

研究種目:若手研究(B)
研究期間:2008~2009
課題番号:20790641
研究課題名(和文) 肝内細胞間ネットワークの破綻が肝細胞のインスリン抵抗性を惹起する機序の解明
研究課題名(英文) Clarification of the mechanism by which the impairment of intra-hepatic cellular network caused hepatic insulin resistance in mice.
研究代表者
和田 努(WADA TSUTOMU)
富山大学・医学薬学研究部・助教
研究者番号:00419334

研究成果の概要(和文):マウスに高脂肪果糖食負荷を行ったところ、脂質代謝異常、血圧上昇、全身のインスリン抵抗性と耐糖能低下を認め、メタボリックシンドロームの表現系を呈した。また肝糖新生の亢進を認め組織学的に脂肪肝を示した。このマウスに同時に抗アルドステロン薬であるスピロラクトン(SP)を投与した群では肝組織所見を含む代謝異常が改善した。肝での遺伝子発現を検討したところ、食事負荷に伴って上昇した糖新生酵素・脂質合成酵素・炎症の発現が抗アルドステロン薬投与で改善していた。

研究成果の概要(英文): We examined the effect of spironolactone on glucose and lipid metabolism in a mouse model with diet-induced diabetes and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). C57BL/6 mice were fed control diet, 60% fat diet with 30% fructose water (HFFD), or HFFD with spironolactone for 8 weeks. HFFD mice demonstrated apparent phenotypes of metabolic syndrome, including insulin resistance, hypertension, dyslipidemia, and fatty liver. Administration of spironolactone effectively ameliorated these phenotypes. These results indicate that inhibition of MR might be a beneficial therapeutic approach for diet-induced phenotypes of metabolic syndrome and fatty liver.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:内科系臨床医学・代謝学

キーワード:メタボリックシンドローム、NAFLD、NASH、アルドステロン

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患はメタボリックシンドロームの肝臓での表現系と考えられ、その対象患者は増加の一途であり、病態の解明と効果的な治療法の開発は急務と考えられる。

肝臓は肝細胞、星細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞により構成されており、単純性脂肪肝から脂肪肝炎、肝線維化に至る過程において、これら各々の細胞が様々な生理活性物質を産生することで互いに作用することが想定された。一方肝臓の線維化には PDGF シグナルが重要であると考えられていた。そこで当初 PDGFR β ^{flox/flox} 変異マウスを用いてアデノウイルスで Cre recombinase を発現することで目的に合わせて PDGF レセプターをノックアウトし、各細胞の機能を検討しようと試みた。しかし検討を行う過程で、線維化に重要な星細胞にはアデノウイルスによる遺伝子導入効率が悪いことが明らかとなり、この方法による検討は困難であることが明らかとなった。

近年アルドステロンが血管、心筋や腎臓の炎症や線維化に関連することが報告されている。そこで我々はインスリン標的組織である脂肪細胞にアルドステロンを作用させ、インスリンの代謝シグナルと糖取り込作用に与える影響を検討した。その結果アルドステロンは活性酸素種の産生を誘導することでインスリンシグナル伝達を傷害することを見だし、その機序を検討し報告した。

そこで肝臓における代謝障害や脂肪肝に対する抗アルドステロン剤の効果につき、肝細胞に加え、肝臓での炎症に中心的な役割を果たすと考えられるクッパー細胞に着目しつつ検討を行うこととした。

2. 研究の目的

レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系によるインスリン抵抗性は主としてアンジオテンシン II により惹起されると考えられてきた。実際アンジオテンシン II 受容体阻害剤はマウスの脂肪肝を改善することも報告されている。しかしアルドステロンによるインスリン抵抗性の発現メカニズムには未知の部分が多く、特に肝臓における作用機転は明らかでない。そこで、本研究ではメタボリックシンドローム病態におけるアルドステロンの影響を明らかにするため、高脂肪果糖食負荷マウスの糖脂質代謝に対するアルドステロン受容体拮抗薬スピロラクソン (SP) 投与の改善効果とその機序を検討し

