

令和元年6月2日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19533

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎病態に対するヘパトカインLECT2の関与

研究課題名(英文)The effect of hepatokine LECT2 on the pathophysiology of NASH

研究代表者

島 孝佑 (Kosuke, Shima)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：20770613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究計画の通り、LECT2欠損(KO)マウスおよびLECT2過剰発現(Tg)マウスへのCDAHFD(コリン欠乏、メチオニン減量、30%脂肪含有)を投与し脂肪肝炎モデルを作成し、野生型マウスと比較。LECT2Tgマウスにおいて脂肪肝炎を誘導すると野生型と比較し、肝臓でのIL-6発現は有意に上昇したが、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、F4/80、TGFB1は上昇したものの有意差なし。肝線維化を反映するヒドロキシプロリン濃度もLECT2Tgマウスで上昇していたが統計的な有意差はなし。Lect2マウスでは線維化炎症関連遺伝子の有意な変化はなく仮説と反し肝中性脂肪肝含有量が有意に上昇していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本検討では、当初の仮説と異なり、肥満で誘導されるヘパトカインであるLect2は肝臓自身には強く作用せず、脂肪肝の病態に影響を及ぼすものではなかった。非アルコール性脂肪肝炎が形成される病態は複雑であり、多数の因子が関与していると考えられる。Lect2以外のヘパトカインがオートクライン/パラクライン的に肝臓に作用する可能性もあり、今後の検討が待たれる。

研究成果の概要(英文)：As in the planned study design, a steatohepatitis model was created by administering CDAHFD (choline deficiency, methionine loss, containing 30% fat) to LECT2 deficient (KO) mice and LECT2 overexpressing (Tg) mice and compared with wild-type mice. Induction of steatohepatitis in LECT2 Tg mice significantly increased IL-6 expression in the liver compared to wild type, but did not significantly differ in TNF- $\alpha$ , MCP-1, F4 / 80, TGFB1. Hydroxyproline levels, which reflect liver fibrosis, were also elevated in Lect2 Tg mice, however there was no statistically significant difference. In Lect2 mice, there was no significant change in fibrotic inflammation-related genes, and contrary to the hypothesis, hepatic triglyceride was significantly elevated.

研究分野：糖尿病

キーワード：非アルコール性脂肪肝 LECT2 ヘパトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者の研究グループは、ヘパトカインである Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) がインスリン抵抗性を誘導することを示した (Lan, et al. Diabetes 2014)。しかし、LECT2 の脂肪肝炎に対する作用は明らかとはなっていない。本研究では、この LECT2 の脂肪肝炎に対する作用を明らかにし、その作用機序を解明することで、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)に対する新たな治療標的を同定する。

### 2. 研究の目的

LECT2 の脂肪肝炎の病態への関わりを培養肝細胞ならびに実験動物モデルを用いて証明する。LECT2 を標的とした脂肪肝炎の新規治療薬開発を目標とした研究基盤を確立する。

### 3. 研究の方法

特殊飼料飼育下での LECT2 遺伝子改変マウスにおける脂肪肝炎の検討

(実験1) LECT2 欠損(KO)マウスにおけるインスリン抵抗性、NAFLD/NASH の表現型解析  
LECT2 を全身で欠損するマウスを、NASH を誘導する AHFDiet や線維化を誘導する CDAHFD (コリン欠乏 メチオニン減量 飼料 (CDAA 飼料) 約 30kcal% 脂肪含有量) 等の特殊飼料で飼育し、インスリン感受性、肝病理組織像に対する影響を対照の野生型マウスと比較検討する。

(実験2) LECT 過剰発現(Tg)マウスにおけるインスリン抵抗性、NAFLD/NASH の表現型解析  
LECT2 を過剰発現する Tg マウスに AthHF や CDAHFD diet 飼育下で、インスリン感受性、肝病理組織像に対する影響を対照の野生型マウスと比較検討する。

