

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590755

研究課題名 (和文) 脂肪酸とクッパー細胞を介した肝疾患病態形成

研究課題名 (英文) Involvement of fatty acids and Kupffer cells for development of liver disease

研究代表者

福島 耕治

東北大学・病院・助教

研究者番号：20400476

研究成果の概要 (和文)：脂肪性肝炎では、肝細胞内に高度の脂肪化が認められることより、脂肪化の誘導機構を検討した。トランス脂肪酸 (TA) は、動脈硬化や炎症を誘導する。マウスに対する長期間 (24週) TA食により、高度の脂肪化、脂肪性肝炎が誘導された。脂肪合成遺伝子 SREBP-1、PPAR γ の誘導や、さらに脂肪酸濃度の上昇が認められ、脂肪蓄積の原因と考えられた。また、クッパー細胞の単離の検討から、TAにより TNF α 産生が誘導されることが示された。

研究成果の概要 (英文)：We clarified the pathogenic mechanism of trans-fatty acid to the mouse liver summarized as caused by the upregulation of lipogenesis in the liver and elevated level of free fatty acids accompanied by the secretion of TNF- α by Kupffer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	300,000	90,000	390,000
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：内科系臨床医学

キーワード：肝臓学

1. 研究開始当初の背景

- (1) 非アルコール性脂肪性肝疾患の原因と病態が未解明。
- (2) 食餌性因子による病態の形成が示唆される。
- (3) 多数の脂肪酸の生理学的な作用が認められる。
- (4) Western diet を主体とする米国において本疾患が多数認められる。
- (5) トランス脂肪酸と動脈硬化や炎症についてほぼコンセンサスが得られているが、肝疾患との関連は不明。

2. 研究の目的

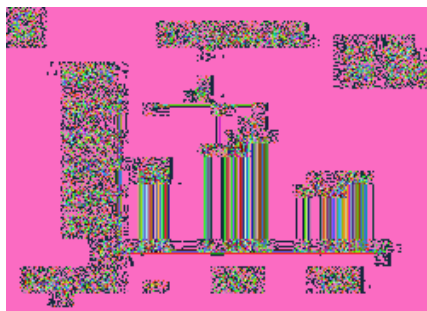
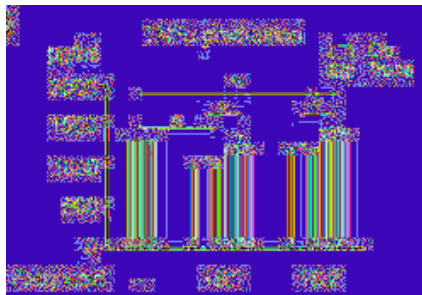
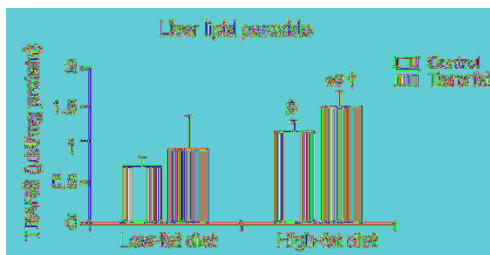
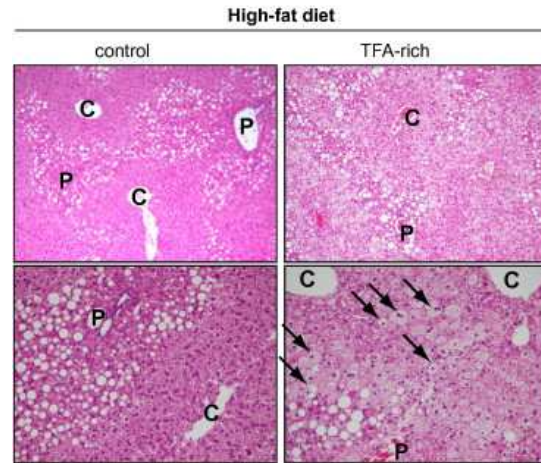
トランス脂肪酸の肝に対する病理性とその機序を検討する。

