

機関番号：21601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21790678

研究課題名 (和文) 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 病態における性ホルモンの影響の解析

研究課題名 (英文) Effects of sex hormones on the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH)

研究代表者

高橋 敦史 (TAKAHASHI ATSUSHI)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40404868

研究成果の概要 (和文)：非アルコール性脂肪肝疾患患者では末梢血単核球のエストロゲンレセプター-GPR30 の発現が健常人に比し有意に増加し、エストロゲンレセプター (ER) α の発現が肝のインスリン抵抗性を反映するレプチンや体重指数 (BMI) と正の相関を認めた。一方、卵巣摘出マウスでは高脂肪食により肝脂肪化、インスリン抵抗性、肝酵素 ALT の上昇を認めた。以上より、エストロゲンレセプターの発現やエストロゲン欠乏が非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 病態に関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)： The expression of messenger RNA for G-protein-coupled receptor 30 (GPR30) was significantly increased in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with NAFLD compared with PBMC from healthy controls. Other, there was a positive correlation between estrogen receptor (ER) α and the levels of leptin. Moreover, positive correlation was observed between ER α and body mass index. On the other hand, ovariectomized mice were predisposed to liver steatosis, insulin resistance and elevation of ALT by high-fat diet. These results indicated that estrogen receptor expression and lack of estrogen might contribute to the pathogenesis of NASH.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：NASH、性差、エストロゲン、エストロゲンレセプター

1. 研究開始当初の背景

アルコール以外の原因で肝臓に脂肪沈着を来すNAFLDには、単純性脂肪肝とNASHが含まれる。NASHはNAFLDの1割を占めるとされ、肝臓に脂肪が沈着した後、酸化ストレスやサイトカインなどの因子により壊死炎症性変化を来し線維化が進行し、肝

硬変に進行後に肝細胞癌を発症し得る疾患である。NASHの発症進展形式にはインスリン抵抗性による肝脂肪変性 (1st hit) に酸化ストレス、TNF α 、エンドトキシンなどの障害 (2nd hit) が加わって発症すると想定されている (two hit theory)。

女性では閉経後に発症頻度が高いことか

ら、エストロゲンなどの女性ホルモンが NASH の病態形成に関与していることが推定される。健常人でも閉経後の女性の方が TNF α の血中濃度が高かったり (Menopause 14:835-40, 2007)、エストロゲンレセプター α の欠損マウスはインスリン抵抗性を示す (Proc Natl Acad Sci USA 97: 12729-34, 2000) ことが明らかとなっており、エストロゲン減少やレセプター異常が NASH 発症に関与することが想定される。

しかし、一方で閉経前の NAFLD 患者で ALT 値が高くエストロゲン自体が NASH を進める可能性も指摘され (Hepatogastroenterology 54:224-8, 2007)、エストロゲンレセプターモジュレーター投与により発症した NASH 患者が報告される (Intern Med 46:57-81, 2007) など、NASH の病態にエストロゲンやエストロゲンレセプターがどのように関与するのか不明である。

2. 研究の目的

NAFLD や NASH の病態形成におけるエストロゲン及びエストロゲンレセプターの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

I. NAFLD におけるエストロゲンレセプターの検討: NAFLD 患者 31 名 (男 16 名、女 15 名 平均年齢 54.5 歳) および健常人 44 名 (男 22 名、女 22 名 平均年齢 41.7 歳) を対象とし、リンポプレップにて末梢血単核球を分離し RNA を抽出後、ER α 、 β 、エストロゲンの細胞膜受容体である G-protein-coupled receptor 30 (GPR30) の mRNA の発現量を real time PCR 法により測定し比較検討した。NAFLD 患者においては、mRNA 発現量と臨床検査成績 (ALT、 γ -GTP、TC、HOMA-IR、レプチン、アディポネクチン、TNF α) ならびに BMI との相関の有無について検討した。

