

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22165

研究課題名（和文）動物性脂質成分の相互作用による非アルコール性脂肪性肝疾患の増悪機序の解明

研究課題名（英文）Mechanism of exacerbation of nonalcoholic fatty liver disease by the interaction of animal lipid components

研究代表者

有澤 琴子 (Arisawa, Kotoko)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：00813122

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、動物性食品に多く含まれる飽和脂肪酸と酸化コレステロールの肝細胞への蓄積が、相乗的に肝障害を増悪することを培養細胞レベルで明らかにした。酸化コレステロールのうち、25-hydroxycholesterol (25-OH)は肝細胞において、飽和脂肪酸による小胞体ストレス応答を増強させ、アポトーシスを介した細胞死を亢進することが明らかになった。また、25-OHの添加により細胞内の脂肪酸不飽和度の減少が見られた。小胞体ストレスは細胞膜の飽和脂肪酸/不飽和脂肪酸比により調節されることから、25-OHの添加による膜不飽和度の変化が、脂肪毒性を増強させ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

飽和脂肪酸と酸化コレステロールは、アルコール性脂肪肝炎(NASH)の病態の肝臓において特徴的に多く見られ、またNASH患者の食嗜好性からも過剰摂取となり がちな脂質成分である。これらの脂質は、それぞれ単独では肝臓における炎症や酸化ストレス、細胞死などに寄与していることが報告されているが、肝臓に同時に存在する場合の影響については知られていなかった。本研究では、飽和脂肪酸と酸化コレステロールの肝細胞への蓄積が、相乗効果的に肝障害を増悪する可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrated at the cultured cell level that the accumulation of saturated fatty acids and oxidized cholesterol, which are abundant in animal products, in hepatocytes synergistically exacerbates liver injury. Among the oxidized cholesterol, 25-hydroxycholesterol (25-OH) was found to enhance the ER stress response induced by saturated fatty acids and cell death via apoptosis in hepatocytes. In addition, the addition of 25-OH decreased intracellular fatty acid unsaturation. Since endoplasmic reticulum stress is regulated by the saturated/unsaturated fatty acid/unsaturated fatty acid ratio of the plasma membrane, it was suggested that the change in membrane unsaturation caused by the addition of 25-OH enhanced lipotoxicity.

研究分野：脂質代謝

キーワード：酸化コレステロール 脂肪毒性 NASH 飽和脂肪酸 小胞体ストレス 生体膜

## 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、肥満や2型糖尿病に関連する生活習慣病であり、世界的な罹患率は25%にもものぼる。NAFLDの多くは予後の良好な単純性脂肪肝であるが、およそ10~20%の割合で炎症・繊維化を伴う進行性の非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に発展し、肝硬変や肝がんへ進行する可能性がある。しかし、この疾患の進行を制御する分子メカニズムについては明らかになっていない部分が多い。

近年、食事由来する「脂肪の質」とNASH発症の関連性が示唆されている。たとえば、NASHの患者は脂肪の総摂取量が多いだけでなく、食事の飽和脂肪酸、コレステロールなどの動物性脂質が健常者と比べて多いことが報告されている (Musso, *Hepatology*, 2003)。また、NASH患者の食事の嗜好性に関しては、糖質や肉類の摂取量が多く、それに相関して肝臓中の飽和脂肪酸、コレステロール含量が、単純性脂肪肝に比べて高いことが明らかになっている (Puri, *Hepatology*, 2007 & 2009)。

動物性食品に存在するコレステロールは、加工・貯蔵や調理によってラジカル的に酸化コレステロールへと変換され、我々はこのような酸化コレステロールを食事から摂取している。また、生体内におけるコレステロールの増加は、酵素反応を介して内因性の酸化コレステロールの増加を引き起こす。これらの酸化コレステロールは生体内で酸化ストレスや細胞死を引き起こすことが報告されている。高脂肪食誘導性のNASHモデルマウスは単純性脂肪肝と比べて酸化コレステロールが多いという報告からも (Serviddio, *Redox Biology*, 2016)、酸化コレステロールの肝臓への蓄積がNASHの病態進行に重要な影響を及ぼす可能性があるが、その因果関係は明確になっていない。これらの知見をふまえ、本研究では単純性脂肪肝からNASHへ進行する要因のひとつとして飽和脂肪酸と酸化コレステロールに着目した。

