

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460990

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝障害における組織リモデリング機構の共通基盤の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the common mechanisms of tissue remodeling in nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者

竹井 謙之(Takei, Yoshiyuki)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10306954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、protein S (PS)の発現異常がNKT細胞の活性化とアポトーシス抑制を介して脂肪性肝炎発症に寄与していることを明らかにした。さらに、アルコール性脂肪性肝炎に合併する動脈硬化症進展には凝固系の活性化と骨髄多能性幹細胞動員因子の低下が重要な役割を果たしていることを示した。これらの成績は凝固線溶系の機能異常が脂肪性肝炎発症と動脈硬化惹起の双方に關与していることを示し、凝固線溶系への介入による肝障害と動脈硬化症の同時制御の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we elucidated that Protein S (PS) exacerbates steatohepatitis by stimulating natural killer T and inhibiting apoptosis of the cell type. Atherosclerosis caused by ethanol is associated with activation of the coagulation system and decreased circulating levels of stromal cell-derived factor-1. These data collectively indicate that derangement of the coagulation and fibrinolysis system contributes to pathogenesis of not only steatohepatitis but atherosclerosis. This suggests that the coagulation and fibrinolysis system is a new therapeutic target for steatohepatitis and its complication, atherosclerosis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：脂肪性肝炎 動脈硬化症 凝固・線溶系 組織リモデリング protein S

1. 研究開始当初の背景

近年、非アルコール性脂肪性肝障害 (NAFLD) の病態解明が進み、肝の脂肪化は決して「良性」の疾患ではなく、ひとたび脂肪性肝炎 (NASH/ASH) に進展すれば、肝硬変・肝癌、肝不全に至るリスクが高いのみならず、耐糖能異常や血圧上昇、脂質代謝の偏奇、免疫異常を惹起して全身へ大きな影響を与え、メタボリックシンドロームの発症基盤となることが明らかとなってきた。NAFLD はまた、それ自体が独立した心血管イベントのリスクファクターであること、内皮機能を障害し動脈硬化を促進する因子であることが報告されている。NASH は内臓脂肪型肥満と密接な関係があり、脂肪細胞は TNF α 、アディポネクチン、レプチン、線溶制御因子、アンジオテンシノーゲンなど多彩なアディポカインを産生する。アディポカインの多くは肝でも活発に産生され、これら因子群が織り成す情報のクロストークは生理機能を維持する上で必須の役割を担っている。NASH ではアディポカインクロストークのゆがみが生じ、組織障害惹起やインスリン抵抗性誘導、免疫系の攪乱を介してその病態形成に関わる。なかでも PAI-1、thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) などは線溶系阻害する作用を持つことから、その過剰発現により NASH では凝固亢進状況が形成されている。肝組織リモデリング、血管疾患発症の両者には凝固系の活性化、線溶系の低下、凝固制御機構の機能異常により血液が凝固亢進状態となっていることが重要な因子と考えられ、凝固線溶系と凝固制御機構の平衡破綻が NASH/ASH の発症と動脈硬化進展の共通基盤であると想定される。

2. 研究の目的

非アルコール性及びアルコール性脂肪性肝炎 (NASH と ASH) は肝硬変・肝癌に進展しうる病態であり、メタボリックシンドロームの発症基盤となり動脈硬化症とも深く関連している。本研究は、NASH/ASH と動脈硬化進展に共通する組織リモデリング機構を凝固・線溶系機能の平衡破綻の面から検討し、「全身に展開する慢性炎症と組織リモデリング」という視点から両者の病態連関を解明するとともに、凝固・線溶系への介入による NASH/ASH と動脈硬化症の同時制御という、新しい治療学への展開を目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、凝固・線溶系の制御因子 (TAFI, protein S 「PS」) 等の肝線維化制御作用を研究対象として、肝障害、肝線維化モデルマウスに対する TAFI, PS の効果について検討を行うものである。

