

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 06 月 01 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790814

研究課題名（和文）脂肪性肝炎（NASH）の病態形成におけるリポドラフトの役割の解明

研究課題名（英文）Role of lipid raft on palmitic acid induced-cell death in primary-cultured mouse hepatocytes

研究代表者

内山 明（UCHIYAMA AKIRA）

順天堂大学・医学部・消化器内科 助教

研究者番号：60529254

研究成果の概要（和文）：

本研究で我々は NASH の発症過程において、リポドラフトの役割を明らかにするために、飽和脂肪酸負荷によるリポドラフトの形態変化と酸化ストレス応答性の変化について検討した。PA で前処置した肝細胞内に有意に脂肪滴の増加を認めた ($p < 0.01$)。また、PA 負荷によりリポドラフトのクラスター化率は対照群 $23.5 \pm 4.7\%$ に対し PA 群では $36.8 \pm 2.5\%$ と有意に増加した ($p < 0.05$)。PA で前処置した肝細胞は極低濃度 ($25 \mu\text{M}$) の *t*-BuOOH 負荷で細胞死 ($75.5 \pm 8.6\%$; $p < 0.01$) が惹起され、酸化ストレス応答性の亢進が示唆された。一方、PA 負荷された肝細胞で *t*-BuOOH 投与前に CHOX で処置すると、この細胞死は有意に抑制された ($56.9 \pm 7.5\%$; $p < 0.05$)。一方、高濃度 ($100 \mu\text{M}$) の *t*-BuOOH 負荷による細胞死は CHOX で抑制されず、CHOX の細胞死抑制効果は *t*-BuOOH の毒性を抑制したものではないことが示された。遊離脂肪酸負荷による細胞膜上のリポドラフトの形態変化が、肝細胞の酸化ストレス応答性の亢進および細胞死に参与している基礎的データを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Excessive saturated free fatty acid (sFFA) causes hepatic steatosis and injury, which explains in part the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Lipid raft, the plasma membrane subdomain that contains high concentration of cholesterol and glycosphingolipids, is involved in a variety of cellular signal transduction processes. In this study, we investigated the impact of sFFA on structure formation of lipid raft, and oxidative stress-induced cell injury in isolated hepatocytes. PA elicits lipid accumulation and sensitization to oxidative stress-induced cell death in isolated hepatocytes. This process appears to be closely related to the clusterization of lipid raft, and blockade of this phenomenon by CHOX prevents oxidative cell killing in PA-pretreated hepatocytes. Lipid raft most likely plays a pivotal role in oxidative stress-related cell injury in fat-loaded hepatocytes, which provides a potential unique target for the prevention and treatment of NASH.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：消化器内科

科研費の分科・細目：肝臓

キーワード：リポドラフト、脂肪性肝炎、酸化ストレス、

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景近年、メタボリックシンドロームに伴う肝病変としての非アルコール性脂肪肝炎（NASH）が注目されている。NASHの発症プロセスにおいては、肝脂肪化に伴う脂肪酸酸化やミトコンドリア機能異常などに起因する活性酸素種（ROS）の増大が重要であると考えられている。しかし、いまだに酸化ストレスをターゲットにしたNASHの治療法で確立されたものはなく、NASHの病態におけるインスリン抵抗性の関与を解明し、酸化ストレスをターゲットにした治療法を見出すことは極めて重要な課題である。コレステロールやリン脂質などの脂質は細胞膜の構成成分であり、過剰な脂質酸化は肝細胞機能障害の原因となる。リポドラフトは細胞膜上に存在するスフィンゴ糖脂質やコレステロールに富んだ脂質マイクロドメインで、これまでに好中球やマクロファージの遊走・貪食・ラジカル産生のプロセスに重要な役割を果たしていることが報告されている。最近になってリポドラフトがインスリンレセプターの足場を形成し、そこに含まれる脂質組成の変化がインスリン受容体の細胞膜上での形態を変化させ、インスリン抵抗性をもたらすことが脂肪細胞を用いて示されている。肝臓においても、Niemann-Pick type C1ノックアウトマウスの肝細胞内のコレステロールおよびスフィンゴ脂質の蓄積に伴いインスリン抵抗性の発現を認めることから、肝細胞においてもリポドラフトの異常がインスリン抵抗性のメカニズムに関与している可能性がある。さらに近年、エタノール暴露に伴う肝細胞内のROSの産生とリポドラフトの関与が報告されている。以上の事象より、脂質代謝異常によるリポドラフトの変性がインスリン抵抗性・酸化ストレス応答

