

Title	過酸化水素シグナルに着目した、脂肪性肝疾患の新規病態機序・治療法の解明
Sub Title	The role of oxidative stress for progression of fatty liver disease
Author	寺谷, 俊昭(Teratani, Toshiaki) 清水, 孝彦(Shimizu, Takahiko)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	非アルコール性脂肪肝炎(Nonalcoholic steatohepatitis : NASH)は、肝臓内に脂質蓄積, 炎症, 加えて線維化を呈する疾患である。NASH病態進展に, 肥満・インスリン抵抗性・高血圧・脂質異常症などの背景因子が関与する。酸化ストレスは, NASH病態形成のセカンドヒットとして考えられているが, 脂肪肝病態形成における役割は不明であった。野生型マウスに比べSOD欠損マウスで, 肝臓への脂質沈着が減少した。酸化ストレスが脂肪肝病態形成に深く関与することが示唆された。 Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is the more severe form of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). NASH is pathologically characterized by fat accumulation, inflammation and fibrosis in liver. Metabolic factors such as obesity, insulin resistance, hypertension and dyslipidemia are involved in the progression in NAFLD. Although Oxidative stress is considered as a second hit of NASH pathogenesis, its role in progression of NAFLD was unknown. Hepatic lipid accumulation was reduced in SOD-deficient mice compared to wild type mice. It is suggested that oxidative stress is involved in NAFLD pathogenesis.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2015～2017 課題番号：15K19348 研究分野：消化器内科
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K19348seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19348

研究課題名(和文) 過酸化水素シグナルに着目した、脂肪性肝疾患の新規病態機序・治療法の解明

研究課題名(英文) The role of oxidative stress for progression of fatty liver disease

研究代表者

寺谷 俊昭 (Teratani, Toshiaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：40624408

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)：非アルコール性脂肪肝炎(Nonalcoholic steatohepatitis: NASH)は、肝臓内に脂質蓄積、炎症、加えて線維化を呈する疾患である。NASH病態進展に、肥満・インスリン抵抗性・高血圧・脂質異常症などの背景因子が関与する。酸化ストレスは、NASH病態形成のセカンドヒットとして考えられているが、脂肪肝病態形成における役割は不明であった。野生型マウスに比べSOD欠損マウスで、肝臓への脂質沈着が減少した。酸化ストレスが脂肪肝病態形成に深く関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is the more severe form of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). NASH is pathologically characterized by fat accumulation, inflammation and fibrosis in liver. Metabolic factors such as obesity, insulin resistance, hypertension and dyslipidemia are involved in the progression in NAFLD. Although Oxidative stress is considered as a second hit of NASH pathogenesis, its role in progression of NAFLD was unknown. Hepatic lipid accumulation was reduced in SOD-deficient mice compared to wild type mice. It is suggested that oxidative stress is involved in NAFLD pathogenesis.

研究分野：消化器内科

キーワード：肝臓 脂肪肝

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis: NASH)は、メタボリックシンドロームの肝臓での表現形と考えられている。NASH患者の多くは、肥満・インスリン抵抗性・高血圧・脂質異常症などを背景因子として有している。NASHは進行性疾患であり、NASH患者の約2割が肝硬変へと進行し、8%が肝臓死に至るとの報告もなされた。現在、日本人口の約1-2%がNASHに罹患しているとの推察がなされ、今後も肥満人口増加に伴いNASH患者数の増加が見込まれる。そのため、NASH発症機序解明と治療法の確立は我が国の重要な課題といえる。

2. 研究の目的

肝臓 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)シグナル増強が、脂肪肝形成の主要な病態機序の1つとして考えられている。一方、肝臓で産生される活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)は、脂肪肝を脂肪肝炎へと進展させる2nd hitの一因と想定されているが、非アルコール性脂肪性肝疾患病態(nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD)における役割は未だ定まっていない。そこで、我々は、肝臓内にROSが蓄積するマウスを作製し、肝臓内ROS蓄積が肝臓 PPARシグナル増強に果たす役割を明確にし、新たな見地からの脂肪肝病態の分子機序の解明と、新規治療法確立を試みる。

3. 研究の方法

1) 脂肪肝病態形成におけるROSの役割に関する検討

CuZn-Super Oxide Dismutase (SOD1)は、細胞質で発生する活性酸素を処理する主要な酵素の1つであり、superoxide anionを過酸化水素と酸素へ不均化する。生成した過酸化水素はCatalaseやPeroxidaseにより酸素と水へ分解され無毒化される。SOD1欠損は、細胞内への過剰なsuperoxide anion蓄積を介して、生理機能に大きな影響を与えると考えられている。

