慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	肝臓線維化病態における、肝星細胞のFree cholesterol代謝機構の解明
Sub Title	Study on the mechanism of free cholesterol metabolism of hepatic stellate cell in liver fibrosis
Author	寺谷, 俊昭(Teratani, Toshiaki)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
JaLC DOI	
Abstract	本邦では, メタボリックシンドロームの患者数増加に伴い, 非アルコール性脂肪肝炎の患者数が増大している。肝星細胞の遊離コレステロール蓄積は, TLR4シグナルの増大を介して, 肝星細胞のTGFβに対する感受性を増大させるが, 我々は細胞内コレステロール代謝関連遺伝子であるAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1の欠損が, 肝臓線維化病態を増悪させることを明らかにした。Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1は非アルコール性脂肪肝炎を含む肝臓線維化治療の有望な治療標的となるであろう。 Given the growing number of metabolic syndrome patients in recent years, the incidence of nonalcoholic steatohepatitis increases in Japan. Accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cell (HSC) increased levels of Toll-like receptor 4 (TLR4), leading to down-regulation of bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor (a pseudoreceptor for transforming growth factor [TGF]β); the HSCs became sensitized to TGFβ-induced activation. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) catalyzes the conversion of free cholesterol to cholesterol ester, which prevents excess accumulation of free cholesterol. ACAT1 deficiency exaggerates liver fibrosis mainly through enhanced free cholesterol accumulation in HSCs. Regulation of ACAT1 activities in HSCs could be a target for treatment of liver fibrosis.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2012～2014 課題番号：24790719 研究分野：消化器内科, 肝臓病学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24790719seika

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.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月　 ２ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2012～2014
課題番号：２４７９０７１９

研究課題名（和文）肝臓線維化病態における、肝星細胞のＦｒｅｅ　ｃｈｏｌｅｓｔｅｒｏｌ代謝機構の解明

研究課題名（英文）Study on the mechanism of free cholesterol metabolism of hepatic stellate cell in liver fibrosis

研究代表者
寺谷　俊昭（TERATANI, TOSHIAKI）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：４０６２４４０８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本邦では、メタボリックシンドロームの患者数増加に伴い、非アルコール性脂肪肝炎の患者数が増大している。肝星細胞の遊離コレステロール蓄積は、TLR4シグナルの増大を介して、肝星細胞のTGFβに対する感受性を増大させるが、我々は細胞内コレステロール代謝関連遺伝子であるAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1の欠損が、肝臓線維化病態を増悪させることを明らかにした。Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1は非アルコール性脂肪肝炎を含む肝臓線維化治療の有望な治療標的となるであろう。

研究成果の概要（英文）：Given the growing number of metabolic syndrome patients in recent years, the incidence of nonalcoholic steatohepatitis increases in Japan. Accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cell (HSC) increased levels of Toll-like receptor 4 (TLR4), leading to down-regulation of bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor (a pseudoreceptor for transforming growth factor [TGF]β); the HSCs became sensitized to TGFβ-induced activation. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) catalyzes the conversion of free cholesterol to cholesterol ester, which prevents excess accumulation of free cholesterol. ACAT1 deficiency exaggerates liver fibrosis mainly through enhanced free cholesterol accumulation in HSCs. Regulation of ACAT1 activities in HSCs could be a target for treatment of liver fibrosis.

研究分野：消化器内科、肝臓病学

キーワード：遊離コレステロール　肝臓線維化

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、肥満・インスリン抵抗性・高血圧・脂質異常症を背景としたメタボリックシンドロームの肝臓での表現形として考えられている。米国では、成人人口の約 3～4% が NASH であろうと推察されている。ライフスタイルの欧米化が進む本邦においても、人口の約１%が NASH に罹患しているとの推察がされており、今後肥満人口の増加に伴い NASH 患者数は更に増加することが予想されている。NASH が進行性の疾患であることは様々な疫学的調査により明らかになっている。NASH 患者の 20%が肝硬変へと進行し、8%が肝臓死に至ったと報告されており、NASH 発症メカニズムの解明および NASH 治療法の確立は重要な緊急課題である。加えて、NASH は肝移植に際しての危険因子であり、移植医療上においても注目集めている疾患である。

