

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590971

研究課題名(和文) 肝臓に対するインクレチン作用機序の解明

研究課題名(英文) Effect of incretin for the liver

研究代表者

藤田 尚己 (FUJITA, Naoki)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80378398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：小腸より分泌される incretin は膵に対する作用 (insulin 分泌増強 / glucagon 分泌抑制) を介して血糖を低下させる。本研究では incretin の新たな作用部位として肝臓に着目し、培養実験にて同シグナルの肝細胞内への到達とそれに伴う糖脂質代謝関連遺伝子の発現動態の変化、更には同細胞質内での脂肪分画組成の変化や培養上清中の糖レベルの変化、更には同剤の投与によるマウス肝内での糖脂質代謝の変化を確認した。本研究結果は incretin の新たな糖脂質代謝調節機構としての肝細胞を介した経路の存在を示しており、更なる incretin 関連薬の臨床的有用性の可能性を広げた。

研究成果の概要(英文)：Incretin is a naturally occurring peptide secreted by the L or K cells of the small intestine. Incretin regulates glucose-mediated insulin and glucagon productions by pancreatic beta and alpha cells. In this study, we demonstrated that incretin has cognate receptors on human and mouse hepatocytes and that incretin has a direct effect on the reduction of hepatic steatosis in the absence of insulin. Incretin increased the phosphorylation of PDK-1, AKT, and protein kinase C in HepG2 and Huh7 cells. Incretin-treated hepatocytes resulted in a significant increase in cAMP production as well as reduction in mRNA expression of fatty acid synthesis-related genes. Finally, incretin treatment reversed hepatic steatosis in mouse, but little effect occurred in hepatic fibrosis and cell proliferation. In conclusion, our data suggest that incretin has a novel direct effect on hepatocyte glucose and fat metabolism.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：消化器内科

キーワード：インクレチン 肝細胞 糖代謝 脂質代謝 肝脂肪化

1. 研究開始当初の背景

近年、糖代謝に及ぼすインクレチンの作用機序の解明が進み、その結果として糖尿病に対し様々なインクレチン関連薬が現在臨床応用されつつある。インクレチンは食事摂取に反応し消化管より分泌される血糖降下作用を有するホルモンであり、主に上部小腸粘膜に存在する K 細胞より分泌される glucose-dependent insulinotropic polypeptide(GIP)と下部小腸粘膜に分布する L 細胞より分泌される glucagon-like peptide-1(GLP-1)が知られている。分泌されたインクレチンは門脈血流によって膵臓に運ばれその効果を発揮する。インクレチンは膵細胞に直接作用しグルコース濃度依存性の insulin 分泌作用を増強し血糖降下に働くが、更にインクレチンには膵細胞に対する細胞増殖促進効果などの膵細胞保護作用も有することが知られている。一方、インクレチンには様々な膵外作用を有することが知られている。Miyawaki らは GIP の脂肪細胞に対する糖取り込みや脂肪蓄積促進作用を(Nat Med, 2002;8:738-742)、Tsukiyama らは骨芽細胞に対する増殖促進作用や apoptosis 抑制作用を介した GIP の骨組織への Ca 蓄積作用を示している(Mol Endocrinol, 2006;20:1644-1651)。

一方、生体内における主要な糖脂質代謝の場である肝臓に対するインクレチンの作用に関してはこれまでほとんど研究されていない。肝臓は生体内において最も多量の糖を取り込む glucose regulator であり、それは insulin などのホルモンや脂肪組織からの遊離脂肪酸や adipokines などの情報を主に門脈を経由し、得ることによって制御されている。更に肝臓内に生じた脂質代謝変化が神経シグナルを介して全身の代謝にも影響を及ぼしていることが報告されるに至り、生体内の代謝調整における肝の重要性は増すばかりである。このような状況をふまえると、消

化管より分泌され門脈を介しその多くが肝臓に流入するインクレチンが肝臓そのものに何らかの直接的な影響を及ぼしている可能性が大いに想定される。更に、インクレチンはその分解酵素である dipeptidyl peptidase-4(DPP-4)により血中では数分で分解・不活化されるために、その生体内におけるインクレチンの作用発現に門脈血中のインクレチンが重要であることは想像に難くない。

多くの疫学調査によって高血糖(insulin 抵抗性)が様々な癌種における危険因子となることが判明しているがその原因は不明である。また、多くの糖尿病患者には脂肪肝が合併するが、肝の脂肪化の進展は肝炎・肝線維化をきたし非アルコール性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis : NASH)を発症し、肝発癌に關与する。