3. 研究の方法


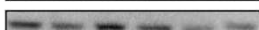

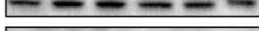

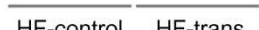
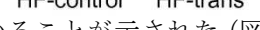
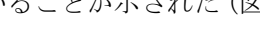
高脂肪食+トランス脂肪酸食長期給餌によるマウスモデルを作成し、肝組織、末梢血生化学、肝遺伝子発現プロファイル、肝脂肪酸プロファイル、Kupffer 細胞の状態とトランス脂肪酸による炎症性サイトカインの分泌などの検討を行う。

4. 研究成果

今回の検討で、マウスに対する長期間 (24 週) のトランス脂肪酸食投与により、体重および肝重量の増加、レプチンの上昇、肝への高度の脂肪化と軽度の炎症、線維化が誘導されることが証明された (表・図右)。肝臓内の脂肪蓄積の他、過酸化脂質の増加 (図下) も合わせて認められた。脂肪合成遺伝子である SREBP-1 や、PPAR γ が誘導されていることが見いだされ (表次ページ左)、さらに脂肪酸濃度の上昇が認められたことより、これらが脂肪蓄積の原因として推定された。また、Kupffer 細胞の単離の検討から、Kupffer 細胞からの TNF α 産生がトランス脂肪酸により誘導されることが示された (図下)。さらに、トランス脂肪酸高脂肪食により、肝内のインスリン抵抗性を示唆すると考えられる、



	Low-fat diet		High-fat diet	
	Control oil (LF-C)	TFA-rich oil (LF-T)	Control oil (HF-C)	TFA-rich oil (HF-T)
Body weight (g)	24.4 ± 2.1	23.1 ± 1.3	31.8 ± 3.6	40.9 ± 7.0 ^c
Liver weight (g)	1.08 ± 0.16	1.22 ± 0.08	1.11 ± 0.11	2.40 ± 1.01 ^c
Liver-body weight ratio (%)	4.5 ± 0.4	5.4 ± 0.2	3.5 ± 0.3	5.6 ± 1.6 ^c
Plasma characteristics				
Aspartate aminotransferase (IU/L)	95.2 ± 12.4	82.5 ± 20.8	136.8 ± 47.0	262.2 ± 72.0 ^c
Alanine aminotransferase (IU/L)	48.8 ± 15.0	37.0 ± 7.3	50.4 ± 10.9	244.0 ± 105.7 ^c
Triglyceride (mg/dl)	60.3 ± 19.2	51.0 ± 12.8	62.4 ± 14.8	124.8 ± 45.0 ^c
Total cholesterol (mg/dl)	77.0 ± 8.9	47.5 ± 6.1	55.2 ± 5.0	87.8 ± 10.1
HDL-cholesterol (mg/dl)	51.6 ± 8.3	26.2 ± 3.9	33.3 ± 7.2	38.6 ± 5.0 ^c
(V)LDL-cholesterol (mg/dl)	16.8 ± 2.1	12.0 ± 1.5	11.9 ± 1.0	17.4 ± 1.7
Free fatty acids (nmol/ml)	1.77 ± 0.38	1.43 ± 0.31	1.99 ± 0.58	3.64 ± 0.42 ^c
Adiponectin (μg/ml)	25.5 ± 1.4	18.2 ± 1.4	20.0 ± 1.5	20.0 ± 1.4 ^c
Leptin (ng/L)	5.6 ± 0.7	5.3 ± 0.6	13.8 ± 2.0	23.7 ± 2.3 ^c
Total: HDL-cholesterol ratio	1.54 ± 0.06	2.33 ± 0.5	1.71 ± 0.37	2.25 ± 0.87 ^c
NAFLD activity score				
Steatosis	0.33 ± 0.52	0.17 ± 0.41	1.67 ± 0.82	1.17 ± 0.41
Inflammation	0.33 ± 0.52	0.33 ± 0.52	0.83 ± 0.75	1.00 ± 0.63
Ballooning	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.63	1.00 ± 0.00	1.67 ± 0.82 ^c

