

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11063

研究課題名(和文) 妊娠マウスから解明する脂肪肝発症メカニズム：新規化合物の開発と臨床応用を目指して

研究課題名(英文) Mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease using a diet-induced mouse model of fatty liver during pregnancy

研究代表者

川上 隆茂 (Kawakami, Takashige)

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：40441589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂肪肝に關与する新規因子の解明を動物実験から試み、脂肪肝や肥満を抑制する新規化合物の可能性を検討した。妊娠マウスに脂肪肝誘発食餌を与えたところ、著しい脂肪肝および肝線維化が認められた。この病態には小胞体ストレスが關与することが明らかとなった。血漿中メタボローム解析から、脂肪肝を生じた妊娠マウスではアシルカルニチン類が著しく低下していた。トレハロース誘導体から合成された新規化合物ビザンチンは、脂肪肝を抑制し、脂肪細胞の機能を改善した。以上、ビザンチンは脂肪肝の新薬候補となる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣の変化に伴い、肝がん・肝硬変の原因となる肥満・脂肪肝の発症人口が増加している。健康的な生活を担保し、医療費の抑制のためにその予防と治療が喫緊の課題である。本研究では脂肪肝発症モデルとして妊娠マウスを用い、極めて短期間で脂肪肝を生じるモデル動物であることを見出した。本実験モデルは、これまで原因が未詳である急性妊娠脂肪肝のモデル動物となることも予想され、脂肪肝発症に關わる因子を明らかにした点と合わせて学術的意義がある。また、大学の研究室から創生された新規化合物が脂肪肝を抑制することを見出し、脂肪肝の新たな解決方法とした点において社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We attempted to elucidate the molecular mechanisms of fatty liver using a diet-induced fatty liver pregnant mouse model, and investigated Vizantin which is a potential drug for treatment of fatty liver and obesity. When pregnant mice were fed a fatty liver-induced diet (CDAA), marked fatty liver and liver fibrosis were observed. Further, we used a ER stress inhibitor 4-phenylbutyrate (PBA) to test whether fatty liver induced by a CDAA diet was mediated by ER stress in pregnant mice. The results showed that PBA ameliorated fatty liver development in CDAA-fed pregnant mice, suggesting that ER stress is, at least in part, responsible for diet-induced fatty liver during pregnancy. Metabolomic analysis revealed that acylcarnitines were significantly reduced in plasma of CDAA-fed pregnant mice compared to control mice. Vizantin suppressed fatty liver and improved adipocyte function. The results of this study suggested that Vizantin could be a candidate for a new drug for fatty liver.

研究分野：環境衛生学

キーワード：脂肪肝 ビザンチン 妊娠マウス 小胞体ストレス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、肝がん・肝硬変の原因となる脂肪肝の発症人口が増加しているが、脂肪肝に対する治療薬は確立されていない。肝硬変や肝がんの原因となる脂肪肝の動物による研究は、脂肪肝を形成させるまで膨大な時間(2ヶ月以上)を必要とする。また、脂肪肝の先にある線維化やがんを誘起させるにはさらに多くの時間が必要であり、その機序は未詳な点が多い。我々は、妊娠マウスに脂肪肝誘発食餌を与えると極めて短期間(17日間)で著しい脂肪肝や線維化を発症することを見出している。これらの結果は、脂肪肝モデルが早期に得られるだけでなく、妊娠状態では脂肪肝や線維化を促進する因子が存在することが示唆され、脂肪肝の治療薬の評価にも有効である可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、妊娠マウスを用いた脂肪肝モデルを用いて脂肪肝・線維化の発症メカニズムを解明し、新規化合物(ビザンチン)の臨床応用の可能性を検討する。具体的には、①本脂肪肝モデルにおけるメタボローム解析から脂肪肝発症の原因を解析する。また、本モデル動物において脂肪肝の原因として知られる小胞体(ER)ストレスの関与を検討する。②妊娠時における脂肪肝発症は、妊娠を終了しないと母子ともに命の危険がある脂肪肝であるが、詳しい機序は不明な点が多く、モデル動物は知られていない。妊娠マウスを用いた脂肪肝モデルの妊娠を中断させ、急性妊娠脂肪肝のモデル動物の可能性を検討する。③本学でトレハロース誘導體から創生された化合物「ビザンチン」は、細胞レベルで脂肪肝の発症・伸展に関与する炎症性サイトカイン分泌を抑制することを報告している。そこで、本研究は脂肪肝モデル動物や脂肪細胞を用いて、ビザンチンおよびその関連化合物(溶解性の改善を目的に合成したビザンチン誘導體の一種)の肥満・脂肪肝治療薬としての有用性について検討する。

