

令和元年6月18日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16154

研究課題名(和文)チアゾリジン誘導体による脂肪肝改善メカニズムの解明

研究課題名(英文)Study of the mechanism by which thiazolidiones improve fatty liver

研究代表者

海老原 千尋 (EBIHARA, CHIHIRO)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：90790915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：チアゾリジン誘導体(TZD)はヒトやラットでは脂肪肝を改善し、マウスでは増悪させる。TZDの脂肪肝改善作用の機序を明らかにするためにレプチン欠損肥満ob/obマウス、Lepmkyo/Lepmkyoラット及び全身性脂肪萎縮A-ZIP/F-1マウス、SKOラットを対象にTZDを4週間投与した。マウスでは肝PPAR $\alpha$ 発現亢進が認められ、脂肪肝は増悪した。ラットでは肝PPAR $\alpha$ 発現亢進は認められず、Lepmkyo/Lepmkyoラットでは脂肪組織増加と脂肪肝改善が認められた。脂肪組織の無いSKOラットでは脂肪肝は変化しなかった。TZDの脂肪肝の改善は脂肪組織を介した作用であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国の脂肪肝患者数は1千万人とも言われ、肝癌対策における非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)の重要性が増している。メタボリックシンドロームや肥満、糖尿病などがNAFLDのリスクファクターであり、食事療法や運動療法がNAFLDの主な治療法である一方、現在確立した薬物療法は存在しない。近年、チアゾリジン誘導体(TZD)のNAFLDに対する治療効果が報告されている(N Engl J Med. 355:2297-307, 2006)。しかしながら、TZDによる脂肪肝改善メカニズムは不明であった。本研究によりTZDによる脂肪肝改善メカニズムが解明され、TZDの脂肪肝治療薬としての意義が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：While TZDs improve fatty liver in human, TZDs aggravate it in mice. To explore the mechanism for this species difference, we analyzed leptin deficient obese models, ob/ob mice and Lepmkyo/Lepmkyo rats and generalized lipodystrophy models, A-ZIP/F-1 mice and seipin KO (SKO) rats. All four animal models showed severe fatty liver. However, hepatic PPAR $\alpha$  mRNA expression was upregulated only in mouse models. We treated with TZDs for 4 weeks. Fatty liver in ob/ob and A-ZIP/F-1 was aggravated while it was improved in Lepmkyo/Lepmkyo. Surprisingly, fatty liver in SKO was unchanged. At this time, TZDs increased a PPAR $\alpha$  target gene in the liver in mouse models but not in rat models. In WAT, TZDs increased Fsp27 expression in both ob/ob and Lepmkyo/Lepmkyo. Furthermore, TZDs improved insulin sensitivity in ob/ob, A-ZIP/F-1 and Lepmkyo/Lepmkyo but not in SKO. These results clearly revealed that effects of TZDs on fatty liver and insulin sensitivity require WAT in rats and might be in humans.

研究分野：糖尿病、肥満

キーワード：脂肪肝 チアゾリジン誘導体 マウス ラット

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

従来、わが国の肝癌はC型肝炎などウイルス性肝疾患が大部分を占めていたが、近年では非ウイルス性の症例が増加しており、その多くは非アルコール性脂肪肝炎（NASH）などの脂肪肝に見られる炎症に起因すると考えられている。

特に2014年以降、C型肝炎に対する direct-acting antiviral agent（DAA）が登場し、肝癌対策における NASH あるいは非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）の重要性が増している。日本国内では脂肪肝患者数は推定1千万人とも言われ、約10人に1人が脂肪肝を有している計算になる。

脂肪肝は肝細胞に中性脂肪が過剰に蓄積する疾患の総称で、明らかな飲酒歴がない脂肪肝が NAFLD である。NAFLD に炎症や線維化を伴う脂肪肝炎を呈したものを NASH と呼ぶ。メタボリックシンドロームや肥満、糖尿病などが NAFLD のリスクファクターである。したがって、食事療法や運動療法が NAFLD の主な治療法となり、現在確立した薬物療法は存在しない。

近年、peroxisome proliferator-activated receptor gamma（PPAR $\gamma$ ）アゴニストであるチアゾリジン誘導体が NAFLD に対して治療効果を有することが報告されている（N Engl J Med. 355:2297-307, 2006）。

しかしながら、チアゾリジン誘導体による脂肪肝改善メカニズムについては解明が進んでいないのが現状である。この原因として、現在医学領域の研究で主に使用される動物種であるマウスではチアゾリジン誘導体により脂肪肝が改善するどころか悪化することが挙げられる（J Clin Invest. 106:1221-8, 2000）。

一方、ラットではヒトと同様にチアゾリジン誘導体により脂肪肝が改善することが報告されている（J Endocrinol Invest. 34:775-80, 2011、J Gastroenterol Hepatol. 23:102-9, 2008）。