レプチンシグナルが、脂肪肝を含む肥満病態形成に関与することが既に報告されている。そこで、NAFLD病態機序における活性酸素の役割を解明するため、レプチン欠損であるob/obマウスとSOD1欠損マウスとの交配により、二重遺伝子変異マウスを作成した(OB/Cont-SOD1^{wt}, OB/Cont-SOD1^{KO}, OB/Ob-SOD1^{wt}, OB/Ob-SOD1^{KO})。加えて、レプチン受容体欠損であるdb/dbマウスとSOD1欠損マウスとの交配により、二重遺伝子変異マウスを作成した(db/Cont-SOD1^{wt}, db/Cont-SOD1^{KO}, db/db-SOD1^{wt}, db/db-SOD1^{KO})。上記マウスを24週間飼育し、脂肪肝形成におけるROSの役割を検証した。

2) 脂肪肝病態治療法確立に向けた試み アデノウィルスベクターをマウスに投与す

ることで容易に肝臓に形質導入することができる。そこで、我々は、脂肪肝病態形成に重要とされるPPARやROS代謝関連酵素を肝臓内で過剰発現させた。

一方で、Thermo Fisher Scientificより販売されているInvivoFectamineは、肝臓特異的にSiRNAを輸送することができる。そこで、PPARやROS代謝関連酵素に対するSiRNAとInvivoFectamineを組み合わせたドラッグデリバリーシステムを構築する。脂肪肝病態モデルマウスを作成し、各種アデノウィルス若しくはSiRNAのいずれかをマウスに投与し、脂肪肝病態のコントロールを試みた。

4. 研究成果

本研究課題の成果

野生型マウス(OB/Cont-SOD1^{wt})と比較して、レプチン欠損マウス(OB/Ob-SOD1^{wt})マウスにおいて、体重・肝重量・脂肪組織重量が有意に高値を呈した。OB/Ob-SOD1^{wt}マウスの血清遊離脂肪酸(free fatty acid: FFA)量およびトリグリセリド(TG)量は野生型に比べ有意に高値であった。OB/Ob-SOD1^{wt}マウスの空腹時血糖は、野生型に比べ有意に高値であった。さらに耐糖能試験(GTT, ITT)を行なったところ、OB/Ob-SOD1^{wt}マウスは明確なインスリン抵抗性病態を示した。肝臓病理組織標本を確認したところ、OB/Cont-SOD1^{wt}マウスの肝臓内において、明確な脂肪滴形成を認めなかったが、OB/Ob-SOD1^{wt}マウスの肝臓内において、大きな脂肪滴が確認された。一方で、OB/Cont-SOD1^{wt}とOB/Ob-SOD1^{wt}のいずれの肝臓においても、維化病態を認めなかった。肝臓トリグリセリド蓄積は、OB/Cont-SOD1^{wt}マウスに比べ、OB/Ob-SOD1^{wt}マウスで顕著であった。肝細胞障害マーカーである血清ALTレベルは、OB/Cont-SOD1^{wt}マウスに比べ、OB/Ob-SOD1^{wt}マウスで有意に高値であった。これらの結果により、OB/Ob-SOD1^{wt}マウスは単純性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver: NAFL)病態を有する肥満マウスであることが明らかとなった。

次に、これらマウスにおけるSOD1欠損の役割を確認した。OB/Cont-SOD1^{wt}とOB/Cont-SOD1^{KO}マウスの体重・肝重量・脂肪組織重量は、ほぼ同値を示した。OB/Contの血清脂質量や耐糖能はSOD1欠損による影響を受けなかった。SOD1欠損は、OB/Contマウスの肝細胞障害や脂肪肝形成に影響を与えなかった。これらの結果は、SOD1欠損が、肥満病態および脂肪肝病態形成に直接惹起しないことを示している。脂肪肝病態におけるSOD1の役割を明確にするために、OB/Ob-SOD1^{wt}とOB/Ob-SOD1^{KO}マウスの肝臓を比較した。OB/Ob-SOD1^{KO}マウスの肝重量は、OB/Ob-SOD1^{wt}と比べ、有意に低値であった。肝臓病理標本を観察したところ、OB/Ob-SOD1^{wt}マウスで確認された脂肪滴サイズが、SOD1欠損により縮小し、肝臓TG蓄積は、OB/Ob-SOD1^{wt}と比較し

て、Ob/Ob-SOD1^{KO} で有意に軽度であった。血清 ALT レベルは、Ob/Ob-SOD1^{WT} と比較して、Ob/Ob-SOD1^{KO} で有意に低値であった。PPAR シグナルは、脂肪肝病態形成において、重要な役割を担っている。そこで、SOD1 欠損と PPAR シグナルの関係を明確にするため、これらマウスの肝臓より RNA を分離し、PPAR シグナル下流遺伝子である Fsp27 mRNA 発現量をリアルタイム PCR で確認した。Ob/Cont-SOD1^{WT} に比べ、Ob/Cont-SOD1^{WT} マウス肝臓の Fsp27 発現量が有意に高値であった。Ob/Cont-SOD1^{WT} と Ob/Cont-SOD1^{KO} マウス肝臓の Fsp27 発現量はほぼ同値であったが、Ob/Ob-SOD1^{KO} マウスの肝臓 Fsp27 発現量は、Ob/Ob-SOD1^{KO} マウスの肝臓に比べ、低値であった。Ob/Ob マウスで観察された SOD1 欠損の脂肪肝病態発症・進展抑制効果は、レプチン受容体欠損である db/db マウスでも同様に観察された。これらの結果より、SOD1 は、肝臓内 PPAR シグナルを介して、脂肪肝形成に関与することが考えられた。