メタボリックシンドロームを背景とした高コレステロール血症は NASH 発症および病態進展の独立した危険因子として考えられているが、NASH 病態機序において血中および肝臓コレステロールの役割は未だに不明瞭である。最近、我々は、食事由来のコレステロールが肝臓構成細胞の１つである肝星細胞に **Free cholesterol** として蓄積し、肝星細胞の TLR4 シグナルを増強させて TGFβ 依存的な肝臓線維化病態を悪化させることを明らかにした(Teratani, et al. [18 人中 1 番目]: Gastroenterology 2012)。ヒト NASH 病態機序・進展において、肝星細胞への **Free cholesterol** 蓄積が肝線維化病態の増悪因子として働くことが示唆される結果である。一方で、初代肝星細胞を用いた in vitro 解析で、細胞内に **Free cholesterol** を蓄積した細胞が TLR4 シグナルの増大を介して TGFβ に対し易感受性を示すのに対し、細胞内に Cholesterol-ester を蓄積した細胞は TGFβ に対し易感受性を示さないことを我々は明らかにした(Teratani, et al. [18 人中１番目]: Gastroenterology 2012)。この結果は、肝星細胞において、細胞内の総コレステロール量ではなく **Free cholesterol** 量が TGFβ に対する感受性を規定する因子の１つであることを示している。以上より、我々は肝星細胞内の **Free cholesterol** 量を低下させることが NASH 線維化病態の改善につながると考えた。

Free cholesterol を Cholesterol-ester に変換する酵素として acetyl-CoA acetyltransferase 1 (ACAT1)が挙げられている。我々の行った in vitro 解析で、ACAT の阻害は肝星細胞に **Free cholesterol** を蓄積させた(Teratani, et al. [18 人中１番目]: Gastroenterology 2012)。

一方で、Cholesterol-ester を **Free cholesterol** に変換する酵素 (cholesterol-ester hydrolase; CEH)として hormone-sensitive lipase (LIPE)が知られており、また、ミクロソームに存在する CEH として neutral cholesterol-ester hydrolase 1 (NCEH1)が最近同定された (Okazaki H, et al.: J Biol Chem, 2008)。マクロファージにおける CEH 活性を NCEH1 と LIPE が半々ずつ担っていることが明らかにされている(Sekiya M, et al.: Cell Metab, 2009)。そこで、我々は NASH モデルラットより肝星細胞を分離し、肝星細胞の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ解析で評価した。正常肝由来の肝星細胞において NCEH1 と LIPE は発現しており、両遺伝子の発現量はほぼ同じであった。一方、NASH モデルラット由来の肝星細胞で、NCEH1 の発現量が通常食群の細胞と比較して顕著に高値を示した(Teratani, et al. unpublished data)。この結果より、我々は NASH 病態進展において肝星細胞の NCEH1 が重要な役割を担うと予想しているが、詳細な解析はまだ行っていない。

２．研究の目的

以上より、我々は、Free cholesterol 代謝関連遺伝子である ACAT1、LIPE および NCEH1 に着目し、これら遺伝子を改変させたマウスとヒト NASH および肝硬変臨床検体を用いて NASH 進展における肝星細胞の Free cholesterol 代謝の役割について評価・検討することを目的とした。