最初に、TAFI 欠損マウスを用いた TAFI の肝障害制御機構の解析を行った。TAFI 欠損マウス、野生型マウス、コントロールマウス

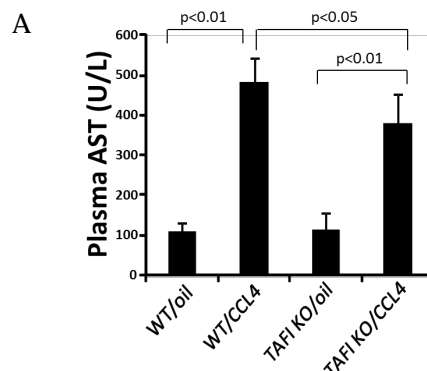
を四塩化炭素 (CCL4) 投与群、オイル投与群に分けて実験を行った。3 週間の処理後、ネプタール麻酔下に開腹して肝を採取し、hydroxyproline 含量などの発現量の比較を行う。また、血液の採取も行い、炎症性サイトカイン量なども定量し、その変化を比較検討する。

次にヒト PS 過剰発現マウス、コントロールマウスをエタノール投与群、プラセボ投与群に分けて実験を行った。48 時間の処理後、ネプタール麻酔下に開腹して肝を採取し、炎症性マーカーなどを測定した。さらに、肝ナチュラルキラー T (NKT) 細胞のアポトーシスに対する PS の作用も検討した。

さらに脂肪性肝炎/アンジオテンシン II 誘導動脈硬化症合併マウスモデルにおいて、動脈硬化進展におけるアルコール摂取量と骨髄由来幹細胞の分化・遊走に関わるケモカインの関連性についても検討を行った。脂肪性肝炎/アンジオテンシン 誘導動脈硬化症マウスモデルを作製するため、高脂肪食を 6 週間投与後、米国の Jackson Laboratory から購入した 9~10 週齢雄の ApoE 欠損マウスに皮下に植え込んだ浸透圧ミニポンプ (alzet osmotic pump[®]) を用いてアンジオテンシン (1.5 mg/kg/day) の投与を行った。また、マウスに腹腔内投与で生理食塩 (Saline/Saline 群、Angiotensin/Saline 群)、低濃度エタノール (Angiotensin/Low-ethanol 群) 又は高濃度エタノール (Angiotensin/High-ethanol 群) を投与してマウス群の間に比較検討を行った。

4. 研究成果

野生型 CCL4 の投与群 (WT/CCL4、TAFI KO/CCL4) では、コントロール群 (WT/oil、TAFI KO/oil) に比べ、aspartate transaminase (AST) と alanine transaminase (ALT) の血液濃度は有意に高値であった。しかし、TAFI KO/CCL4 群では、AST と ALT の血中濃度は WT/CCL4 群に比べ、有意に上昇した (図 1A,B)。肝組織中の transforming growth factor (TGF) β 1 の濃度及び hydroxyproline の含量も検討した。TAFI KO/CCL4 群では、WT/CCL4 群に比べ、肝組織の TGF β 1 mRNA 発現は有意に上昇し、hydroxyproline の含量は高い傾向であった (図 2)。TAFI による線溶系の低下は肝炎・肝線維化の発症機序に関与することが示唆された。



