

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461014

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎進展におけるストレスおよび交感神経系の関与

研究課題名(英文)Involvement of stress and sympathetic nervous system on the progression in NASH

研究代表者

中出 幸臣 (Nakade, Yukiomi)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70431400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ストレスで活性化される交感神経系のNASHに対する影響を検討し、マウスに交感神経 受容体作動薬phenylephrine、 受容体作動薬isoproterenolを投与し、高脂肪食と併用し4週間後に肝を組織学的に評価した。phenylephrine群はcontrol群と肝脂肪沈着に差がなかったが、isoproterenol群では肝脂肪沈着に増加傾向を認めた。マイクロアレイおよびReal Time PCR ではisoproterenol群でミトコンドリアの 酸化に関わるCPT1の発現に低下傾向を認め、交感神経 受容体作動薬が刺激されると 酸化の低下により肝脂肪化を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effect of sympathetic nervous system which is activated by stress on NASH, alpha-adrenergic receptor agonist, phenylephrine and beta-adrenergic receptor agonist, isoproterenol were administered to mice concurrent with high fat diet feeding. Four weeks after the commencement of feeding, hepatic histological findings were evaluated. While hepatic steatosis was not changed by phenylephrine, isoproterenol augmented hepatic steatosis. Microarray and Real time PCR showed that hepatic CPT1 mRNA level, which is related to beta-oxidation in mitochondria tended to be decreased in isoproterenol-treated mice. These indicates that beta-adrenergic agonist stimulates hepatic steatosis through the suppression of beta-oxidation in NASH.

研究分野：消化器内科

キーワード：ストレス 交感神経系 NASH NAFLD 脂肪性肝炎 脂肪肝 CPT1

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国では肥満、高血圧、糖尿病、高脂血症を基盤とするメタボリックシンドロームと呼ばれる疾患群が増加している。メタボリックシンドロームは心疾患および脳血管障害の危険因子であることから注目を集めている。消化器領域、特に肝臓においてはメタボリックシンドロームの肝臓での表現型として脂肪肝は以前より認識されていたが、慢性肝炎に至る疾患とは考えられていなかったためあまり注目されてこなかった。1980年アメリカのLudwigによりに非アルコール性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis: NASH)という疾患概念が提唱され、脂肪肝の中でアルコール摂取がなくても炎症や肝線維化を伴い、肝硬変にまで進展する病態のあることが明らかにされた。日本においてNASHはほとんど注目されることはなかったが、メタボリックシンドロームが注目されるとともにここ数年関心が高まっている。NASHの背景には肥満、糖尿病、高血圧を合併していることが多いため、これらに伴うインスリン抵抗性によって肝臓内に脂肪が蓄積して脂肪肝が発症し、その後何らかの原因によって炎症および線維化が起こると想定されているが、その本態は解明されていない。

2005年アメリカ消化器病学会において北欧の疫学調査で脂肪肝患者に比べてNASH患者において強いストレス下状態にあるとの報告がなされて関心を集めた。これまでにストレスが肝に及ぼす影響について、いくつかの臨床報告がなされている。心筋梗塞後の患者において posttraumatic stress の重症度に比例して血清肝酵素が上昇していたと報告されている。またアルコール性肝障害の患者は生活ストレスの増加が炎症や肝線維化の増悪と関連があったと報告され(J Psychosom Res:33 515-521,1989) C型慢性肝炎患者は心理社会的ストレスが肝炎の重症度と関連があったと報告がなされている

(Psychosomatics : 45 100-106,2004) さらにはB型慢性肝炎の患者ではうつ病の自己評価尺度が高い患者ほど肝酵素が高かったとの報告されている(Psychosomatics : 41 100-106,2000) このように慢性肝疾患とストレスに関する報告がなされているが、NASHとストレスに関連する研究報告はこれまでほとんどなされていない。

