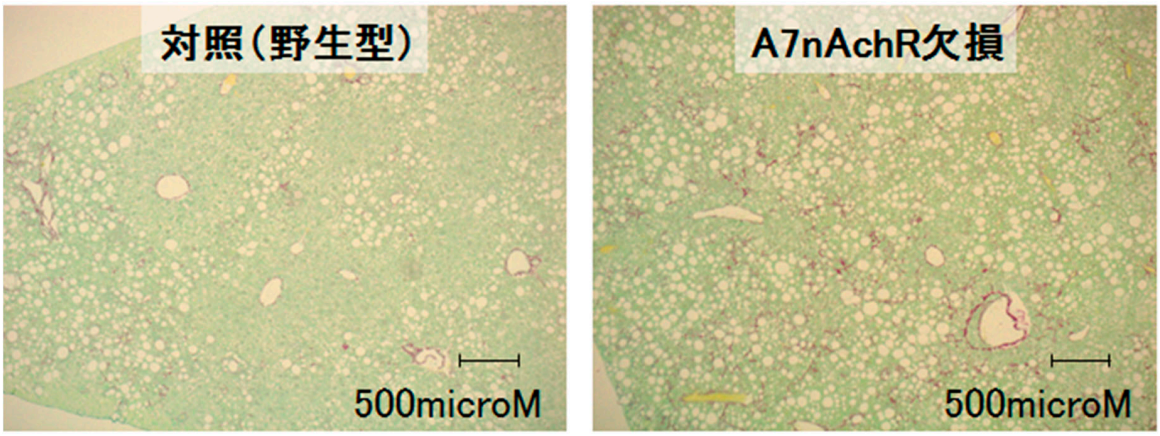
23　迷走神経による非アルコール性脂肪性肝疾患の進行制御	井上　啓

【目的】非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の進行に、肝臓炎症が重要な役割を果たしており、炎症抑制因子が、NAFLD の予防・治療法の候補と考えられている。迷走神経α7 型ニコチン受容体（A7nAchR）作用が、炎症抑制作用を発揮することが知られている。本研究では、A7nAchR 欠損マウス（A7KO）を用いて、その NAFLD の発症・進行への作用を検討した。

【方法】A7KO に対し、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）を誘導する高脂肪高コレステロール餌（HFHC 餌）の投与を行い、NASH における A7nAchR 作用の役割を検討した。NASH への効果は、炎症または線維化関連の肝臓遺伝子発現解析、シリウスレッド染色による肝組織解析により行った。

【結果】A7KO は、HFHC 餌投与 32 週間後に、肝臓線維化関連遺伝子である Col1a1 と、肝臓炎症関連遺伝子である Ccl2 の有意な発現増加を呈した。肝組織像解析でも、A7KO は、明らかな線維化の増悪を呈した（下図）。これらの結果は、A7nAchR 欠損によって、HFHC 餌により誘導される NASH が増悪することを示しており、迷走神経 A7nAchR 作用が、NAFLD 発症・進行抑制に重要な役割を担う可能性が示唆された。

α7 型ニコチン受容体（A7nAchR）欠損による非アルコール性脂肪肝炎の増悪



23. 迷走神経による非アルコール性脂肪性肝疾患の進行制御

井上　啓

金沢大学 新学術創成研究機構 革新的統合バイオ研究コア 栄養・代謝研究ユニット

Key words：非アルコール性脂肪性肝疾患，迷走神経，炎症，α7 型ニコチン受容体

緒　言

非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は、肥満・インスリン抵抗性に伴い、肝臓脂肪蓄積の増加と肝障害を来す疾患であり、単純性脂肪肝から、細胞障害・線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎（NASH）・肝硬変までを含んでいる。単純性脂肪肝の一部が、NASH・肝硬変へと進行するが、このような NAFLD の進行に、肝臓における炎症が重要な役割を果たしている。実際に、炎症性サイトカインや腸内細菌由来成分、飽和脂肪酸などの、肝臓炎症の誘導因子が、NAFLD の進行に寄与することが知られている。一方で、アディポネクチンや不飽和脂肪酸などの炎症抑制因子は、NAFLD の進行を抑制することが指摘され、NAFLD の予防・治療法の候補と考えられている。

