

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10555

研究課題名(和文) NASHにおける血管内皮ミトコンドリア障害と急性心筋梗塞との関連

研究課題名(英文) Role of endothelial mitochondrial dysfunction on cardiovascular diseases associated with NASH

研究代表者

宮尾 昌 (Miyao, Masashi)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：90711466

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)：非アルコール性脂肪性肝炎、NASHの発症と病態進展は、急性心筋梗塞発症と関連することが分かっていたが血管内皮ミトコンドリア障害と急性心筋梗塞との関連は不明であった。私たちは、NASH進展に伴い、肝細胞内のミトコンドリア過剰分裂の誘導が起きることがわかったが、当初の仮説とは異なり内皮細胞内ミトコンドリアの挙動には大きな変化を見いだすことはできなかった。また、過剰なミトコンドリア分裂を阻害すれば、肝臓内炎症、線維化反応を抑制できることがわかった。これらの研究成果は増え続ける肥満関連疾患による健康障害を抑えるための新しい予防・治療戦略に繋がることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満関連疾患の中で最も若年層の有病率が高く、病態理解の進んでいないNASHは全世界で増え続けており、その予防・治療法開発は持続可能な社会の発展にとって重要である。私たちはモデルマウスを用いた実験研究で、血管内皮やマクロファージ、伊東細胞のミトコンドリア障害ではなく、肝細胞内ミトコンドリアの過剰分裂がNASHの病態を進めてしまう原因となりうることを明らかにした。このように、NASHの病態に関連するものを明らかにしていくことで、肥満病態の危険性と予防可能性の啓発、新たな診断・予防法開発につなげ、1人でも多くの予防可能な死を減らすことに貢献したい。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic steatohepatitis (NASH), liver manifestation of a metabolic syndrome, has been demonstrated to be an independent risk factor for cardiovascular disease (CVD). However, the association between mitochondrial dysfunction of endothelial cells, NASH, and CVD remains elusive. We have tested the hypothesis whether mitochondrial fission in endothelial cells could have a causative role in NASH and CVD progression. Contrary to our hypothesis, excessive mitochondrial fissions were not induced in endothelial cells. However, we found that excessive fissions were profoundly induced in hepatocytes, and the blockade of the fissions in hepatocytes could lead to amelioration of NASH progression, especially in the early NASH phase. These findings provide new insights into the potential therapeutic strategies to prevent obesity-related morbidity and mortality.

研究分野：法医学

キーワード：法医病理学

1. 研究開始当初の背景

法医学者が関与する異状死の種類としては病死が最も多く、その殆どを占める。そのため、法医学者は外因死だけでなく、病死、特にその多くを占める急性心臓死の正確な死因究明が望まれている。一方、運動不足や栄養過多な食生活、寿命の延伸などから単純性脂肪肝や非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)を含めた肥満関連疾患が急増しており、NASH は急性心筋梗塞発症の重要な原因の一つであるため、法医病理学的観点から NASH を背景とした急性心臓死に関する研究を進める必要がある。

現在、世界における成人の約3人に1人が単純性脂肪肝やNASHに罹患しており、少なくとも2040年までこのような肥満関連疾患は増え続けることが予測されている。これまでに、単純性脂肪肝やNASH病態における肝障害を抑えうる治療薬の報告はあるものの、長期の寿命(生命予後)を改善させる薬剤はなく、長期予後改善には継続的な減量、体重管理や運動療法以外にはない。日本での肥満(BMI25以上、世界では過体重)の患者さんの場合、体重の少なくとも3%以上の減量、あるいは1日当たり500から1000kcalを抑えた食生活を少なくとも3か月以上継続できた場合には肥満関連疾患の発症率、服薬の必要性、減薬の考慮、心疾患イベント、全死亡率の有意な改善が見込めることが分かっている。しかし、患者さん自身による減量療法や運動療法のみでは不十分となったり、反対にリバウンドによる負の影響が起こる可能性も高まることが多い。また、特に日本人などのアジア人では標準体型、あるいはやせ体型にも拘わらず、糖尿病やNAFLD、NASHの有病率は、肥満人口割合の高い米国とほぼ同程度報告されることが分かっており、遺伝的にも*PNPLA3*などの脂質代謝に関連するような遺伝子の脆弱性の高い集団の割合が高い(5人に1人程度)ことが分かっている。このような肥満人口の低さにもかかわらず、遺伝的、人種的背景、肥満やNASHに対するスティグマにより、日本では知らず知らずのうちにNAFLDの病態進展、結果として心血管イベント、死亡リスク上昇が起こっていることが考えられる。しかしながら、日本を含め世界中で脂肪肝やNASHに対する承認薬は存在していない。この高い有病率、重症度に比較して治療・予防法開発が進んでいない主な原因としては、病態理解が進んでいないことが考えられる。もし、単純性脂肪肝やNASHを放置したり、対策が不十分な状態が続くと、肝硬変や肝がんに進展するだけでなく、急性心筋梗塞の原因ともなりうる。単純性脂肪肝の発症は急性心筋梗塞の死亡率を30%以上増加させ、NASHがさらに進展するとその死亡率は5倍以上になる(GB Goh et al. *Dig Dis Sci.* 2016)。その急性心筋梗塞の主な病態は冠動脈の内膜下に形成されたプラークの破綻と、それに続く血栓形成による冠動脈内腔の閉塞と考えられている。冠動脈内腔は内皮細胞に覆われているので、このプラークの破綻には内皮細胞がどの程度障害されやすいかなどが関与すると考えられ、実際、種々の形態を示す動脈硬化性プラークの中でも破綻しやすいプラークとして不安定プラークが知られている。従って、急性心筋梗塞の冠動脈プラーク破綻における全身の内皮細胞障害機序を明らかにすることは、急性心筋梗塞の更なる病態解明、治療法及び予防法の開発において研究意義がある。しかしながら、これまで急性心筋梗塞における内皮細胞障害とNASHとの関連についてのモデル動物を用いた基礎研究は進んでいなかった。

私たちは、これまでに心臓や肝臓などの実質細胞のみならず内皮細胞を含めたあらゆる細胞に分布しているミトコンドリアの障害が慢性肝疾患、腎障害、多臓器不全の病態進展と相関することを報告してきた(M Miyao et al. *Dig Liver Dis.* 2013, M Miyao et al. *Lab Invest.* 2015, C Kawai et al. *Am J Pathol.* 2016, T Ishida et al. *PLOS ONE* 2016)。また、これまでの他の研究者により、このミトコンドリアが先天的あるいは後天的に障害されると、過剰な活性酸素の産生やアポトーシス、オートファジー、小胞体ストレスを引き起こし、血管内皮細胞にも障害が起こることが報告されてきた(MA Kluge et al. *Circ Res.* 2013)。従って、NASHを背景とした急性心筋梗塞における冠動脈や肝臓類洞の内皮細胞におけるミトコンドリア障害が関与している蓋然性が考えられた。しかしながら、これまでNASHにおける血管内皮細胞のミトコンドリア障害と急性心筋梗塞との関連については分かっていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、NASHを背景とした急性心筋梗塞と冠動脈内皮細胞ミトコンドリア障害の関係を明らかにすることであった。そして、この目的の達成が肥満を背景とした急性心筋梗塞患者を1人でも減らすことができる治療法や予防法開発の端緒の1つになることを目指す。

3. 研究の方法

私たちは、モデルマウスを用いてNASH、心筋梗塞、ミトコンドリア障害を病理学的に解析し、多臓器障害機序を解明することを目的とした。研究方法は以下の2つの段階で行った。

A. NASHと急性心筋梗塞における血管内皮ミトコンドリアの病理学的変化

C57BL/6マウス(8週齢)にコリン欠乏食を1、4、12週間投与しNASHモデルを作製した。また、同週齢のマウスを対照とした。両群のマウスの心臓、肝臓、脾臓、内臓脂肪(精巣上体周囲脂肪)を摘出し、病理学的評価を行うとともに炎症や線維化関連遺伝子やタンパク質の発現変化

を免疫組織学的、ウェスタンブロット、RT-PCR で解析した。そして、各臓器の血管内皮、肝細胞、マクロファージ、肝星細胞(伊東細胞)におけるミトコンドリアを透過型および走査型電子顕微鏡を用いて超微細構造学的に解析することで、NASH、心筋梗塞の病態と血管内皮ミトコンドリア障害の関連を明らかにした。

B . 血管内皮ミトコンドリア障害のNASHと急性心筋梗塞病態への影響

C57BL/6 マウス(8週齢)にミトコンドリアの分裂阻害剤である mdivi1 を腹腔内投与した。対照のマウスには Vehicle を投与した。両群の生存率を評価するとともに、心臓、肝臓、脾臓、内臓脂肪を摘出し、ミトコンドリアを超微細構造学的に比較解析し、mdivi1 の効果を確認した。その後、上記 A と同様のプロトコールで実験を行い、mdivi1 投与群と対照群の生存率、各臓器の病理学的解析をすることで血管内皮ミトコンドリア障害の NASH と心筋梗塞病態への影響を明らかにした。

