

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08317

研究課題名（和文）コノフィリンによるNASH進展抑制機序の解明

研究課題名（英文）Impact of conophylline on the progression in NASH

研究代表者

中出 幸臣（NAKADE, YUKIOMI）

愛知医科大学・愛知医科大学・客員研究員

研究者番号：70431400

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）：高脂肪食にコノフィリンを投与するとは高脂肪食による肝脂肪化、炎症、線維化を抑制した。トランスクリプトーム解析では肝脂肪化に関してコノフィリンを投与すると、PPARαmRNAが高脂肪食群に比べ有意に発現が亢進していた。肝脂質のメタボローム解析を行い、コノフィリンを投与することで肝中性脂肪は減少する一方、phosphatidylethanolamineは増加していた。phosphatidylethanolamineは肝臓中では、VLDLの分泌にも関与することが報告されている。コノフィリンによる肝phosphatidylethanolamineの増加はVLDLの分泌促進に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、高脂肪食によって引き起こされる肝脂肪化やそれに関連する代謝異常の理解を深め、コノフィリンのような低分子化合物が肝機能を改善するための有望な治療法や予防法なる可能性があることに学術的意義があるものと推察される。また肥満やメタボリックシンドロームといった社会的な健康問題に関連する肝臓疾患の予防や治療に将来役立つ可能性があります。

研究成果の概要（英文）：Conophyllin administration on a high-fat diet suppressed hepatic lipidification, inflammation, and fibrosis induced by a high-fat diet. Transcriptome analysis showed that PPARαmRNA expression was significantly upregulated in the conophylline-treated group with respect to hepatic lipidification compared to the high-fat diet group. Metabolomic analysis of hepatic lipids showed that conophyllin treatment decreased hepatic triglycerides while increasing phosphatidylethanolamine, which has also been reported to be involved in the secretion of VLDL in the liver. The increase in hepatic phosphatidylethanolamine by conophyllin may be involved in the promotion of VLDL secretion.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：肝疾患

キーワード：MASH コノフィリン PPARα 高脂肪食 メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病と深い関連のある非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD)、非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) は世界的に増加傾向であり、これまでに種々の薬物治療が試みられているが確立した治療はない。

キョウチクトウ科のエルバタミアマイクロフィラより抽出されるコノフィリン (Conophylline : CnP)は、元々は膵β細胞の誘導課程でスクリーニングされたピンカアルカロイドである(Anticancer Res. 1994 Nov-Dec;14(6B):2413-7)。 *In vitro* で CnP は膵星細胞の活性化およびコラーゲンの発現を低下させることが報告され、また CnP は 2 型糖尿病モデル動物の膵島線維化を改善することも示されている (Endocrinology. 2012 Feb;153(2):621-30)。肝においては CnP が肝星細胞の活性化を抑制し、肝硬変ラットモデルにおける肝線維化を抑制することが確認されている (Liver Int. 2014 Aug;34(7):1057-67)。

これらを背景に申請者はこれまでに NASH における肝線維化が改善するか、メチオニンコリン欠乏食 (MCD) を用いた病理学的 NASH モデルに対して CnP を投与したところ、肝線維化のみならず肝脂肪化を軽減させることを見いだしてきた (PLoS One. 2017 Jun 8;12(6):e0178436)。MCD により増加した肝脂肪は CnP により有意に減少し、組織学的に MCD により増加した肝脂肪、炎症、線維化は CnP によって改善を認めることが確認され、本研究により申請者は特許を取得した (特許第 6453636 号)。さらに MCD は病理学的 NASH のモデルであるため、高脂肪食 (HFD) を用いた脂肪肝モデルに CnP を投与したところ、肝脂肪が軽減しそのメカニズムに PPAR α の活性化および β 酸化の促進が関与することを見いだしてきた (PLoS One. 2019 Jan 28;14(1):e0210068)。しかし高脂肪食だけでは炎症および肝線維化を誘発できず、よりメタボリックシンドロームの病態を反映しているモデルにおいて、CnP が肝炎症および肝線維化を抑制するかは明らかではない。さらに CnP が肝星細胞に作用することはわかっているが、肝星細胞あるいは肝細胞において肝脂肪化および炎症を抑制することに関しては明らかではない。