迷走神経のアセチルコリン作用が、炎症を抑制することが知られている［1］。アセチルコリンやニコチンの添加により、マクロファージにおいて、TNFαや IL-6 などの炎症性サイトカイン産生が抑制される。また、マウス個体においても、迷走神経の電気的刺激により血中炎症性サイトカインが低下することが報告されている［2］。このような迷走神経による炎症抑制は、α7 型ニコチン受容体（A7nAchR）を介した作用であることが明らかにされている［2］。実際に、A7nAchR 欠損マウス（A7KO）では、炎症性サイトカインの血中濃度が高値を呈し、迷走神経の電気刺激による血中 TNFα レベルの低下も障害されることが報告されている［2］。しかし、迷走神経 A7nAchR 作用による炎症抑制が NAFLD の発症・進行に果たす役割は、十分に明らかにされていない。

迷走神経は、中枢神経と肝臓との臓器連関に、中心的な役割を担っており、迷走神経は炎症抑制のみならず、糖脂質代謝から肝細胞増殖まで様々な肝臓機能を制御している。実際に、我々も、迷走神経肝臓枝を切除に伴い、持続性の炎症誘導とともに、中枢神経性の肝糖産生抑制障害が起こることを見出している。さらに、我々は、中枢神経による肝臓糖代謝調節が、迷走神経 A7nAchR による炎症調節を介したメカニズムであることを見出している［3］。具体的には、中枢神経が、インスリンやアミノ酸の血中レベルの増加を感知すると、迷走神経活動が減弱し、A7nAchR 作用の低下により肝臓クッパー細胞での IL-6 産生が増加し、IL-6 依存的に肝細胞において糖産生が減少する。

NAFLD の誘因である肥満・インスリン抵抗性状態では、中枢神経と肝臓連関が破綻していることが知られている。実際に、高脂肪食負荷肥満マウスでは、中枢神経でのインスリン・アミノ酸作用による迷走神経活動の変動が消失する［3］。迷走神経切除によって持続性炎症が誘導されることを考慮すると、肥満・インスリン抵抗性における迷走神経活動の障害が肝臓慢性炎症の増悪に関与する可能性が考えられる。本研究では、A7KO に対し、NASH を誘導する高脂肪高コレステロール餌（HFHC 餌）負荷を行い、迷走神経 A7nAchR 作用の破綻が NAFLD の発症・進行に及ぼす作用を解明した。

方　法

1. 動物実験

マウスを用いた動物実験は、金沢大学動物実験規定に従い実施した。マウスは、8 週齢の雄マウスを実験に使用し、12 時間の明暗周期下で、自由摂水摂餌下で飼育し、実験に供した。A7KO は、Jackson Laboratory（Bar Harbor、ME）より、野生型マウスとして C57BL/6J Slc を日本 SLC 株式会社より導入し実験に供した。HFHC 餌（脂肪含有；エネルギー比 61%、コレステロール含有；1.3 g/100 g）は、Research Diet（New Brunswick、NJ）より購入した。

HFHC 餌の投与は、8 週齢より 32 週間実施した。

2. 血液生化学内分泌検査

血糖値は、GLUCOCARD G+meter（Arkray, Inc.、京都）を用い測定した。血液は、随時摂食下で、アプロチニン(Wako、大阪)および EDTA（Dojindo、熊本）存在下で尾静脈より採取し、血漿分離後に、測定まで-80℃で保存した。血中インスリン値・aspartate aminotransferase（AST）値・alanine aminotransferase（ALT）値は、レビス インスリン-マウス T（Shibayagi、群馬）・Transaminase CII-Test-Wako kit（Wako）を用いてそれぞれ測定した。