申請者らはこれまでにストレスと肝生理機能および病態に関する基礎的検討を行ってきた。ストレスによって脳内で合成が高まる神経ペプチドに着目し、脳肝臓相関に

おける中枢性神経ペプチドの関わりを検討してきた。その結果、ストレス下で増加する脳内の神経ペプチドの一つである corticotropin-releasing factor (CRF)が末梢の交感神経を介して肝臓の門脈抵抗を増大させて肝血流量を減少させ、さらに実験的急性肝障害を増悪させることをラットにおいて証明した(Am J Physiol 276: G622-8, 1999、Neurosci Lett 313: 149-52, 2001、Gut 54: 282-288, 2005.)。その後の申請者らの検討で、ラットにストレスを負荷すると実験的急性肝障害が増悪し、CRF受容体拮抗剤を中枢性に投与すると肝障害増悪作用が消失することを明らかにし、内因性のCRFがストレス下の肝障害増悪に対して重要な役割を果たしていることが確認された(Am J Physiol 282: R1782-R1788, 2002、Eur J Pharmacol 460: 135-138, 2003) これら肝生理機能および実験肝障害においてストレスが関与していることを踏まえて、病理学的にNASH類似の病態を呈するコリン欠乏アミノ酸食(CDAA食)を用いたラットモデルを作成した上で、ストレスがCDAA食誘発NASHを増悪させるか検討したところ、CDAA食投与に拘束ストレスを負荷すると脂肪変性、肝線維化が対照群に比べ増悪傾向にあることがわかった。しかし、CDAA食モデルは肥満や糖尿病を伴わないため、メタボリックシンドロームの表現系としてのNASHとは異なっており、ストレスがNASHの進展に関与するかは明らかではない。

2. 研究の目的

(1)肥満糖尿病マウスであるob/obマウスにおいてこれまでに確立されている高脂肪食による脂肪肝モデルを用い、拘束ストレスを連日負荷して脂肪肝からNASHへの進展が見られるか否かを明らかにする。また拘束ストレスは中枢神経の神経ペプチドであるCRFおよび交感神経系を活性化することから、拘束ストレス負荷の代わりに中枢性CRFまたは交感神経賦活薬をマウスに投与し脂肪肝からNASHに進展するか明らかにする。さらに拘束ストレスあるいは中枢性CRFおよび交感神経賦活薬によってNASHへの進展が見られたことを確認した後、中枢性CRF受容体拮抗薬および交感神経遮断薬を投与しNASH進展が抑制されるか明らかにする。

(2)NASHへの進展にストレスが関与しているという仮説のもと、脂肪沈着および炎症、肝線維化といった病態進展を評価する因子に関して、ストレス負荷および中枢性CRFまたは交感神経賦活薬を投与したマウスの肝よりmRNAを抽出しマイクロアレイにて発現変動している遺伝子をスクリーニン

グした上で遺伝子プロファイリングを行い、各種遺伝子のパスウェイ解析を行う。特に肝脂肪化、炎症、肝線維化に関して発現変動しているシグナルを検証する。また肝脂肪化、炎症、肝線維化に関してのシグナルが上昇している経路に着目し、各々で重要な役割を果たしている蛋白の発現が増強しているかを確認し、ストレスが脂肪肝から脂肪性肝炎への病態進展に關与しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ストレスが高脂肪食投与マウスの脂肪肝に及ぼす影響：週齢7週雄性 ob/ob マウスを用いて、高脂肪食投与を開始し、拘束ゲージにて2時間の拘束ストレスを連日負荷する群と対照群の2群にわけける。拘束負荷開始1週目より採血を行い、血清コルチコステロン、TNF- α 、IL-6、AST、ALTを測定する。その後毎週採血を行い、高脂肪食投与開始から4週間後にマウスを屠殺して採血の後、血清コルチコステロン、TNF- α 、IL-6、AST、ALTを測定し計時的変化を確認し、ストレス負荷群と対照群で比較する。さらに肝組織をパラフィン包埋固定の後 oil red-O 染色、ヘマトキシリン・エオジン染色、マッソン・トリクローム染色を行い、肝における肝脂肪化、炎症細胞浸潤、肝線維化の程度を評価する。肝脂肪化に関しては oil red-O 染色にて顕微鏡的1視野における肝脂肪の割合を Brunt の分類にしたがって mild: 33%以下、moderate: 33-66%、severe: 66%以上の3段階にわけて評価する。炎症細胞浸潤に関してはヘマトキシリン・エオジン染色にて Brunt の分類(Am J Gastroenterol 1999; 116: 2467-74)にしたがって、1: mild、2: moderate、3: severe の3段階で評価する。さらに肝線維化に関してはマッソン・トリクローム染色にて門脈域および中心静脈を含む任意の5視野を選択し、青紫色に染まる領域をコンピュータイメージ分析装置にて面積を算出し、これらをストレス負荷群と対照群で比較する。

