

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590995

研究課題名(和文) エピジェネティクス制御をターゲットとした脂肪性肝炎の病態進展抑制の検討

研究課題名(英文) The new strategy of steatohepatitis targeting alteration of epigenetic regulation

研究代表者

今 一義 (Kon, Kazuyoshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30398672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪性肝炎の新規治療法を模索するため、脂肪性肝炎マウスの病態進展過程においてエピジェネティックな変化が果たす役割を、特に小胞体ストレスとの関連に着目して解析した。

運動療法は肝組織内カルニチンプールを増加させ脂質代謝不全を改善させることによって、脂質制限食による脂肪性肝炎の改善効果を促進させる可能性を示した。また、小胞体ストレスの亢進が肝組織におけるエピジェネティックな変化を誘導し、肝線維化・肝発癌の進展過程に関与していることを見出した。そして、フェニル酪酸による抗小胞体ストレス療法が病態の改善に寄与することを *vitro*、*vivo* の系で示し、新規の治療ターゲットになり得ることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To develop a new strategy of steatohepatitis to take the place of dietary and exercise treatment, we investigated the role of epigenetic alterations on the development of steatohepatitis, using mice (*in vivo* models) and primary-cultured mouse hepatocytes. In particular, we focused the relationship between endoplasmic reticulum (ER) stress and epigenetic changes in hepatocytes. First, we showed the possibility that the exercise by treadmill increased carnitine pool, followed by improving lipid metabolism and accelerating the effect of low fat diet feeding. Next, we revealed that increase of ER stress in liver induced epigenetic alteration in liver tissue, leading to hepatic fibrosis and carcinogenesis. Finally, we demonstrated that the anti-ER stress treatment with 4-phenylbutyric acid ameliorated ER stress, followed by improving steatohepatitis *in vitro* and *in vivo*.

研究分野：肝臓病学

キーワード：エピジェネティクス NASH 肝癌 化学シャペロン トランス脂肪酸 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は肝細胞の脂肪沈着に炎症・線維化を伴う進行性の疾患であることが明らかにされており、食生活の欧米化に伴い本邦における罹患率が増加傾向にあった。NASH の病態の発症進展機序は不明な点が多いが、当初からインスリン抵抗性、酸化ストレスの増加、ミトコンドリア機能障害が関与していると考えられていた。しかしその一方でインスリン抵抗性改善薬や抗酸化剤による治療は十分な効果が得られておらず、従来とは異なるアプローチによる病態改善の試みが必要であった。食事運動療法は唯一の有効性が証明されている治療法であったが、効果発現の機序に関する検討は十分になされていなかった。そこで我々は、食事運動療法による NASH の病態改善メカニズムを明らかにすることにより、NASH に対する新規治療を見出せるのではないかと考えた。

当時、ヌクレオソームを形成する DNA のメチル化修飾やコアヒストンの修飾といった、いわゆるエピジェネティックな変化によって生じる遺伝子情報の読み取りの変化と、生活習慣病の病態との関連が注目され始めていた。それまでも過食や慢性炎症が DNA メチル化、ヒストンアセチル化の変化を惹起することが報告されており、エピジェネティクス異常が肥満、インスリン抵抗性の発現に影響することが報告されていた^{1,2}。また、エピジェネティックな変化が小胞体 (ER) ストレス誘導を介してエタノールによる脂肪性肝炎の病態に寄与するという報告があった³。しかしながら、エピゲノムの変化と NASH の病態との関連は不明であった。

我々はそれまでに Agouti 遺伝子を挿入した肥満モデル動物 (KK-AY マウス) が脂肪性肝炎を自然発症し、KK-AY マウスより単離した肝細胞は C57Bl/6 マウス由来の肝細胞と比較して酸化ストレス刺激に対する応答性が亢進しており、軽度の刺激で容易に肝細胞死に至ることを明らかにしていた。さらにその背景として KK-AY マウスの肝細胞はグルタチオンが減少していることを 2010 年に報告した⁴。酸化ストレス応答性の亢進は NASH の病態進展に深く関与している可能性があり、KK-AY マウスは酸化ストレス亢進を伴う脂肪性肝炎のモデルマウスとして有用であると考えた。