3. RNA 抽出、定量的 PCR、肝臓組織解析

HFHC 餌投与 32 週間後に、随時摂食条件で、肝臓を採取した。RNA 抽出および相補的 DNA の合成は既報のごとく行った［3］。定量的 PCR は、SYBR Premix ExTaq2 Kit（Takara、大津）により行い、Rplp0 を対照遺伝子として解析した。定量的 PCR に用いたプライマー塩基配列は表 1 に記載した。肝臓組織は、4%パラホルムアルデヒド･りん酸緩衝液（Wako、大阪）により肝臓を固定し、シリウスレッド染色を行い、作成した。

4. 統計解析

データは、平均±標準誤差で示した。統計解析は、Student's t test を用いて行った。P 値が 0.05 未満で統計的有意と判断した。

結果および考察

HFHC 餌投与下において、対照と A7KO では明らかな体重差を示さなかった（図 1a)。また、血糖値および血中インスリン値も、対照および A7KO の両群間に、明らかな差を認めなかった（図 1b および c)。A7KO は、18 週間の高脂肪餌飼育によって、体重増加と血糖値上昇を来さないものの、対照と比して、血中インスリンレベルの増加を示し、インスリン抵抗性を発症することが報告されている［4］。HFHC 餌飼育では、高脂肪餌飼育に比して、誘導されるインスリン抵抗性および耐糖能障害の程度が軽度である。このことが、本研究において、A7KO がインスリン抵抗性の増悪を示さなかった原因と考えられた。

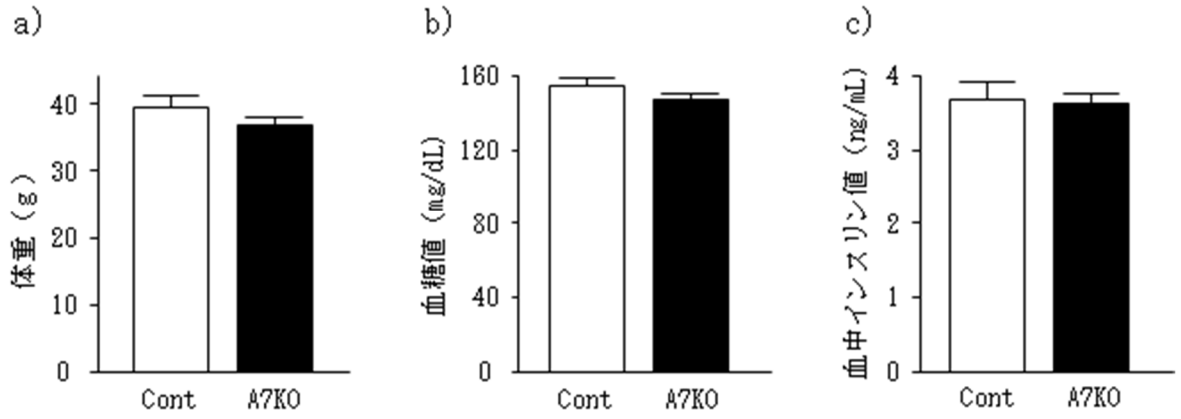


図 1. HFHC 餌投与後の体重および血糖値、血中インスリン値

対照（Cont：n＝6）および A7nAchR 欠損マウス（A7KO：n＝10）に対し、8 週齢より 32 週間の HFHC 餌投与を行い、40 週齢における a）体重、b）血糖値、c）血中インスリン値を測定した。

HFHC 餌の投与によって、投与後 24 週間後には、血中 ALT 値が上昇し、肝臓の炎症と線維化を伴う NASH を発症することが報告されている［5］。HFHC 餌投与 32 週間後において、血中 ALT 値は A7KO で有意な増加を呈した（図 2a)。血中 AST 値は、統計的に有意ではないものの、A7KO で増加傾向を示した（図 2b)。