次に、アデノウィルスベクターおよびリポフェクタミンを用いて ROS 代謝酵素を標的とした脂肪肝病態治療法の確立を試みた。

Ob/Ob マウスに ROS 分解酵素である PPAR (Ad-Pparg) もしくは Catalase (Ad-Cat) を組み込んだアデノウィルスベクターを用いて、PPAR および Catalase を肝臓内に過剰発現させた。Ad-Pparg 投与群において Ob/Ob マウスの脂肪肝病態と肝細胞障害の増悪を認め、Ad-Cat 投与は Ob/Ob マウスの脂肪肝病態を改善した。さらに、Ad-Cat 投与は、肝臓 Fsp27 mRNA 量を有意に低下させた。

高脂肪食 (high fat diet: HFD) をマウスに 24 週間摂餌させ、ヒト病態に近似した脂肪肝病態モデルマウスを作製した。HFD 摂食は、体重・肝重量・脂肪重量を有意に増加させた。HFD 摂餌群マウスの血清 TG, FFA 量は、コントロール食摂餌群マウスに比し、有意に高値を呈した。HFD 摂食は、インスリン抵抗性病態を惹起した。HFD 摂食は、肝臓内 TG 蓄積を増加させ、巨大な脂肪滴を形成した。血清 ALT レベルは、HFD 摂食により有意に増加した。これら食餌性肥満マウスに、各種 Si-RNA を尾静脈より投与し、肝臓内の標的遺伝子をノックダウンした。Si-Pparg 投与群マウスにおいて、脂肪肝病態の改善が認められた。HFD 摂餌による肝臓 Fsp27 発現亢進が Si-Pparg 投与により抑制された。一方で、Si-SOD1 投与により HFD 摂餌による脂肪肝病態が増悪した。Si-Control 投与群に比べ、Si-Pparg 投与群で、肝臓 Fsp27 発現量が低下していた。これらの結果より、ROS 代謝関連酵素を標的とした脂肪肝治療法が有効的であると示された。PPAR 活性化機構は、未だに詳細になっていない。本研究結果により、ROS を介した新たな PPAR シグナル活性化機構の存在が考えられた。

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)

[雑誌論文](計5件)

全て査読あり

1. Furuhashi H, Tomita K, Teratani T et al., Vitamin A-coupled liposome system targeting free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells offers a beneficial therapeutic strategy for liver fibrosis. *Hepatol Res.*, 2018, 48 巻, 397-407. doi: 10.1111/hepr.13040.

2. Nakamoto N, Amiya T, Aoki R, Taniki N, Koda Y, Miyamoto K, Teratani T et al., Commensal Lactobacillus Controls Immune Tolerance during Acute Liver Injury in Mice., *Cell Rep.*, 2017, 21 巻, 1215-1226. doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.022.

3. Hayashi A, Mikami Y, Miyamoto K, Kamada N, Sato T, Mizuno S, Naganuma M, Teratani T et al., Intestinal Dysbiosis and Biotin Deprivation Induce Alopecia through Overgrowth of Lactobacillus murinus in Mice., *Cell Rep.*, 2017, 20 巻, 1513-1524. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.057.

4. Teratani T, Tomita K, Suzuki T et al., Free cholesterol accumulation in liver sinusoidal endothelial cells exacerbates acetaminophen hepatotoxicity via TLR9 signaling., *J Hepatol.*, 2017, 67 巻, 780-790. doi: 10.1016/j.jhep.2017.05.020.

5. Amiya T, Nakamoto N, Chu PS, Teratani T et al., Bone marrow-derived macrophages distinct from tissue-resident macrophages play a pivotal role in Concanavalin A-induced murine liver injury via CCR9 axis., *Sci Rep.*, 2016, 6 巻, 35146. doi: 10.1038/srep35146.

[学会発表](計2件)

1. 寺谷 俊昭, Aryl Hydrocarbon Receptor シグナルが、非アルコール性脂肪肝炎肝臓線維化病態機序に果たす役割に関する検討、第 52 回日本肝臓学会総会、2016 年

2. 寺谷 俊昭, gut-liver-brain axis によるマウス大腸炎抑制制御メカニズム、第 53 回日本消化器免疫学会総会、2016 年

[図書](計0件)

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺谷 俊昭 (TERATANI, Toshiaki)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号: 40624408

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

清水 孝彦 (SHIMIZU, Takahiko)
千葉大学・医学部・特任准教授