3. 研究の方法

(1) ICR系の妊娠マウスにコリン欠乏メチオニン減量飼料(CDAA)食もしくはcontrol食を摂食させ妊娠17日目に解剖を行った。採取した肝臓は組織固定を行い、HE染色法による組織学的観察をおこなった。血漿パラメータ測定は、各種キットを用いた。ERストレスに関与するタンパク質は、ウェスタンブロット法により解析した。さらに、化学シャペロンの脂肪肝への効果を検討するためにCDAAの摂食期間に1日2回salineもしくは4-PBA(300 mg/kg/day)を経口投与した。肝臓における遺伝子の発現量は、real-time PCRで測定した。

(2) マウスの血漿3検体(非妊娠マウスのCDAA群、妊娠マウスの対照群および妊娠マウスのCDAA群)についてメタボローム解析を行った。CE-TOFMSのカチオンモード、アニオンモードによる測定およびLC-TOFMSのポジティブモード及びネガティブモードによる測定を実施した。本試験ではHMTライブラリに登録された物質を対象として解析を行った。

(3) 妊娠中断によるCDAA誘発性脂肪肝への影響を検討する目的で、ICR妊娠マウスSTD群およびCDAA群の妊娠12日目に妊娠中断薬(RU486)を投与した。解剖日に血液を採取し、血清中ALT、AST値を測定した。肝臓中の線維化関連遺伝子(TGF-β、colla1、Timp-1、Mmp2)のmRNA発現量はリアルタイムPCR法を用いて解析した。

(4) 6週間、高脂肪食(HFD)を摂食させたメタロチオネインMT欠損(MTKO)マウスに高脂肪食条件下で、ビザンチンを10あるいは30 mg/kg bwで連続投与した。肝臓はHE染色による組織学的検索を行った。また、マウス胎児線維芽細胞株3T3-L1を脂肪細胞に分化させ、ビザンチンおよびビザンチン誘導體を8日間連続曝露し、Nile Red法を用いて脂肪滴を評価した。また、ビザンチン誘導體(0, 0.1, 1, 10μM)、10 μMビザンチン、10 nMインスリン(Ins)で90 min処理し、インスリンシグナルに関与するタンパク質をウェスタンブロット法にて解析した。

4. 研究成果

【1】妊娠マウスを用いた脂肪肝モデルにおける脂肪肝・肝線維化のメカニズム解明

Fig. 1

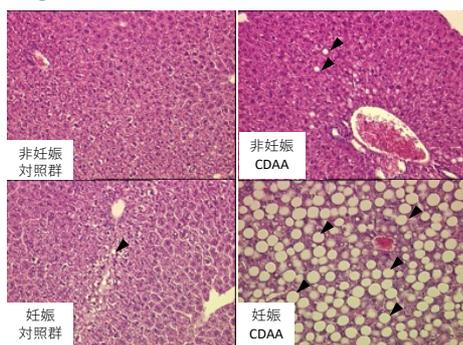
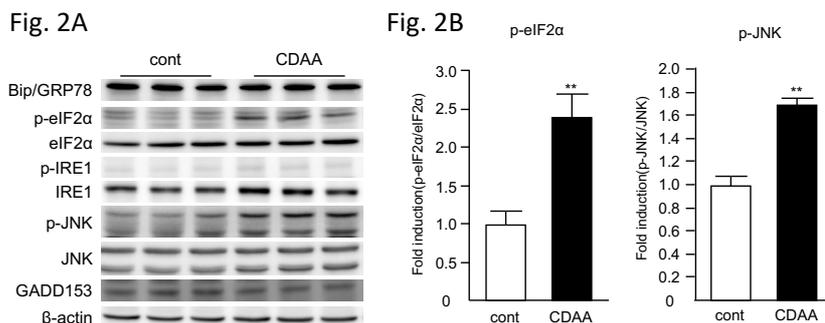


