

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790543

研究課題名（和文）細胞内コレステロール動態を標的とした NASH 発症の遺伝的・後天的要因の解明

研究課題名（英文）Genetic and epigenetic differences in cholesterol kinetics in relation to NASH development between SHRSP and SHRSP5/Dmcr rat

研究代表者

内藤 久雄 (NAITO HISAO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90547556

研究成果の概要（和文）：高脂肪・高コレステロール飼料を摂取させることにより、短期間に肝線維化を発症させるラット(SHRSP5/Dmcr)とその系統元の SHRSP を比較し、肝線維化発症の分子メカニズムを解析した。その結果、肝線維化は SHRSP5/Dmcr 群で重度に認められ、同時にコレステロールの代謝産物である胆汁酸を胆管に排泄する輸送体 BSEP の発現低下及び血中排泄輸送蛋白 MRP3 の発現増加が SHRSP5/Dmcr 群でのみ認められた。このことから、細胞毒性のある胆汁酸が肝臓内に蓄積し、肝細胞壊死を経て肝線維化発症につながったことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study aims to clarify the differences in molecular mechanisms of the cholesterol and bile acid kinetics in the progression of high fat-cholesterol diet (HFC)-induced steatohepatitis and fibrosis between SHRSP5/Dmcr and SHRSP rats. In the result, SHRSP5/Dmcr may be more susceptible to liver fibrosis than SHRSP, which may be resulted from the higher intracellular accumulation of cytotoxic bile acid by decreased BSEP expression, though increased MRP3.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：肝線維化、非アルコール性脂肪性肝疾患、コレステロール、胆汁酸、

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の 1 つの表現型である非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は、単純性脂肪肝から肝炎・線維化・肝硬変へ進展する疾患であり高脂肪食摂取が一因であるが、その発症メカニズムは十分解明されていない。しかし、食生活の欧米化により、我が国でもその患者数は増加傾向であり、診断・予防・治療法の確立が急務となっている。

2. 研究の目的

我々の研究室では、脂肪肝・肝炎・線維化の一連の進展を短期間に経時的に追えるモデルラット(SHRSP5/Dmcr)を開発した。SHRSP5/Dmcr は脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット(SHRSP)に高脂肪・高コレステロール飼料(HFC)を与え、血中総コレステロール(TC)が高値を示すラットを継代的に兄妹交配させ確立した亜系統であるが、TC 高値のラット兄妹の交配で肝炎・線維症に進展するラットがどのように系統樹立したか不明で

ある。この研究では SHRSP5/Dmcr と k 系統元の SHRSP に HFC を与え、TC 恒常性に関与する Liver X Receptor (LXR) α を中心に両ラットの遺伝子発現量の差異を比較し、標的となる因子の差異を解明し、NASH 発症メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

10週齢の SHRSP5/Dmcr 及び SHRSP に HFC を2週間及び8週間摂取させる。また対照群として、SP (コントロール) 飼料を同週摂取させ、血液・肝臓サンプルを採取する (各群6匹)。

血液サンプルは、一般生化学検査 (AST、ALT、TC、中性脂肪 (TG)、 γ GTP) を測定。また、肝臓サンプルは、病理組織用に一部ホルマリン固定し、残りは -80°C で凍結保存した。病理組織はパラフィン固定後、切片を作成し、HE 染色及び線維化評価のため、アザン染色及びエラスチカワンギーソン染色を行い、病理評価を行った。

肝臓サンプルは、コレステロール動態に関与する遺伝子発現量を測定するために、RNA 抽出し、mRNA を定量リアルタイム PCR 法で測定した。同様に蛋白量の測定のためにホモジネートを作成し、Western Blot 法により蛋白発現量を測定した。また、肝臓内脂質の測定のために、Folch の方法により、脂質抽出後、Wako のキットを用いて、肝臓内 TC、TG を測定した。

これらを SHRSP5/Dmcr と SHRSP で比較した。

4. 研究成果

(1) 解剖時重量

SHRSP 及び SHRSP5/Dmcr ともに HFC 摂取により、体重は対照群より低かった (図1参照)。しかし、肝重量は HFC 摂取により著明に増加し、肝体重は著明に増加し、肝体重比は特に HFC8 週摂取した SHRSP5/Dmcr 群で SHRSP 群よりも有意に高かった (図2参照)。