以上の研究背景より、我々は肝臓に対するインクレチンの様々な生理活性作用を探る検討を開始するに至った。

2. 研究の目的

本研究ではインクレチンの肝臓での糖脂質代謝に及ぼす影響、更には肝線維化や肝発癌への関与を検討し、生体に及ぼす肝臓を介したインクレチン作用を明らかにすることを目的とする。本研究結果は肝臓における新たな糖脂質代謝調節機構を解明するとともに、インクレチン関連薬の更なる可能性に繋がると思われる。

3. 研究の方法

(1) インクレチンの肝細胞に対する糖脂質代謝への影響

肝細胞株に対し GLP-1、GIP、更にはインクレチンミメティックを作用させ、細胞内脂肪量や様々な糖脂質代謝関連酵素の発現動態を検討する。更にはマウスを用いたインクレチン投与実験を行い、マウス肝臓への糖脂質代

謝へのインクレチン投与の影響を組織学的及び代謝酵素の観点から検討する。

(2) インクレチンの肝線維化への影響

肝の線維化進展には原因の如何に関わらず肝星細胞の活性化が重要である。星細胞は活性化すると TGF- β をはじめとする様々なサイトカインを発現し、パラクラインもしくはオートクライン的に自身及び周囲細胞を活性化し肝線維化を進展させる。そこで、インクレチンの肝星細胞活性化作用の有無を培養細胞にて検討するとともに、インクレチン投与によるマウス肝臓への線維化進展の有無を検討する。

(3) インクレチンの肝発癌への影響

耐糖能異常は発癌と密接に関連している。また前記のようにインクレチンには様々な細胞に対する細胞増殖活性作用や抗 apoptosis 作用を有することが示されている。そこで、肝発癌に及ぼすインクレチンの影響を検討する意義があると考えた。そこで肝癌細胞株を用いインクレチンの増殖能に及ぼす影響や apoptosis への影響を検討し、更にはインクレチンによる細胞内 signal カスケードへの影響を検討する。

4. 研究成果

(1) インクレチンの肝細胞における糖脂質代謝に及ぼす影響

肝細胞及び肝癌細胞株(Huh7 や HepG2)に GLP-1 receptor の細胞表面への発現を確認した。更に培養上清中に GLP-1、GIP、またはインクレチンミメティックを添加し、以下の検討を行った。

細胞内脂肪濃度の解析

細胞内における脂肪蓄積量を Suan IV、Oil red O 染色にて可視化し定量し更には HPLC 法によって脂肪分画の変化を測定したところ、その量的質的变化を認めた。

糖代謝関連遺伝子発現動態の解析

肝細胞内において糖代謝に関連する CREB,

PGC1, G6PC, PCK1, GK などの各酵素の発現動態を mRNA レベルは real-time PCR 法にて、蛋白レベルは Western blotting 法や免疫染色法にて検討したところ、インクレチンによるこれらの発現増強効果を認めた。

脂質代謝関連遺伝子発現動態の解析

同様に SREBP-1&2, MLX, ACC, PK, PPAR, AOX, MTP, DGAT-1&2, perilipin などの脂質代謝に関連する酵素群の発現増強効果も確認した。

(2) インクレチンの肝線維化に及ぼす影響

肝星細胞の細胞表面における GLP-1 や GIP に対する receptor の存在を確認した後、培養上清中に GLP-1、GIP、またはインクレチンミメティックを添加し、以下の変化につき検討した。

細胞の形態的变化

インクレチン投与によって肝星細胞の活性化を示す筋線維芽様細胞への形質転化と免疫染色によって細胞質内での SMA やデスミンの発現を検討した。その結果、インクレチンの形態学的な軽度の活性化作用を認めるも、明らかな蛋白発現は認めなかった。

また、線維化関連遺伝子(procollagen, MMPs, TIMPs, ICAM-1, VCAM-1 など)の発現動態の解析を real-time PCR 法や Western blotting 法にて検討するも有意な変化は認めなかった。

線維化関連サイトカインの発現動態の解析

肝星細胞は活性化の過程で TGF- β , PDGF などのサイトカインを分泌し、パラクラインもしくはオートクライン的に活性化されることが知られている。そこで、これらサイトカインの培養上清中における変化を検討したところ、その分泌増強作用を確認した。