Table 1

処置	非妊娠マウス		妊娠マウス	
	対照群	CDAA	対照群	CDAA
血糖値(mg/dl)	110.3±9.4	125.2±5.2	95.6±3.4	67.8±4.1**
ALT (IU/l)	4.0±0.5	5.1±0.2	6.6±1.3	46.6±7.3*
AST (IU/l)	25.8±2.4	26.0±2.4	28.9±4.2	190.7±11.3**
TG (mg/dl)	103.0±23.0	118.6±28.5	162.6±23.6	46.3±0.7**
NEFA (mEq/L)	1.01±0.07	1.12±0.09	0.60±0.09	0.44±0.06
HDLコレステロール (mg/dl)	181.6±14.8	156.9±6.7	24.4±7.8	4.8±0.6*
総コレステロール(mg/dl)	141.7±14.4	111.5±6.0	32.5±4.5	10.8±0.9**

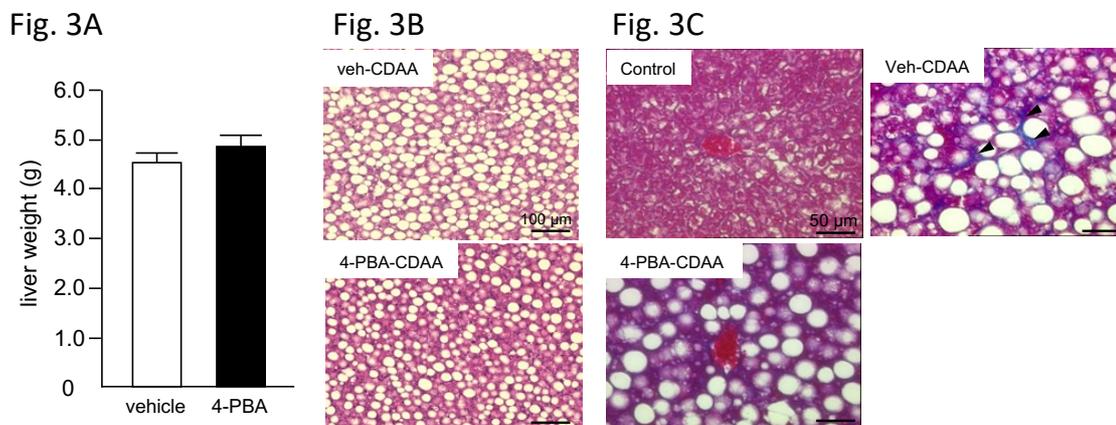
(1) Fig. 1 および Table 1 CDAA 摂食による肝臓組織および血清パラメータへの影響

非妊娠マウスの CDAA 群と妊娠マウス対照群において、血管周辺にわずかな脂肪滴が認められた。また、妊娠マウスの CDAA 群は他群と比較して著しい脂肪蓄積と AST、ALT の値の増加が認められた。妊娠マウスの CDAA 群では、対照群と比較して血糖値、TG、HDL コレステロール、総コレステロール値で有意な低下が認められた。



(2) Fig. 2 ER ストレスマーカー及び JNK のタンパク質の比較解析

妊娠マウス CDAA 群は対照群と比較して、p-eIF2 および p-JNK の有意な増加を示した。



(3) Fig. 3 CDAA 誘導性脂肪肝に対する化学シャペロンの影響

(A) 4-PBA 処理による CDAA 摂食妊娠マウスの肝重量に有意な差は認められなかった。(B) 妊娠マウスの CDAA 食群では、他群と比較しておびただしい数の大型の脂肪滴が認められたが、4-PBA 投与群では veh 群と比較して脂肪滴の縮小傾向が認められた。(C) 4-PBA 投与群では veh 群と比較して、肝線維化の抑制が認められた。以上、妊娠期は食餌誘導性脂肪肝発症リスクが増加し、そのメカニズムの一部に ER ストレスならびに JNK の経路が関与している可能性が考えられた。

(4) 血漿メタボローム解析

CE-TOFMS 解析では総数 203 (カチオン 113、アニオン 90) のピークが検出された。また、LC-TOFMS 解析では、総数 141 (ポジティブ 66、ネガティブ 75) のピークが検出された。検出されたピークについて PCA 主成分分析および HCA 階層的クラスタリングを行ったところ、各群間に主要なピークプロファイルの違いが検出された。この中でも、妊娠マウスの CDAA 群は他群と比較してアシルカルニチン類が著しく低下していた。また、妊娠マウスの対照群および CDAA 群間において遊離カルニチン量の著しい差は認められなかった。以上の結果から、妊娠マウスの CDAA 群で認められた脂肪肝の原因の一つとして、脂肪酸のミトコンドリア内への転送障害による脂肪酸代謝の不全が示唆された。

【2】 妊娠時における脂肪肝発症：急性妊娠脂肪肝モデルの可能性の検証

Fig. 4A

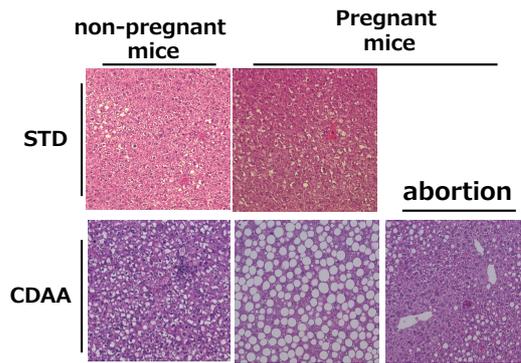
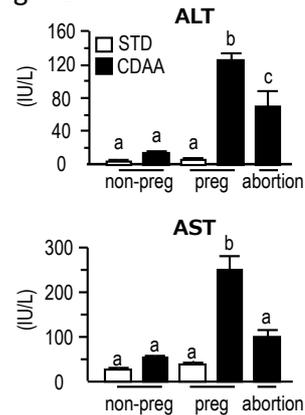


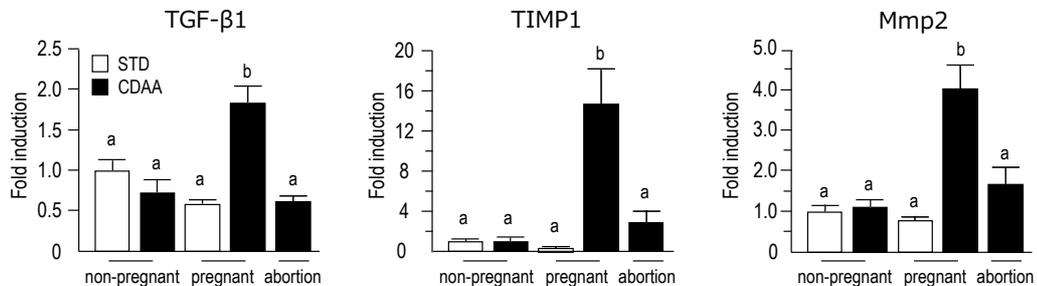
Fig. 4B



(5) Fig. 4A, B 妊娠中断によるの肝臓組織中の脂肪滴蓄積変化および肝機能の検討

(A) (B) CDAA を与えた妊娠マウスは非妊娠マウスと比較して、血漿中 ALT と AST の著しい増加を伴う肝臓組織中での大型の脂肪滴が観察された。妊娠中断群は CDAA を与えた妊娠マウスと比較して、増加した ALT と AST の減少を伴う肝臓中の脂肪滴の減少・小型化が認められた。

Fig. 4C



Data represent means ± SE. (n = 4-6), Different letters mean statistically significant differences at $p < 0.05$.

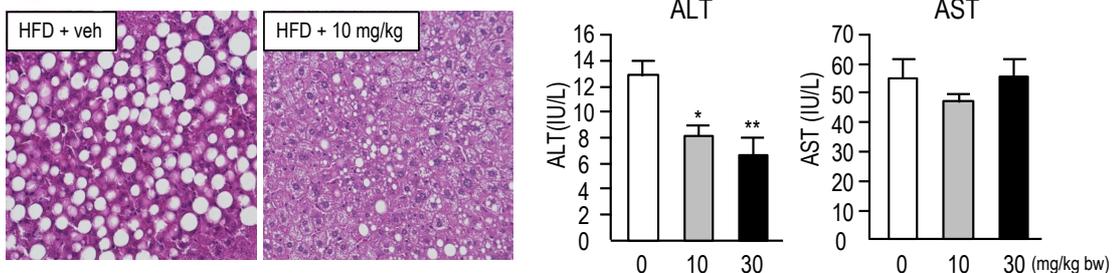
TGF-β; Transforming growth factor beta 1, TIMP1; Tissue inhibitor of metalloproteinase 1, Mmp2; Matrix metalloproteinase-2

(6) Fig. 4C 妊娠マウスにおける食餌誘発性肝線維化リスクと妊娠中断の影響

CDAA を摂取した妊娠マウスは他群と比較して、線維化に関与する TGF-β1、TIMP1 および Mmp2 mRNA 発現量の有意な増加が認められた。さらに、妊娠を中断することにより、検討した全ての遺伝子の mRNA 発現量の有意な減少が認められた。以上、妊娠期における食餌誘発性脂肪肝および肝線維化の感受性亢進に胎仔・胎盤から分泌される因子が関連する可能性が示唆された。また、急性妊娠脂肪肝の特徴をよく反映しており、急性妊娠脂肪肝モデルとして有用であることが考えられた。

【3】 新規化合物「ビザンチン」の肥満・脂肪肝に対する予防・治療戦略の検討

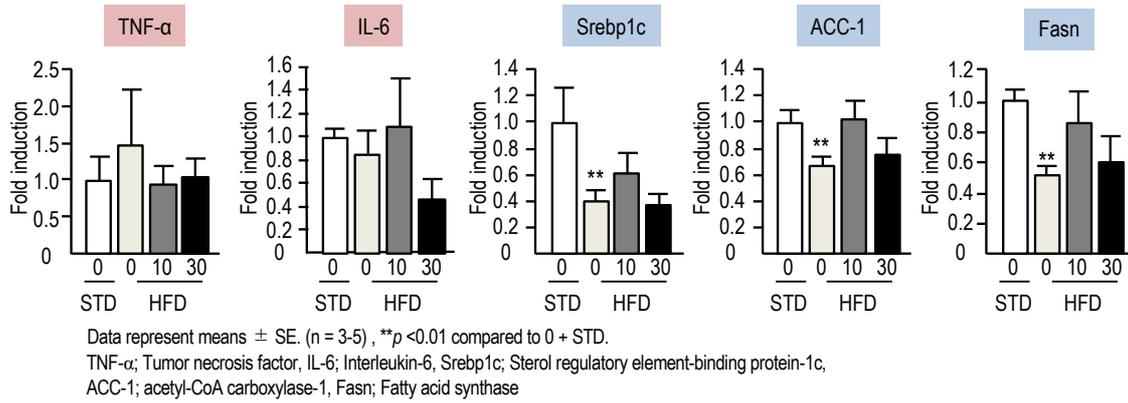
Fig. 5



(7) Fig. 5 ビザンチンの脂肪肝および肝機能改善作用の可能性の検討

MTKO マウスは HFD によって容易に肥満・脂肪肝を形成することを見出している。MTKO マウスへの 10 週間の HFD 摂取は肝臓において脂肪滴の著しい増加を引き起こしたが、ビザンチン投与群では増加した脂肪滴の減少、小型化が認められた (Fig. 5)。また、ビザンチン投与群は対照群と比較して、ALT の有意な減少が認められた。

Fig. 6



(8) Fig. 6 肝臓内の炎症性サイトカイン、脂肪酸合成酵素 mRNA 発現量に対する影響

ビザンチンは肝臓における炎症性サイトカインである TNF- α および IL-6 mRNA 発現量に影響を与えなかった。また、HFD 摂取により減少した脂肪酸合成酵素 (Srebp1c、ACC-1、Fas、SCD-1) mRNA 発現量は、ビザンチン処理において改善が認められた。

(4) 3T3-L1 を用いたビザンチンの脂肪細胞分化に及ぼす影響

Fig. 7A

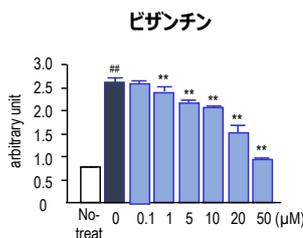
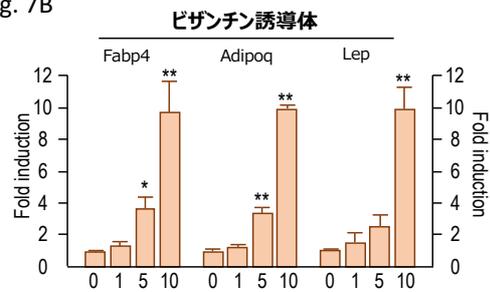


Fig. 7B

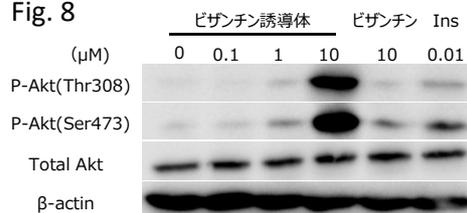


Data represent means \pm SD. (n = 3), *p < 0.05, **p < 0.01 compared to vehicle-treated-differentiated 3T3-L1 cells, #p < 0.01, compared no-treated 3T3-L1 cells.
 PPAR γ : peroxisome proliferator activated receptor gamma, C/EBP α : CCAAT/enhancer binding protein alpha, C/EBP δ : CCAAT/enhancer binding protein delta,
 Fabp4: Fatty acid binding protein 4, Adipoq: Adiponectin, Lep: leptin

(9) Fig. 7 3T3-L1 細胞におけるビザンチンおよびビザンチン誘導体の脂肪細胞分化に及ぼす影響

(A) ビザンチンの連続処理 (day0-8) は、3T3-L1 細胞において用量依存的に脂肪蓄積量を減少させた。一方、ビザンチン誘導体の連続処理は、脂肪蓄積量を用量依存的に増加させた。(B) ビザンチン誘導体は、脂肪細胞分化関連遺伝子 (PPAR γ , C/EBP α , C/EBP δ) および成熟脂肪細胞マーカー (Fabp4, Adipoq, Lep) mRNA 発現量を用量依存的に増加させた。

Fig. 8



(10) Fig. 8 ビザンチン誘導体のインスリンシグナルへの関与

ビザンチン誘導体処理は、用量依存的に Akt のリン酸化 (Thr308 および Ser473) を促進した。ビザンチン誘導体はインスリンシグナルの中心的役割を担う Akt のリン酸化を促進させることにより、脂肪細胞への分化を促進し、アディポネクチンやレプチン分泌を介してインスリン抵抗性を改善する可能性が示唆された。以上、トレハロース誘導体から合成された新規化合物ビザンチンは、肥満や脂肪肝の新薬候補となる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takashige Kawakami	4. 巻 226
2. 論文標題 Regulatory role of metallothionein-1/2 on development of sex differences in a high-fat diet-induced obesity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Sci.	6. 最初と最後の頁 12-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2019.04.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川上 隆茂、門田 佳人、阿部 友美、井上 正久、鈴木 真也
2. 発表標題 妊娠脂肪肝発症モデルマウスを用いた血漿メタボローム解析
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本 楓夏 , 川上 隆茂 , 門田 佳人, 山崎 直人, 山本 博文, 鈴木 真也
2. 発表標題 妊娠マウスを用いたピザンチンの食餌誘発性脂肪肝の抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会 第139回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上 隆茂、古味 和、山崎 直人、門田 佳人、山本 博文、鈴木真也
2. 発表標題 ピザンチンおよびピザンチン誘導体の脂肪細胞分化に及ぼす影響
3. 学会等名 フォーラム2018 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://p.bunri-u.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------