また各実験においては 1. 肝臓の組織学的評価 (HE 染色、Azan 染色、シリウスレッド染色)、2. 肝線維化マーカー (ハイドロキシプロリン) による評価、3. 体重と血糖を経過観察、4. 血液検査 (AST, ALT, TG, Tcho, FFA, 血糖, IRI)、5. 肝中性脂肪、コレステロール、遊離脂肪酸含量、6. IPGTT による耐糖能評価、7. 肝臓の遺伝子発現評価 (脂肪合成系, 炎症, 酸化ストレス, 線維化関連遺伝子)、8. T-BARS による肝での酸化ストレス評価、9. 肝臓中の炎症シグナル伝達の評価: Western Blotting 法を用いた評価、10. Realtime PCR 法を用いた、肝臓での脂肪化、炎症、線維化関連遺伝子発現の評価など多面的に脂肪肝炎の程度の差異を検討する予定である。

### 4. 研究成果

LECT2 欠損(KO)マウスおよび LECT2 過剰発現(Tg)マウスへ CDAHFD (コリン欠乏 メチオニン減量、約 30kcal% 脂肪含有量) を投与し脂肪肝炎モデルを作成し、野生型マウスに脂肪肝炎を誘導した場合と比較した。

(1) CDAHFD 食飼育下 LECT2KO マウスにおいて、Lect2Tg マウスとは反対に肝臓での IL-6 遺伝子発現は有意に低下していた。また肝線維化を示す aSMA も有意に低下した。しかし、その他の炎症線維化関連遺伝子である TNF- $\alpha$ 、MCP-1、F4/80、TGfb1 は低下していたものの有意ではなかった。仮説と反し、Lect2 KO マウスでは野生型と比較し、肝中性脂肪含量が有意に上昇していた。

(2) LECT2Tg マウスにおいて脂肪肝炎を誘導すると、WT と比較し、肝臓での IL-6 遺伝子発現は有意に上昇していた。しかし、その他の炎症線維化関連遺伝子である TNF- $\alpha$ 、MCP-1、F4/80、TGfb1 は上昇していたものの有意ではなかった。肝線維化を反映するハイドロキシプロリン濃度も Lect2Tg マウスにおいて上昇していたが統計学的有意差は見られなかった。

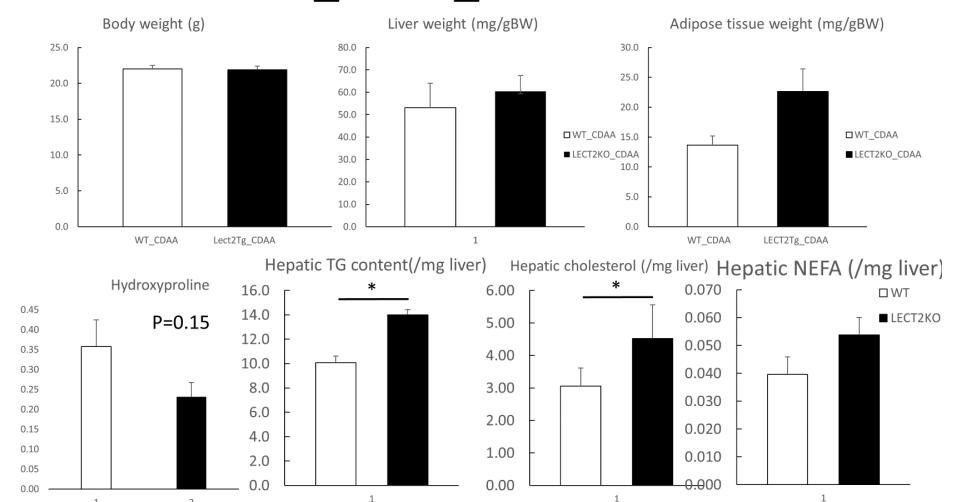
CDAHFD 食で予想よりも高度な脂肪肝炎起こったため表現型を明確に評価できなかった可能性がある。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

1. Kosuke Robert Shima, Tsuguhito Ota, Ken-ichiro Kato, Yumie Takeshita, Hirofumi

WT vs Lect2KO\_CDAA\_4w



Misu, Shuichi, Kaneko, Toshinari Takamura

Ursodeoxycholic acid potentiates dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin by enhancing glucagon-like peptide-1 secretion in patients with type 2 diabetes and chronic liver disease: a pilot randomized controlled and add-on study  
BMJ Open Diabetes Research & Care 2018 (6) e000469.

DOI <http://dx.doi.org/10.1136/bmjdr-2017-000469> 査読あり

2. **Kosuke Robert Shima**, Rika Usuda, Takeshi Futatani, Hiroshi Akahori, Shuichi Kaneko, Tohru Yorifuji, and Toshinari Takamura  
Heterogeneous nature of diabetes in a family with a gain-of-function mutation in the ATP-binding cassette subfamily C member 8 (ABCC8) gene  
Endocrine Journal. 2018, 65 (10), 1055-1059 査読あり
3. Yamamoto R, **Shima KR**, et al. Impact of preoperative pasireotide therapy on invasive octreotide-resistant acromegaly. Endocr J. 2018 Aug 4. doi: 10.1507/endocrj.EJ17-0487. 査読あり
4. Tanaka Atsushi, Shimabukuro Michio, Okada Yosuke, Taguchi Isao, Yamaoka-Tojo Minako, Tomiyama Hirofumi, Teragawa Hiroki, Sugiyama Seigo, Yoshida Hisako, Sato Yasunori, Kawaguchi Atsushi, Ikehara Yumi, Machii Noritaka, Maruhashi Tatsuya, **Shima Kosuke R**, Node Koichi, other 8  
Rationale and design of a multicenter placebo-controlled double-blind randomized trial to evaluate the effect of empagliflozin on endothelial function: the EMBLEM trial  
Cardiovascular Diabetology 2017;(16) 48.  
DOI <https://doi.org/10.1186/s12933-017-0532-8> 査読あり
5. Arumugam Mathivanan, Yoshio Minabe, Tsuguhito Ota, Naoto Nagata, **Shima KR** and Tetsumori Yamashima  
Role of GPR40 for Fish Oil PUFA-mediated BDNF Synthesis in the Monkey Hippocampus  
Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism 2016(6)  
DOI 10.4172/2161-0460.1000213 査読あり
6. Hanbai Liang, Shota Kurimoto, **Kosuke R Shima**, Daiki Shimizu, Tsuguhito Ota, Yoshio Minabe and Tetsumori Yamashima  
Why is Hippocampal CA1 Especially Vulnerable to Ischemia?  
SOJ Biochemistry 2016(1)  
DOI 10.15226/2376-4589/2/1/00108 査読あり
7. **島 孝佑**, 迫佐央理, 御簾博文, 篁 俊成 . 骨髄癌腫症に至った治療抵抗性悪性パラガングリオーマの一例検例 日本内分泌学会雑誌 94(suppl): 45-47, 2018.  
査読なし  
〔学会発表〕(計5件)
1. **Kosuke R Shima**, Yumie Takeshita, Hirofumi Misu, Tsuguhito Ota, Toshinari Takamura  
The effect of ursodeoxycholic acid added to dipeptidyl peptidase-4 inhibitor on GLP-1 secretion and glucose tolerance in subjects with type 2 diabetes 77th Scientific Sessions of the American Diabetes Association (国際学会) 2017年
2. **島 孝佑**, 迫佐央理, 御簾博文, 篁 俊成

骨髄癌腫症に至った治療抵抗性 悪性パラガングリオーマの一部検例

第27回臨床内分泌代謝Update 2017年

3. **Kosuke R SHIMA**, Rika USUDA, Yinhua NI, Shuichi KANEKO, Toshinari TAKAMURA, Tsuguhito OTA

Comparison of acarbose versus voglibose monotherapy on GLP-1 secretion and postprandial dyslipidemia in patients with type 2 diabetes

International Diabetes Federation 2017 Congress (国際学会) 2017年

4. **Kosuke R Shima**, Tsuguhito Ota, Ken-ichiro Kato, Yumie Takeshita, Hirofumi Misu, Shuichi Kaneko, Toshinari Takamura

The effect of ursodeoxycholic acid added to dipeptidyl peptidase-4 inhibitor on GLP-1 secretion and glucose tolerance in subjects with type 2 diabetes

Keystone symposia Bile Acid Receptors as Signal Integrators in Liver and Metabolism (国際学会) 2017年

5. **島 孝佑**、竹下有美枝、圓山泰史、御簾博文、篁 俊成

2型糖尿病患者に対するウルソデオキシコール酸及びDPP-4阻害薬の単独・併用が血糖コントロールと活性型GLP-1値に及ぼす効果

第59回 糖尿病学会年次学術総会 2016年

〔図書〕(計 1 件)

島 孝佑、篁 俊成

元気の出る糖尿病チームのつくり方 糖尿病診療マスター 医学書院 2016(2)121 - 123.

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。