2. 研究の目的

今回の計画では、脂肪性肝炎モデルマウスを用いて肝細胞の酸化ストレス応答性亢進のメカニズムと食事運動療法が病態に与える影響をエピジェネティクス制御の視点から解析し、NASH の病態解明とエピゲノム異常をターゲットとした新規治療を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

実験開始当初は KK-AY マウスに通常食を与えてモデルを作成したが、12 週齢の時点でも肝脂肪化が軽微であったため、KK-AY マウスに高脂肪食を与えて高度の脂肪肝マウスを作成した。

KK-AY マウスに高脂肪食を 8 週間摂取させた。一部のマウスでは後半 4 週間を低脂肪食に切替え、一部のマウスにはマウス用トレッドミル装置 (Excer-3/6 ラット/マウス用トレッドミル; Columbus Instruments 社) を用いて一日 1 時間の運動負荷を与えた。また、一部のマウスでは低脂肪食に切替つつ、運動負荷を加えた。

その後に行った STAM マウスを用いた検討では、STAM マウスがやせ型モデルであるため、食事運動療法は用いず、抗小胞体ストレス療法として化学シャペロンの 4 フェニル酪酸 (PBA) を用いて、連日の腹腔内投与を行った。

in vitro における脂肪毒性と ER ストレスの関連を見るため、C57Bl/6 マウスよりコラゲナーゼ還流法にて肝細胞を単離し、初代培養肝細胞の系を作成した。肝細胞に不飽和トランス脂肪酸 (エライジン酸) もしくは不飽和シス脂肪酸 (オレイン酸) を負荷して細胞質内に脂肪滴を誘導し、微量の *tert*-Butyl hydroperoxide を投与することによって軽度の酸化ストレス刺激を加え、ストレス応答性を見る実験を加えた。また、脂肪滴誘導後に PBA を培地内に添加して、小胞体ストレス抑制の影響をみた。

4. 研究成果

8 週齢の KK-AY マウスに高脂肪食を 8 週間投与した群 (HFD 群) では著明な肥満、肝体重比の増加、有意な血清 ALT 値の上昇が認められ、肝組織に著明な小滴性 + 大滴性の高度脂肪沈着が得られた。後半 4 週間を低脂肪食に切り替えて食餌制限を行った群 (LFD 群) とトレッドミル装置による運動負荷を 4 週間加えた群 (HFD+EX 群) を作成したところ、低脂肪食群では肝脂肪化、体重、肝体重比、血清 ALT 値の改善を認めたが、運動療法単独群ではそのいずれも改善しなかった。一方、食餌制限と運動負荷を共に行った群 (LFD+EX 群) では肝組織上の脂肪滴はほぼ消失し、低脂肪食群と比較してさらに有意な体重および肝体重比の低下が得られ、血清 ALT 値についても有意な減少が得られた。高度脂肪肝の病態形成機序を分子生物学的に解析したところ、HFD 群

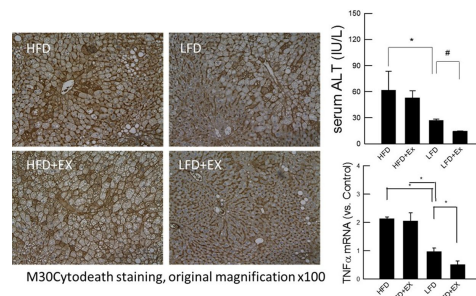
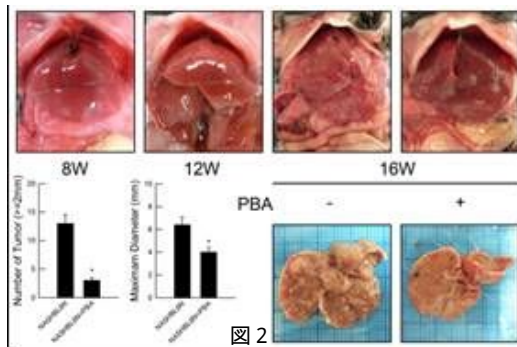