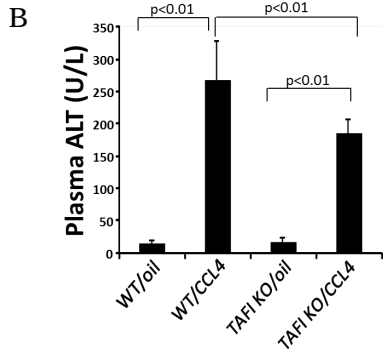


図 1AB . トランスアミナーゼの血中濃度

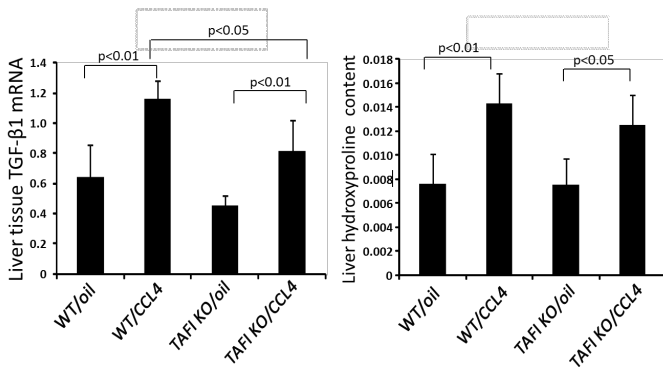


図 2 . TGFβ1 発現と hydroxyproline の含量

一方、PS 過剰発現マウスでは野生型マウスに比べ、エタノール投与により AST、ALT の上昇 (図 3) 肝脂肪化 (図 4AB) が観察された。PS 過剰発現マウスの肝から分離した単球を用いた検討で、肝 NKT 細胞のアポトーシス抑制、活性化亢進が示され、PS との共培養で増強したことから、肝障害には PS を介した NKT 細胞のアポトーシス抑制の関与が推定された (図 5AB)。凝固制御因子である PS の活性化亢進はアルコール性の脂肪肝・脂肪性肝炎の発症機序に関わることが明らかとなった。

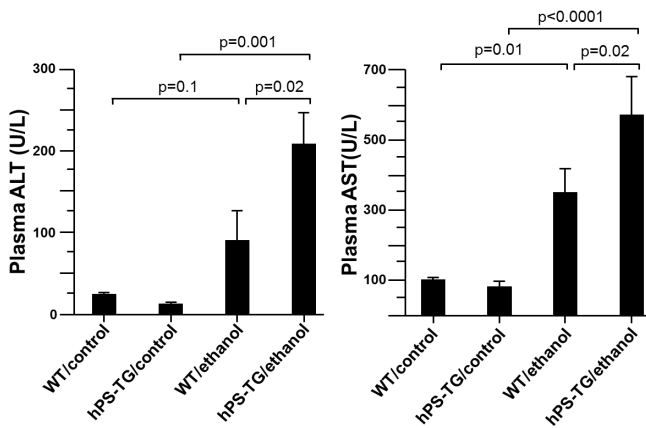


図 3 . 各群の肝臓障害のマーカー

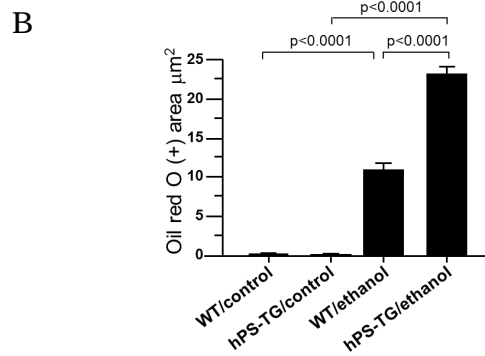
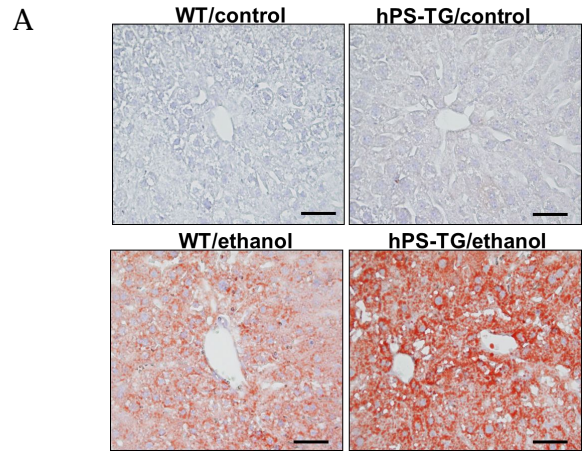