(2) 中枢性 CRF および交感神経賦活薬投与が高脂肪食投与マウスの脂肪肝に及ぼす影響：週齢7週雄性 ob/ob マウスを用いて、高脂肪食投与開始の1週間前に、マウスの脳質内に定位脳手術固定装置を用いて、CRF を中枢性に持続投与するための脳質内カテーテルを留置する。さらに交感神経賦活薬を持続注入するための浸透圧ポンプにノルアドレナリン(5.6 mg/kg/day)を充填した後にマウスの背側皮下にポンプを留置する。脳質内カテーテルまたは浸透圧ポンプ留置後1週間の後、高脂肪食を開始し、CRF は連日脳質内に投与し、1週目より採血を行い血清コルチコステロン、TNF- α 、IL-6、AST、ALTを測定する。その後毎週採血を行い、高脂肪食投与開始から4週間後にマウスを屠殺して採血の後、血清コルチコステロン、TNF- α 、IL-6、

AST、ALT を測定し計時的変化を確認し、中枢性 CRF 投与群と交感神経賦活薬投与群を各々の対照群と比較する。さらに肝組織をパラフィン包埋固定の後 oil red-O 染色、ヘマトキシリン・エオジン染色、マッソン・トリクローム染色を行い、肝における肝脂肪化、炎症細胞浸潤、肝線維化の程度を評価する。肝脂肪化に関しては oil red-O 染色にて顕微鏡的1視野における肝脂肪の割合を Brunt の分類にしたがって mild: 33%以下、moderate: 33-66%、severe: 66%以上の3段階にわけて評価する。炎症細胞浸潤に関してはヘマトキシリン・エオジン染色にて Brunt の分類(Am J Gastroenterol 1999; 116: 2467-74)にしたがって、1: mild、2: moderate、3: severe の3段階で評価する。さらに肝線維化に関してはマッソン・トリクローム染色にて門脈域および中心静脈を含む任意の5視野を選択し、青紫色に染まる領域をコンピュータイメージ分析装置にて面積を算出し、中枢性 CRF 投与と交感神経賦活薬投与が脂肪肝に与える影響を拘束ストレス負荷による影響と組織学的に比較する。

(3) 中枢性 CRF 受容体拮抗薬および交感神経遮断薬投与が拘束ストレス負荷した高脂肪食投与マウスの脂肪肝に及ぼす影響：週齢7週雄性 ob/ob マウスを用いて、高脂肪食投与開始の1週間前に、マウスの脳質内にカテーテルを留置する。また浸透圧ポンプに交感神経遮断薬である β 受容体拮抗薬であるプロプラノロール(50 mg/kg/day)あるいは α 受容体拮抗薬であるプラゾシン(30 mg/kg/day)を充填した後にマウスの背側皮下にポンプを留置する。脳質内カテーテルまたは浸透圧ポンプ留置後1週間の後、高脂肪食および連日2時間の拘束ストレス負荷を開始し、CRF 受容体拮抗薬である α -helical CRF は連日脳質内投与する。1週目より採血を行い血清コルチコステロン、TNF- α 、IL-6、AST、ALTを測定する。その後毎週採血を行い、高脂肪食投与開始から4週間後にマウスを屠殺して採血の後、血清コルチコステロン、TNF- α 、IL-6、AST、ALT を測定し計時的変化を確認し、中枢性 CRF 受容体拮抗薬投与と交感神経遮断薬投与が拘束ストレス負荷マウスの脂肪肝に及ぼす影響を検討する。さらに肝組織をパラフィン包埋固定の後 oil red-O 染色、ヘマトキシリン・エオジン染色、マッソン・トリクローム染色を行い、上述の基準に従って肝における肝脂肪化、炎症細胞浸潤、肝線維化の程度を評価し、中枢性 CRF 受容体拮抗薬投与と交感神経遮断薬投与の拘束ストレス負荷マウスの脂肪肝に及ぼす影響を検討する。

