみられ、密である部位は回復しなかった。バルサルタン群は、全体的に脂質が減少したが中心静脈付近では脂質が残存し、ヒドララジン群では中心静脈付近のみ脂質が減少した。ウェスタンブロッティング結果も含めて検討した結果、脂質の減少についてはバルサルタンの方が有効であり、繊維化改善にはヒドララジンの方が有効であると示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでNASHの治療は脂質とコレステロールの摂取制限を主体とした栄養管理が第一選択であったが、栄養管理だけでは肝臓の繊維化の軽減や完全な改善は困難であった。動物モデルを用いた研究より高血圧がNASH進展に関わっている可能性があるということから、NASHの予防・治療に降圧剤の投与を選択するという新たな視点を与えることが出来る。

研究成果の概要(英文)：Pathological evaluation showed smaller fat droplets in the central venous region in the valsartan group and sinusoids in the hydralazine group, with cells recovered from the central venous region. In the portal vein area, the valsartan group showed more normal cells, while the hydralazine group showed more fat droplets. Lipid staining showed large fat droplets in areas of less dense fibrosis in the control group, while areas of dense fibrosis did not recover. In the valsartan group, lipid was reduced overall, but remained near the central vein, while in the hydralazine group, lipid was reduced only near the central vein. The results, including Western blot results, suggest that valsartan is more effective in reducing lipids, while hydralazine is more effective in improving fibrosis.

研究分野：栄養学および健康科学関連

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎 繊維化 降圧剤投与 食事療法 SHRSP5/Dmcr

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は脂肪肝、肝炎、線維化、肝硬変へと進展する疾患であり、近年、肥満やメタボリックシンドロームの患者数増加に伴い有病率の増加が懸念されている。また、ヒト NASH 患者は脂質とコレステロールを過剰に摂取していることが示されており、治療の第一選択は脂質とコレステロールの制限を主体とした食事療法とされている。そこで、我々の研究室では高脂肪・高コレステロール飼料 (HFC 食) を与えることで NASH 病変を段階的に再現できる NASH モデルラット (SHRSP5/Dmcr) を開発した。そして、線維化を発症させた SHRSP5/Dmcr を用いて脂質とコレステロールを制限した食事療法を行うと、肝臓への脂肪蓄積および血液検査値 (ALT) は改善され、食事療法の有用性が示された。しかし、線維化の軽減という面では不十分であった。この研究での問題点は、すでに形成された線維化は食事療法だけで改善することが出来ないことであった。

また、疫学的に NAFLD では高血圧の有病率が高く、高血圧は NAFLD/NASH の独立した危険因子とされている。しかし、組織学的に診断された NASH と高血圧の関連に言及したエビデンスレベルの高い報告は少ないのが現状である。また、SHRSP5/Dmcr の開発途中で血圧と NASH 病変に関連が見られる可能性が考えられ、開発過程を確認すると、正常血圧ラット (WKY) では軽度の肝炎を誘導するのみであるが、高血圧ラット (SHR、SHRSP、SHRSP5/Dmcr) では肝炎や重度の線維化を誘導することが明らかとされた。そのため、「血圧が NASH の発症に関与している」可能性があり、高血圧の治療すなわち降圧剤の投与が線維化改善に影響を与えるのではないかと考えた。

そこで、食事療法を行うことによって脂肪蓄積の改善を狙い、降圧剤投与によって肝炎や線維化を改善出来るのではないかと予想した。さらに、食事療法と降圧剤投与を同時に行うことで、それぞれの治療を単独で行うよりも治療効果が期待できるのではないかと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

- (1) 食事療法と降圧剤投与を同時に行うことで、これまで困難であった NASH の線維化改善を目指す。
- (2) 作用機序の異なる降圧剤を 2 種類用い (アンギオテンシン II レセプター阻害剤および血管拡張性降圧剤)、それぞれの治療効果を明らかにする。
- (3) 食事介入と降圧剤投与による NASH 改善の分子メカニズムを解明し、遅々としている NASH の予防・治療方法の確立に貢献する。

3. 研究の方法

NASH モデルラット SHRSP5/Dmcr に 10 週間、普通飼料 (SP 食) を与えて飼育し、その後 HFC 食に切り替えた。これまでの研究より、HFC 食を与えて 8 週間で肝臓に線維化を発症することが明らかとされているため、この時点で 3 群に分けた。食事介入群 (コントロール群) は HFC 食から SP 食に戻し、食事介入 + バルサルタン投与群 (バルサルタン群) は、HFC 食から SP 食に戻すとともに、SP 食にバルサルタンを混ぜて摂餌させた。食事介入 + ヒドララジン投与群 (ヒドララジン群) は、HFC 食から SP 食に戻し、飲料水にヒドララジンを混ぜて与えた。その後、3 群共に 8 週間飼育し、解剖した。また、摂餌量、体重、血圧は毎週測定し、解剖時には血液と肝臓をサンプルとして採取した。

(1) 血清を用いた生化学検査

栄養状態の指標として総タンパク、アルブミン、グルコース、総コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸を測定した。肝障害の指標として、AST、ALT、 γ -GTP を測定した。さらに、ELISA キットを用いて、炎症性サイトカイン (TNF- α)、線維化の指標 (TGF- β) を測定した。