脂肪酸や酸化コレステロールなどの脂質成分を単独で細胞やモデル動物に与え、機能性を調べる研究は多く行われており、飽和脂肪酸と酸化コレステロールは、それぞれ単独で肝臓における炎症や酸化ストレス、細胞死などに寄与していることが報告されている。しかし、実際には食事として一度に摂取する脂質は多種にわたる。脂質に限らず、食事由来・生合成由来の様々な代謝物の変化は生体内で同時に起こっており、複数の栄養素や代謝物の相互作用を検討することは、様々な病態メカニズムの理解や、食事改善を介した生活習慣病予防において重要な知見をもたらすことが予想される。

本研究では、飽和脂肪酸の脂肪毒性に対して促進的に機能する酸化コレステロール種を網羅的に探索し、その機序を明らかにすることで、NASH患者への食事指導や、病態進行抑制に対する重要な知見を得ることができると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、飽和脂肪酸と酸化コレステロールの肝細胞への蓄積が、相互作用的に肝障害を増悪する可能性を明らかにすることを目的とした。

そのために、(1)飽和脂肪酸との相互効果により肝細胞死を促進する酸化コレステロールの探索、(2)飽和脂肪酸と酸化コレステロールの同時処理による細胞死の分子メカニズム解明の2点を研究項目とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 飽和脂肪酸毒性を促進する酸化コレステロールの探索

ヒトの生体内で合成される、あるいは食事より摂取され得る主要な酸化コレステロールをそれぞれ飽和脂肪酸とともに肝がん由来細胞株 HepG2 に添加し、飽和脂肪酸による細胞死を増悪させる酸化コレステロールを探索した。

### (2) 飽和脂肪酸と酸化コレステロールの同時処理による細胞死の分子メカニズム

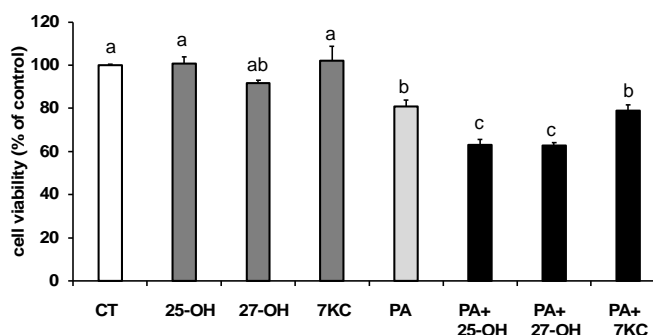
(1)において細胞死が増強した条件について、蛍光プローブおよび阻害剤を用いて細胞死形態を評価した。また、酸化ストレス、小胞体ストレスなど細胞死に影響する遺伝子発現およびタンパク質発現や細胞内局在を解析し、飽和脂肪酸との同時添加が特に大きく寄与する経路を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 飽和脂肪酸毒性を促進する酸化コレステロールの探索

ヒト肝がん由来細胞 HepG2 を用いて、飽和脂肪酸と同時添加することで細胞死を増強させる酸化コレステロールの探索を行なった。飽和脂肪酸としてパルミチン酸 150  $\mu\text{M}$  を24時間曝露すると細胞毒性を示し、細胞生存率が80%程度まで減少した (図1)。酸化コレステロールとしては、25-hydroxycholesterol (25-OH) および 27-hydroxycholesterol (27-OH)、7-ketocholesterol (7KC) を用いた。これらの酸化コレステロールを 10  $\mu\text{M}$ 、24時間 HepG2 細胞に曝露した際には細

胞死は見られなかったが、パルミチン酸と同時処理すると、25-OHと27-OHにおいて細胞生存率の低下が見られた。酸化コレステロール単独では細胞生存率の低下が見られなかったことから、酸化コレステロールは飽和脂肪酸による細胞毒性を増強することが示唆された。



**図1. 飽和脂肪酸と酸化コレステロールの同時添加による細胞死の増強効果**  
HepG2細胞にパルミチン酸を処理すると細胞死が起こり、27-OHおよび25-OHはその細胞死を増強した。  
CT; control, 25OH;25-hydroxycholesterol, 27OH; 27-hydroxycholesterol, 7KC; 7-ketocholesterol, PA; palmitate