図 4AB . 各群の脂肪肝の程度

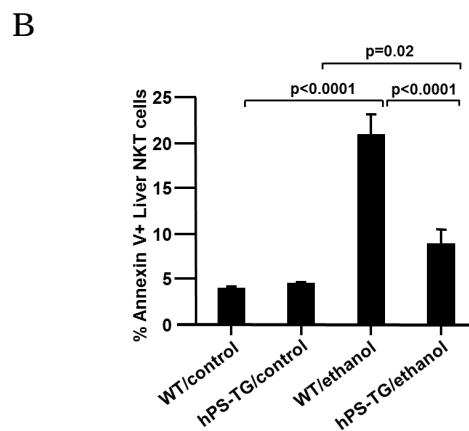
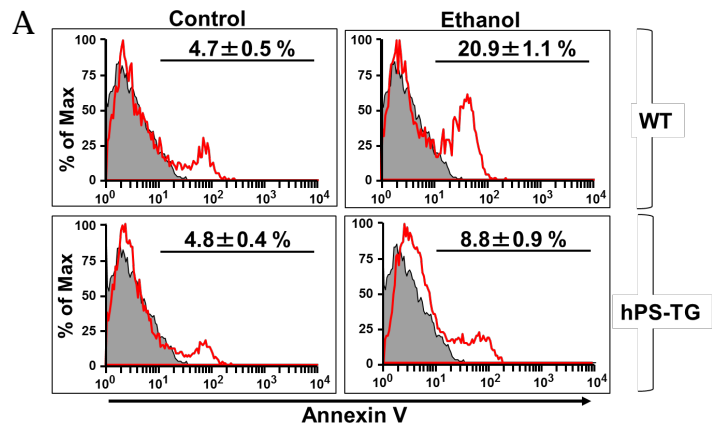


図 5AB . 各群の肝 NKT のアポトーシス

次に動脈硬化症におけるアルコール摂取量、凝固系の活性化、骨髄多能性幹細胞動員因子の関係について検討した。アルコール摂取量が高いマウス群ではアルコール摂取量が低いマウス群に比べ、活性型 VII 因子の血中濃度が有意に高値であったが、CXCL12/SDF-1 の血中濃度が有意に低下した（図 6、図 7）。また、動脈硬化症の進展はアルコール摂取量が高いマウス群ではアルコール摂取量が低いマウス群に比べ、有意に悪化した（図 8）。以上より、動脈硬化症の病態進展に凝固系の活性化と骨髄多能性幹細胞動員因子の低下が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

