

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590990

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝疾患の脂質鉄代謝異常に関する新たな解析

研究課題名(英文)Analysis of dysregulated lipid and iron metabolisms in patients with nonalcoholic fatty liver disease

研究代表者

光吉 博則 (Mitsuyoshi, Hironori)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30363972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)においてGP120やFerroportinのSNPと病態との関連を解析したが、特定の関連は見いだせなかった。現在は、PNPLA3遺伝子のSNPとNAFLDの病態との関連を前向きに試験が進行中である。次に、過剰な栄養負荷によるInflammasomeの活性化とNAFLDの病態との関連を検討した。その結果、NAFLDではNLRP3 Inflammasome関連分子の発現が亢進しており、Inflammasomeの活性化によってマクロファージやクッパー細胞で産生されるIL-1 やIL-18が組織学的炎症やトランスアミナーゼ値と正に相関することが判明した。

研究成果の概要(英文)：Relationships between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of GP120 or ferroportin and NAFLD development were examined. However, no significant relationship was identified. Now, prospective studies on SNP of adiponutrin in NAFLD patients are ongoing. Subsequently, the role of inflammasomes for the pathogenesis of NAFLD was examined. The expression of NLRP3 infalmassome-related molecules was increased in the liver of NAFLD. IL-1 and IL-18 produced by NLRP3 activation in hepatic macrophages and Kupffer cells were associated with histological inflammation or serum transaminases.

研究分野：肝臓病学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) や非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) はインスリン抵抗性を基盤とするメタボリック症候群の肝臓における表現型である。Day らが提唱した NASH/NAFLD の病態進展モデルはインスリン抵抗性によって肝臓に脂肪が蓄積し (1st hit)、さらに二次的な障害因子 (2nd hit) が加わることで肝障害が進展する (Day CP, Gastroenterology 1998)。しかし、2nd hit である酸化ストレス、小胞体ストレス、炎症性サイトカインなどは同時に 1st hit にもなり得ることから、two hit model は修正が必要である。すなわち、NASH/NAFLD では種々の肝障害因子がネットワークを形成し、さらに遺伝的な要因も加わって複雑な病態が形成されていると考えられる。

(2) 本研究代表者らは NASH/NAFLD では、1) 酸化ストレスが NASH の病態進展の重要な因子であること、2) 脂肪酸酸化酵素の発現は酸化ストレスと密接に関連しているが、これらの肝発現レベルは病態の進展によって発現が低下すること、3) NASH では肝組織中の hepcidin 発現レベルが鉄の過剰蓄積の原因となり、鉄起因性の酸化ストレスを増悪させる可能性などを明らかにしてきた。しかしこれらの障害因子のみで NASH/NAFLD の病態解明は不十分であり、新たな病態進展モデルを構築する必要がある。

## 2. 研究の目的

NASH/NAFLD では高度な脂肪変性と鉄の過剰蓄積が酸化ストレスを惹起させ、肝障害の進展に重要な役割を果たしている。インスリン抵抗性は脂質代謝を障害して肝の脂肪変性を促進させるが、インスリン抵抗性のみで高度な肝脂肪蓄積を説明することは出来ない。一方、鉄代謝の恒常性維持のメカニズムに対する知見は飛躍的な進歩を遂げてきたが、いまだ NASH/NAFLD の鉄蓄積の原因は解明されていない。本研究計画ではこれまでに報告されてきた NASH/NAFLD の病態メカニズムを見直し、肝脂肪化や鉄過剰蓄積に関する新しいメカニズムを解析する。

## 3. 研究の方法

初年度は組織学的診断が確定した NASH/NAFLD 症例の PNPLA3 遺伝子型を調べる。既知の肝病態促進因子についても検討し、PNPLA3 遺伝子型が組織学的進展度に与える影響を多変量解析で明らかにする。さらに、肝生検組織の PNPLA3 の発現レベルと肝脂肪変性度や内臓脂肪面積との関連について検討し、脂肪酸代謝の動態を推定する。次年度以降は前年度の研究を継続しつつ、動物実験で鉄代謝異常を解析する。ここでは、特に鉄吸収の制御メカニズムに焦点を絞り、食事の脂肪や鉄が鉄吸収に与える影響を分子レベルで解析する。