性の亢進を介してNASHの発症・進展に関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、脂肪代謝異常を背景として肝細胞膜上のリポドラフトの変性がROSの感受性の亢進をもたらし、脂肪性肝炎などの病態増悪に関与する仮説を立て、肝細胞膜上のリポドラフトの変性に伴う酸化ストレス応答性および鉄イオンの肝細胞内動態の変化について *in vitro* および *in vivo* の両面から解析を行う。①インスリン抵抗性の病態における肝細胞膜上のリポドラフトの変性を明らかにする。②脂質負荷による肝細胞膜上のリポドラフトの変化を検討し、酸化ストレス応答性への影響を検討する。③リポドラフトの変性による肝細胞内の鉄イオンの動態と細胞死への影響を評価する。④リポドラフトの変性により生じたミトコンドリア機能異常やアポトーシスについて検討する。

3. 研究の方法

C57BL/6 雄性マウスより単離した初代培養肝細胞の系を用いた。

1) 一部の肝細胞は飽和脂肪酸（パルミチン酸；PA 6 mM）を培養液中に添加した。肝細胞内の脂肪沈着を Oil Red O 染色で可視化し、マイクロプレートリーダーを用いて定量した。

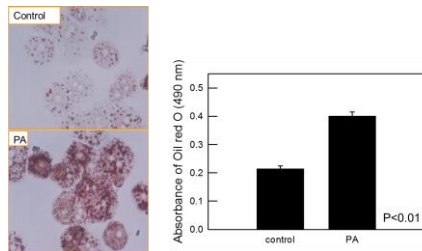
2) 一部の肝細胞は cholesterol oxidase（CHOX; 0.1U）の前処置により細胞膜上のコレステロールを除去した。Propidium iodide で染色し、*tert*-butylhydroperoxide（*t*-BuOOH; 25-100 μ M）を添加してラジカルを誘導し、蛍光増強をマイクロプレートリーダーで経時的に測定して肝細胞死を評価し

た。

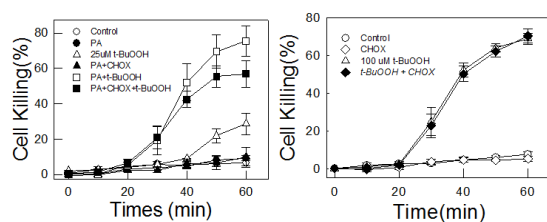
3) リピドラフト内を可視化するためにスフィンゴ糖脂質 (GM1) の免疫細胞染色を行い、リピドラフトの形態変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察しクラスター化率を算出した。

4. 研究成果

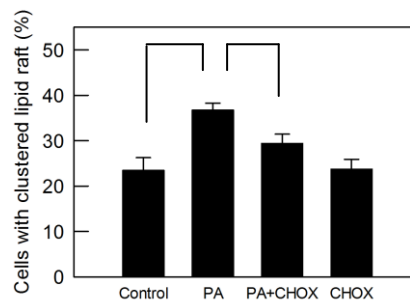
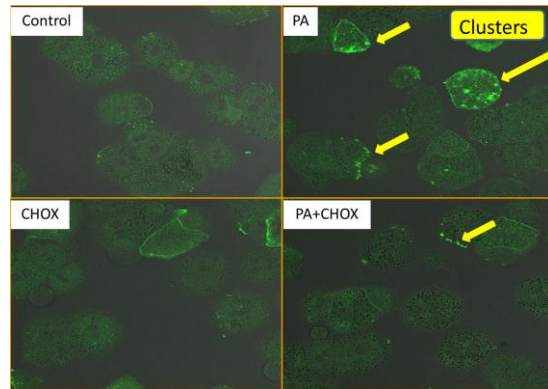
1) PA で前処置した肝細胞内に有意に脂肪滴の増加を認めた ($p < 0.01$)。