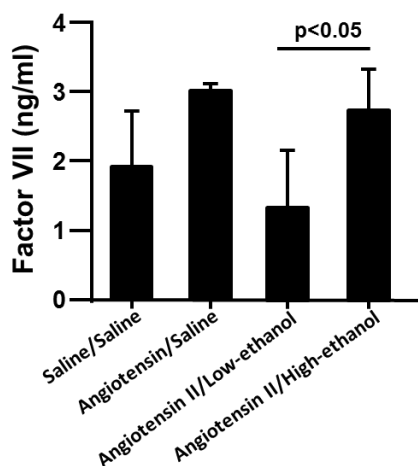


図 6 . アルコール摂取量と凝固系の活性化の関係

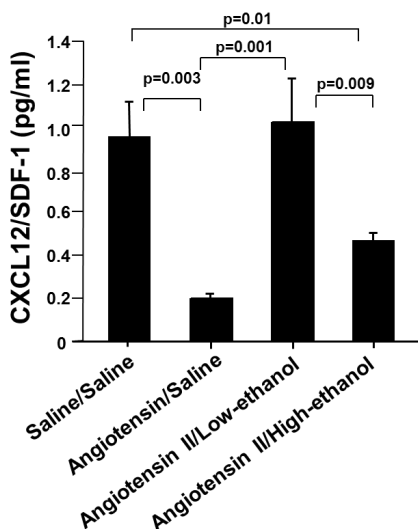


図 7 . アルコール摂取量と血中 SDF-1 の関係

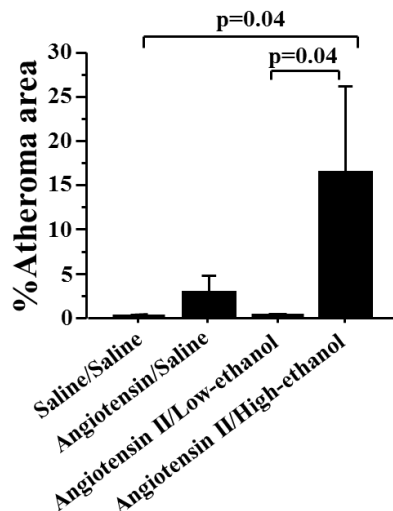


図 8 . アルコール摂取量と動脈硬化症の程度の関係

以上の結果から、凝固線溶系因子の異常（PS の多量発現等）がアルコール性脂肪性肝炎の発症に寄与していることが示された。また、TAFI 欠損による凝固系の異常は肝障害を悪化させること、脂肪性肝炎に合併する動脈硬化惹起にはトロンビンの上昇と CXCL12/SDF-1 低下が関与することが明らかになった。特に PS が肝および全身の炎症反応の中心的役割を担う肝 NKT 細胞の活性化を調節していることから、PS-NKT 系の操作により肝炎、肝線維化、動脈硬化症を制御できる可能性が示された。現在、凝固線溶系因子の異常による血管内皮細胞および血管平滑筋細胞活性化と血管リモデリングへの関与、PS の発現操作による肝線維化、動脈硬化への影響をマウスモデル・in vitro モデルを用いてさらに詳細に検討を行っている。それらの成果を踏まえて、慢性炎症と組織リモデリングに関わる凝固線溶系遺伝子を対象とした分子標的治療法を構築していきたい。

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〕

1. Kobayashi H, Naito M, Masuya M, Maruyama M, Urata K, Takahashi Y, Tomaru A, Fujiwara K, Ohnishi M, Takagi T, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza C, Urawa M, Gabazza EC, Taguchi O, Takei Y. Circulating fibrocytes correlate with the asthma control test score. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2016, in press. (査読有り)
2. Tano S, Horiki N, Omata F, Tanaka K,