## 2. 研究の目的

本研究ではマウスのみならずラットの脂肪肝モデルを用いてチアゾリジン誘導体による脂肪肝改善メカニズムを解明し、チアゾリジン誘導体の脂肪肝治療薬としての意義を明らかにする。チアゾリジン誘導体による脂肪肝改善メカニズムの解明は、NAFLD の病態メカニズムの解明にも繋がる可能性があり、新しい脂肪肝治療法の開発にも繋がる可能性がある。

## 3. 研究の方法

我々はこれまでに京都大学で開発された新規 DNA スクリーニング法である MuT-POWER と凍結精子アーカイブからの個体復元技術（ICSI）を用いた ENU ミュータジェネシスによる標的遺伝子変異ラット作製システムを用いて、複数の疾患モデルラットの開発に携わってきた。

このうち肥満モデルラットとしてはレプチン遺伝子にナンセンス変異を有する *Lep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup>* ラットを作製し、このラットが肥満のみならず重度の脂肪肝を呈することを報告した（Physiol Genomics. 45:786-793, 2013）。

また、全身性脂肪萎縮症モデルラットとして、ヒトの先天性全身性脂肪萎縮症の原因遺伝子として同定されているセイピン遺伝子のノックアウト（SKO）ラットの作製にも成功しており、ヒトの全身性脂肪萎縮症と同様に重度の脂肪肝を呈することを報告した（Hum Mol Genet. 24:4238-4249, 2015）。

そこで本研究では12週齢雄性の *ob/ob* マウス、A-ZIP/F-1 マウス、*Lep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup>* ラット、SKO ラットを対象に TZD である rosiglitazone（RGZ）あるいは pioglitazone（PGZ）の1日1回経口投与を4週間行い、肝臓、脂肪組織、骨格筋における中性脂肪蓄積量および PPAR $\gamma$  遺伝子と PPAR $\gamma$  の標的遺伝子である Fsp27 遺伝子の発現を検討した。

また、空腹時の血糖および血中インスリン濃度も測定し、インスリン感受性について検討した。

#### 4. 研究成果

*ob/ob* マウス、A-ZIP/F-1 マウス、*Lep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup>* ラット、SKO ラットではいずれもインスリン抵抗性および著しい脂肪肝を認めた。*ob/ob* マウス、A-ZIP/F-1 マウスでは肝臓の PPAR $\gamma$  遺伝子発現が亢進しているのに対し、*Lep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup>* ラット、SKO ラットでは PPAR $\gamma$  遺伝子の発現亢進は認められなかった。

RGZ あるいは PGZ 投与により *ob/ob* マウス、A-ZIP/F-1 マウスにおいて脂肪肝の増悪が認められたが、*Lep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup>* ラットでは脂肪肝の改善が認められ、SKO ラットでは脂肪肝に明らかな変化は認められなかった。

このとき PPAR $\gamma$  の標的遺伝子である Fsp27 遺伝子の肝臓における発現は *ob/ob* マウスおよび A-ZIP/F-1 マウスで亢進が認められたが、*Lep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup>* ラットおよび SKO ラットでは変化は認められなかった。

脂肪組織重量は RGZ あるいは PGZ 投与により *ob/ob* マウスでは変化が認められず、*Lep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup>* ラットでは増加が認められた。

しかし、脂肪組織における Fsp27 遺伝子の発現亢進は *ob/ob* マウス、*Lep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup>* ラットの両方で認められた。全身性脂肪萎縮症モデルである A-ZIP/F-1 マウスおよび SKO ラットでは脂肪萎縮状態に変化はなかった。骨格筋中性脂肪含量は *ob/ob* マウスおよび A-ZIP/F-1 マウスでは減少したが、*Lep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup>* ラットおよび SKO ラットでは変化しなかった。

骨格筋における Fsp27 遺伝子の明らかな発現変化はいずれの動物でも認められなかった。

空腹時血糖および血中インスリン濃度は *ob/ob* マウス、A-ZIP/F-1 マウス、*Lep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup>* ラットで低下したが、SKO ラットでは明らかな変化は認められなかった。

以上より、ラットにおける TZD のインスリン抵抗性および脂肪肝の改善は脂肪組織を介した作用であることが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

1. **Ebihara C**, Ebihara K, Masayo Isoda, Akiko Murakami, Daisuke Yamamuro, Manabu Takahashi, Shuichi Nagashima, Shun Ishibashi. Celastrol and Withaferin A Restore the Sensitivity of the Hypothalamus to Leptin through Upregulating ATP Concentration. ADA' s 77<sup>th</sup> Scientific Sessions, San Diego, June 9-13, 2017.

2. **Ebihara C**, Ebihara K, Masayo Isoda, Akiko Murakami, Daisuke Yamamuro, Manabu Takahashi, Shuichi Nagashima, Shun Ishibashi. Hypothalamic ATP up-regulation is the mechanism for the amelioration of leptin resistance by celastrol and withaferin A. 53rd EASD Annual Meeting, Lisbon, September 11-15, 2017.

〔図書〕 (計 0 件)

〔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。