

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860551

研究課題名(和文) 飽和脂肪酸の肝内でのlipotoxicityとNASH病態への関与

研究課題名(英文) Association between the lipotoxicity of saturated fatty acids in the liver and pathophysiology of NASH.

研究代表者

小川 祐二(Ogawa, Yuji)

横浜市立大学・附属病院・指導診療医

研究者番号：20644959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：C57BL/6Jマウスに右頸静脈よりカテーテルを挿入して乳化パルミチン酸を持続投与した。その結果、短期間に好中球遊走、マクロファージ浸潤、星細胞の活性化を認めた。長期投与においては肝線維化を認めた。これらは非アルコール性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis: NASH)類似の病態であり、飽和脂肪酸であるパルミチン酸はNASH病態に重要な役割を担うことが示唆された。さらなる分子メカニズムを解明することで、NASHの新規治療方法開発に有用である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The right jugular veins of C57BL/6 mice were catheterized. Then the mice were continuously infused with ethyl palmitate. Short-term palmitate treatment recruited neutrophil and macrophage to the liver, and activated hepatic stellate cell. Long-term palmitate treatment induced liver fibrosis. We showed that the saturated fatty acid, palmitate, induces nonalcoholic steatohepatitis(NASH)-like condition. The molecular interactions in this study could provide novel therapeutic targets for the treatment of NASH.

研究分野：非アルコール性脂肪肝炎

キーワード：非アルコール性脂肪肝疾患 非アルコール性脂肪肝炎 飽和脂肪酸 lipotoxicity

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease 以下 NAFLD) は、進行しない nonalcoholic fatty liver (NAFL) と進行性の nonalcoholic steatohepatitis (NASH) を包括した概念であり、肥満、糖尿病、高脂血症などの生活習慣病と関与する。NAFLD は近年増加傾向にある肝疾患であり日本において人口の約 20% 存在するとされる。NASH は人口の 3% 前後が罹患しているとされ、約 50% が進行性で、10 年間で 20% が肝硬変に移行し、最終的に肝臓癌に進行する。しかしながら、NAFL から NASH へと至るメカニズムは未だ不明であり、そのため有効な治療法が確立されていない。現時点で病態を最も有力に説明しているのは、肝臓に脂肪が沈着し (1st hit)、次に炎症が惹起される (2nd hit) という two-hit theory¹⁾ である。我々は 2nd hit の部分として腸管由来の endotoxin と、その受容体 TLR4 (Toll-like receptor 4) に着目してこれまで報告してきた^{2,3)}。TLR4 は肝内炎症の key となるが、そのリガンドとして endotoxin が広く知られている一方で、脂肪酸も挙げられる⁴⁾。脂肪酸は全身臓器での慢性炎症の誘因、インスリン抵抗性増悪や膵島細胞での細胞障害による糖尿病の悪化⁵⁾、動脈壁のアポトーシスに伴う動脈硬化の進展⁶⁾ など引き起こす。それらは“lipotoxicity” と称され⁷⁾ 大きな注目を浴びている。肝臓での lipotoxicity は、*in vitro* において飽和脂肪酸が JNK のリン酸化を介して肝細胞のアポトーシス感受性を増大させるとの報告があるが⁸⁾、*in vivo* での脂肪酸投与と肝障害に関する報告はない。我々は世界に先駆けて、野生型 (Wild type 以下 WT) マウスへの経内頸静脈的飽和脂肪酸持続投与で脂肪肝炎が起こることを発見した。この病態進展には飽和脂肪酸-TLR4 経路が関与していると考えている。