2. 研究の目的

本申請研究では食事により誘導される NAFLD/NASH モデルである Amylin liver NASH model (high fat (40% kcal), high fructose (22% by wt), and high cholesterol (2% by wt) ; HFHFHCD) (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2013 Oct 1;305(7):G483-95) を用いて、CnP に肝脂肪化、炎症、線維化を抑制する作用があるか確認することを目的にする。本モデルは脂肪、フルクトース、コレステロールの3者が含有されているもので、30週間にわたりマウスに摂食させると脂肪化から炎症および線維化が誘導される有用なモデルである。本モデルにおいてCnPの肝脂肪化、炎症および線維化抑制作用を検証した後、肝臓のトランスクリプトーム解析を行ってCnPの肝脂肪化、炎症および線維化抑制に関わる遺伝子を網羅的に探索していく。さらに肝メタボローム解析を行ってCnPによる肝内脂質の組成変化を同定し、炎症および線維化抑制に結びつく肝内脂質変化を探索する。これまでの検討によりCnPの肝脂肪化抑制にPPAR α の活性化および β 酸化の促進が関与している可能性があることから、PPAR α ノックアウトマウスを用いてCnPによる肝脂肪化、炎症および線維化抑制が阻害されるかを確認していく。またこれまでにCnPは活性化肝星細胞に対して作用し活性化を抑制することがわかっているが、肝脂肪化および炎症に関して明らかでないため、肝星細胞および肝細胞に対して肝脂肪化を誘導した際、CnPが肝脂肪および炎症性サイトカインの発現に影響を及ぼすか *in vitro* で検証を行っていく。

NASH に対する治療に関する研究は種々なされているが、CnP が肝臓に作用し脂肪化、炎症および線維化を抑制すること、さらにはその作用機序を解明する研究は申請者以外皆無である。さらに *in vitro* では CnP は活性化肝星細胞を抑制することがわかって

いるが、肝脂肪化および炎症を抑制するか明らかでない。NASH に対する肝脂肪化、炎症、線維化を抑制するか確認していくことは、将来の NASH に対する治療開発に結び付く可能性を見据えた意義深い研究になると考えられる。

3. 研究の方法

コノフィリン(CnP)が Amylin liver NASH model に対して肝脂肪化、炎症および線維化を抑制するかを明らかにする

9 週齢雌性 C57BL/6 マウスに対して、普通食(NC)あるいは HFHFHCD に CnP (1 $\mu\text{g/g}$) を混餌し摂取させる。NC 群、NC + CnP 群、HFHFHCD 群、HFHFHCD + CnP 群の 4 群にわけて、摂食開始より 30 週間にわたり 2 週間毎に体重測定および採血を行い血清 AST、ALT、TNF- α 、IL-6、インスリンおよび血糖を測定する。摂食開始から 30 週間後にマウスを屠殺して採血の後、血清 AST、ALT、TNF- α 、IL-6、インスリンおよび血糖を測定し経時的変化を比較する。肝および精巣上体脂肪を採取し、Oil Red O 染色、HE 染色およびマッソン・トリクローム染色を行い、それぞれ肝脂肪化、炎症および線維化の程度を評価する。肝脂肪化および炎症に関してはそれぞれ Brunt の分類(Am J Gastroenterol 1999; 116: 2467-74)にしたがって mild: 33%以下、moderate: 33-66%、severe: 66%以上の 3 段階にわけて評価する。また肝線維化に関してはマッソン・トリクローム染色にて門脈域および中心静脈を含む任意の 5 視野を選択し、青紫色に染まる領域をコンピュータイメージ分析装置にて面積を算出し比較する。また精巣上体脂肪量を定量し CnP の内蔵脂肪への影響を評価する。

コノフィリン(CnP)が NASH における肝脂肪化、炎症および線維化に及ぼす影響をトランスクリプトーム解析にて明らかにする

NC 群、NC + CnP 群、HFHFHCD 群、HFHFHCD + CnP 群の各群のマウス肝より mRNA を抽出しトランスクリプトーム解析にて発現変動している遺伝子をスクリーニングした上で遺伝子プロファイリングを行い、各種遺伝子のパスウェイ解析の比較を行う。マウスの凍結肝組織から総 RNA を抽出し cDNA に逆転写させ、Agilent 社の Whole mouse genome CGH マイクロアレイを用いて赤色蛍光色素(Cy3)で、それぞれのコントロールを緑色蛍光色素 (Cy5)で標識し、両者をスライドガラス上のプローブをハイブリダイズさせ、蛍光シグナル強度を測定する。次に Agilent Feature Extraction Software (FES)を用いてマイクロアレイイメージファイルを読み出し、データ分析システムを用いて、各群における各遺伝子の信号強度を対照群との間でその比率を算出する。次に MAPPFinder を用いて特定の pathway に指定された範疇の遺伝子が偶然より多く含まれているか評価した上で、各遺伝子発現値を Pathway マッピングし脂肪化、炎症および線維化に関連するシグナルに関してどのように変化しているか比較する。

コノフィリン(CnP)が NASH における肝脂肪化、炎症および線維化に及ぼす影響をメタボローム解析にて明らかにする

NC 群、NC + CnP 群、HFHFHCD 群、HFHFHCD + CnP 群の各群のマウス肝よりメタノールおよびメチルテートブチルエーテルの混合液を用いて脂質の含まれる上清を回収し、LC-MS 分析を行う。HPLC は Agilent 1200 series を用いてカラムの温度は 50 でを行い、精密質量分析計は LTQ ORBITRAP XL (thermo fisher scientific)を用いて ESI ポジティブモードにて検出を行う。解析ソフトウェアは Lipid Search バージョン 4.1.27 を用いて 20 グループ 74 クラスに渡る脂質を検出し、各群の検出された脂質を同定する。さらに検出されたクラスごとに上記 4 群間での比較解析をおこなって、肝内脂質組成の変化を同定する。

PPAR α ノックアウトマウスを用いてコノフィリン(CnP)による肝脂肪化抑制に PPAR α が関与しているかを明らかにする

肝脂肪化に関して CnP は PPAR α および肝 β 酸化を促進する可能性が見いだされている (PLoS One. 2019 Jan 28;14(1):e0210068)。PPAR α ノックアウトマウスに対して HFHFHCD を用いて NASH を誘導し、CnP を投与することで肝脂肪化、炎症および線維化の改善の有無を検討する。PPAR α ノックアウトマウスおよび wild type マウスに対して HFHFHCD を 30 週間にわたり摂食させながら CnP を投与し、2 週間毎に採血および体重測定を行い血清 AST、ALT、TNF- α 、IL-6、インスリンおよび血糖を測定する。摂食開始 30 週間後マウスを屠殺して採血の後、血清 AST、ALT、TNF- α 、IL-6、インスリンおよび血糖を測定し経時変化を比較する。採取した肝の Oil Red O 染色、HE 染色およびマッソン・トリクローム染色をおこなって、肝脂肪化、炎症および線維化の程度を Brunt の分類およびマッソン・トリクローム染色で青紫色に染まる領域面積を算出し、組織学的評価の基準にしたがって比較する。

In vitro においてコノフィリン(CnP)の肝脂肪化抑制が肝細胞あるいは肝星細胞を介して作用するかを明らかにする

In vitro の検討において、CnP は肝星細胞の活性化を抑制する効果が見いだされている。しかし肝脂肪化に関して、CnP が肝細胞に作用するかあるいは肝星細胞に作用するか不明である。ヒト肝細胞株である HepG2 細胞およびヒト肝星細胞株である Lx2 細胞に対して遊離脂肪酸の一つであるパルミチン酸を用いて細胞の脂肪化誘導を行い、CnP を投与することで、肝脂肪化が抑制されるか細胞の Oil Red O 染色にて検討を行う。また脂肪化に伴い出現する炎症性サイトカイン (TNF α mRNA) の発現を Real Time PCR で定量し比較する。