図 1

では SREBP1c および CPT1 の亢進、肝内カルニチン量の有意な減少、インスリン抵抗性の亢進、TNF の増加、肝細胞アポトーシスが生じていた(図1)。カルニチンは脂肪酸酸化に寄与する因子であることから、高脂肪食負荷によるカルニチンプール減少は相対的な脂質代謝不全を惹起する可能性が考えられた。LFD 群では SREBP1c の mRNA の抑制が得られたのに対して、肝内カルニチン量は低脂肪食摂取による改善は認められず、運動負荷によって有意な増加が得られた。よって、運動療法が肝内カルニチン量を増加させた機序は不明であるが、カルニチンプールの改善が脂肪酸酸化の亢進に寄与し、脂質代謝を改善させた可能性が考えられた。また、LFD + EX 群では LFD 群と比べてインスリン抵抗性および TNF、肝細胞アポトーシスがさらに有意に減少した。

食餌療法と運動療法の組み合わせはカルニチンを中心とした脂質代謝の調整機構の回復をもたらすことにより脂肪性肝炎の病態を改善させた可能性が考えられた。本モデルでは明らかなエピジェネティックな変化は認められず、結果的に研究テーマに全く合致するものではなかったが、新たな視点での脂肪性肝炎治療の可能性を示すことができた。

次に、より本研究のテーマに沿った研究として、後期の NASH の病態を反映したモデルとして、STAM マウスを用いた研究を試みた。STAM マウスは 12 週令で肝細胞の脂肪肝・肝細胞膨化・炎症を来してヒトの非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に酷似した病理像を呈し、16 週令で NASH に特徴的な肝細胞周囲の肝線維化を生じ、同時に多発性の肝がんを発症した。8 週令から PBA を連日投与した STAM マウスでは、肝脂肪化、肝細胞膨化、炎症のいずれもが抑制され、16 週令の時点では肝線維化および肝癌の個数・最大径のいずれをも有意に抑制した(図2)。



STAM マウスの肝組織から酸抽出した核蛋白に対してアセチル化およびメチル化ヒストン抗体を用いたウエスタンブロット法で解析したところ、12 週令の NASH-BI6N マウスの肝組織にてヒストン H3 の 27 番目のリジン残基 (H3Lys27) アセチル化の亢進を認めた。また、肝組織の蛋白を用いた実験では DNA メチル化に寄与する DNMT1 の発現が亢進していた。PBA を投与して ER ストレスの抑制を試み

たところ、H3Lys27 のアセチル化および DNMT1 の発現がいずれも有意に抑制された(図3)。

STAM マウスの肝組織における eIF2 のリン酸化および GRP78 の発現を測定したところ、いずれのマーカーも STAM マウスで亢進しており、STAM マウスの肝組織では ER ストレスが亢進していることが示された。また、PBA 投与群では eIF2 および GRP78 のいずれも STAM マウスの無治療群と比較して有意に発現が低下しており、PBA の投与によって肝組織中の ER ストレスが抑制されたことが明らかになった。

以上の事象から、ER ストレスが STAM マウスにおける脂肪性肝炎の病態進展プロセスに深く寄与している可能性が示された。また、PBA によって小胞体ストレスを抑制すると STAM マウスの肝組織中のヒストンアセチル化、DNA メチル化がいずれも抑制されたことから、脂肪性肝炎の病態進展過程における肝線維化・肝発癌に通じるエピジェネティックな変化を押さえるためには、ER ストレスの抑制が重要であるとの仮説が導き出された。

次に、肝細胞レベルの解析として、初代培養肝細胞を用いた検討を行った。C57Bl6 マウスより単離して作成した初代培養肝細胞に同濃度のオレイン酸およびエライジン酸を加えて遊離脂肪酸の質の違いによる肝細胞のストレス応答性に対する影響の相違を検討したところ、オレイン酸負荷で前処置した肝細胞死は微量の *tert*-Butyl hydroperoxide 投与後の肝細胞死が軽微であったのに対し、エライジン酸で前処置した肝細胞は同量の *tert*-Butyl hydroperoxide の添加後、速やかに肝細胞死を呈した。さらに解析を進めたところ、エライジン酸を添加して脂肪滴を形成させたマウス肝細胞では ER ストレスマーカーの eIF2 リン酸化および GRP78 の発現が亢進していることを発見し、PBA は培地に添加しても化学シャペロンとして機能して、小胞体ストレスを抑制し、酸化ストレス刺激による細胞死を有意に減少させたことが明らかになった(図4)。