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。

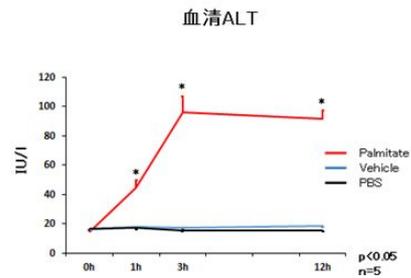
3. 研究の方法

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、各種分子生物学的検討を行った。

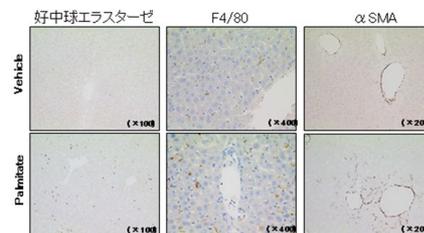
4. 研究成果

(1) 血清 ALT

短期投与モデルでは血清 ALT において野生型対照群 vs 野生型パルミチン酸投与群 = 17 ± 1.5 vs 96 ± 11 と有意差を認めた。

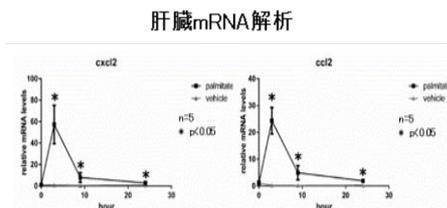


(2) SMA, 好中球エラストーゼ, F4/80 パルミチン酸投与群の肝臓で好中球エラストーゼ, F4/80, SMA 陽性細胞数が上昇した。



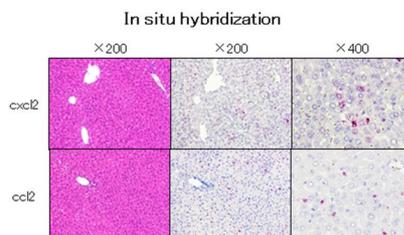
(3) mRNA 解析

肝臓における mRNA 解析ではケモカイン cxcl2, ccl2 が上昇した。

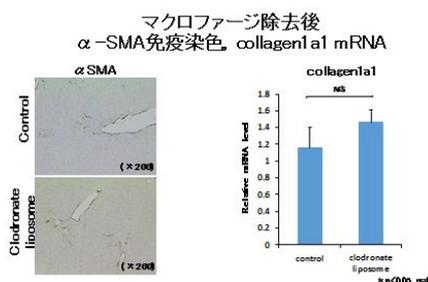


(4) In situ hybridization

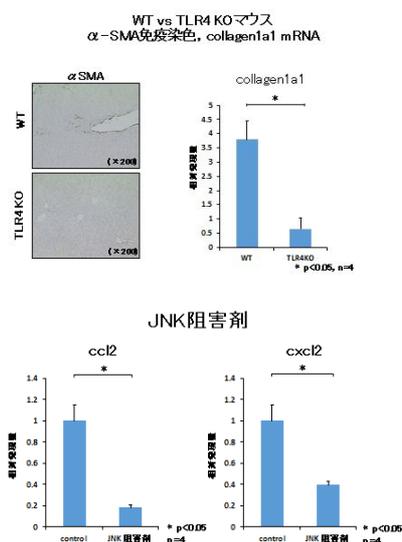
In situ hybridization では cxcl2 は肝細胞, ccl2 は Kupffer 細胞から発現すると示唆された。



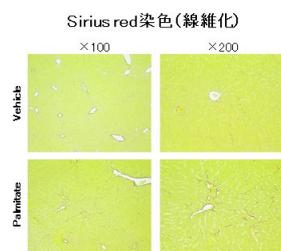
(5) マクロファージ除去後
clodronate liposome にてマクロファージ
除去後でも、パルミチン酸投与による
SMA 陽性細胞を認めた。



(6) TLR4 KO マウスおよび JNK 阻害剤
TLR4 KO マウス, JNK 阻害剤を用いた検討
においてパルミチン酸投与による各種変化
はキャンセルされる傾向にあった。



(7) 長期投与モデル
長期パルミチン酸投与モデルでは sirius red
染色での微細な肝線維化を示した。



我々は, *in vivo* において, 単一飽和脂肪酸の
肝臓への影響を評価できるマウスモデルを
確立した. パルミチン酸は, TLR4-JNK 経路を
介した自然免疫応答でケモカインを産生し,
好中球とマクロファージ浸潤を引き起こし
た. さらに直接的な星細胞活性化を介して
肝線維化を呈することは今までに報告がな
い. この機序のさらなる解明が,
NAFLD/NASH における lipotoxicity の解明,
新規診断法および治療法につながると思
う。

<引用文献>

- Day CP, et al. Gastroenterology. 1998; 114, 842-845.
- Imajo K, Ogawa Y, et al. Hyperresponsivity to low-dose endotoxin during progression to nonalcoholic steatohepatitis is regulated by leptin-mediated signaling. Cell Metab. 2012; 16(1): 44-54.
- Ogawa Y, Imajo K, et al. Soluble CD14 levels reflect liver inflammation in patients with nonalcoholic steatohepatitis. PLoS One. 2013; 8(6): e65211.
- Suganami, T., and Ogawa, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. J. Leukoc. Biol. 2010; 88(1), 33-39.
- Eguchi K, Manabe I, et al. Saturated fatty acid and TLR signaling link cell dysfunction and islet inflammation. Cell Metab. 2012; 15(4): 518-33.
- Furuhashi M, Tuncman G, et al. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. Nature. 2007(6): 959-965.
- Weinberg JM. Lipotoxicity. Kidney Int. 2006(9): 1560-6.
- Malhi H, Bronk SF, et al. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. J Biol Chem. 2006 (17): 12093-101.

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 9 件)

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. 9(12), 2014, e115403, 査読有.
doi: 10.1371/journal.pone.0115403.