4. 研究成果

Amylin liver NASH model (high fat (40%kcal), high fructose (22% by wt), and high cholesterol (2% by wt) ; HFHFHCD) を用いて、コノフィリン(CnP)が肝脂肪化、炎症および線維化を抑制するかを確認した。9 週齢雌性 C57BL/6 マウスに対して、普通食 (NC) あるいは HFHFHCD に CnP (1 μ g/g) を混餌し摂取させた。NC 群、NC + CnP 群、HFHFHCD 群、HFHFHCD + CnP 群の 4 群にわけて、摂食開始より体重測定を行い経時変化を観察した。HFHFHCD 群は NC 群に比べ体重は増加し、一方 HFHFHCD 群と HFHFHCD + CnP 群の間にも体重増加に差がみられなかった。肝組織染色では、HFHFHCD 群で著明な肝脂肪化、肝炎症細胞浸潤、肝線維化が観察された。一方 HFHFHCD + CnP 群においては肝脂肪化、肝炎症細胞浸潤、肝線維化がいずれも軽減していた。

トランスクリプトーム解析にて発現変動している遺伝子をスクリーニングした上で遺伝子プロファイリングを行い、肝脂肪化に関しては高脂肪食によって遊離脂肪酸取り込みに関わる分子である CD36mRNA が増加していた。コノフィリンを投与すると、CD36mRNA に有意な変化を認めなかったが、代謝亢進に関連した PPARA、CPT1、CPT2、ACOX1mRNA といった分子の発現が高脂肪食群に比べ有意に発現が亢進していた。また炎症に関しては TNF α 、CD68mRNA が高脂肪食群で増加し、コノフィリンによって減少していることが確認された。さらに肝線維化に関しては高脂肪食で増加した TGF β および TIMP1mRNA 発現がコノフィリン群で減少していることが確認された。一方、パスウェイ解析においては、肝脂肪化、炎症および線維化それぞれにおいて特定のパスウェイは見いだせなかった

肝脂質のメタボローム解析を行い、高脂肪食によって、肝中性脂肪以外に phosphatidylethanolamine、phosphatidylcholine、dimethylphosphatidylethanolamine が普通食によって増加していた。一方、コノフィリンを投与することで、肝中性脂肪は減少し、phosphatidylcholine も減少したが、phosphatidylethanolamine および dimethylphosphatidylethanolamine は増加していた。phosphatidylethanolamine は膜タンパク質の安定化などに関与し肝臓中では、VLDL の分泌にも関与することが報告されている。コノフィリンによる肝 phosphatidylethanolamine の増加は VLDL の分泌促進に関与する可能性が示唆され

た。

PPARAKO マウスにおいてコノフィリンを投与し肝脂肪化に影響を及ぼすか検討を行ったが、PPARAKO マウスにて増加した肝脂肪はコノフィリン投与によって有意な変化をみとめなかった。

またヒト肝細胞株である HepG2 細胞およびヒト肝星細胞株である Lx2 細胞に対して遊離脂肪酸の一つであるパルミチン酸を用いて細胞の脂肪化誘導を行い、CnP を投与することで、肝脂肪化が抑制されるか細胞の Oil Red O 染色にて検討を行ったが、脂肪化に伴い出現する炎症性サイトカイン (TNF α mRNA) の発現を Real Time PCR で定量し比較した有意な変化を認めなかった

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 0件）

1. 著者名 Nakade Yukiomi, Kitano Rena, Yamauchi Taeko, Kimoto Satoshi, Sakamoto Kazumasa, Inoue Tadahisa, Kobayashi Yuji, Ohashi Tomohiko, Sumida Yoshio, Ito Kiyooki, Yoneda Masashi	4. 巻 22
2. 論文標題 Effect of Central Corticotropin-Releasing Factor on Hepatic Lipid Metabolism and Inflammation-Related Gene Expression in Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3940 ~ 3940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22083940	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 Nakade Yukiomi, Kitano Rena, Sakamoto Kazumasa, Kimoto Satoshi, Yamauchi Taeko, Inoue Tadahisa, Kobayashi Yuji, Ohashi Tomohiko, Sumida Yoshio, Ito Kiyooki, Yoneda Masashi	4. 巻 16
2. 論文標題 Characteristics of bile acid composition in high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in obese diabetic rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0247303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0247303	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 Nakade Yukiomi, Kitano Rena, Yamauchi Taeko, Kimoto Satoshi, Sakamoto Kazumasa, Inoue Tadahisa, Kobayashi Yuji, Ohashi Tomohiko, Sumida Yoshio, Ito Kiyooki, Yoneda Masashi	4. 巻 21
2. 論文標題 Effect of Adrenergic Agonists on High-Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9392 ~ 9392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21249392	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0件

〔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
---------	---------