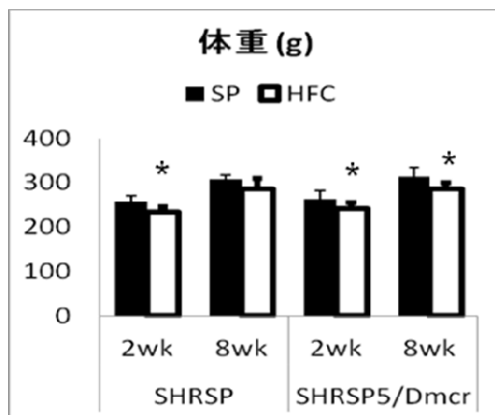


図1. 解剖時重量
*compared with SP group ($P < 0.05$)

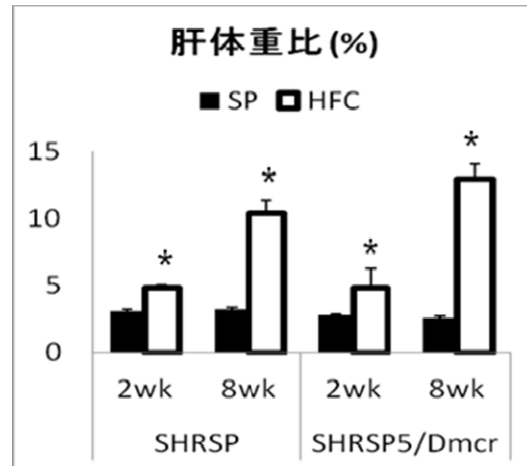


図2. 解剖時肝体重比 (%) * $P < 0.05$

(2) 血清生化学所見、肝臓内脂質量

肝機能マーカーである AST、ALT は両系統ラットとも HFC 摂取により経時的に増加した。特に ALT は HFC8 週摂取の SHRSP 群が SHRSP5/Dmcr 群よりも有意に高値を示した。血清 TC 値及び肝臓内 TC は、HFC 摂取により両系統とも増加し、HFC8 週摂取の SHRSP5/Dmcr 群は SHRSP 群よりも有意に高値を示した (図3が、肝臓内 TC は逆に SHRSP 群のほうが有意に高値を示した)。血清 TG は SP8 週摂取群以外は SHRSP5/Dmcr 群が有意に高値を示した。肝臓内 TG は HFC 摂取により増加したが、経時的には減少傾向であった。

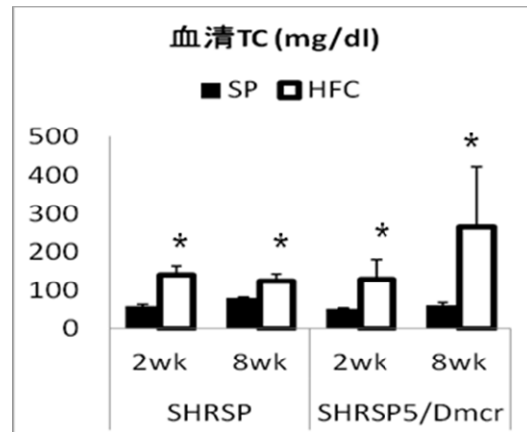


図3. 血清 TC * $P < 0.05$

(3) 病理所見

病理評価は NAFLD scoring system (NAS スコア) 及び Fibrosis scoring system を用いて解析を行った。その結果、両系統とも HFC 摂取により、著明な脂肪蓄積を認めたが、HFC8 週摂取において、SHRSP はバルーニングが大多数を占めたに対し、SHRSP5/Dmcr 群では大脂肪滴が多く認められた。また、線維化に関しても HFC2 週では線維化はほとんど認められなかったが、HFC8 週では SHRSP では軽度

に、SHRSP5/Dmcr 群では切片の 1/3 半分程度が肝細胞のほとんど認められない線維化領域となっていた。共通点として、肝臓の背側部（後腹膜側に線維化領域が多く認められ、総じて辺縁部（肝臓表面）に著明な線維化領域を認めた。

(4) 遺伝子・蛋白解析

① コレステロール動態

研究の焦点であった、コレステロール動態に関与する制御因子 LXR α 、取込 LDL-R、排出 ABCA1、MTP、合成 HMGCoA reductas、代謝（異化） CYP7A1 などの mRNA 発現量には両系統に差はほとんど認められなかった。脂質代謝に関与する核内受容体 PPAR α も同様に差は認められなかった。