(4) ストレス負荷、中枢性 CRF および交感神経賦活薬による NASH 進展の影響：マイクロアレイを用いたパスウェイ分析：上記実験 1),2),3)によって得られたマウスの凍結肝組織を液体窒素で冷却しながら粉砕し、得られたホモジネートから RNeasy Mini Kit を

用いて総 RNA を抽出する。RNA は定量した後、最終的に得られた RNA から高用量 cDNA Reverse Transcription キットを用いて cDNA に逆転写させる。Agilent 社の Whole mouse genome CGH マイクロアレイを用いて赤色蛍光色素 (Cy3) で、それぞれのコントロールを緑色蛍光色素 (Cy5) で標識し、両者をスライドガラス上のプローブをハイブリダイズさせ、蛍光シグナル強度を測定する。次に Agilent Feature Extraction Software (FES) を用いてマイクロアレイイメージファイルを読み出し、Rosetta Resolver gene expression data 分析システムを用いて、ストレス負荷群、中枢性 CRF 群、交感神経賦活薬群、ストレス負荷 + 中枢性 CRF 受容体拮抗薬、ストレス負荷 + 交感神経遮断薬群における各遺伝子の信号強度を各々の対照群との間でその比率を算出する。さらに Resolver gene expression data 分析システムで得られた data を標準化し、その信号強度比が $2\log$ 以上かつ p 値が 0.01 以下の遺伝子を抽出する。次に MAPPFinder を用いて特定の pathway に指定された範疇の遺伝子が、偶然より多く含まれているか評価した上で、各遺伝子の発現値を Pathway マッピングする。なかでも肝脂質代謝に関連するミトコンドリア脂肪酸 β 酸化シグナル、肝炎症細胞浸潤に関わる TNF- α /NF- κ B シグナル、肝線維化に関連する TGF- β シグナルに関してストレス負荷群、中枢性 CRF 群、交感神経賦活薬群、ストレス負荷 + 中枢性 CRF 受容体拮抗薬、ストレス負荷 + 交感神経遮断薬群が各々のシグナル増強にどのように関与しているかを検討し比較する。

(5) ストレス負荷、中枢性 CRF および交感神経賦活薬による NASH 進展の影響：肝脂質代謝、肝炎症細胞浸潤、肝線維化に関連する蛋白発現に関する検討：上記実験 4) によって確認されたミトコンドリア脂肪酸 β 酸化シグナル、肝炎症細胞浸潤に関わる TNF- α /NF- κ B シグナル、肝線維化に関連する TGF- β シグナルに関連する蛋白発現の検討を行う。蛋白抽出は肝凍結組織 1g をホモジェナイズの後、lysis buffer にて溶解し、比色法にて蛋白定量後、SDS-PAGE を行い各種蛋白発現の検討を行う。具体的にはミトコンドリア脂肪酸 β 酸化シグナルに関連する carnitine palmitoyltransferase 1a (cpt1a)、TNF- α /NF- κ B シグナルに関連する I κ B、TGF- β シグナルに関連する SMAD3 の発現をストレス負荷、ストレス負荷群、中枢性 CRF 群、交感神経賦活薬群、ストレス負荷 + 中枢性 CRF 受容体拮抗薬、ストレス負荷 + 交感神経遮断薬群によって発現が変化しているか比較検討する。

4. 研究成果

ストレスが肝脂肪化に及ぼす影響を検討するため、拘束ストレスおよび中枢性 CRF が肥満糖尿病モデルマウス (*ob/ob* マウス) に対

する影響を検討した。開始後 1, 2 週と経るにつれて、拘束ストレス群、おおび中枢性 CRF 投与群いづれの群においても、血清コルチコステロン濃度や肝脂肪化、炎症に関わるサイトカインの発現に有意な違いが得られなかった。このためストレスで活性化される交感神経系を対象をしぼり、*ob/ob* マウスに交感神経受容体作動薬 phenylephrine および受容体作動薬 isoproterenol をマウス背側皮下より持続注入を開始し、高脂肪食と同時併用し 4 週間後に肝を取り出し組織学的に脂肪肝を評価した。phenylephrine 群は control 群と差がなく肝脂肪沈着に著変なかったが、isoproterenol 群では高脂肪食による肝脂肪沈着に増加傾向を認めた。交感神経受容体作動薬が肝脂肪化を促進する可能性が示唆された。次に肝より RNA を採取し、マイクロアレイを用いて、Resolver gene expression data 分析システムで得られた data を標準化し、その信号強度比が $2\log$ 以上かつ p 値が 0.01 以下の遺伝子を抽出したところ、control 群に比べ isoproterenol 群においてはミトコンドリアの酸化に関わる CPT1 の発現に低下傾向を認め、Real Time PCR を用いて確認したところ、CPT1 の発現が control 群に比べ、isoproterenol 群において低下していた。一方肝炎症細胞浸潤に関わる TNF- α /NF- κ B シグナル、肝線維化に関連する TGF- β シグナルに関連する遺伝子発現に有意な変動が認められなかった。以上から肝脂肪化において、交感神経受容体が刺激されると、酸化の低下により肝脂肪沈着が増強される可能性が示唆された。