2) PA で前処置した肝細胞は極低濃度 ($25 \mu\text{M}$) の *t*-BuOOH 負荷で細胞死 ($75.5 \pm 8.6\%$; $p < 0.01$) が惹起され、酸化ストレス応答性の亢進が示唆された。一方、PA 負荷された肝細胞で *t*-BuOOH 投与前に CHOX で処置すると、この細胞死は有意に抑制された ($56.9 \pm 7.5\%$; $p < 0.05$)。一方、高濃度 ($100 \mu\text{M}$) の *t*-BuOOH 負荷による細胞死は CHOX で抑制されず、CHOX の細胞死抑制効果は *t*-BuOOH の毒性を抑制したものではないことが示された。



3) また、PA 負荷によりリピドラフトのクラスター化率は対照群 $23.5 \pm 4.7\%$ に対し PA 群では $36.8 \pm 2.5\%$ と有意に増加した ($p < 0.05$)。



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 0 件)

【非アルコール性脂肪性肝疾患】 メタボリック症候群と非アルコール性脂肪性肝疾患

[学会発表] (計 2 件)

① Role of lipid raft on palmitic acid induced-cell death in primary-cultured mouse hepatocytes Akira Uchiyama, Kazuyoshi Kon, Kenichi Ikejima, Kumiko Arai, Shunhei Yamashina, Sumio Watanab アメリカ肝臓学会, The Liver Meeting® 2012, 63rd Annual Meeting of the AASLD, November 9-13, 2012, Hynes Convention Center, Boston, Massachusetts, USA

② Nicotine and cigarette smoke blunt the induction of autophagy in hepatocytes, Shunhei Yamashina,

- Kousuke Izumi, Yuka Fukuo, Akira Uchiyama, Kazuyoshi Kon, Kenichi Ikejima, Sumio Watanab, アメリカ肝臓学会, The Liver Meeting® 2012, 63rd Annual Meeting of the AASLD, November 9-13, 2012, Hynes Convention Center, Boston, Massachusetts, USA
- ③ Inhibition of endoplasmic reticulum stress by 4-phenylbutyrate prevents steatohepatitis progression and tumorigenesis in NASH-HCC model mice
Kazuyoshi Kon, Kenichi Ikejima, Akira Uchiyama, Kumiko Arai, Shunhei Yamashina, Sumio Watanab, アメリカ肝臓学会, The Liver Meeting® 2012, 63rd Annual Meeting of the AASLD, November 9-13, 2012, Hynes Convention Center, Boston, Massachusetts, USA,
- ④ Hepatic Steatosis Causes the Dysfunction of Autophagy in NAFLD Patients, Yuka Fukuo, Shunhei Yamashina, Hiroshi Sonoue, Atsushi Arakawa, Kousuke Izumi, Tomonori Aoyama, Akira Uchiyama, Kazuyoshi Kon, Satoko Suzuki, Kenichi Ikejima, Sumio Watanabe, 2013 年米国消化器病週間 (DDW 2013) May 19-21, Orlando FL, USA
- ⑤ The Expression of Autophagy-Related Proteins in Non-B Non-C Hepatocellular Carcinogenesis, Kazuyoshi Kon, Kenichi Ikejima, Akira Uchiyama, Shunhei Yamashina, Sumio Watanabe, 2013 年米国消化器病週間 (DDW 2013) May 19-21, Orlando FL, USA,
- ⑥ 飽和脂肪酸負荷によるリポドラフトの形態変化と酸化ストレス応答性の亢進。
内山 明、今 一義、山科 俊平、鈴木 聡子、池嶋 健一、渡辺純夫第 49 回日本肝臓学会総会、2013 年 6 月 7 日、京王プラザホテル、新宿・東京
- [図書] (計 3 件)
- ① 【非アルコール性脂肪性肝疾患】 メタボリック症候群と非アルコール性脂肪性肝疾患、内山 明、今 一義、渡辺 純夫、臨床検査 (0485-1420) 57 巻 4 号 Page427-431 (2013. 04)
- ② 【生活習慣と消化器疾患・治療薬】 肝硬変、肝臓、内山 明、渡辺 純夫、Medicinal2 巻 4 号 Page85-92 (2012. 04)
- ③ 【内科医が知っておくべき最新医療機器 (2)】 消化器 消化器の最近の話題 超音波による肝硬度診断 (解説/特集)、内山 明 渡辺 純夫、診断と治療 (0370-999X) 100 巻 2 号 Page237-241 (2012. 02)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 内山 明 (UCHIYAMA AKIRA)
- 順天堂大学 医学部 消化器内科
- 研究者番号 : 60529254