② 胆汁酸動態

そこでコレステロールの異化産物である胆汁酸動態に関与する遺伝子・蛋白発現量の解析を行った。その結果、HFC8 週において、胆汁酸制御因子である核内受容体 FXR は SHRSP5/Dmcr 群で有意にその発現を低下し、その標的遺伝子である胆汁酸排泄に関与する BSEP (ABCB11) もまた SHRSP5/Dmcr 群で有意に発現低下を示した (図 4 参照)。さらに、ビリルビンの胆管排泄に関与する MRP2 は両系統とも発現が低下しており、MRP2 及び BSEP の発現が低下すると防護的に類洞側に存在する胆汁酸排泄に関与する MRP3 発現量が両系統とも増加しており、特に SHRSP5/Dmcr 群でその発現は高かった (図 5 参照)。また、胆汁酸は抱合体を形成して、胆管及び血中に排泄されることが知られており、それらに関与する遺伝子群を解析したところ、制御因子である核内受容体 PXR、CAR の発現量は SHRSP5/Dmcr 群でのみ有意に低下しており、グルクロン酸抱合に関与する UGT 活性 (UGT1A6 活性) を HPLC により測定したところ、これもまた HFC8 週摂取の SHRSP5/Dmcr 群でのみ有意に低下していた。

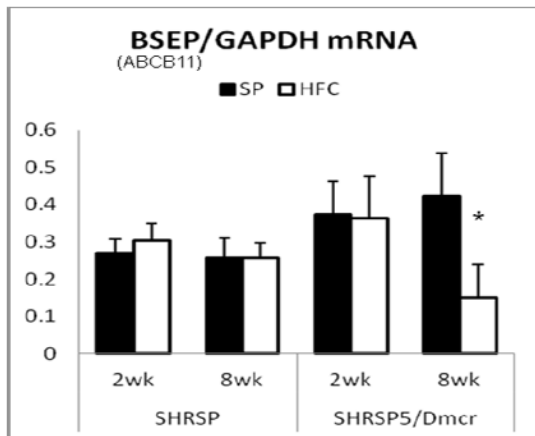


図 4. BSEP mRNA 発現量

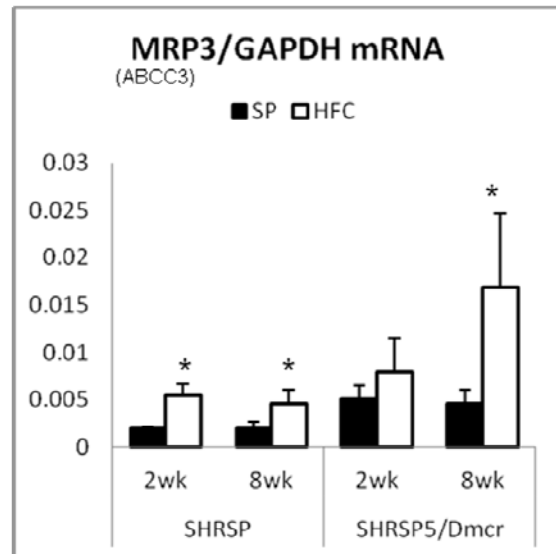


図 5. MRP3 mRNA 発現量

(5) 免疫組織学的染色

線維化局在と胆汁酸排泄との関連性を調査するために、MRP3 蛋白の免疫組織学的染色を行った。MRP3 は、前述の通り、胆汁酸の胆管排泄が滞ると防護的に増加する蛋白である。その結果、HFC8 週摂取した SHRSP5/Dmcr の肝臓切片の維化密集部位に MRP3 蛋白が強く発現していた。

(6) 考察

SHRSP5/Dmcr は HFC 摂取により、高度な線維化を認めた。この原因は当初のコレステロールの細胞内動態ではなく、コレステロールの異化産物である胆汁酸動態の異常であることが考えられた。すなわち、コレステロール動態に関与する遺伝子群に両系統間で差が認められなかった点、肝臓内 TC 値は線維化が軽度であった SHRSP 群が高度な線維化を認めた SHRSP5/Dmcr 群よりも高値を示した点からもコレステロールの毒性自体は線維化発症にそれほど多くは関与していないことが示唆されたからである。

また、胆管への胆汁酸排泄低下や胆汁酸の解毒に関与する抱合活性の低下は、細胞内に胆汁酸を蓄積させ、濃度上昇とともにその毒性が強く発現し、壊死を誘導したことが考えられた。その結果として大脂肪滴が増加し、肝線維化の発症につながったと考えられた。このことは、MRP3 蛋白発現と線維化密集部位の一致からもその関連性は強く示唆された。