(2) 肝臓中の脂質含量の測定

- 80 °C で保存された肝臓を用い、Folch法で脂質を抽出して、肝臓中のコレステロールおよび中性脂肪を測定した。

(3) 肝臓の組織学的変化

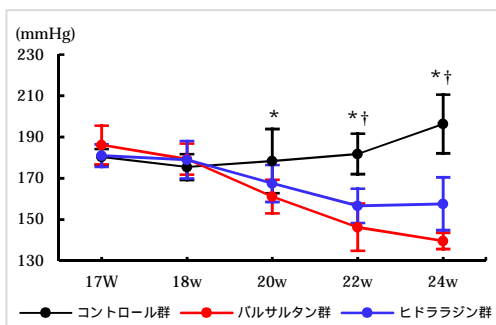
肝臓は剖出後、パラフィンブロックを作成して薄切し、Hematoxylin-eosin (H.E.) とElastica

Van Gieson (E.V.) で染色した。その後、光学顕微鏡で炎症性細胞浸潤と線維化を観察し、病理像の重症度を病理画像の視覚的表示と共にスコア化して評価した。さらに、免疫染色 (CD68) を行った。

(4) 肝臓中のタンパク発現分析

肝臓ホモジネート泳動用サンプルを作成し、ウエスタンブロット法によりタンパク質の発現解析を行った。

4. 研究成果



降圧剤は18週から投与を開始し、20・22・24週目にはコントロール群に比べバルサルタン群で有意に低値を示し (* : $p < 0.05$)、22・24週目にはコントロール群に比べてヒドララジン群で有意に低値を示した († : $p < 0.05$)。これらの結果より、両群共に血圧を下げる事が出来ており、研究計画通りに降圧効果が得られた。

(1) 肝臓の組織学的変化

H.E.染色では、コントロール群と比べてバルサルタン群では細胞質中の小脂肪滴が減少した。しかし、この効果は中心静脈中心であった。一方、ヒドララジン群では類洞が多く観察され、細胞一個当たりの肥大が抑えられていた。また、ヒドララジン群では、中心静脈周辺に正常細胞が観察され、細胞が回復している可能性があるとして示唆された。しかし、線維化が密になっている部分では改善されておらず、比較的軽度の線維症でないと改善は困難であると考えられる。

E.V.染色の結果より、バルサルタン群では繊維化が残っているところが多かった。しかし、ヒドララジン群では、バルサルタン群と比べて繊維化細胞が減少していることが確認出来た。

また、スコア化の結果より、バルサルタン群では特に小脂肪滴が減少し、肝脂肪化のスコアは最も低値を示した。一方、ヒドララジン群は、コントロール群に比べて大脂肪滴のスコアが有意に低値を示し、線維化のスコアは最も低値を示した。これらの結果より、降圧作用はどちらの薬剤でも得られたが、肝臓組織に対する効果は異なり、バルサルタンは脂肪滴減少に、ヒドララジンは繊維化の改善に寄与する可能性があるとして推察される。

CD68陽性細胞の発現に関しては、バルサルタン群では中心静脈付近で、ヒドララジン群では全体的に発現が少ないことが明らかとなった。CD68はクッパー細胞の特異的なマーカーであり、その活性化は肝炎症と線維化に重要な役割を果たし、NAFLD患者の病理学的重症度と関連している。これらの結果より、炎症に関しては食事療法に加え、降圧剤投与を併用することで治療効果が得られるのではないかと推察される。

(2) 血清を用いた生化学検査

栄養状態の指標として、総タンパク、アルブミン、グルコース、総コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸を測定したが、3群間に有意な差はみられなかった。肝障害の指標はAST、ALT、 γ -GTPを測定したが、3群間に有意な差はみられなかった。炎症性サイトカインであるTNF- α 、線維化の指標であるTGF- β についても、3群間に有意な差はみられなかった。

(3) 肝臓中の脂質含量の測定

肝臓中のTCは、コントロール群に比べてヒドララジン群で高値を示したが、有意な差は見られなかった。肝臓中のTGは有意な差はみられなかったが、コントロール群に比べてバルサルタン群で低値を示し、ヒドララジン群では高値を示した。

(4) 肝臓中のタンパク発現分析

どちらの降圧剤でも繊維化が改善されると考えていたが、脂質の減少効果の違いが顕著であったため、脂質代謝関連の指標について測定した。その結果、DGAT1はコントロール群に比べて、バルサルタン群、ヒドララジン群共に低下しており、降圧剤投与によりトリグリセリド合成が抑制されたと推察される。一方、DGAT2は、コントロール群に比べてバルサルタン群では低下したが、ヒドララジン群はコントロール群と同程度であり、脂質の減少については、ヒドララジンよりバルサルタンの方が有効であると示唆される。一方、血管新生や繊維疾患に関与するPDGFR- β はバルサルタン群よりヒドララジン群で低値を示し、繊維化改善の効果としてはヒドララジンの方が有効であると示唆される。

5. 主な発表論文等

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

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 0243846-0243846
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 橋本沙幸、内藤久雄、那須民江	4. 巻 第47巻第1号通巻616号
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 橋本沙幸、内藤久雄、那須民江	4. 巻 Vol.4 No.4 通巻No.35
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シン	6. 最初と最後の頁 91～95
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 -

〔学会発表〕 計2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、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 降圧薬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 日本衛生学会学術総会
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 日本産業衛生学会学術総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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