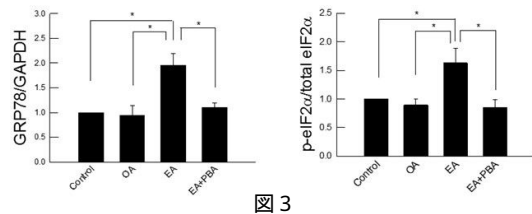


図3

研究期間全体を総括すると、KK-AY マウスに高脂肪食を摂取させた系では食事運動療法による脂肪性肝炎の病態改善に脂質代謝の制御が深く関与している可能性を示した。ストレプトゾトシン前処理 + 高脂肪食摂取マウスの実験系では、脂肪性肝炎から肝癌発症に至る過程で ER ストレスの亢進を介してエピジェネティックな変化が生じており、PBA で小胞体ストレスを抑制することによりこ

これらの病態が抑制されることを明らかにした。また、脂肪酸を加えた初代培養肝細胞の系ではトランス脂肪酸の添加により小胞体ストレスが亢進し、2 次的酸化ストレスによる肝細胞死が誘導されることを示した。

本研究では、NASH 特有の多彩な背景疾患と進行性の病態を解析するために、複数の動物モデル・細胞モデルを用いて実験を行った。その結果、NASH の初期病態であるインスリン抵抗性の増悪、肝脂肪化、肝細胞膨化といったプロセスと、NASH の後期の病態である肝線維化、肝発癌のプロセスにおける治療ターゲットを明らかにすることができた。また、初代培養肝細胞を用いた実験により、脂肪酸の質が肝細胞内の ER ストレスに直接与える影響と PBA の保護作用について詳細な検討を加えることができた。

脂質代謝の制御不全は肥満・インスリン抵抗性を基盤とした脂肪性肝炎の初期病態の形成に重要な役割を果たしており、食事療法と運動療法を組み合わせることによる脂肪性肝炎の病態改善には脂質代謝の正常化が寄与している可能性が示された。また、脂肪性肝炎の病態進展に寄与するエピジェネティックな変化を示し、肝細胞が脂肪酸毒性に暴露されることによって生じる ER ストレスが病態悪化の誘因になっている機序を明らかにし、化学シヤペロンを用いた新規治療法の可能性を示すことができた。

<引用文献>

1. Coste A, Louet JF, Lagouge M, et al. The genetic ablation of SRC-3 protects against obesity and improves insulin sensitivity by reducing the acetylation of PGC-1 α . Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:17187-92.
2. Devaskar SU, Thamocharan M. Metabolic programming in the pathogenesis of insulin resistance. Rev Endocr Metab Disord 2007;8:105-13.
3. Esfandiari F, Medici V, Wong DH, et al. Epigenetic regulation of hepatic endoplasmic reticulum stress pathways in the ethanol-fed cystathionine beta synthase-deficient mouse. Hepatology 2010;51:932-41.
4. Kon K, Ikejima K, Okumura K, et al. Diabetic KK-A^y mice are highly susceptible to oxidative hepatocellular damage induced by acetaminophen. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2010;299:G329-37.

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 6 件)

1. Fukuo Y, Yamashina S, Sonoue H, Arakawa A, Nakadera E, Aoyama T, Uchiyama A, Kon K, Ikejima K, Watanabe S. Abnormality of autophagic function

and cathepsin expression in the liver from patients with non-alcoholic fatty liver disease. Hepatol Res. 査読有, 44(9):1026-36, 2014, doi: 10.1111/hepr.12282.

2. 今一義, 渡辺純夫 . 医学と医療の最前線 脂肪肝と糖尿病の最前線 . 日本内科学会雑誌, 査読なし, 103(12):p3118-3125, 2014, NCID:AN00195836
3. Hosoya S, Ikejima K, Takeda K, Arai K, Ishikawa S, Yamagata H, Aoyama T, Kon K, Yamashina S, Watanabe S. Innate immune responses involving natural killer and natural killer T cells promote liver regeneration after partial hepatectomy in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 査読有, 304(3):G293-299, 2013, doi: 10.1152/ajpgi.00083.2012.
4. Yamagata H, Ikejima K, Takeda K, Aoyama T, Kon K, Okumura K, Watanabe S. Altered expression and function of hepatic natural killer T cells in obese and diabetic KK-A^y mice. Hepatol Res. 査読有, 43(3):276-288, 2013, doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01062.x.
5. 今一義 . 脂質代謝におけるシグナル伝達制御 . 分子消化器病, 査読なし, 9(4):62-66, 2012, http://www.sentan.com/cgi-bin/db_n.cgi?mode=view_backno&no=918
6. 今一義, 渡辺純夫 . 非 B 非 C 肝癌の実態 . 内科, 査読なし, 109,3:p393-397, 2012, <http://www.nankodo.co.jp/g/g3009031/>

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 今一義, 森永真紀, 渡辺純夫 . 脂肪肝モデルマウスに対する L-カルニチンの治療効果 第 40 回日本肝臓学会東部会シンポジウム 2 2014 年 11 月 27 日、京王プラザホテル (東京都)
2. Kon K, Ikejima K, Kusama H, Morinaga M, Arai K, Uchiyama A, Aoyama T, Yamashina S, Watanabe S. L-carnitine improves high-fat diet-induced steatohepatitis through insulin sensitization and regulation of lipid metabolism. 63th American Association of Study of Liver Disease.: November 9, 2014, Boston (USA)
3. 今一義, 森永真紀, 渡辺純夫 . カルニチンによる脂肪性肝疾患の治療効果 - 高度脂肪肝マウスモデルを用いた検討 - . 第 18 回 日本肝臓学会大会、第 22 回 日本消化器関連学会週間 シンポジウム 4、2014 年 10 月 23 日、神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)
4. 今一義, 池嶋健一、渡辺純夫 . 脂肪性肝