## 4. 研究成果

(平成 24 年度) NASH/NAFLD における鉄代謝遺伝子である ferroportin の一塩基多形 (SNP) の解析を行った。Hepcidin 結合部位やその他の細胞内外ドメインの SNP を検討したが、肝病態と有意な相関関係は得られなかった。PNPLA3 の遺伝子型が肝線維化進展の独立因子であることを報告し、これを詳細に調べるため、PNPLA3 遺伝子型と肝病態の関連を前向き試験で検討することにした。一方、肝炎発症の分子メカニズムとしてマクロファージにおける Inflammasome の役割に注目し、肝生検組織における NLRP3 Inflammasome 関連分子の発現解析を行った。

(平成 25 年度)

NASH/NAFLD の解析と並行して、C 型肝炎における Inflammasome の役割を検討した。その結果、C 型肝炎の肝組織では Inflammasome 関連分子の発現が亢進しており、IL-1 $\beta$  や IL-18 の活性化が肝炎の増悪に関与していることが判明した。さらに、Inflammasome の活性化は主にマクロファージやクッパー細胞で起きていることが推測された。さらに、C 型肝炎では非実質に蓄積する鉄が肝病態を促進させることを明らかにした。

(平成 26 年度)

NASH/NAFLD を対象にした NLRP3 Inflammasome 解析では、肝組織中の発現レベルが亢進し、肝炎の程度と相関していること、Inflammasome 関連分子の発現が PNPLA3 の遺伝子型と関連している可能性があること、血清 IL-1 $\beta$  や IL-18 が肝炎の程度と相関すること、Inflammasome の活性化はクッパー細胞やマクロファージで起きていること、などを明らかにした。さらに、NASH のモデルマウスの実験では、Inflammasome 活性化阻害剤を投与することで肝炎が改善する可能性を見出した。

#### 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)

[雑誌論文](計 19 件)

1. Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Yasui K, Itoh Y. (15 人中 11 番目) Blockade of interleukin 6 signalling ameliorates systemic insulin resistance through upregulation of glucose uptake in skeletal muscle and improves hepatic steatosis in high-fat diet fed mice. *Liver Int.* 2015 35:550-61. doi: 10.1111/liv.12645. (査読あり)
2. Seko Y, Sumida Y, Mitsuyoshi H, Yasui K, Itoh Y. (14 人中 11 番目) Predictors of malignancies and overall mortality in Japanese patients with biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res.* 2014, in press. (査読あり)
3. Sumida Y, Yonei Y, Mitsuyoshi H, Yasui K, Itoh Y. (17 人中 14 番目) Lower levels of insulin-like growth factor-1 standard deviation score are associated with histological severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res.* 2014, in press. (査読あり)
4. Jo M, Yasui K, Itoh Y. (23 人中 2 番目) Efficacy and safety of sorafenib in very elderly patients aged 80 years and older with advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2014 44: 1329-1338. DOI: 10.1111/hepr.12308 (査読あり)
5. Musso G, Yasui K, Cassader M. (33 人中 32 番目) Association of Non-alcoholic Fatty Liver Disease with Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Med.* 2014 11:e1001680. doi: 10.1371/journal.pmed.1001680. eCollection 2014. (査読あり)
6. Sumida Y, Mitsuyoshi H, Yasui K, Itoh Y. (12 人中 8 番目) The 'donations for decreased ALT (D4D)' prosocial behavior incentive scheme for NAFLD patients. *J Public Health (Oxf).* 2013 Oct 6. pp. 1-6 | doi:10.1093/pubmed/fdt098. (査読あり)
7. Akazawa T, Yasui K, Mitsuyoshi H, Itoh Y, Yoshikawa T. (11 人中 7 番目) Aberrant expression of the PHF14 gene in biliary tract cancer cells. *Oncol Lett.* 2013 5:1849-1853. (査読あり)
8. Mitsuyoshi H, Yasui K, Yamaguchi K, Minami M, Okanou T, Itoh Y. (6 人中 1 番目) Pathogenic Role of Iron Deposition in Reticuloendothelial Cells during the Development of Chronic Hepatitis C. *Int J Hepatol.* 2013;2013:686420. doi: 10.1155/2013/686420. (査読あり)
9. Okada Y, Yasui K, Mitsuyoshi H, Itoh Y. (15 人中 11 番目) Rosuvastatin ameliorates high-fat and high-cholesterol diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Liver Int.* 2013 33:301-11. (査読あり)
10. Dohi O, Yasui K, Mitsuyoshi H, Arii S, Yoshikawa T. (14 人中 9 番目) Epigenetic silencing of miR-335 and its host gene MEST in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 2013 42:411-8. (査読あり)
11. Endo M, Yasui K, Mitsuyoshi H, Arii S, Yoshikawa T. (13 人中 8 番目) Alterations of the SWI/SNF chromatin remodelling