次に HFC 摂取により両系統ラットともに線維化量に違いがあるが、肝臓表面にあたる辺縁部を中心に線維化密集部位が存在していたことは、胆汁酸がその部位に蓄積しやすかったことが考えられた。すなわち、細胞のブルーニングにより、毛細胆管や類洞が圧

迫・閉塞されやすく、胆汁酸が蓄積しやすかったのではないかということが考えられた。特に両系統ラットとも HFC8 週摂取により、肝臓重量が SP 群の 3~5 倍程度に増加していたことからその関連性は強く考えられた。また、ヒトにおいても脂肪肝・肝炎の患者では肝臓は CT 画像などで腫大化しているが、肝硬変になると委縮し、肝臓表面は硬くなることが知られており、これらの所見と一致する。

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 9 件)

- ① Jia X, Naito H, Yetti H, Tamada H, Kitamori K, Hayashi Y, Yamagishi N, Wang D, Yanagiba Y, Ito Y, Wang J, Tanaka N, Ikeda K, Yamori Y, Nakajima T. Modulation of hepatic adenosine triphosphate and inflammation by eicosapentaenoic acid under severe fibrosis progression in SHRSP5/Dmcr. Life Sci. 査読有 2012 in press
- ② Moriya T, Kitamori K, Naito H, Yanagiba Y, Ito Y, Yamagishi N, Tamada H, Jia X, Tsuchikura S, Ikeda K, Yamori Y, Nakajima T. Simultaneous changes in high-fat and high-cholesterol diet-induced steatohepatitis and severe fibrosis and those underlying molecular mechanisms in novel SHRSP5/Dmcr rat. Environ Health Prev Med. 査読有 2012 Mar 11. [Epub ahead of print]
- ③ Kitamori K, Naito H, Tamada H, Kobayashi M, Miyazawa D, Yasui Y, Sonoda K, Tsuchikura S, Yasui N, Ikeda K, Moriya T, Yamori Y, Nakajima T. Development of novel rat model for high-fat and high-cholesterol diet-induced steatohepatitis and severe fibrosis progression in SHRSP5/Dmcr. Environ Health Prev Med. 査読有 2011 Aug 19. [Epub ahead of print]

[学会発表] (計 28 件)

- ① 内藤久雄、高脂肪食摂取による 2 系統ラットの線維化進展の差は各々の胆汁酸排泄の違いと関連する、第 82 回日本衛生学会学術総会、2012/3/25、京都大学
- ② 内藤久雄、2 系統のラットを用いた高脂肪食による肝炎・線維化進展に関連する

コレステロール・胆汁酸動態の解析、第 84 回日本産業衛生学会学術総会、2011/5/18、東京都立産業貿易センター浜松町館

- ③ 内藤久雄、高脂肪食によるコレステロール・胆汁酸の体内動態変化と肝線維化進展への影響、第 81 回日本衛生学会学術総会、2011/3/26、要旨集
- ④ Yetti H, Apoptosis and necrosis in relation to liver fibrosis in SHRSP5/Dmcr rats fed high-fat-cholesterol (HFC) diet and EPA effects. 第 10 回分子予防環境医学研究会、2011/1/22、京都府立医科大学医学部旧図書館棟 3 階講堂
- ⑤ Naito H、Differential Response to High-fat and High-cholesterol Diet-induced Hepatic Fibrogenesis in SHRSP5/Dmcr and SHRSP Rats. The Nine JSH Single Topic Conference NASH 2010、2010/11/18-19、Grand Prince Hotel Takanawa
- ⑥ 内藤久雄、2 系統のラットを用いた高脂肪食による肝炎・線維化進展に関連するコレステロール・胆汁酸動態の解析、平成 22 年度日本産業衛生学会東海地方学会、2010/11/13、浜松医科大学
- ⑦ 柳場由絵、高脂肪食による肝炎・線維化進展におけるコレステロール・胆汁酸の合成・代謝・排泄に関わる核内受容体及び薬物トランスポーターの発現低下、第 83 回日本産業衛生学会、2010/5/26-28、フェニックス・プラザ (福井)
- ⑧ 内藤久雄、高脂肪食によるコレステロール・胆汁酸の体内動態変化と肝線維化進展への影響、第 80 回日本衛生学会学術総会、2010/5/11、仙台国際センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 久雄 (NAITO HISAO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90547556