Kessoku T, Ogawa Y, Yoneda M, Imajo K, Sumida Y, Eguchi Y, Fujii H, Hyogo H, Ono M, Suzuki Y, Kawaguchi T, Chayama K, Tanaka S, Fujimoto K, Anzai K, Saibara T, Sata M, Itoh Y, Nakajima A, Okanoue T; Japan Study Group of NAFLD (JSG-NAFLD). Simple scoring system for predicting cirrhosis in nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol. 20(29), 2014, 10108-10114, 査読有.
doi: 10.3748/wjg.v20.i29.10108.

Ogawa Y, Imajo K, Yoneda M, Nakajima A. Update: epidemiology and pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*. 111(1) 2014, 14-24, 査読有.

Imajo K, Yoneda M, Ogawa Y, Wada K, Nakajima A. Microbiota and nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Immunopathol*. 36(1), 2014, 115-32, 査読有.
doi: 10.1007/s00281-013-0404-6.

Imajo K, Yoneda M, Fujita K, Kessoku T, Tomeno W, Ogawa Y, Shinohara Y, Sekino Y, Mawatari H, Nozaki Y, Kirikoshi H, Taguri M, Toshima G, Takahashi J, Saito S, Wada K, Nakajima A. Oral choline tolerance test as a novel noninvasive method for predicting nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol*. 49(2), 2014, 295-304, 査読有.
doi: 10.1007/s00535-013-0776-3.

Imajo K, Yoneda M, Kessoku T, Ogawa Y, Maeda S, Sumida Y, Hyogo H, Eguchi Y, Wada K, Nakajima A: Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Int J Mol Sci*, 14(11), 2013, 21833-21857, 査読有.
doi: 10.3390/ijms141121833.

Tomeno W, Yoneda M, Imajo K, Ogawa Y, Kessoku T, Saito S, Eguchi Y, Nakajima A: Emerging drugs for non-alcoholic steatohepatitis. *Expert Opin Emerg Drugs*, 18(3), 2013, 279-290, 査読有.
doi: 10.1517/14728214.2013.811232.

Ogawa Y, Imajo K, Yoneda M, Kessoku T, Tomeno W, Shinohara Y, Kato S, Mawatari H, Nozaki Y, Fujita K, Kirikoshi H, Maeda S, Saito S, Wada K, Nakajima A: Soluble CD14 levels reflect liver inflammation in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One*, 8(6), 2013, e65211, 査読有.
doi: 10.1371/journal.pone.0065211.

Tomeno W, Yoneda M, Imajo K, Suzuki K, Ogawa Y, Shinohara Y, Mawatari H, Fujita K, Shibata W, Kirikoshi H, Maeda S, Nakajima A, Saito S: Evaluation of the liver fibrosis index calculated by using real-time tissue elastography for the non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic liver diseases. *Hepatol Res*, 43(7), 2013, 735-742, 査読有.
doi: 10.1111/hepr.12023.

〔学会発表〕(計 11 件)

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, 2014.10.24, 神戸国際会場 (兵庫県).

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, 2014.10.21, Vienna (Austria).

小川祐二, 本多靖, 結束貴臣, 留野 渉, 今城 健人, 馬渡 弘典, 斉藤 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), 2014.10.11, 横浜市立大学 (神奈川県).

小川祐二, 本多 靖, 結束 貴臣, 留野 渉, 今城 健人, 馬渡 弘典, 斉藤 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, 2014.7.10, 芝蘭会館 (京都府).

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 WS10 8 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, 2014.5.30, ホテルニューオータニ (東京).

Ogawa Y, Honda Y, Kessoku T, Tomeno W, Imajo K, Mawatari H, Yoneda M, Kirikoshi H, Maeda S, Saito S, Wada K, Nakajima A: Analysis of lipotoxicity in liver induced by palmitate in vivo. ADDW poster session (Steatohepatitis Basic), 2014.5.3 Cicago (U.S.A).

小川祐二, 今城 健人, 結束 貴臣, 中島 淳: パルミチン酸単独投与が引き起こす肝臓における lipotoxicity の検討. 第 10 回酸化ストレスと肝研究会 一般演題, 2013.11.16, ANA クラウンプラザホテル福岡 (福岡県).

小川祐二, 今城 健人, 中島 淳: 血清 soluble CD14 は NASH における肝内炎症を反映する. 2013 年度日本消化器関連学会週間 (JDDW 2013) パネルディスカッション 5 (肝臓学会・消化器病学会・消化器外科学会合同) (非侵襲的肝病態評価法の適応と限界), 2013.10.9, 品川プリンスホテル (東京都).

小川祐二, 斉藤 聡, 米田 正人: エストロゲン受容体 α 遺伝子 (ESR1) の SNPs は NAFLD 病態進展に関与する. 第 99 回日本消化器病学会総会 パネルディスカッション 4 (遺伝子多型解析と消化器疾患), 2013.3.23, 城山観光ホテル (鹿児島県).

〔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：
出願年月日：
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

小川 祐二 (OGAWA, Yuji)
横浜市立大学・附属病院・指導診療医
研究者番号：20644959

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし