

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590796

研究課題名(和文)

脂肪肝炎病態における、肝インスリン抵抗性・酸化ストレス paradox の解明

研究課題名(英文)

Analysis of the paradoxical correlation between hepatic insulin resistance and oxidative stress in the pathogenesis of steatohepatitis

研究代表者

富田 謙吾 (TOMITA KENGO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：50317129

研究成果の概要(和文):

我が国では、メタボリックシンドロームの患者数の増加とあいまって、非アルコール性脂肪肝炎患者が増加している。アディポネクチンは脂肪組織から放出され、インスリン抵抗性を改善させるアディポサイトカインであるが、我々は肝臓のアディポネクチン受容体である AdipoR2 を介したアディポネクチンシグナルが、非アルコール性脂肪肝炎の病態において重要であることを明らかにした。このシグナルは非アルコール性脂肪肝炎治療の有望な治療標的となるであろう。

研究成果の概要(英文):

Given the growing number of metabolic syndrome patients in recent years, the incidence of nonalcoholic steatohepatitis increases in Japan. Adiponectin, an adipocytokine, is released by adipose tissue and improves insulin resistance. AdipoR2, one of the adiponectin receptors, is expressed predominantly in the liver. In the present study, we have found that hepatic adiponectin sensitivity and resistance mediated by adiponectin/AdipoR2 signaling plays a significant role in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. Thus, the liver AdipoR2 signaling pathway could be a promising target in treating nonalcoholic steatohepatitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：消化器内科学、肝臓病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：酸化ストレス、インスリン抵抗性、脂肪肝炎

1. 研究開始当初の背景

脂肪肝は、肝臓に脂質が蓄積する病態であり、現在先進国の成人の約 2 割に認められるとされている。従来脂肪肝は、特に治療を要しない病態とみなされてきたが、近年重症肝障害進展への危険因子であることが明らかとなり、その病態機序の解明は重要な研究課題である。脂肪肝の病態に対する、活性酸素を始めとす

る second hit とも言える刺激が、脂肪肝を脂肪肝炎、さらには肝硬変に進展させるという説が提唱されている。近年、脂肪肝のドナーが、肝移植成績を増悪させるとの報告が散見される。一方で、肝細胞の脂肪化と発癌との相関が報告されており、慢性 B 型・C 型肝炎・肝硬変の背景因子としての脂肪肝、脂肪肝炎が、発癌の見地において注目を集めている。

また、特に NASH は肥満人口の増加に伴い欧米・日本を中心に増加の一途にあり、米国では実に人口の約 3% が本疾患に罹患していると推定されている。Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) 患者全体では、人口の約 20% に到達するものと考えられ、現在米国で最も患者数の多い肝疾患であることを銘記せねばならない。10 年間の追跡で NASH 患者の 20% が肝硬変へと進行し、8% が肝臓死に至る進行性の疾患であり、米国では社会問題となりつつある。我が国においても、人口の約 1% が NASH に罹患しているとの推計がなされており、今後肥満人口の増加に伴い更に増える事が予想され、その進展を阻害する薬剤の開発は急務であろうと考えられる。

NASH はその背景にインスリン抵抗性を有する場合が多いが、申請者らはいち早く、インスリン抵抗性改善薬であり PPAR γ アゴニストである Pioglitazone が脂肪肝の病態を改善することを報告した (Tomita, et al. *Gastroenterology*, 2004)。その際肝細胞における PPAR を介した HGF/c Met シグナリングの活性化という新たなパスウェイが、病態に重要な役割を果たすことを明らかとした。同じく、インスリン抵抗性改善に關与する AMP kinase の activator の投与によっても脂肪肝の病態が改善された (Tomita, et al. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005)。また、レプチンは肥満・インスリン抵抗性に深く關与する adipocytokine であるが、そのシグナル欠損が、ストレスタンパク質メタロチオネインの発現誘導の抑制を介して脂肪肝発症への易感受性を惹起することも明らかとした (Tomita, et al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004)。同様に adipocytokine の一つである TNF α が、肝臓星細胞 TIMP-1 発現増強を介して、NASH 病態における肝線維化を促進する (Tomita, et al. *Gut*, 2006) ことが判明した。このように、申請者らは、インスリン抵抗性の制御と、それに関わる adipocytokine が、metabolic syndrome をバックグラウンドとする NASH の病態に深く關与することを明らかにしてきた。

一方で、線虫で発見された daf-2 長寿変異体の遺伝学的解析から、インスリン様受容体シグナルの抑制が線虫の個体寿命を延長することが判明したが (Kimura, et al. *Science*, 1997) 申請者らは同様の遺伝子変異をインスリン受容体遺伝子にノックインした遺伝子改変マウスを作成した (Shimizu, Shirasawa, et al. *J Biol Chem*, 2005)。

このインスリン受容体遺伝子ヘテロ改変マウスは、インスリン抵抗性状態にあったが、同時に酸化ストレスに対しても抵抗性を示し、長寿の形質を呈した。この遺伝子改変マウスでは、肝臓の SOD2 活性・発現の亢進を認め、酸化ストレス抵抗性の機序の一つと考

えられた。

ヒトにおけるメタボリックシンドロームの病態においても、背景にインスリン抵抗性が存在するが、細胞内インスリンシグナルの活性化と、その受容体レベルでの抵抗性とを区別して考える必要があることを、本研究は示唆するものである。しかしながら、実際の病態において、その詳細はほとんど明らかとなっていない。そして、特に NASH の病態においては、その背景に肝臓におけるインスリン抵抗性と、酸化ストレスの亢進が想定されており、この両者の相互關係が paradox を形成する。我々は、既に肝臓特異的 SOD2 欠損マウスも作成している (Shimizu, Shirasawa et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002)。

2. 研究の目的

脂肪肝発症機序における、肝臓におけるインスリン抵抗性と、抗酸化ストレス因子との相互作用、およびその各々の病態に果たす役割に関する検討をおこなう。本研究により、NASH 発症における、肝インスリン抵抗性と酸化ストレスの關与を明らかにするとともに、病態における両者の共存という paradox を、解明することができる。

一方、肝臓のインスリン抵抗性および酸化ストレス状態が、脂肪細胞の産生するアディポネクチンや TNF α を初めとする adipocytokine によって調節されていることが近年明らかとなっている。アディポネクチンはインスリン抵抗性改善作用を有し、糖尿病などの病態機序で重要な役割を果たすアディポサイトカインである。AdipoR2 は肝臓における主要なアディポネクチン受容体であるため、我々は、AdipoR2 過剰発現アデノウイルス及び、AdipoR2 SiRNA 発現アデノウイルスを作成した。これらのアデノウイルスを用い、AdipoR2 の肝臓発現レベルを調節することにより、肝臓でのアディポネクチンシグナルが、NASH 病態機序に果たす役割を明らかとすることができる。

このように、本研究では、アディポネクチンシグナルを介した、肝臓におけるインスリン抵抗性と、抗酸化ストレス因子との相互作用についても明らかとすることができる。

本研究で得られた知見により、幅広い視点から、肝におけるインスリン抵抗性と酸化ストレス状態の双方を配慮した新たな治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

インスリン受容体遺伝子ヘテロ改変マウス、肝臓特異的 SOD2 欠損マウスに、メチオニン・コリン欠損食を各群が同一カロリーを摂取するよう 12 週間施行する。また AdipoR2 過剰発現アデノウイルス、AdipoR2 SiRNA 発現アデノウイルスを作成し、NASH モデルマウス

に感染実験を施行する。

その後、各群のマウスの肝臓、内臓脂肪、皮下脂肪、骨格筋、血清を採取し、脂肪肝・肝障害・肝臓線維化の差異を、組織学的・血清学的に評価検討する。また各群の肝臓より、RNA、タンパク質を抽出し、DNA array法、Real time PCR法、Western blot法、Gel shift assay法、免疫沈降法を用い、サイトカインを始めとした各種パラメーター及び、転写因子活性変化の定量的な評価を施行する。各組織におけるカルボニルアッセイ、SOD活性測定を施行し、また組織切片における4-HNE、8-OHdG、アクロレインの免疫染色施行により、酸化ストレス状態の評価も併せて検討する。

各モデルマウスより、初代培養肝細胞、および初代培養肝星細胞を分離し、*in vivo*での結果を踏まえた*in vitro*解析を施行することにより、肝臓構成細胞レベルでの病態機序をも明らかとすることができる。

4. 研究成果

インスリン受容体遺伝子ヘテロ改変マウス、肝臓特異的 SOD2 欠損マウスに、メチオニン・コリン欠損食を各群が同一カロリーを摂取するよう 12 週間施行した。現在、各群のマウスの肝臓、内臓脂肪、皮下脂肪、骨格筋、血清を採取し、脂肪肝・肝障害・肝臓線維化の差異を、組織学的・血清学的に評価検討している所である。また各群の肝臓より、RNA、タンパク質を抽出し、DNA array 法、Real time PCR 法、Western blot 法、Gel shift assay 法、免疫沈降法を用い、PI3kinase、Akt シグナル、サイトカインを始めとした各種パラメーター及び、FOXO を始めとした転写因子活性変化の定量的な評価の施行中である。各組織における TBARS 定量、SOD 活性測定を施行し、また組織切片における 4-HNE、8-OHdG、アクロレインの免疫染色施行により、酸化ストレス状態の評価も併せて検討している。