II. モデルマウスを用いた NAFLD におけるエストロゲンの影響の検討: 8 週齢の C57BL/6J マウス (雌性) を卵巣摘出の有無と給餌内容から以下の 4 群に分類した。A 群: 卵巣摘出+高脂肪食、B 群: 卵巣摘出+通常食、C 群: 卵巣未摘出+高脂肪食、D 群: 卵巣未摘出+通常食。各群において食事開始から 8 週の時点における血液検査所見 (ALT、LDL-C、Fe、空腹時血糖 (FBS)、空腹時インスリン (Ins)、HOMA-IR)、肝組織所見及び肝組織における collagen I の mRNA 発現を比較検討した。肝組織については脂肪化、炎症、線維化、肝細胞傷害の 4 項目でスコアリングを行い検討した。

4. 研究成果

I. NAFLD におけるエストロゲンレセプターの検討: NAFLD 患者における ER α 、ER β 及

び GPR30 の mRNA 発現量はいずれも男女間で有意差を認めなかった。健常人との比較では ER α 0.77 倍、ER β 1.22 倍および GPR30 が 4.79 倍と NAFLD 患者では GPR30 が健常人に比し有意に発現量が多かった。(図 1)

Expression index

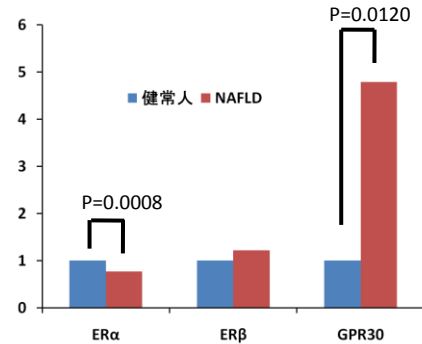


図 1

ER 発現量と臨床検査成績との相関では ER α とレプチン間で相関係数 0.589、p 値 0.0427 と正の相関を認め、ER α は BMI とも相関係数 0.632、p 値 0.025 と正の相関を認めた。その他 ALT、ALT、 γ -GTP、TC、HOMA-IR、アディポネクチン、TNF α と ER 発現量との間に有意な相関は認めなかった。ER β では ER α と相関係数 0.890、p 値 <0.0001 と正の相関を認めたのみであった。(表 1. 2)

検討項目		A vs B	
A vs B		p 値	相関係数
ER α	ALT	0.5727	0.186
ER α	γ GTP	0.7448	0.108
ER α	TC	0.2737	-0.349
ER α	HOMA-IR	0.9850	0.006
ER α	leptin	0.0427	0.589
ER α	adiponectin	0.8871	-0.417
ER α	TNF α	0.5690	-0.188
ER α	BMI	0.0256	0.632
ER α	ER β	<0.0001	0.890
ER α	GPR30	0.9008	-0.042

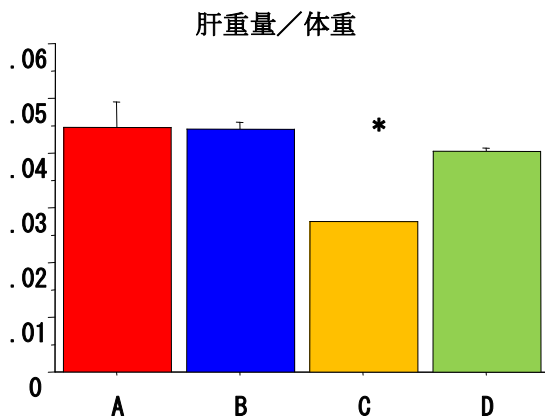
表 1

検討項目		A vs B	
A vs B		p 値	相関係数
ER β	ALT	0.5229	0.210
ER β	γ GTP	0.7437	0.109
ER β	TC	0.1218	-0.474
ER β	HOMA-IR	0.8326	0.070
ER β	leptin	0.2215	0.386
ER β	adiponectin	0.4536	-0.245
ER β	TNF α	0.8559	-0.060
ER β	BMI	0.1552	0.441
ER β	ER α	<0.0001	0.890
ER β	GPR30	0.5573	0.193