(3) インクレチンの肝発癌に及ぼす影響

肝癌細胞に対する増殖能や apoptosis に及ぼすインクレチンの影響を検討した。

細胞の増殖能や apoptosis に及ぼす影響

肝癌細胞株培養上清中にインクレチンを添加後、細胞増殖能の変化を cell counting や MTT assay にて、また apoptosis の程度を TUNEL 染色にて評価、更にはフローサイトメトリーにて細胞周期率を測定するも、有意な変化に乏しかった。

細胞増殖関連 signal 遺伝子の発現動態の解析

MAPK, JNK, PI3 kinase, TGF β /Smad などの細胞増殖能に関与する細胞内 signal 遺伝子群のインクレチンによる発現動態の変化を real-time PCR 法や Western blotting 法にて検討するも、有意な変化を認めなかった。

Apoptosis 関連遺伝子の発現動態の解析同様に apoptosis に関連する Bcl-2 family, caspase などの遺伝子群の発現動態の変化も検討したが同様であった。

(4) In vivo におけるインクレチンの肝に及ぼす影響

上記の in vitro の解析結果よりマウスによる in vivo でのインクレチン投与実験を行った。具体的にはマウスにインクレチンミメティックを投与し、以下につき検討した。

肝組織学的検討

インクレチン投与による肝脂肪化の改善に加え軽度の炎症や肝線維化の改善効果を認めた。更には、PNCA 染色や BrdU labeling index、TUNEL 染色により細胞増殖や apoptosis におけるインクレチンの影響を評価するも、これらに変化は認めなかった。

肝における糖脂質代謝関連遺伝子の発現動態の解析

In vitro と同様にインクレチンによるこれらの遺伝子群の発現変化を確認した。尚、線維化関連遺伝子や細胞増殖や apoptosis に関連する遺伝子の発現動態には変化を認めなかった。

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 13 件)

1. 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 査読有, 8;2013, e70309
2. Kobayashi Y, Iwasa M, Sugimoto R, Mifuji-Moroka R, Fujita N, Takei Y. Hepatobiliary and Pancreatic: Duodenal bleeding from a hepatic artery aneurysm. J Gastroenterol Hepatol 査読有, 28;2013, 1256
3. Iwasa M, Iwata K, Hara N, Hattori A, Ishidome M, Sekiguchi-Fujikawa N, Mifuji-Moroka R, Sugimoto R, Fujita N, Kobayashi Y, Takei Y. Nutrition therapy using a multidisciplinary team improves survival rates in patients with liver cirrhosis. Nutrition 査読有, 29;2013, 1418-1421
4. Kobayashi Y, Iwasa M, Miyachi H, Sugimoto R, Tanaka H, Mifuji-Moroka R, Fujita N, Sumida Y, Takei Y. Effect of iron-mediated oxidative stress on insulin resistance through the Forkhead box-containing protein 0 subfamily-1 (FOXO-1) pathway in chronic hepatitis C. Int J Clin Med 査読有, 4;2013, 10-18
5. Nakano T, Okano H, Kobayashi M, Ito K, Ohmori S, Nomura T, Kato H, Ayada M, Nakano Y, Akachi S, Sugimoto K, Fujita N, Shiraki K, Takei Y, Takahashi M, Okamoto H. Molecular epidemiology and genetic history of European-type genotype 3 hepatitis E virus indigenized in the central region of Japan. Infection Genetics and Evolution 査読有, 12;2012, 1524-1534
6. Iwasa M, Mifuji-Moroka R, Kuroda M, Moroka H, Fujita N, Kobayashi Y, Adachi Y, Gabazza EC, Matsuda H, Takei Y. Regional reduction in gray and white matter volume in barins of cirrhotic patients: voxel-based analysis of MRI. Metabolic Brain Disease 査読有, 27;2012, 551-557
7. Mifuji-Moroka R, Iwasa M, Sugimoto R, Katsurahara M, Fujita N, Kobayashi Y, Takei Y. Liver abscess associated with lipoma of the duodenum. J Gastroenterol Hepatol 査読有, 27;2012, 1129
8. Nakano T, Takahashi K, Pybus OG, Hashimoto N, Kato H, Okano H, Kobayashi M, Fujita N, Shiraki K, Takei Y, Ayada M, Arai M, Okamoto H, Mishiro S. New findings regarding the epidemic history and

population dynamics of Japan-indigenous genotype 3 hepatitis E virus inferred by molecular evolution. Liver Int 査読有, 32;2012, 675-688

9. Iwasa M, Mifuji-Moroka R, Hara N, Ishidome M, Iwata K, Sugimoto R, Takana H, Fujita N, Kobayashi Y, Takei Y. Visceral fat volume predicts new-onset type 2 diabetes in patients with chronic hepatitis C. Diabetes Res Clin Pract 再読有, 94;2011, 468-470