- Hamada Y, Katsurahara M, Ninomiya K, Nishikawa K, Nojiri K, Yamada R, Inoue H, Gabazza EC, Katayama N, Takei Y. Second and third-look endoscopy for the prevention of post-ESD bleeding. *Medicine (Baltimore)* 94:e491, 2015 (査読有り)
3. Chelakkot AL, Mifuji-Moroka R, D'Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Matsuda Y, Gil-Bernabe P, Roen Z, Yasuma T, Yano Y, Gabazza EC, Iwasa M, Takei Y. Protein S exacerbates alcoholic hepatitis by stimulating liver natural killer T cells. *J Thromb Haemost* 13:142-54, 2015 (査読有り)
 4. Kitade T, Horiki N, Katsurahara M, Totoki T, Harada T, Tano S, Yamada R, Hamada Y, Inoue H, Tanaka K, Gabazza EC, Hayashi H, Tanaka M, Takei Y. Usefulness of Small Intestinal Endoscopy in a Case of Adult-onset Familial Mediterranean Fever Associated with Jejunoileitis. *Intern Med* 54:1343-7, 2015 (査読有り)
 5. Teshima N, Shimo M, Miyazawa K, Konegawa S, Matsumoto A, Onishi Y, Sasaki R, Suzuki T, Yano Y, Matsumoto K, Yamada T, Gabazza EC, Takei Y, Sumida Y. Effects of sugar-sweetened beverage intake on the development of type 2 diabetes mellitus in subjects with impaired glucose tolerance: the Mihama diabetes prevention study. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 61:14-9, 2015 (査読有り)
 6. Horiki N, Furukawa K, Kitade T, Sakuno T, Katsurahara M, Harada T, Tano S, Yamada R, Hamada Y, Inoue H, Tanaka K, Gabazza EC, Ishii N, Fukuda K, Omata F, Fujita Y, Tachibana H, Takei Y. Endoscopic findings and lesion distribution in amebic colitis. *J Infect Chemother* 21:444-8, 2015 (査読有り)
 7. Maruyama T, Fujisawa T, Okuno M, Toyoshima H, Tsutsui K, Maeda H, Yuda H, Yoshida M, Kobayashi H, Taguchi O, Gabazza EC, Takei Y, Miyashita N, Ihara T, Brito V, Niederman MS. A new strategy for healthcare-associated pneumonia: a 2-year prospective multicenter cohort study using risk factors for multidrug-resistant pathogens to select initial empiric therapy. *Clin Infect Dis* 57:1373-83, 2013 (査読有り)
 8. Naito M, Taguchi O, Kobayashi T, Takagi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Matsushima Y, Boveda-Ruiz D, Gil-Bernabe P, Matsumoto T, Chelakkot AL, Toda M, Yasukawa A, Hataji O, Morser J, Takei Y, Gabazza EC. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor protects against acute lung injury by inhibiting the complement system. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49:646-53, 2013 (査読有り)
 9. Lustenberger T, Relja B, Puttkammer B, Gabazza EC, Geiger E, Takei Y, Morser J, Marzi I. Activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFIa) levels are decreased in patients with trauma-induced coagulopathy. *Thromb Res* 131:e26-30, 2013 (査読有り)
 10. Relja B, Lustenberger T, Puttkammer B, Jakob H, Morser J, Gabazza EC, Takei Y, Marzi I. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) is enhanced in major trauma patients without infectious complications. *Immunobiology* 218:470-6, 2013 (査読有り)
 11. Iwasa M, Mifuji-Moroka R, Kobayashi Y, Takei Y, D'Alessandro-Gabazza C, Gabazza EC. Comment on serum FGF21 and RBP4 levels in patients with chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol* 48:252-3, 2013 (査読有り)
 12. Iwasa M, Kobayashi Y, Mifuji-Moroka R, Hara N, Miyachi H, Sugimoto R, Tanaka H, Fujita N, Gabazza EC, Takei Y. Branched-chain amino acid supplementation reduces oxidative stress and prolongs survival in rats with advanced liver cirrhosis. *PLoS One* 8:e70309, 2013 (査読有り)
- [学会発表](計 2件)
1. 諸岡 留美、岩佐 元雄、長谷川 浩司、竹井 謙之、ガバザ エステバン。アルコール性肝障害における。Protein Sの肝NKT細胞活性化を介した病態への関与。第51回日本肝臓学会総会。ホテル日航熊本・熊本ホテルキャッスル・鶴屋東館・同仁堂(熊本県・熊本市)。2015年5月21日-22日
 2. Toda M, Chelakkot AL, Urawa M, Yasuma T, Harada E, Matsushima Y, Yasukawa A, Roen Z, D'Alessandro Gabazza CN, Gabazza EC. Role of protein S in the activation of NKT Cells in a model of acute alcoholic hepatitis. 第42回日本免疫学会学術集会。幕張メッセ(千葉県・千葉市)2013年12月11日-13日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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

竹井 謙之 (TAKEI, Yoshiyuki)
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号：10306954

(2) 研究分担者

Gabazza Esteban (GABAZZA, Esteban)
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号：00293770

(3) 研究分担者

岩佐 元雄 (IWASA, Motoh)
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・
准教授
研究者番号：80378299

(4) 研究分担者

藤田 尚己 (FUJITA, Naoki)
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・
リサーチアソシエイト
研究者番号：80378398