

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590981

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝疾患におけるキニノーゲン断片ペプチドを介した高血圧の関与

研究課題名(英文) Involvement of hypertension in nonalcoholic fatty liver disease via the kininogen fragment peptide

研究代表者

宇都 浩文(Uto, Hirofumi)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：20347058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)は、高血圧などの生活習慣病と関連し、NAFLD患者血中から同定したキニノーゲン断片は高血圧と関連することから、NAFLDの病態進展と高血圧やキニノーゲン断片との関連を検討した。塩分感受性高血圧ラットにコリン欠乏アミノ酸置換食と高塩分食を投与すると、高血圧は脂肪肝の程度には影響せず、IL-10やHO-1の発現抑制を介して肝炎と肝線維化を促進した。一方、NAFLDではキニノーゲン分解が亢進していたが、NAFLDにおいてキニノーゲン断片濃度と高血圧との関連はなかった。以上のことから、高血圧はNAFLDの増悪因子であるが、その作用にキニノーゲンは関連しないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with lifestyle-related diseases such as hypertension. In a previous study, we identified kininogen fragments, which are associated with hypertension, in the serum of patients with NAFLD. In this study, we examined the relationship between the pathological conditions of NAFLD and the presence of hypertension or kininogen fragments. Administration of a high-salt diet, in addition to a choline-deficient L amino-acid-defined diet, to salt-sensitive hypertensive rats revealed that hypertension aggravated hepatitis and liver fibrosis by suppressing the expression of HO-1 and IL-10, but did not affect the degree of fatty liver. On the other hand, kininogen degradation was promoted in NAFLD, but there was no association between hypertension and kininogen fragment concentration in NAFLD patients. Therefore, hypertension is an accelerating factor of NAFLD, but kininogen is not associated with the interaction between NAFLD and hypertension.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：NAFLD NASH キニノーゲン 高血圧 肝炎 肝線維化 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、非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) の中で肝硬変や肝細胞癌へ進展する予後不良な疾患であり、食生活の欧米化などで、肥満人口の増加にともない NASH 患者が増加することが本邦でも危惧されている。NAFLD、特に NASH は肥満、糖尿病、高血圧などの生活習慣病と関連し、高血圧の約 40% に NAFLD を合併する。しかし、NASH の病態や生活習慣病との関連性は十分明らかでなく、NASH の診断には肝生検が必須であり、治療法も確立されていない。

NASH の発生には、正常肝から非アルコール性脂肪肝 (nonalcoholic steatosis; NAFL) となる “First hit” と、単純性脂肪肝から NASH へ進行する “Second hit” が必要といわれている。“First hit” には、高血圧などの生活習慣病、“Second hit” には、高インスリン血症、TNF- α などのサイトカインや高血圧と関連するレニン・アンジオテンシン系の活性化などに起因する酸化ストレスなどが重要な因子として挙げられる。しかし、高血圧と NASH との関連を詳細に解析した報告や、NASH に対する薬物治療に関して、エビデンスレベルの高い報告はほとんどなく、推奨度の高い治療法は十分確立していない。

我々は以前から、プロテオミクス研究を行ってきており、NAFLD や NASH の診断マーカー候補をいくつか同定しているが、本研究では、NAFLD 患者から同定した Kininogen 断片が高血圧と関連することに着目した。

2. 研究の目的

疾患の原因遺伝子から翻訳されるタンパク質と、それに関連して変動するタンパク質群を解析し、さらに翻訳後修飾情報を含めて詳細に解析するという観点から、系統的に整理するプロテオミクス (網羅的タンパク質解析) は診断マーカーの創出や病態の解明に有用であると考えられる。また、新しい診断マーカーを探索する上で、血液や尿中に特異的に出現する成分を同定する方法は、臨床応用しやすい利点がある。我々は、患者血清を用いたプロテオミクスで、NAFLD に関連する可能性のある蛋白の一つとして Kininogen 断片を同定したが、NAFLD や NASH におけるこれらの分子の臨床的意義は解明されていない。

血圧降下作用を持つ生理活性物質の一種である Bradykinin はノナペプチドで、Kininogen から組織 Kallikrein (カリクレイン) やトリプシンによって産生される。NAFLD の約 40% に高血圧が認められ、血圧調整を司る種々の因子が NAFLD/NASH の発症・増悪に関与し、特にレニン・アンジオテンシン (RA) 系の活性亢進やアディポサイトカイン分泌異常が病態進展に重要と推測されている。しかし、NAFLD/NASH における高血圧の意義や、

NAFLD/NASH の病態進展における Kininogen や Bradykinin の関与は十分明らかでない。

本研究では、NAFLD や NASH における高血圧の臨床的意義を、プロテオミクスで同定した Kininogen 断片やその関連分子である Bradykinin、Kallikrein に着目して、高血圧モデル動物を用いて解明する。本研究により、高血圧からみた NAFLD/NASH の病態解明や新しい診断・治療法を創出する。