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)

1. Yamamoto T, Nakade Y (10 名中 2 番目). Glucagon-like peptide-1 analogue prevents nonalcoholic steatohepatitis in non-obese mice. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 2512-23. (査読あり) doi: 10.3748/wjg.v22.i8.2512
2. Ueyama M, Nishida N, Ito K (30 名中 21 番目). The impact of PNPLA3 and JAZF1 on hepatocellular carcinoma in non-viral hepatitis patients with type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol* 2016;51:370-9. (査読あり) doi: 10.1007/s00535-015-1116-6
3. Ito K, Yotsuyanagi H (25 名中 1 番目). Geographic distribution and

- characteristics of genotype A hepatitis B virus infection in acute and chronic hepatitis B patients in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 2016;31:180-9. (査読あり) doi: 10.1111/jgh.13030
4. Masaki N, Ito K (6 名中 4 番目). Use of nucleoside analogs in patients with chronic hepatitis B in Nepal: A prospective cohort study in a single hospital. *Hepatol Res* 2015;45:1163-9. (査読あり) doi: 10.1111/hepr.12482
5. Sato K, Goshō M, Nakade Y (10 名中 7 番目). Vitamin E has a beneficial effect on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition* 2015; 31: 923-30. (査読あり) doi: 10.1016/j.nut.2014.11.018.
6. Kobayashi K, Nakao H, Nakade Y(13 名中 11 番目). Diagnostic accuracy of real-time tissue elastography for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *European radiology* 2015; 25: 230-8. (査読あり) doi: 10.1007/s00330-014-3364-x
7. Kanamori H, Nakade Y (15 名中 2 番目). Case of cholangiocellular carcinoma in a patient with glycogen storage disease type Ia. *Hepatol Res* 2015; 45: 494-9. (査読あり) doi: 10.1111/hepr.12366
8. Ito K, Yotsuyanagi H, Mizokami M (23 名中 1 番目); Japanese AHB Study Group. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology*. 2014 Jan;59(1):89-97. (査読あり) doi: 10.1002/hep.266359.
9. Nakade Y, Yoneda M. What are the important lifestyle interventions for preventing the progression of impaired glucose tolerance (IGT) and type 2 diabetes in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients? *Intern Med* 2014; 53: 1399-400. (査読あり)
10. Tamaki Y, Nakade Y, (13 名中 2 番目) Angiotensin II type 1 receptor antagonist prevents hepatic carcinoma in rats with nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol* 2013; 48: 491-503. (査読あり) doi: 10.1007/s00535-012-0651-7
11. Nakade Y, Sato K, Nakao H, Yoneda M. [Hepatocarcinogenesis in NASH]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2012; 39: 693-7.
- 〔雑誌論文〕(計 11 件)
- 〔学会発表〕(計 2 件)
大橋知彦 他
The relationship among fatty liver, endogenous Glucagon like peptide-1(GLP-1) and bile acid in spontaneously diabetic trii fatty rat.
第 19 回日本肝臓学会大会
2015 年 10 月 9 日 東京
中出幸臣他
NAFLD における交感神経β受容体の関与
第 102 回日本消化器病学会総会
2016 年 4 月 22 日 東京
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔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

中出幸臣 (Nakade Yukiomi)
愛知医科大学肝胆膵内科准教授
研究者番号：70431400

(2) 研究分担者

伊藤清顕 (Ito Kiyooki)
愛知医科大学肝胆膵内科教授
研究者番号：50551420

(3) 連携研究者

()

研究者番号：