また、メチオニン・コリン欠損食摂餌により作成されたマウス NASH モデルに対して、その病態の初期と、晩期にそれぞれアデノウイルス (AdipoR2 過剰発現アデノウイルス、AdipoR2 siRNA 発現アデノウイルス) を投与することで、肝臓の AdipoR2 発現をコントロールした。肝臓 AdipoR2 発現増強により、NASH 病態 (肝臓の脂肪化・炎症・線維化) のいずれもが改善し、肝臓 AdipoR2 発現減弱により、NASH 病態のいずれもが増悪することが明らかとなった。肝細胞でのアディポネクチンシグナルは、AdipoR2 を介して PPAR α 活性を増強し、catalase 発現を増加させることにより、TGF β によって引き起こされる酸化ストレスを減弱させ、脂肪肝病態を改善させることを、我々は明らかにした。AdipoR2 を介した、肝臓でのアディポネクチン感受

性・抵抗性が、肝臓酸化ストレスレベルの調節を介して脂肪肝病態を規定していることが今回明らかとなった。そして、この肝臓アディポネクチン感受性・抵抗性が、肝臓でのインスリン抵抗性・酸化ストレス paradox の病態機序の一つであると考えられる。

また、我々の研究結果により、肝臓 Adiponectin/AdipoR2 シグナルという、脂肪肝の新たな治療ターゲットが明らかとなった。脂肪肝は未だ治療法が確立していないため、我々のこの研究結果は、脂肪肝治療学において重要な位置を占めるものと考えられる。今後、臨床治療応用に向けての更なる取り組みが期待されるものである。

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 33 件)

・ Tomita K (10 人中 1 番目), et al. Plasma free myristic acid proportion is a predictor of nonalcoholic steatohepatitis. **Dig Dis Sci** 2011 in press. (査読有り)

・ Tomita K (8 人中 4 番目), et al. Fbxw7 controls lipid metabolism and cell fate decision in the liver. **J Clin Invest** 2011; 121: 342-354. (査読有り)

・ Shimizu T (7 人中 7 番目), et al. Insulin receptor mutation results in insulin resistance and hyperinsulinemia but does not exacerbate Alzheimer's-like phenotypes in mice. **Biochem Biophys Res Commun** 2011 in press. (査読有り)

・ Shimizu T (18 人中 18 番目), et al. Oxidative stress in skeletal muscle causes severe disturbance of exercise activity without muscle atrophy. **Free Radic Biol Med** 2010; 48: 1252-1262. (査読有り)

・ Tomita K (14 人中 2 番目), et al. Utility of quantitative ^{99m}Tc-phytate scintigraphy to diagnose early-stage non-alcoholic steatohepatitis. **Scand J Gastroenterol** 2009; 44: 229-236. (査読有り)

・ Tomita K (25 人中 17 番目), et al. Glucocorticoid protects rodent hearts from ischemia/reperfusion injury by activating lipocalin-type prostaglandin D

synthase derived PGD2 biosynthesis.
J Clin Invest 2009; 119: 1477-1488.
(査読有り)

. Shimizu T (14人中9番目), et al. Conditional knockout of Mn-SOD targeted to type IIB skeletal muscle fibers increases oxidative stress and is sufficient to alter aerobic exercise capacity.
Am J Physiol Cell Physiol 2009; 297: C1520-1530. (査読有り)

. Shimizu T (9人中9番目), et al. Skin atrophy in cytoplasmic SOD-deficient mice and its complete recovery using a vitamin C derivative.
Biochem Biophys Res Commun 2009; 382: 457-461. (査読有り)

. Tomita K (17人中1番目), et al. Hepatic AdipoR2 signaling plays a protective role against progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice.
Hepatology 2008; 48: 458-473. (査読有り)

. Tomita K (11人中1番目), et al. Evaluating the severity of nonalcoholic steatohepatitis with superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging.
J Magn Reson Imaging 2008; 28: 1444-1450.
(査読有り)

. Shimizu T (13人中5番目), et al. Retinal dysfunction and progressive retinal cell death in SOD1-deficient mice.
Am J Pathol 2008; 129: 291-298.
(査読有り)

〔学会発表〕(計2件)

- . 富田謙吾. 非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) 発症・進展における、adiponectin/AdipoR2 シグナルの果たす役割に関する検討. 第5回宮崎サイエンスキャンプ. 2009年2月20日. 宮崎
- . 富田謙吾. 非アルコール性脂肪肝炎病態機序における、抗酸化酵素 catalase を介した肝臓アディポネクチン感受性・抵抗性の役割に関する検討. 日本応用酵素協会第34回研究発表会. 2008年11月17日. 大阪

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 謙吾 (TOMITA KENGO)
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号: 50317129

(2) 研究分担者

清水 孝彦 (SHIMIZU TAKAHIKO)
(財)東京都高齢者研究・福祉振興財団・
東京都老人総合研究所・研究員
研究者番号: 40301791

(3) 連携研究者

なし