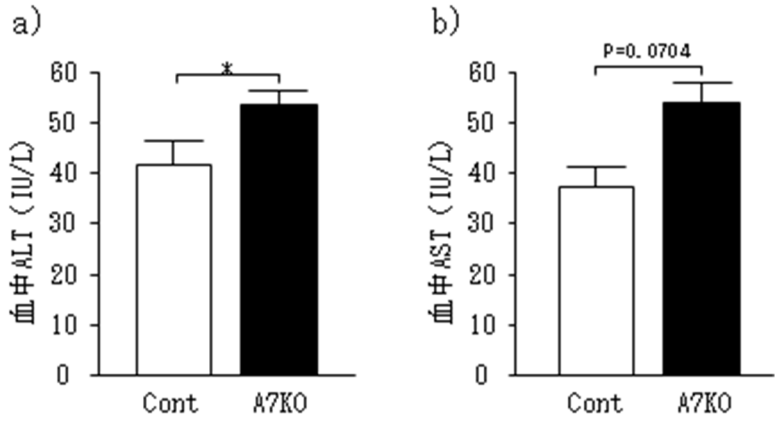


図 2. HFHC 餌投与後の血中 ALT および AST 値

対照（Cont：n = 6）および A7nAchR 欠損マウス（A7KO：n = 10）に対し、8 週齢より 32 週間の HFHC 餌投与を行い、40 週齢における a）血中 ALT 値、b）血中 AST 値を測定した。*P < 0.05。

肝臓での線維化関連遺伝子について、A7KO では、*Acta2* および *Tgfb1* の発現は、対照と比して変化を示さず、一方で、*Col1a1* の発現は有意な増加を呈した（図 3a）。肝臓での炎症関連遺伝子について、A7KO では、*Tnf* および *Il6* の発現は変化を示さなかったが、*Ccl2* の発現は有意な増加を呈した（図 3b）。