表 2

以上より、NAFLD 群は健常人に比し GPR30 の発現量が有意に増加し、ER α の発現量が健常人と比し低下傾向を示したことから、ER の発現が NAFLD の病態に関与していること示唆された。さらに、ER α の発現量がレプチンや BMI と正の相関があり、NAFLD の背景として重要とされる肥満と ER α 発現が関与している可能性が考えられた。NAFLD の病態形成に ER 発現が関与していることが明らかとなった。今後症例を蓄積し、NASH と単純性脂肪肝での ER 発現量の比較や NASH の 2nd hit への ER の関与についての検討する必要がある。

II. モデルマウスを用いた NAFLD におけるエストロゲンの影響の検討：マウスは A 群で他群より体重、肝重量が増加しており、肝体重比で C 群と比較し A 群で体重当たりの肝重量が有意に増加していた。(図 2) 血液検査成績は ALT (A; 80.0 \pm 23.3 B; 24.0 \pm 3.6 C; 32.7 \pm 12.5 D; 30.0 \pm 4.9) LDL-C (A; 14.0 \pm 2.2 B; 8.7 \pm 1.6 C; 9.3 \pm 3.3 D; 6.0 \pm 2.2) FBS (A; 317.0 \pm 68.4 B; 210.0 \pm 25.7 C; 242.8 \pm 31.4 D; 163.7 \pm 29.7) Ins (A; 22.2 \pm 8.4 B; 6.5 \pm 2.7 C; 9.4 \pm 2.7 D; 3.3 \pm 0.6)、HOMA (A; 41.6 \pm 25.1 B; 5.6 \pm 1.8 C; 9.6 \pm 3.4 D; 2.2 \pm 0.5) で ALT、FBS、Ins、HOMA が A 群で他 3 群に比べ有意に上昇していた。(図 3)



* P<0.05 versus group A

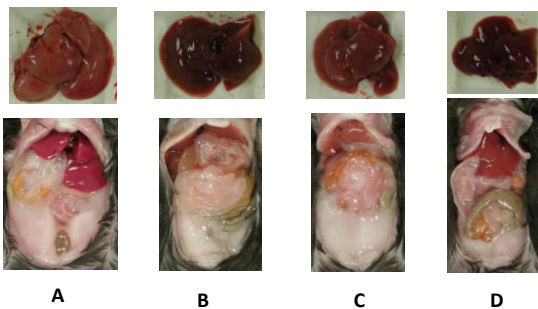
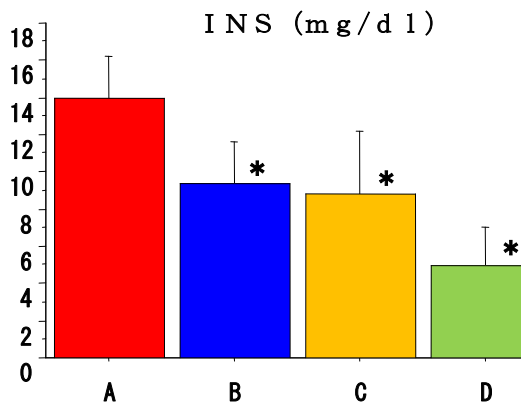
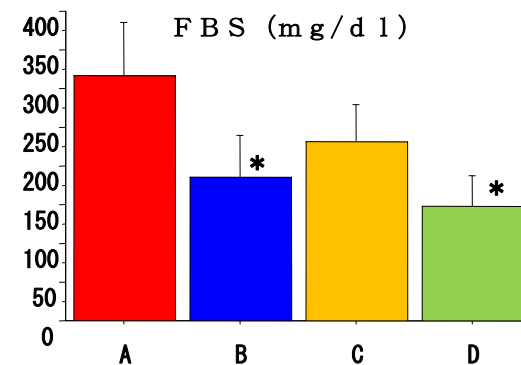
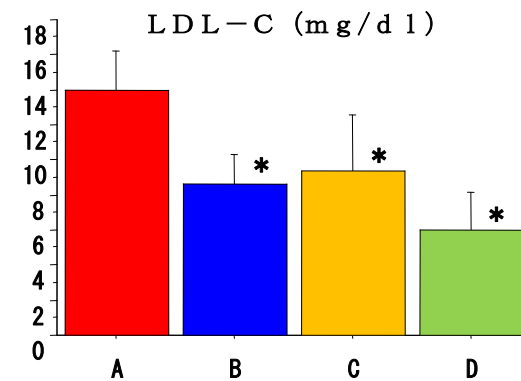
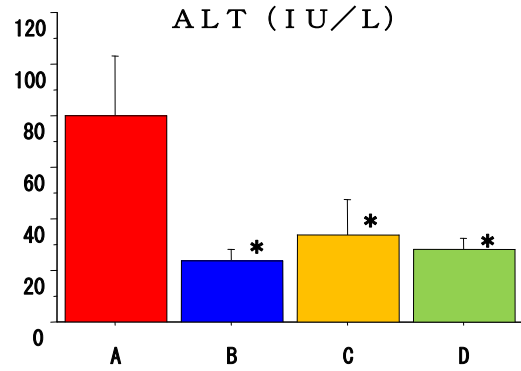