		Low-fat TFA-rich (LF-T)	High-fat control (HF-C)	High-fat TFA-rich (HF-T)
Cytokine and adipokine				
Tumor necrosis factor	TNF	0.98 ± 0.20	2.11 ± 0.73	1.94 ± 0.77 [‡]
Interleukin6	IL6	1.30 ± 0.28	1.16 ± 0.14	1.10 ± 0.25
Transforming growth factor-β	TGF-β	0.26 ± 0.17	1.35 ± 0.30	0.98 ± 0.22
Nitric oxide synthase 2, inducible	iNOS	1.29 ± 0.34	2.23 ± 0.75	2.69 ± 0.74 [‡]
Adiponectin receptor 1	AdipoR1	1.01 ± 0.17	1.29 ± 0.29	1.21 ± 0.25
Adiponectin receptor 2	AdipoR2	0.92 ± 0.16	1.20 ± 0.22	1.28 ± 0.26
Lipogenesis				
Fatty acid synthase	FAS	1.36 ± 0.21	0.79 ± 0.12	1.69 ± 0.46 [‡]
Acetyl CoA carboxylase	ACC	1.27 ± 0.10	0.20 ± 0.05	1.49 ± 0.37 [‡]
Sterol regulatory element-binding protein-1	SREBP-1	3.76 ± 0.51	1.93 ± 0.23	4.69 ± 0.17 [‡]
Peroxisome proliferator activated receptor γ1	PPARγ1	1.45 ± 0.42	1.36 ± 0.48	1.29 ± 0.26
Peroxisome proliferator activated receptor γ2	PPARγ2	1.28 ± 0.33	12.92 ± 6.04	30.12 ± 3.61 [‡]
PPARγ coactivator-1β	PGC-1β	0.21 ± 0.10	0.61 ± 0.15	0.38 ± 0.12 [‡]
Fatty acid oxidation				
Peroxisome proliferator activated receptor α	PPARα	0.51 ± 0.23	1.25 ± 0.48	1.28 ± 0.41
Carnitine palmitoyl transferase-1	CPT-1	0.63 ± 0.11	1.08 ± 0.34	1.06 ± 0.37
Triglyceride excretion				
Microsomal triglyceride transfer protein	MTP	1.04 ± 0.16	0.92 ± 0.11	0.91 ± 0.11
Apolipoprotein B	ApoB	1.11 ± 0.15	1.20 ± 0.13	1.15 ± 0.09
Cholesterol metabolism				
Sterol regulatory element-binding protein-2	SREBP-2	0.27 ± 0.15	1.66 ± 0.25	1.69 ± 0.34
Hydroxymethylglutaryl CoA synthase-1	HMGCS1	1.08 ± 0.11	1.60 ± 0.26	4.36 ± 0.73 [‡]
Hydroxymethylglutaryl CoA reductase	HMGCR	0.99 ± 0.13	1.22 ± 0.32	2.93 ± 0.44 [‡]
Apolipoprotein A-1	ApoA1	0.93 ± 0.08	1.26 ± 0.21	0.61 ± 0.11 [‡]
pAKT(Thr308)				
pAKT(Ser473)				
Total AKT				
β-actin				