3. 研究の方法

(1) 高血圧モデルを用いた肝炎と肝線維化に及ぼす高血圧の影響の解析

6 週齢の高血圧自然発症ラット (SHR) に普通食 \pm 高塩分食 (8%) を 7 週間投与し、その後、CDAA \pm 高塩分食 (8%) を 8 週間、もしくは 24 週間投与した。肝脂肪化は Oil red O 染色と肝中性脂肪含有量で、肝線維化は Sirius red 染色と Azan 染色で評価した。肝線維化や炎症に関連する遺伝子発現はリアルタイム PCR 法で評価した。インスリン抵抗性指数 (HOMA-R) は空腹時血糖 (mg/dl) \times 血清インスリン (mU/ml) / 405 で算出した。

(2) プロテオミクスから同定した非アルコール性脂肪性肝疾患の分子マーカーの臨床的意義と新しい診断法の確立

NAFLD 患者 44 例と健常者 26 例の血清を用いて、プロテオミクスによりタンパク質を比較検討し、有意差のある蛋白の一つである Kininogen 断片 (Kini-F) を同定し、ELISA 測定系を構築した。さらに、健常者 41 例、非アルコール性脂肪肝 (NAFL) 30 例、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 101 例における Kini-F 濃度を測定した。また、CK-18F、ApoE も同時に測定し、マルチマーカー解析 (決定木) を用いた NASH 診断の有用性を検討した。

4. 研究成果

(1) 飼育期間中の食餌摂取量は高塩分負荷の有無で差はなかったが、体重増加は高塩分群で有意に低かった。高塩分群では週齢とともに血圧は徐々に上昇し、7 週目から高塩分群は、普通塩分群と比較して有意な血圧の上昇を認めた。空腹時血糖、HOMA-R は高塩分群で有意に高値であった。CDAA 8 週間投与により、肝に脂肪沈着と肝細胞風船様腫大を認めしたが、高塩分群と普通塩分群で肝脂肪化の程度に明らかな差はなかった。一方、血清 ALT 値は普通塩分群と比較して高塩分群で有意に高値であった。また、肝組織中の tumor necrosis factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-6 の遺伝子発現レベルは高塩分群と普通塩分群で差はなかったが、IL-10 と heme oxygenase (HO)-1 は高塩分群で有意に低かった。さらに、CDAA 24 週間投与後の肝線維化は、高塩分群で有意に進行し、 α -SMA の肝遺伝子発現は高塩分群で有意に増加し、TGF-

1、TIMP-1 の肝遺伝子発現は高塩分群で増加していた。また、IL -10 と H0-1 は高塩分群で有意に低かった。

以上のことから、高血圧は脂肪肝の発症や脂肪沈着の程度への影響は少ないと考えられた。一方、高血圧はインスリン抵抗性の増悪や IL-10 と H0-1 の遺伝子発現低下による抗炎症作用の抑制を介して肝障害や肝線維化を増悪させると考えられた。

本研究は、高血圧と NAFLD との関連を高血圧動物モデルで検討したものであり、その結果、高血圧は two hit theory の second hit として作用することが示唆され、インスリン抵抗性の増大や IL-10 と H0-1 の発現低下を介した機序が存在する可能性を明らかにした。また、適正な血圧コントロールは高血圧を有する NAFLD/NASH 患者の肝炎や肝線維化の予防につながると考えられた。

(2) プロテオミクスにより、健常者より NAFLD で有意に高い蛋白ピークの一つは Kini-F であった。また、Western Blot と ELISA で検討した全長キニノーゲン濃度は、NAFLD 患者では低下し、ELISA 測定した Kini-F 濃度は健常者より NAFLD 患者で高値であったが、NASH は NAFL よりむしろ低値であった。また、Kini-F は ALT や CK-18F とは相関しなかった。一方、CK-18F と ApoE は健常者より NAFLD で有意に高く、NAFL より NASH は高い傾向であった。Kini-F、CK-18F、ApoE および 3 つのマーカーを組み合わせた決定木による NASH の正診率は、それぞれ 50% (50 例/101 例)、55%、38%、77% で、NAFL の正診率も決定木が最も高値で、健常者は同等であった。

以上のことから、NAFLD では Kininogen 分解が亢進しているが、NASH 特異的ではないと考えられた。また、Kini-F や既知の NASH マーカー候補を組み合わせて作製した決定木は、診断や治療効果判定に有用な新しい分子マーカーになる可能性があると考えられた。

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 9 件)

1. Imamura Y, Uto H, Hiramine Y, Hosoyamada K, Ijuin S, Yoshifuku S, Miyahara H, Maenohara S, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Increasing prevalence of diabetes mellitus in association with fatty liver in a Japanese population. *J Gastroenterol*. 2013 Oct 31. [Epub ahead of print] doi:10.1007/s00535-013-0902-2
2. Kumamoto R, Uto H, Oda K, Ibusuki R, Tanoue S, Arima S, Mawatari S, Kumagai K, Numata M, Tamai T, Moriuchi A, Fujita H, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Dietary fructose enhances the

incidence of precancerous hepatocytes induced by administration of diethylnitrosamine in rat. *Eur J Med Res*. 2013 Dec 9;18:54. doi: 10.1186/2047-783X-18-54.