図 2



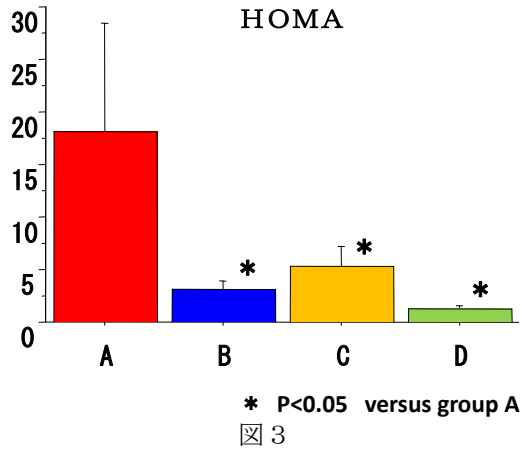
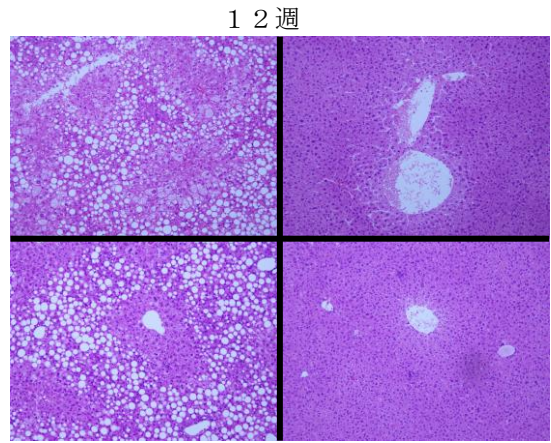


図 3

肝組織では4週時点ではA群で他群よりも顕著となり、8週時点でもほぼ同じ状態であったが12週の時点ではC群でも脂肪化が顕著となった。しかし、A群の方が肝細胞風船化変性も著しく肝組織スコアでも他群に比べA群高かった。(図4) また、肝組織での肝線維化の程度は各群で差異を認めなかったものの、12週時点での collagen I mRNA の発現はD群に比しA群で7.8倍、B群で3.7倍、C群で3.2倍でありA群で特に発現が増加していた。(図5)