３．研究の方法

我々は既に、ACAT1 ノックアウトマウスを有している。これらのノックアウトマウス、野生型マウスに、通常食、メチオニン-コリン欠損食投与を、各群が同一カロリーを摂取するように 12 週間施行し NASH モデルを作成する。また、我々は既にマウス肝臓に NASH を発症させる高脂肪食を調整している。この食餌に関しても、通常食、1% コレステロール食、高脂肪食、1% コレステロールを含んだ高脂肪食投与を、各群が同一カロリーとなるように 24 週間施行し NASH モデルを作成する。その後、各群のマウスより肝臓および血清を採取する。肝臓線維化の差異は、組織学的(マッソントリクローム染色、αSMA 免疫組織染色)・生化学的(ハイドロキシプロリンの定量)手法で評価し、さらに肝臓線維化関連遺伝子(collagen 1α1, collagen 1α2, αSMA)の mRNA 発現についてもリアルタイム PCR を用いて定量評価する。脂肪肝の差異は、組織学的（HE 染色）手法により評価し、肝臓に含まれるコレステロールおよびトリグリセライド量については生化学的手法を用いて定量評価をする。肝細胞障害の差異は、組織学的（TUNEL 染色)・血清学的・生化学的(肝臓ミトコンドリア膜電位の測定)手法により評価検討する。肝臓へのマクロファージの浸潤は組織学的（F4/80 免疫組織染色)手法で評価し、さらにクッパー細胞の活性化は肝臓サイトカインおよび炎症反応関連遺伝子群(TNFα, F4/80, CD68, CD11b, Vcam, Icam)の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で定量することで評価する。

同様に、これらのノックアウトマウス・wild マウスに CCL_4 ４週間投与もしくは総胆管結紮により各々肝硬変モデルを作成する。各種解析は、NASH モデル解析時と同様に施行する。

４．研究成果

NASH モデルマウス各群の肝臓より、RNA、タンパク質を抽出し、線維化マーカーや炎症マーカーの変動を定量評価している。また DNA マイクロアレイ法により、病態変化に関与する遺伝子産物のピックアップも施行中である。GTT、ITT 施行によりインスリン抵抗性の変動をも評価検討中である。

また、CCL_4 投与による肝臓線維化モデルマウスの検討では、ACAT1 ノックアウトマウスで肝臓線維化が有意に進展していた。総胆管結紮による肝臓線維化モデルでも同様に ACAT1 ノックアウトマウスで肝臓線維化が増悪した。ACAT1 欠損マウス由来の肝星細胞では wild マウス由来の肝星細胞に比べて Free cholesterol の有意な蓄積を認めた。さらに、In vitro での TGFβ刺激による、肝星細胞の活性化実験でも、ACAT1 欠損肝星細胞では、活性化が有意に増強していた。ACAT1 欠損に伴う細胞内 Free cholesterol 蓄積により、リガンド結合により惹起される TLR4 タンパク質分解が阻害され、結果として TLR4 タンパク質蓄積の増強が起こることが確認された。その結果、ACAT1 欠損肝星細胞では、TLR4 シグナル下流分子であり、TGFβ偽受容体である Bambi (bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor)の発現が有意に低下し、TGFβ刺激に対する感受性が増強し活性化が促進することが明らかとなった。

このように我々は、細胞内の Free cholesterol 蓄積が、細胞外コレステロールレベルとは独立した形で肝星細胞活性化を規定する重要な因子であることを明らかと

した。そして、ACAT1を初めとするその代謝機構の調節が、肝線維化の新たな治療戦略となり得ることも明らかとなった。
今後、この分野に着目した創薬研究の進展が期待されるものである。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　４件）

1. Teratani T (23人中2番目), et al. : Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. **Hepatology** 59:154-69, 2014. doi: 10.1002/hep.26604. 査読有
2. Teratani T (28人中2番目), et al. : Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1 mediates liver fibrosis by regulating free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells. **J Hepatol** 61: 98-106, 2014. doi: 10.1016/j.jhep.2014.03.018., 査読有
3. Teratani T (19人中8番目), et al.：CCR2 knockout exacerbates cerulein-induced chronic pancreatitis with hyperglycemia via decreased GLP-1 receptor expression and insulin secretion. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 304: G700-707, 2013. doi: 10.1152/ajpgi.00318.2012. 査読有
4. Teratani T (23人中2番目), et al.：p53/p66Shc-mediated signaling contributes to the progression of non-alcoholic steatohepatitis in humans and mice. **J Hepatol** 57: 837-843, 2012. doi: 10.1016/j.jhep.2012.05.013. 査読有

〔学会発表〕（計　１件）

1. Teratani T（17人中2番目） The characteristic Mechanisms of Free Cholesterol Accumulation in Hepatic Stellate Cells Aggravate liver fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice. The 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of Liver Diseases. Amsterdam, The Netherlands, April24-28, 2013.

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・助教
研究者番号：40624408