- subunit-BRG1 and BRM in hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2013 33:105-17. (査読あり)
12. Nishimura T, Yasui K, Mitsuyoshi H, Itoh Y. (14人中9番目) Prediction of a favorable clinical course in hepatitis C virus carriers with persistently normal serum alanine aminotransferase levels: A long-term follow-up study. *Hepatol Res.* 2013 43:557-62. (査読あり)
  13. Sumida Y, Yasui K, Yoshikawa T. (11人中8番目) Long-term (>=2 yr) efficacy of vitamin E for non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2013 60:1445-50. (査読あり)
  14. Gen Y, Yasui K, Nishikawa T, Yoshikawa T. (4人中2番目) SOX2 promotes tumor growth of esophageal squamous cell carcinoma through the AKT/mammalian target of rapamycin complex 1 signaling pathway. *Cancer Sci.* 2013 104:810-6. (査読あり)
  15. Yasui K, Otsuji E, Yoshikawa T. (11人中1番目) Selective accumulation of platinum and formation of platinum-DNA adducts in hepatocellular carcinoma after transarterial chemoembolization with miriplatin. *Hepatol Res.* 2013 3:1093-9. (査読あり)
  16. Shima T, Yasui K, Okanoue T. (15人中7番目) Clinicopathological features of liver injury in patients with type 2 diabetes mellitus and comparative study of histologically proven nonalcoholic fatty liver diseases with or without type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol.* 2013 48:515-25. (査読あり)
  17. Arai T, Yasui K, Kudo M. (29人中19番目) FGF3/FGF4 amplification and multiple lung metastases in responders to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2013 57:1407-15. (査読あり)
  18. Kawaguchi T, Yasui K, Matsuda F, Takeshi Okanoue. (21人中7番目) Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese. *PLoS One.* 2012 7:e38322. doi: 10.1371/journal.pone.0038322. (査読あり)
  19. Yasui K, Okanoue T. (12人中1番目) Clinical and pathological progression of non-alcoholic steatohepatitis to hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2012 42:767-73. (査読あり)
- [学会発表](計4件)
1. Hironori Mitsuyoshi, Kouichirou Yasui, et al. Distinctive pathogenic roles of iron deposition in hepatocytes and reticuloendothelial cells for the development of chronic hepatitis C. 米国肝臓学会 (AASLD) 11 Nov. 2012 Boston (USA)
  2. 光吉博則 安居幸一郎 他 C型慢性肝炎における鉄蓄積パターンの解析 第48回日本肝臓学会総会 平成24年6月7日 金沢
  3. Hironori Mitsuyoshi, Kohichiroh Yasui, et al. Activation of the inflammasome is involved in the pathogenesis of chronic hepatitis C 米国肝臓学会 (AASLD) 5 Nov. 2013 Washington (USA)
  4. 光吉博則 安居幸一郎 他 C型肝炎における inflammasome 活性化の検討 第50回日本肝臓学会総会 平成26年5月30日 東京
- [図書]  
該当なし  
[産業財産権]  
該当なし  
[その他]  
ホームページ等  
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/syokanai/>  
6. 研究組織  
(1)研究代表者  
光吉 博則 (MITSUYOSHI, Hironori)

京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：30363972

(2)研究分担者

安居 幸一郎 (YASUI, Kohichiroh)  
京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：30323695