10. Miyachi H, Kobayashi Y, Reija B, Zaiter YE, Fujita N, Iwasa M, Gabazza EC, Takei Y. Effect of suppressor of cytokine signaling (SOCS) on hepcidin production in HCV replicon cells. Hepatol Res 査読有, 41;2011, 364-374

11. Fujita N, Takei Y. Alcohol consumption and metabolic syndrome. Hepatol Res 査読有, 41;2011, 287-295

12. Fujita N, Takei Y. Iron overload in nonalcoholic steatohepatitis. Advances in Clinical Chemistry 査読有, 55;2011, 105-132

13. Fujita N, Nakanishi M, Mukai J, Naito Y, Ichida T, Kaito M, Yoshikawa T, Takei Y. Identification of treatment efficacy related host factors in chronic hepatitis C by ProteinChip serum analysis. Mol Med 査読有, 17;2011, 70-78

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 藤田尚己, 他 7 名. アルコール性肝障害患者における hepcidin 発現動態の検討. 第 49 回日本肝臓学会総会 2013 年 6 月 6 日 東京

2. Fujita N, et al. Increased hepcidin secretion by inflammatory cytokines in patients with alcoholic liver disease. EASL2013 2013 年 4 月 25 日 Amsterdam

3. 藤田尚己, 他 2 名. 肝脂肪化およびメタボリック症候群関連因子に及ぼす飲酒習慣の影響. 第 99 回日本消化器病学会総会 2013 年 3 月 22 日 鹿児島

4. Fujita N, et al. Impaired bone morphogenetic protein signaling causes hepcidin deficiency and iron overload in patients with chronic hepatitis C. The 10th JSH Single Topic Conference 2012 年 11 月 21 日 Tokyo

5. Fujita N, et al. Impaired bone morphogenetic protein signaling causes hepcidin deficiency in patients with chronic hepatitis C. 63rd AASLD 2012 年 11 月 11 日 Boston, USA

6. 藤田尚己, 他 2 名. 断酒は体脂肪量を変化させずに肝脂肪化とインスリン抵抗性を改善する-問題飲酒者 101 例の断酒における

前向き研究より-. 第 16 回日本肝臓学会 2012 年 10 月 11 日 神戸

7. Fujita N, et al. Iron overload and oxidative stress in alcoholic liver disease. 16th World Congress Biomedical Alcohol Research 2012 年 9 月 9 日 Sapporo

8. 藤田尚己, 他 2 名. NAFLD は独立した動脈硬化進展因子である. 第 48 回日本肝臓学会総会 2012 年 6 月 7 日 東京

9. 藤田尚己, 他 2 名. 断酒は体脂肪量を変化させずに肝脂肪化とインスリン抵抗性を改善させる-問題飲酒者 101 例に対する前向き研究より-. 第 98 回日本消化器病学会総会 2012 年 4 月 21 日 東京

10. Fujita N, et al. Impaired bone morphogenetic protein signaling causes hepcidin deficiency in patients with chronic hepatitis C. EASL2012 2012 年 4 月 18 日 Barcelona, Spain

11. 藤田尚己, 他 9 名. C 型慢性肝炎(CHC)における鉄過剰の病態伸展に及ぼす影響とその原因機序. 第 109 回日本内科学会総会 2012 年 4 月 14 日 東京

12. 藤田尚己, 他 2 名. 心血管イベント発生に及ぼす肝脂肪化の影響. 第 15 回日本肝臓学会大会 2011 年 10 月 20 日 福岡

13. Fujita N, et al. Hepatic oxidative DNA damage in patients with alcoholic liver disease. 6th International Symposium on ALPD and Cirrhosis 2011 年 10 月 20 日 Fukuoka

14. 藤田尚己, 他 1 名. Hepatic iron overload increases hepatic cancer occurrence in patients with chronic hepatitis C. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 4 日 名古屋

15. 藤田尚己, 他 7 名. 慢性肝疾患進展因子としての肝内酸化ストレスの位置付け. 第 47 回日本肝臓学会総会 2011 年 6 月 3 日 東京

16. 藤田尚己, 他 8 名. 肝脂肪化の病態に及ぼす影響-NASH vs アルコール性肝障害-. 第 97 回日本消化器病学会総会 2011 年 5 月 15 日 東京

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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

藤田 尚己 (FUJITA, Naoki)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80378398