4 . 研究成果

研究期間中には以下のことを明らかにした。

NASH 進展に伴い、肝細胞内のミトコンドリア過剰分裂の誘導が起きることがわかったが、当初の仮説とは異なり内皮細胞内のミトコンドリアの挙動には大きな変化を見いだすことはできなかった。また、肝臓内の炎症や線維化に重要なマクロファージや肝星細胞内のミトコンドリアの挙動にも大きな変化を見出すことはできなかった。

NASH に至る手前の単純性脂肪肝(NAFL)の段階ではミトコンドリア分裂阻害による病態進展抑制の効果は低く、わずかに肝臓内グリコーゲン貯蔵能の改善などがみられるのみであることがわかった。また、ミトコンドリア阻害剤投与による肝細胞以外の内皮細胞、マクロファージ、肝星細胞には、ミトコンドリアの挙動、炎症反応や線維化を示唆するような所見のいずれにおいても大きな変化を見出すことはできなかった。

NASH に至ると過剰なミトコンドリア分裂を阻害すれば、肝細胞内のミトコンドリア優位に分裂抑制が起き、肝細胞や胆管上皮、内皮、マクロファージ、肝星細胞の障害を抑制することで肝臓内炎症、線維化反応を抑制できることがわかった。NAFL の際と同様に、肝細胞以外の細胞のミトコンドリアの挙動には大きな変化を見出すことはできなかった。

心臓組織では、NASH の進展やミトコンドリア分裂阻害の有無に関わらず病理学的に有意な変化を見いだすことができなかった。

特に NASH 発症早期の段階において、ミトコンドリア分裂阻害剤投与をすることで、糖尿病の改善が NASH 進展抑制に部分的に寄与していることが分かった。

進展期の NASH においてもミトコンドリア分裂阻害により、炎症反応、線維化などの病態進展を抑制する効果がみられることが分かった。

これらの研究成果は増え続ける肥満関連疾患による健康障害を抑えるためのミトコンドリアの挙動を標的とした新しい予防・治療戦略に繋がることが期待される。

もし、NASH 早期病態に効果があり安価で安全性の高い治療薬が開発されれば、体重管理や運動療法のみを継続することが難しい患者さんに対しても外来診療継続による強い動機づけにつながり、さらに社会の肥満に対するスティグマ(負の烙印)が解消されることで、予防可能な死を防ぐ実現可能性の高い予防・治療を継続できることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Forrester SJ, Preston KJ, Cooper HA, Boyer MJ, Escoto KM, Poltronetti AJ, Elliott KJ, Kuroda R, Miyao M, Sesaki H, Akiyama T, Kimura Y, Rizzo V, Scalia R, Eguchi S.	4. 巻 76
2. 論文標題 Mitochondrial Fission Mediates Endothelial Inflammation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 267-276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14686.	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 該当する
1. 著者名 Miyao M, Cicalese S, Kawai T, Cooper HA, Boyer MJ, Elliott KJ, Forrester SJ, Kuroda R, Rizzo V, Hashimoto T, Scalia R, Eguchi S.	4. 巻 21(9)
2. 論文標題 Involvement of Senescence and Mitochondrial Fission in Endothelial Cell Pro-Inflammatory Phenotype Induced by Angiotensin II	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 E3112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21093112.	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 Jemal L, Miyao M, Hamayasu H, Minami H, Abiru H, Baba S, Osamura T, Tamaki K, Kotani H.	4. 巻 21
2. 論文標題 Fatal Mumps Myocarditis Associated With Left Ventricular Non-Compaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Case Reports	6. 最初と最後の頁 e921177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12659/AJCR.921177.	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 Miyao Masashi, Kawai Chihiro, Kotani Hirokazu, Minami Hirozo, Abiru Hitoshi, Hamayasu Hideki, Yamamoto Akira, Tamaki Keiji	4. 巻 57
2. 論文標題 Fatal Dieulafoy lesion with IgG4-related disease: An autopsy case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 102059 ~ 102059
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2022.102059	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 Hamayasu Hideki, Miyao Masashi, Kawai Chihiro, Osamura Toshio, Yamamoto Akira, Minami Hirozo, Abiru Hitoshi, Tamaki Keiji, Kotani Hirokazu	4. 巻 12
2. 論文標題 A proof-of-concept study to construct Bayesian network decision models for supporting the categorization of sudden unexpected infant death	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-14044-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 -