3. Arima S, Uto H, Ibusuki R, Kumamoto R, Tanoue S, Mawatari S, Oda K, Numata M, Fujita H, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Hypertension exacerbates liver injury and hepatic fibrosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet in rats. *Int J Mol Med*. 2014 Jan;33(1):68-76. doi: 10.3892/ijmm.2013.1544.
4. Shima T, Uto H, Ueki K, Takamura T, Kohgo Y, Kawata S, Yasui K, Park H, Nakamura N, Nakatou T, Tanaka N, Umemura A, Mizuno M, Tanaka J, Okanoue T. Clinicopathological features of liver injury in patients with type 2 diabetes mellitus and comparative study of histologically proven nonalcoholic fatty liver diseases with or without type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol*. 2013 Apr;48(4):515-25. doi: 10.1007/s00535-012-0653-5.
5. Hosoyamada K, Uto H, Imamura Y, Hiramine Y, Toyokura E, Hidaka Y, Kuwahara T, Kusano K, Saito K, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Fatty liver in men is associated with high serum levels of small, dense low-density lipoprotein cholesterol. *Diabetol Metab Syndr*. 2012 Jul 18;4(1):34.
6. Yasui K, Hashimoto E, Tokushige K, Koike K, Shima T, Kanbara Y, Saibara T, Uto H, Takami S, Kawanaka M, Komorizono Y, Okanoue T; Japan NASH Study Group. Clinical and pathological progression of non-alcoholic steatohepatitis to hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2012 Aug;42(8):767-73. doi:10.1111/j.1872-034X.2012.00986.x.
7. Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, Koike K, Arii S, Imai Y, Shima T, Kanbara Y, Saibara T, Mori T, Kawata S, Uto H, Takami S, Sumida Y, Takamura T, Kawanaka M, Okanoue T; Japan NASH Study Group, Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan. Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011 May;9(5):428-33. doi: 10.1016/j.cgh.2011.01.023.
8. Hamabe A, Uto H, Imamura Y, Kusano K,

Mawatari S, Kumagai K, Kure T, Tamai T, Moriuchi A, Sakiyama T, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Impact of cigarette smoking on onset of nonalcoholic fatty liver disease over a 10-year period. J Gastroenterol. 2011 Jun;46(6):769-78. doi: 10.1007/s00535-011-0376-z.

9. Hiramane Y, Imamura Y, Uto H, Koriyama C, Horiuchi M, Oketani M, Hosoyamada K, Kusano K, Ido A, Tsubouchi H. Alcohol drinking patterns and the risk of fatty liver in Japanese men. J Gastroenterol. 2011 Apr;46(4):519-28. doi: 10.1007/s00535-010-0336-z.

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) 宇都浩文、岡上武、坪内博仁．プロテオミクスから同定した非アルコール性脂肪性肝疾患の分子マーカーの臨床的意義と新しい診断．第 99 回日本消化器病学会総会 2013 年 03 月 21 日 鹿児島市．
- 2) Arima S, Uto H, Ibusuki R, Kumamoto R, Tanoue S, Mawatari S, Kure T, Numata M, Setoyama H, Fujita H, Sakiyama T, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Hypertension exacerbates hepatic fibrosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet in rats. The American Gastroenterological Association (AGA) . 2012 年 05 月 19 日 ~ 2012 年 05 月 22 日 . San Diego (USA)
- 3) 有馬志穂、宇都浩文、指宿りえ、隈元亮、熊谷公太郎、呉 健、馬渡誠一、寄山敏男、桶谷真、井戸章雄、坪内博仁．高血圧はコリン欠乏アミノ酸置換食による肝線維化を促進する．第 48 回日本肝臓学会総会．2012 年 6 月 8 日．金沢市．
- 4) 有馬志穂、宇都浩文、隈元亮、熊谷公太郎、呉 健、馬渡誠一、玉井努、森内昭博、寄山敏男、桶谷真、井戸章雄、坪内博仁．脂肪肝における高血圧の病態への関与．第 48 回日本肝臓学会総会．2011 年 6 月 3 日．東京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし。

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宇都 浩文 (UTO HIROFUMI)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号 : 20347058

(2) 研究分担者
なし。

(3) 連携研究者
なし。