pAKT が低下していることが示された (図上)。

以上より、トランス脂肪酸を多く含む高脂肪食はヒトでの注意喚起があるような、HDL コレステロール低下、LDL コレステロールの上昇、冠動脈硬化症などの誘因となる他、マウスでは長期投与により非アルコール性脂肪性肝疾患を惹起すると考えられ、ヒトにおいても、病態形成に関与する可能性が想定された。トランス脂肪酸の表示義務が欧米諸国のみならず、本邦においても課される予定であり、また、Western diet の生活習慣病への関与が想定される中、人工的な副産物であるトランス脂肪酸がその一因となることが本研究において証明できたことは疫学的にも意義のあることと考えられた。さらに、TNF α など炎症に関与することが本実験から示唆され、粥状硬化など動脈硬化性病変との関連が示唆され、接種脂肪酸種による全身炎症との関連において興味深いものと考えられる。以上、トランス脂肪酸による炎症の惹起や、インスリン抵抗性の惹起、肝臓における脂肪合成遺伝子の発現増強作用について動物実験で検討したが、その機序については明らかではない。今後さらにトランス脂肪酸および長鎖飽和脂肪酸などによる生体に対する鶴弊害の機序を検討していく必要があると考えられる。仮説としては、膜流動性に関する影響、さらに脂肪酸組成により、ER ストレスが変化することが報告されているほか、これらの脂肪酸負荷により、LPA の産生が増強し、膜リン脂質からのシグナルに影響している可能性が示唆されるなど、検討すべき課題が残っている。さらに、本研究において認められた PPAR γ の発現上昇について、ER ストレスがこれを誘導する機序が示唆されていることから脂肪酸負荷とこれらの機序についてさらに検討を進める必要があるものと考えられる。今回、肝脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで検討した結果、エライジン酸などトランス脂肪酸が多く含まれていたことに加え、アラキドン酸や PUFA が減少していることが認められた。トランス脂肪酸が、SCD1 や elov16 など脂肪酸代謝に及ぼす影響も今後検討していく必要があるものと考えられた。また、今回の検討は肝臓に対する影響を主に検討したが、内臓脂肪の maturation や、炎症細胞への影響、実際の動脈硬化性病変への影響、さらに、マクロファージの M1 あるいは M2 phenotype への影響など検討すべき課題は多い。本研究の結論として、マウスモデルにおいて食餌中のトランス脂肪酸は肝臓に高度の脂肪化を誘導し、炎症反応を惹起した。遊離脂肪酸濃度は高値であり、脂肪酸合成酵素の誘導を伴っていた。ヒトへの影響については未知の部分はあるものの、これらの生体への好ましかからざる潜在的な影響を考慮すれば、可及的に避けるべき脂質であり、さらに、非アルコール性脂肪性肝炎

の形成機序として環境要因も考慮していくべきかと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Noriyuki Obara, Koji Fukushima, Yoshiyuki Ueno. Possible involvement and the mechanisms of excess trans-fatty acid consumption in severe NAFLD in mice. *Journal of Hepatology* 53(2) 326-34, 2010 査読あり

2. 小原範之, 福島耕治, 上野義之, 下瀬川徹クッパー細胞に対する遊離脂肪酸の生理学的作用 *Jpn Pharmacol Ther* 2008 36(s2) s193-5 査読なし

[学会発表] (計 8 件)

1. 福島耕治、小原範之、上野義之、トランス脂肪酸マウスモデルの病態解析、2010 年 10 月 14 日、日本肝臓学会、消化器病学会、消化吸収学会、横浜

2. 小原範之、福島耕治、上野義之、トランス脂肪酸高含有特殊脂肪食による脂肪性肝疾患の惹起と発症機序、2010 年 5 月 27 日、日本消化器病学会、山形

3. 福島耕治、小原範之、上野義之、トランス脂肪酸と肝関連指標に関する検討(フェロシップ賞受賞者講演)、2010 年 2 月 25 日、日本静脈経腸栄養学会、幕張

4. Noriyuki Obara, Koji Fukushima, Yoshiyuki Ueno, Trans fatty acid containing high fat diet induced nonalcoholic fatty liver disease in mice, 2009 年 11 月 2 日、米国肝臓学会、ボストン(アメリカ)

5. Noriyuki Obara, Koji Fukushima, Yoshiyuki Ueno, Mouse model of nonalcoholic fatty liver disease induced by long term feeding of *trans*-fat rich high-fat diet, 2009 年 9 月 26 日、欧州肝臓学会、ボローニャ(イタリア)

6. Koji Fukushima, Noriyuki Obara, Yoshiyuki Ueno, Fatty liver disease model caused by long-term feeding of trans-fatty acids, 2009 年 9 月 1 日、欧州経腸栄養学会、ウィーン(オーストリア)

7. 福島耕治、小原範之、上野義之、トランス脂肪酸と肝関連指標に関する検討、2009 年 1 月 29 日、日本静脈経腸栄養学会、鹿児島

8. 小原範之、福島耕治、上野義之、Non alcoholic steatohepatitis (NASH)で認められる高脂肪酸血症の病態への意義、2008 年 6 月 6 日、日本肝臓学会、松山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 耕治 (KOJI FUKUSHIMA)

東北大学・病院・助教

研究者番号：20400476

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

小原 範之 (NORIYUKI OBARA)

東北大学・大学院医学系研究科・大学院生

研究者番号：