- 炎の病態形成における小胞体ストレスの役割 . 平成 26 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 シンポジウム 8, 2014 年 10 月 4 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
5. Kon K, Ikejima K, Arai K, Morinaga M, Kusama H, Uchiyama A, Aoyama T, Yamashina S, Watanabe S. Suppression of endoplasmic reticulum stress by chemical chaperon inhibits carcinogenesis in steatohepatitis-related HCC model mice. International Society for Biomedical Research on Alcoholism 2014 (ISBRA2014), Jun 21, 2014, Bellevue (USA)
 6. 今一義, 池嶋健一、内山明、山科俊平、渡辺純夫 . スレプトゾトシン/高脂肪食による脂肪性肝炎由来肝発癌モデルの解析と化学シャペロンによる効果の検討 . 第 50 回日本肝臓学会総会 パネルディスカッション 1、2014 年 5 月 29 日 ホテルニューオータニ (東京都)
 7. Kon K, Ikejima K, Uchiyama A, Aoyama T, Arai K, Morinaga M, Yamashina S and Watanabe S. The chemical chaperon 4-phenylbutyrate prevents epigenetic alterations and carcinogenesis in NASH-HCC model mice. 49th Annual Meeting of The European Association for the Study of the Liver. (EASL) 2014.4.10 : London (United Kingdom)
 8. 今一義, 池嶋健一、山科俊平、渡辺純夫 . 非 B 非 C 肝発癌と肝細胞内 Pten 発現の関連 . 第 50 回日本臨床生理学会総会 . 2013 年 11 月 8-9 日 東京
 9. 今一義, 池嶋健一、渡辺純夫 . 非 B 非 C 肝発癌におけるオートファジー関連蛋白の発現と臨床像 . 第 21 回日本消化器関連学会週間(JDDW2013) 2013 年 10 月 9-12 日 東京
 10. 今一義, 池嶋健一、内山明、山科俊平、渡辺純夫 . 第 49 回日本肝臓学会総会 . 2013 年 6 月 6-7 日 東京
 11. Kon K, Ikejima K, Uchiyama A, Yamashina S, Kawasaki S, Watanabe S. The expression of autophagy-related proteins in non-B non-C hepatocellular carcinogenesis. Digestive Disease Week2013(DDW2013), May 20, 2013, Orlando (USA)
 12. 今一義, 池嶋健一、渡辺純夫 . 非 B 非 C 肝発癌におけるオートファジー関連蛋白の関与 . 第 99 回日本消化器病学会総会 . 2013 年 3 月 21-23 日 鹿児島
 13. 今一義, 池嶋健一、渡辺純夫 . 非 B 非 C 肝発癌におけるオートファジー関連蛋白発現の変化 . 第 32 回アルコール医学生物学研究会学術集会 . 2013 年 1 月 25-26 日 東京
 14. 今一義, 池嶋健一、渡辺純夫 . 非 B 非 C 肝発癌における Pten およびオートファジー活性の変化-肝癌・背景肝組織を用いた検討-. 第 39 回日本肝臓学会東部会 ワークショップ、2012 年 12 月 東京
 15. Kon K, Ikejima K, Uchiyama A, Arai K, Yamashina S, Watanabe S. Inhibition of endoplasmic reticulum stress by 4-phenylbutyrate prevents steatohepatitis progression and tumorigenesis in NASH-HCC model mice. 63th American Association of Study of Liver Disease.: November 12, 2012, Boston (USA)
 16. Kon K, Ikejima K, Uchiyama A, Yamashina S, Kawasaki S, Watanabe S. The Role of Autophagy in HCV-associated Hepatocarcinogenesis. The 10th Single Topic Conference 2012 年 11 月 東京
 17. Kon K, Ikejima K, Watanabe S. The chemical chaperone 4-phenylbutyric acid attenuates trans-fatty acid-induced ER stress and hepatic lipotoxicity. The 3rd Asian-Pacific Topic Conference 2012 年 11 月 東京
 18. 今一義, 池嶋健一、渡辺純夫 . 小胞体ストレス軽減による NASH 肝発癌抑制 - NASH 発癌モデルマウスを用いた検討 - . JDDW2012 (第 20 回日本消化器関連学会週間), 第 16 回日本肝臓学会大会 . 2012 年 10 月 神戸
 19. Kon K, Ikejima K, Uchiyama A, Yamashina S, Watanabe S. Reduction of endoplasmic reticulum stress prevents hepatic fibrosis and tumorigenesis in mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. International Society for Biomedical Research on Alcoholism Satellite Symposium, 2012 年 7 月 14 日, 京都市サテライトパーク(KRP) (京都府京都市)
 20. 今一義, 池嶋健一、内山明、山科俊平、渡辺純夫 . 非 B 非 C 肝発癌における Pten および P62 の発現の変化 . 第 48 回日本肝臓学会総会 . 2012 年 6 月 石川県
 21. Kon K, Ikejima K, Hosoya S, Arai K, Uchiyama A, Yamashina S, Watanabe S. The chemical chaperon 4-phenylbutyrate inhibits liver fibrosis and tumorigenesis in high-fat diet with N-acetyl-D-glucosaminidase inhibitor-induced NASH model mice. Digestive Disease Week2012 (DDW2012) May 22, 2012, San Diego (USA)
- [図書] (計 2 件)
1. 今一義 . 動物モデルからの NASH 病態の

- 洞察 .Hepatology Practice Vol.2 NASH・
アルコール性肝障害の診療を極める、
p370-372, 2013 文光堂
2. 今一義 . 脂肪肝 (NAFLD) . 専門医のための
消化器病学第 2 版、p376-381, 2013
医学書院

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今 一義 (KON, Kazuyoshi)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：30398672

(2) 研究分担者

池嶋 健一 (IKEJIMA, Kenichi)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：20317382

川上 恭司郎 (KAWAKAMI, Kyojiro)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ
ンター (東京都健康長寿医療センター研究
所)・研究員

研究者番号：90589227