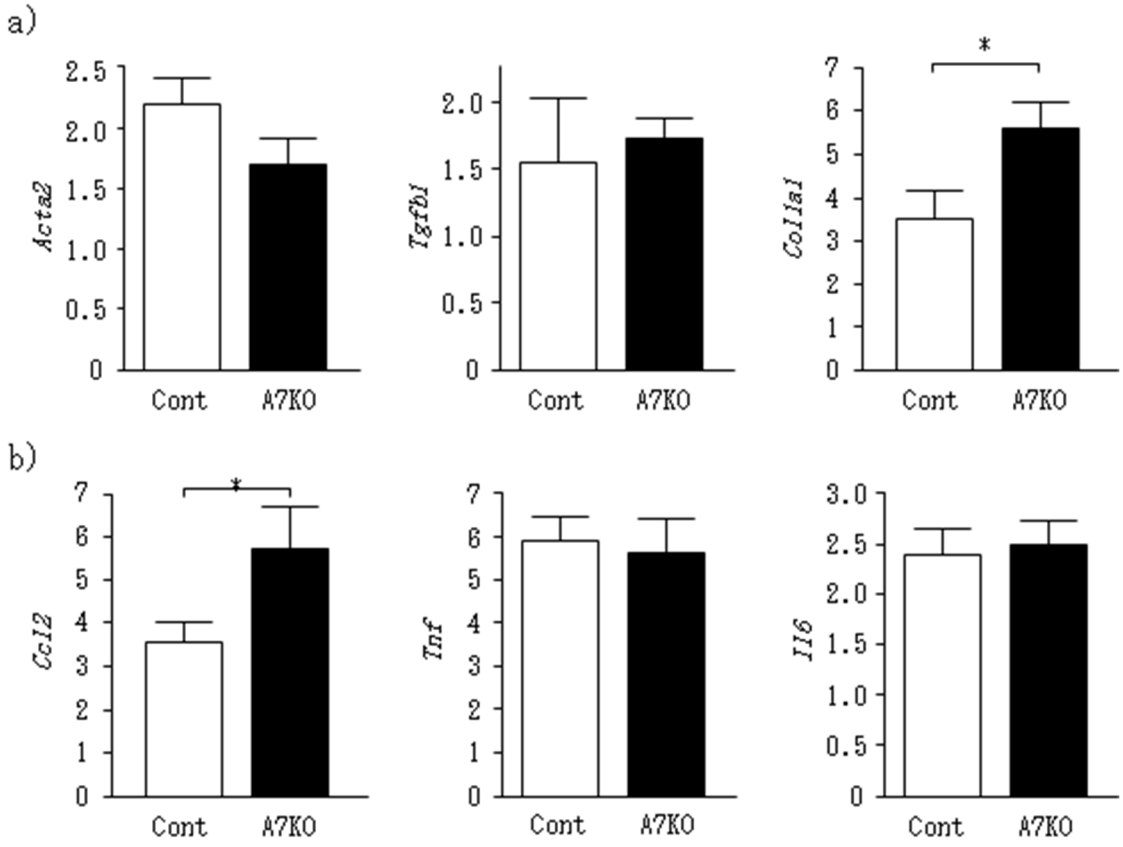


図 3. HFHC 餌投与後の肝臓線維化または炎症関連遺伝子の発現

対照（Cont：n = 6）および A7nAchR 欠損マウス（A7KO：n = 10）に対し、8 週齢より 32 週間の HFHC 餌投与を行い、40 週齢において随時摂食下で肝臓を採取し、肝臓における a）線維化関連遺伝子、*Acta2*、*Tgfb1*、*Col1a1* と b）炎症関連遺伝子、*Ccl2*、*Tnf*、*Il6* の発現を定量的 PCR 法により測定した。*P < 0.05。

コラーゲン線維を染色するシリウスレッド染色を用いた肝組織像解析では、A7KO は、対照と比して、明らかな線維化の増悪を呈した（図 4）。これらの結果は、HFHC 餌により誘導される NASH が、A7nAchR 欠損によって増悪することを示している。