A	B
C	D

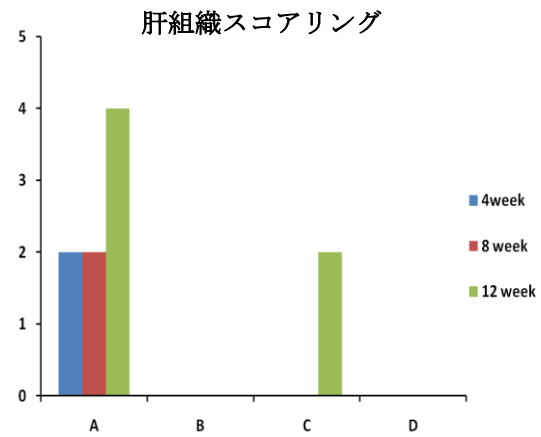


図 4

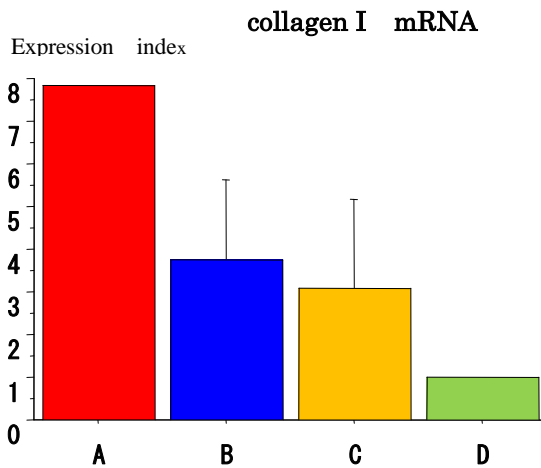
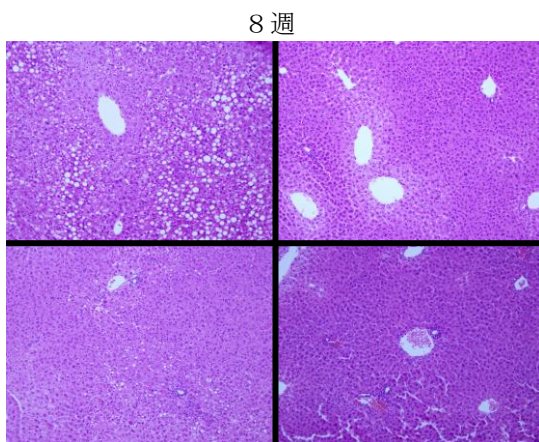
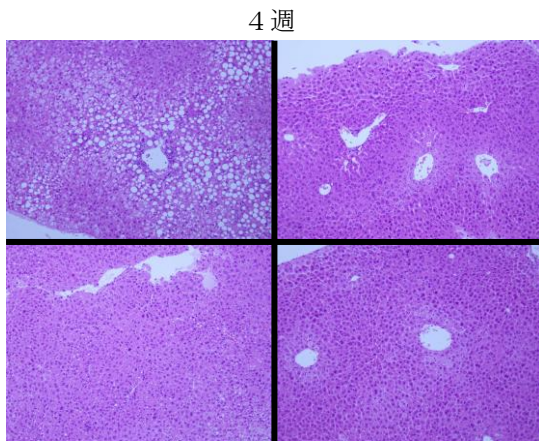


図 5

以上より卵巣摘出マウスへの高脂肪食付加により肝脂肪化と AST 上昇、インスリン抵抗性の増強、さらに肝線維化遺伝子発現の上昇を認めたことから、女性ホルモンの欠如が NASH の病態に強く影響していることが確認できた。

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)

[学会発表] (計 3 件)

①高橋 敦史、NASH 病態における女性ホルモンの影響の解析、第 38 回日本肝臓学会東部会、平成 22 年 12 月 2 日、東京

②TAKAHASHI ATSUSHI, Estrogen deficiency plays a role in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). NASH2010 The 9th JSH Single Topic Conference, 平成 22 年 11 月 18 日、東京

③高橋 敦史、非アルコール性脂肪肝疾患におけるエストロゲンレセプターの検討、第 46 回日本肝臓病学会総会、平成 22 年 5 月 28 日、山形

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 敦史 (TAKAHASHI ATSUSHI)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40404868

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし