

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293175

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎における lipotoxicity による病態の解明

研究課題名(英文)Role of lipotoxicity in NASH

研究代表者

中島 淳 (NAKAJIMA, Atsushi)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30326037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)非常に大きい。今回の研究ではマウスモデルを用いて大概より遊離脂肪酸であるパルミチン酸を投与してその肝臓への直接作用の検討を行った。遊離脂肪酸の肝臓への直接投与は(1)肝臓組織における好中球を中心とした炎症細胞の浸潤、(2)星細胞の活性化と線維化進展、を呈した。その機序は脂肪酸によるケモカインの産生と、炎症細胞の浸潤であり、線維化は星細胞への直接刺激である。

研究成果の概要(英文)：Non Alcoholic Steato-hepatitis (NASH) is a emerging disease which arise from Non Alcoholic Fatty Liver (NAFLD). The number of NAFLD patient is estimated about 20 million in Japan. NASH is the highest number of patients among liver disease. In this study, we investigate the effect of free fatty acid, palmitate on mouse liver. Administration of free fatty acid induced the inflammatory cells infiltration and activate stellate cells and fibrosis formation in the liver. We showed the neutrophil infiltration is caused by the production of the chemokine by the free fatty acids whereas fibrosis directly induced by free fatty acids via TLR4.

研究分野：肝臓病学

キーワード：脂肪肝 NASH NAFLD

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis : NASH) は線維化の進行により肝硬変に至る重要な疾患である。しかし、好中球を中心とした炎症細胞浸潤と肝細胞周囲線維化という、他の肝炎とは異なる特徴的な病態について詳細な機序は明らかにされていない。

遊離脂肪酸は全身臓器での慢性炎症の誘因、膵島細胞での細胞障害による糖尿病の悪化 1)、動脈壁のアポトーシスに伴う動脈硬化の進展 2)などを引き起こす。それらは“lipotoxicity”と称され 3)注目を浴びている。肝臓での lipotoxicity は、in vitro において飽和脂肪酸が肝細胞のアポトーシスを起こすとの報告があるが 4)、技術的な難しさから、in vivo での遊離脂肪酸投与と肝障害に関する報告はない。マウスへの経内頸静脈的飽和脂肪酸持続投与モデルを用いて in vivo での遊離脂肪酸が肝臓に与える影響を解析した。

詳細な NASH 病態については、ヒト NASH 病態で重要な因子を担うエンドトキシン 5) と遊離脂肪酸の相互作用、および、飽和脂肪酸がリガンドとなる自然免疫応答シグナル TLR4 経路にも注目した。

2. 研究の目的

今回の研究では、飽和脂肪酸の“lipotoxicity”が肝臓において NASH 病態の本幹部を引き起こすという仮説を立て、NAFLD/NASH 病態における飽和脂肪酸の役割を明らかにする。

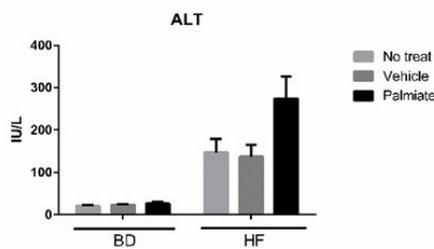
3. 研究の方法

12 週齢の C57/B6J オス、野生型マウスおよび TLR4KO マウスの右内頸静脈よりカテーテルを挿入し、乳化パルミチン酸を投与した後に、各種分子生物学的検討を行った。高脂肪負荷マウスにも同様の処置を行い解析した。

4. 研究成果

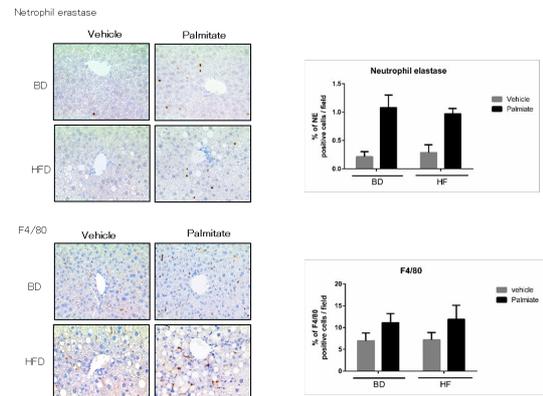
(1) 血清 ALT

高脂肪食負荷では普通食負荷と比較して、パルミチン酸単回投与で ALT の上昇を認めた。



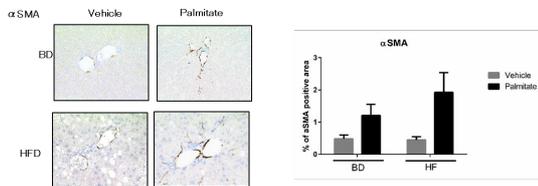
(2) 炎症細胞浸潤

普通食負荷および高脂肪食負荷にパルミチン酸を単回投与すると同程度に好中球浸潤およびマクロファージ浸潤を認めた。



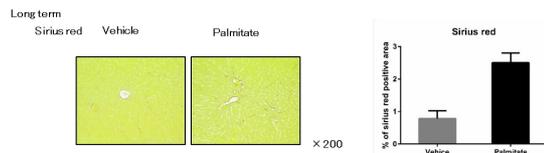
(3) SMA 陽性領域

パルミチン酸単回投与で肝内 SMA 陽性領域の増大を認めた。普通食負荷と比較して高脂肪食負荷では SMA 陽性領域はより増大した。



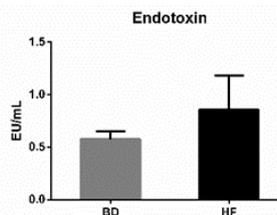
(4) 線維化

パルミチン酸の長期投与では肝に微細な線維化を認めた。



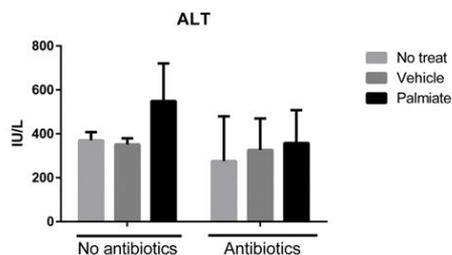
(5) 血中エンドトキシン

普通食負荷に比較して、高脂肪食負荷では血中エンドトキシンの増加を認めており、パルミチン酸負荷での反応性の違いの原因と考えられた。



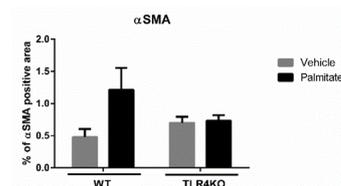
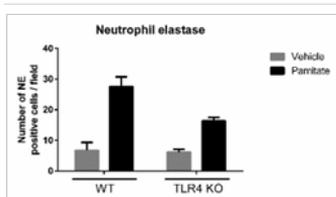
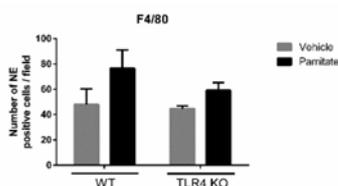
(6) 腸管滅菌後のパルミチン酸投与での ALT 高脂肪負荷マウスにおいて抗菌薬で腸管滅菌を行うと、パルミチン酸投与による ALT 上

昇はキャンセルされた。



#### (7)TLR4KO マウスでの検討

TLR4KO マウスでは、野生型でみられた炎症細胞浸潤、SMA 活性化が低下した。



#### < 引用文献 >

1. Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, et al. Saturated fatty acid and TLR signaling link cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab.* 2012; 4: 518-33.
2. Furuhashi M, Tuncman G, Görgün CZ, et al. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature.* 2007; 6: 959-965.
3. Weinberg JM. Lipotoxicity. *Kidney Int.* 2006; 9:1560-6.
4. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, et al. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem.* 2006; 17: 12093-12101.
5. Imajo K, Fujita K, Ogawa Y, Nakajima A et al. (2012), Hyperresponsivity to low-dose endotoxin during progression to nonalcoholic steatohepatitis is regulated by leptin-mediated signaling, *Cell Metab,*

16(1), 44-54.