## (2) 飽和脂肪酸と酸化コレステロールの同時処理による細胞死の分子メカニズム

以下は、主に25-OHを用いて飽和脂肪酸との共処理による細胞死の増強機序を検討した。

まず、25-OHとパルミチン酸を同時添加した場合の細胞死形態の評価を行った。脂質の添加16時間後にAnnexin V-FITC、Propidium Iodide (PI)、Hoechst 33342でHepG2細胞を共染色すると、25-OH単独ではPI陽性細胞、Annexin V陽性細胞ともわずかであったのに対して、パルミチン酸単独処理ではPI、Annexin V共に陽性の細胞が増加し、パルミチン酸と25-OHの共処理でさらに増加した。また、Caspase-3のWestern blottingを行ったところ活性型Caspase-3がパルミチン酸と25-OHの共処理でパルミチン酸単独添加と比べて増加しており、アポトーシスを介した細胞死が増強していることが示唆された。

アポトーシスの上流因子として、小胞体ストレスおよび酸化ストレスについて検討した。小胞体ストレス応答マーカーであるCHOPタンパク質発現やPERK経路で活性化されるeIF2のリン酸化は、パルミチン酸と25-OHの共処理により増加した。また、パルミチン酸と25-OHを共処理した細胞にPERK経路の阻害剤(GSK2656157)を処理することによりアポトーシスが減弱し、細胞生存率は飽和脂肪酸単独添加と同程度まで回復した。小胞体ストレス応答経路のIRE1経路は、飽和脂肪酸により活性化されるものの25-OHとの共処理では増強されなかった。

酸化ストレスの影響については、ビタミンEやN-アセチルシステイン(NAC)などの抗酸化剤処理を行ったが、細胞生存率の回復は見られなかった。

これらの結果から、25-OHによる飽和脂肪酸毒性の増加には、PERKの活性化を介した小胞体ストレス応答の増強が関与していることが明らかになった。

PERKは小胞体膜タンパク質であり、小胞体膜の流動性の低下により活性が促進されることが報告されている。酸化コレステロールは、内因性の脂質代謝において重要な転写因子であるLXRのリガンドとして知られており、細胞内のコレステロール合成や脂肪酸合成などの脂質代謝に影響を与える可能性がある。このことから、25-OHによる細胞内の脂質代謝の変化が小胞体膜の流動性を調節する可能性を検討した。検討の結果、25-OHを細胞に添加すると飽和脂肪酸の有無にかかわらず、LXR下流のSCD-1(Stearoyl-CoA desaturase 1)の遺伝子発現の減少が見られた。また、細胞内の脂肪酸組成をGC-MSで測定したところ、25-OHとパルミチン酸の同時処理によって、不飽和脂肪酸/飽和脂肪酸比が減少することがわかった。さらに、意外なことにパルミチン酸の添加により25-OHの細胞内蓄積が増加するという結果が得られた。これらの脂質組成の変化は生体膜の流動性を低下させる可能性があることから、飽和脂肪酸と25-OHの同時添加によるPERK経路の活性化には、生体内脂質の代謝変化が影響していることが示唆された。

本研究期間内では小胞体膜の分画までは至らず、今回見られた脂質の変化が、実際に小胞体膜の脂質組成変化にどの程度寄与しているかという点については明らかにすることはできていない。今後、小胞体膜脂質組成の解析と共に、膜の流動性についても蛍光プローブを用いて評価を行う予定である。

以上の結果より、本研究では飽和脂肪酸と酸化コレステロール(25-OH、27-OH)の肝細胞への蓄積は、相乗効果的に肝障害を増悪する可能性を明らかにした。また、その細胞死経路には小胞体ストレス応答が関与し、細胞内の脂質組成の変化が、小胞体ストレスの増強に関与する可能性が示唆された。この結果は、複数の脂質成分が相乗的に肝障害を悪化させるという仮説を支持するものである。本研究をさらに発展させ、肝障害の悪化にかかわる脂質成分の組み合わせを探索することで、NASHをはじめとした肝疾患の発症メカニズム解明や治療・食生活改善による予防などに貢献できると期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有澤琴子、山田安香音、岸本真弥、藤原葉子、市 育代
2. 発表標題 25-hydroxycholesterolは肝細胞における飽和脂肪酸毒性を増強させる
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度仙台大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 石井淑夫（分担執筆：有澤琴子、市育代）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 テクノシステム	5. 総ページ数 618
3. 書名 脂質・脂肪酸関連物質の使いこなし方 - 素材開発・機能創生・応用技術 -	

〔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
---------	---------