1. 著者名 Miyao Masashi, Kawai Chihiro, Kotani Hirokazu, Minami Hirozo, Abiru Hitoshi, Hamayasu Hideki, Eguchi Satoru, Tamaki Keiji	4. 巻 52
2. 論文標題 Mitochondrial fission in hepatocytes as a potential therapeutic target for nonalcoholic steatohepatitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 1020 ~ 1033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13832	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 Kawai Chihiro, Miyao Masashi, Kotani Hirokazu, Minami Hirozo, Abiru Hitoshi, Hamayasu Hideki, Yamamoto Akira, Tamaki Keiji	4. 巻 60
2. 論文標題 Systemic amyloidosis with amyloid goiter: An autopsy report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 102167 ~ 102167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2022.102167	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 Chu Ming-Chieh, Morimoto Chie, Kawai Chihiro, Miyao Masashi, Tamaki Keiji	4. 巻 60
2. 論文標題 Effects of DNA degradation and genotype imputation on high-density SNP microarray in pairwise kinship analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 102158 ~ 102158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2022.102158	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16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮尾 昌, 川合千裕, 南 博蔵, 阿比留仁, 玉木敬二
2. 発表標題 ミトコンドリアダイナミクス破綻とNASH
3. 学会等名 第68回日本法医学会学術近畿地方集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮尾 昌, 川合千裕, 阿比留仁, 南 博蔵, 玉木敬二
2. 発表標題 NASH早期病態におけるミトコンドリア分裂の影響
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川合千裕, 宮尾 昌, 阿比留 仁, 南 博蔵, 曲 敏潔, 玉木敬二.
2. 発表標題 心臓振盪により突然死した青年男性の1例.
3. 学会等名 第67回日本法医学会学術近畿地方集会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮尾 昌, 川合千裕, 桜井健祥, 花村天斗, 井上花菜, 玉木敬二.
2. 発表標題 アンジオテンシン誘導性内皮老化におけるミトコンドリア分裂の寄与.
3. 学会等名 第67回日本法医学会学術近畿地方集会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮尾 昌, 小谷泰一, 濱保英樹, 阿比留 仁, 南 博蔵, 玉木敬二.
2. 発表標題 内皮細胞老化とアンジオテンシンII.
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川合千裕, 宮尾 昌, 阿比留仁, 南 博蔵, 濱保英樹, 玉木敬二.
2. 発表標題 扁桃腺炎が先行し急激に進行した劇症型心筋炎の一例.
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱保英樹, 小谷泰一, 宮尾 昌, 川合千裕, 玉木敬二
2. 発表標題 Novel Models for SIDS Diagnosis and Prediction using Bayesian Statistics.
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桜井健祥, 曲 敏潔, 花村天斗, 西岡 春, 川合千裕, 宮尾 昌, 玉木敬二
2. 発表標題 新旧PCRキットによる身元確認のための血縁鑑定結果の分析
3. 学会等名 第68回日本法医学会学術近畿地方集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱保英樹, 阿比留仁, 南 博蔵, 川合千裕, 宮尾 昌, 玉木敬二
2. 発表標題 造影剤アナフィラキシーとの関連が疑われた, 大動脈解離の1例.
3. 学会等名 第68回日本法医学会学術近畿地方集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉木敬二, 曲 敏潔, 桜井健祥, 川合千裕, 宮尾 昌, 眞鍋 翔
2. 発表標題 Incest caseにおける尤度比利用の留意点について.
3. 学会等名 第106次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮尾 昌, 川合千裕, 阿比留仁, 南 博蔵, 玉木敬二
2. 発表標題 ミトコンドリア過剰分裂に伴うNAFLDの病態進展.
3. 学会等名 第106次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川合千裕, 宮尾 昌, 阿比留仁, 南 博蔵, 玉木敬二
2. 発表標題 アミロイド甲状腺腫に伴う粘液水腫性昏睡の一部検例.
3. 学会等名 第106次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川合千裕, 宮尾 昌, 南 博蔵, 阿比留仁, 玉木敬二
2. 発表標題 受傷時期が推定できた亜急性頭部外傷例.
3. 学会等名 第44回日本法医学会学術中部地方集会・第69回日本法医学会学術近畿地方集会合同集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸井有美花, 宮尾 昌, 川合千裕, 濱保英樹, 阿比留仁, 南 博蔵, 玉木敬二
2. 発表標題 劇症化したアデノウイルス性髄膜炎の小児事例.
3. 学会等名 第44回日本法医学会学術中部地方集会・第69回日本法医学会学術近畿地方集会合同集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮尾 昌, 川合千裕, 濱保英樹, 玉木敬二.
2. 発表標題 肥満病態における肝細胞ミトコンドリア過剰分裂と肝線維化.
3. 学会等名 第44回日本法医学会学術中部地方集会・第69回日本法医学会学術近畿地方集会合同集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森本千恵, 眞鍋 翔, 川合千裕, 濱保英樹, 宮尾 昌, 玉木敬二.
2. 発表標題 不完全なSTR型に対応した血縁鑑定ソフトウェアの開発.
3. 学会等名 日本DNA多型学会第31回学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ
<http://www.fp.med.kyoto-u.ac.jp>

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