#### 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 5 件)

1. Kessoku T, Imajo K, Honda Y, Kato T, Ogawa Y, Tomeno W, Kato S, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Nagashima Y, Saito S, Wada K, Nakajima A. Resveratrol ameliorates fibrosis and inflammation in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Rep.* 査読有、2016 Feb 25;6:22251. doi: 10.1038/srep22251.
2. Honda Y, Yoneda M, Kessoku T, Ogawa Y, Tomeno W, Imajo K, Mawatari H, Fujita K, Hyogo H, Ueno T, Chayama K, Saito S, Nakajima A, Hotta K. The characteristics of non-obese NAFLD: Effect of genetic and environmental factors. *Hepatol Res.* 査読有、2016 Jan 13. doi: 10.1111/hepr.12648.
3. Honda Y, Imajo K, Kato T, Kessoku T, Ogawa Y, Tomeno W, Kato S, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Saito S, Nakajima A. The Selective SGLT2 Inhibitor Ipragliflozin Has a Therapeutic Effect on Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice. *PLoS One.* 査読有、2016 Jan 5;11(1). doi: 10.1371/journal.pone.0146337
4. Imajo K, Kessoku T, Honda Y, Tomeno W, Ogawa Y, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Taguri M, Hyogo H, Sumida Y, Ono M, Eguchi Y, Inoue T, Yamanaka T, Wada K, Saito S, Nakajima A. Magnetic Resonance Imaging More Accurately Classifies Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease Than Transient Elastography. *Gastroenterology.* 査読有、2016 Mar;150(3):626-637.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2015.11.048.
5. Imajo K, Hyogo H, Yoneda M, Honda Y, Kessoku T, Tomeno W, Ogawa Y, Taguri M, Mawatari H, Nozaki Y, Fujita K, Kirikoshi H, Saito S, Sumida Y, Ono M, Wada K, Nakajima A, Eguchi Y. LDL-migration index (LDL-MI), an indicator of small dense low-density lipoprotein (sdLDL), is higher in non-alcoholic steatohepatitis than in non-alcoholic fatty liver: a multicenter cross-sectional study. *PLoS One.* 査読有、2014 Dec 26;9(12):e115403. doi: 10.1371/journal.pone.0115403.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Yuji Ogawa, Kento Imajo, Atsushi Nakajima: Obesity exacerbates lipotoxicity induced by saturated fatty acid. JDDW2015 International Session (Workshop) 1, グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京都), 2015, 10.9.

2. 小川祐二, 今城健人, 中島淳: パルミチン酸単独投与による自然免疫を介した肝臓における炎症細胞浸潤と線維化についての検討. 第 101 回 消化器病学会総会 ワークショップ 12, 仙台国際センター(宮城県), 2015 4.25.

3. 小川 祐二, 今城 健人, 中島 淳: パルミチン酸単独投与による肝臓への炎症細胞浸潤についての検討. 2014 年度日本消化器関連学会週間(JDDW 2014) シンポジウム 12(消化器病学会・消化器内視鏡学会・肝臓学会合同) 生活習慣病と脂質・胆汁酸代謝, 神戸国際会議場(兵庫県), 2014, 10.24.

4. Ogawa Y, Honda Y, Kessoku T, Tomeno W, Imajo K, Mawatari H, Saito S, Nakajima A: Lipotoxicity in liver induced by palmitate in vivo. 22nd United European Gastroenterology Week Free Paper Session Liver steatosis: The road from inflammation to fibrosis, Vienna(Austria), 2014, 10.20.

5. 小川祐二, 本多靖, 結束貴臣, 留野涉, 今城健人, 馬渡弘典, 齊藤聡, 中島淳: パルミチン酸単独投与による肝臓への炎症細胞浸潤と線維化についての検討. 第 131 回日本薬理学会関東部会(癌 2), 横浜市立大学(神奈川県), 2014, 10.11.

6. 小川 祐二, 本多 靖, 結束 貴臣, 留野 涉, 今城 健人, 馬渡 弘典, 齊藤 聡, 中島 淳: 優秀演題賞 パルミチン酸単独投与が引き起こす肝臓における自然免疫応答の検討. 第 51 回日本消化器免疫学会総会 ワークショップ, 京都大学医学部 芝蘭会館(京都府), 2014, 7.10.

7. 小川 祐二, 今城健人, 中島淳: 肝疾患における自然免疫の役割 最新知見と今後の展開. 第 50 回日本肝臓学会総会 ワークショップ 10 パルミチン酸単独投与による肝臓における自然免疫応答についての検討, ホテルニューオータニ(東京), 2014, 5.29.

〔図書〕(計 2 件)

1. 小川祐二, 本多靖, 結束貴臣, 今城健人, 留野涉, 米田正人, 齊藤聡, 中島淳: 肝臓における脂肪毒性. The Lipid, 2016 July, 2016 年.

2. 小川祐二, 本多靖, 結束貴臣, 今城健人, 米田正人, 中島淳: NASH と腸内細菌. Mebio, 2016 January: p.44-53, 2015 年.  
〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 淳 (NAKAJIMA, Atsushi)  
横浜市立大学・医学研究科・主任教授  
研究者番号: 30326037

### (2) 研究分担者

齊藤 聡 (SAITO, Satoru)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号: 00275041

今城 健人 (IMAJO, Kento)  
横浜市立大学・附属病院・助教  
研究者番号: 30600192  
(平成 25 年度より研究分担者)

米田 正人 (YONEDA, Masato)  
横浜市立大学・附属病院・講師  
研究者番号: 10423831  
(平成 25 年度より連携研究者)

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

( )