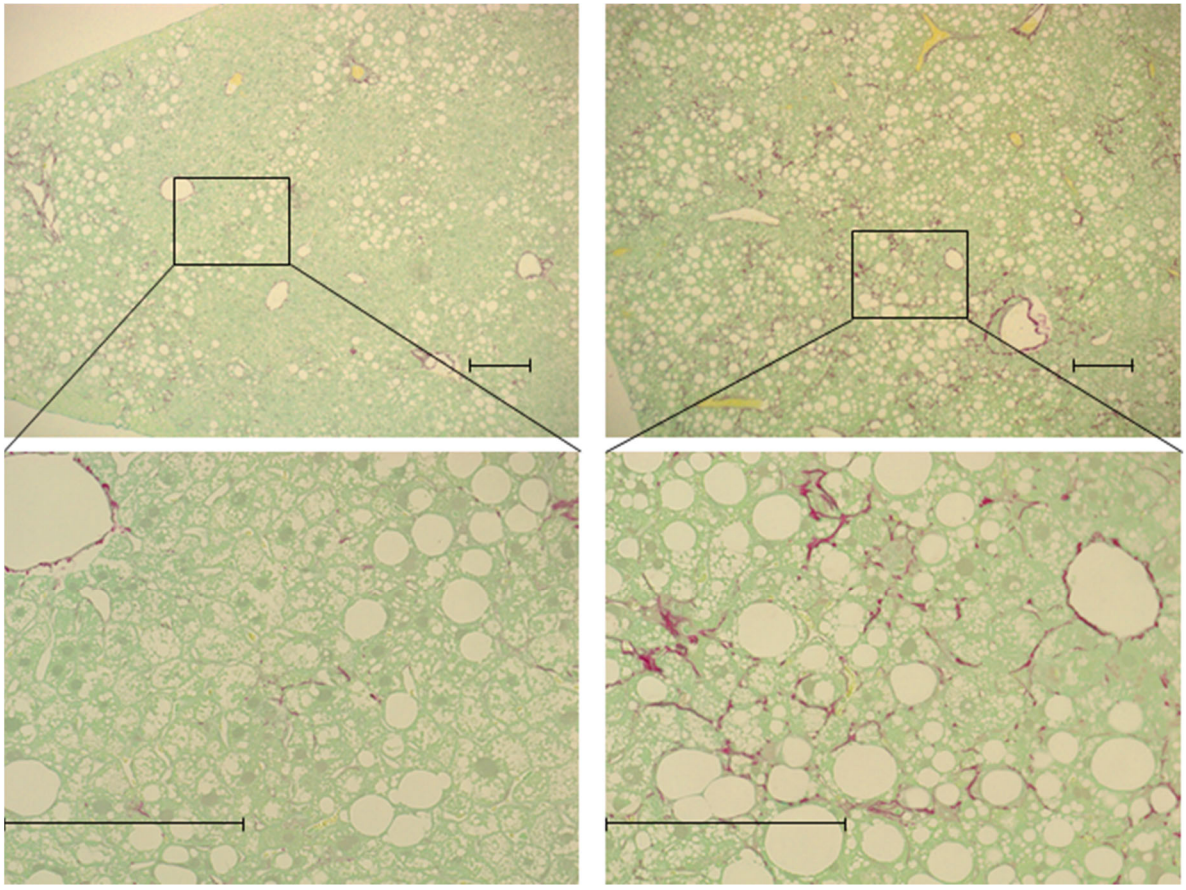


図 4. HFHC 餌投与後の肝臓線維化

対照および A7nAchR 欠損マウス（A7KO）に対し、32 週間の HFHC 餌投与後に、肝臓を採取し、シリウスレッド染色により肝線維化を検討した。左上および下図に、対照マウス由来の肝臓組織を、右上および下図に、A7KO マウス由来の肝臓組織を示す。スケールバーは 500 μ m。

本研究において、迷走神経 A7nAchR 作用が、NAFLD 発症・進行を抑制する可能性が示唆された。また、肥満・インスリン抵抗性状態では、迷走神経 A7nAchR 作用の破綻の可能性が考えられていたが、A7KO において HFHC 餌摂取による NAFLD 誘導が増悪したことは、肥満・インスリン抵抗性状態においても、迷走神経 A7nAchR 作用が、NAFLD 発症・進行の抑制に、一定の役割を担っている可能性を示唆した。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、金沢大学新学術創成研究機構革新的統合バイオ研究コア栄養・代謝研究ユニットの木村久美特任助教、及び稲葉有香助教である。

文　献

1） Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. Nature. 2000;405(6785):458-62. Epub 2000/06/06. doi: 10.1038/35013070. PubMed PMID: 10839541.

2) Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. Nature. 2003;421(6921):384-8. Epub 2003/01/01. doi: 10.1038/nature01339
3) nature01339 [pii]. PubMed PMID: 12508119.
4) Kimura K, Tanida M, Nagata N, Inaba Y, Watanabe H, Nagashimada M, et al. Central Insulin Action Activates Kupffer Cells by Suppressing Hepatic Vagal Activation via the Nicotinic Alpha 7 Acetylcholine Receptor. Cell Rep. 2016;14(10):2362-74. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.032. PubMed PMID: 26947072.
5) Wang X, Yang Z, Xue B, Shi H. Activation of the cholinergic antiinflammatory pathway ameliorates obesity-induced inflammation and insulin resistance. Endocrinology. 2011;152(3):836-46. doi: 10.1210/en.2010-0855. PubMed PMID: 21239433; PubMed Central PMCID: PMC3040050.
6) Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, et al. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. Hepatology. 2007;46(5):1392-403. doi: 10.1002/hep.21874. PubMed PMID: 17929294.