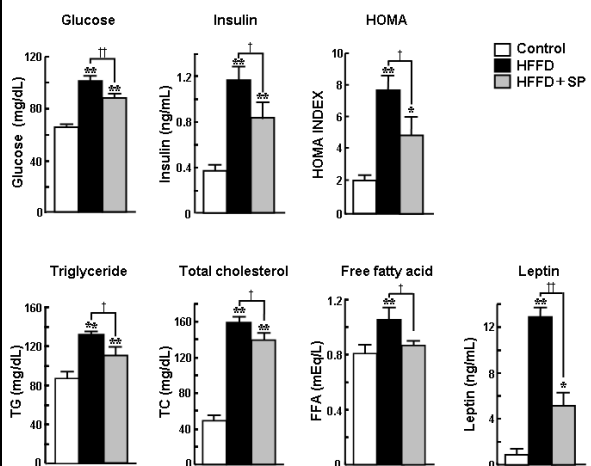
た。

3. 研究の方法

8 週齢の雄 C57BL/6J マウスを①通常食 (Control)、②通常食下 SP 投与群 (SP)、③60% 高脂肪食、30% 高フルクトース水負荷群 (HFFD)、④HFFD 下 SP 投与群 (HFFD+SP) の 4 群に分け、8 週間の食事負荷を行った。体重、摂食量、血圧は経時的に測定し、8 週後に表現系を比較検討した。血清生化学検査は ELISA 法にて測定した。耐糖能やインスリン感受性を解析する目的でグルコース、インスリン、ピルビン酸負荷試験を行った。肝組織は HE 染色と Oil red O 染色にて検討した。また、肝臓における糖代謝、脂質合成、炎症に関わる遺伝子の発現は Real-time PCR 法にて定量した。

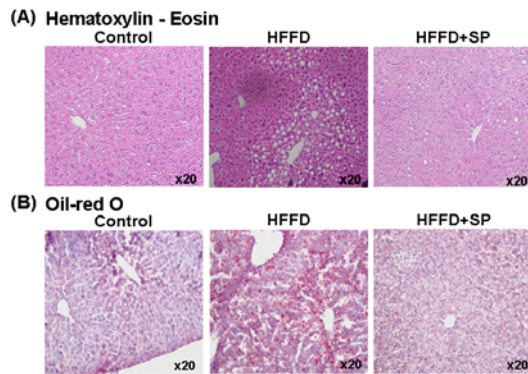
4. 研究成果

Control 群に比べ HFFD 群は高血圧、糖脂質代謝異常、脂肪肝を示し、メタボリックシンドロームの表現系を呈した。HFFD 群で認められた体重と精巣上体脂肪重量の増加は HFFD+SP 群では低下し、収縮期血圧も低下した。血清生化学検査では HFFD で認められた空腹時血糖、インスリン、HOMA-R の上昇と血清 TG、NEFA、コレステロール、レプチンの上昇も HFFD+SP 群では有意に低下した。



また、グルコース酸負荷試験とインスリン負荷試験で認められた耐糖能障害とインスリン抵抗性も改善し、ピルビン酸負荷試験において観察された糖新生の亢進も HFFD+SP 群では Control 群と同程度まで改善した。

肝組織の検討では、HFFD 群において認められた肝小葉中心性のトリグリセリドの顕著な蓄積は、HFFD+SP 群において効果的に改善された。



さらに HFFD 群では肝臓において顕著に上昇した炎症性サイトカイン (TNF α , MCP1)・糖新生酵素 (PEPCK)・脂質合成系転写因子及び酵素 (PGC1, ChREBP, SCD1) 等の mRNA の発現上昇が認められたが、これらは HFFD+SP 群で有意に抑制された。

これらの結果に対し、初代培養肝細胞および肝培養細胞株である HepG2 細胞にアルドステロンを直接作用させても明らかなインスリンシグナルの低下は認められず、SP の処置も影響が無かったことから、SP の主な標的細胞は肝細胞ではなく炎症性サイトカインを産生するクッパー細胞であると考えられた。

以上の結果から、SP は HFFD マウスの肝臓において炎症を抑制することで肝のインスリン抵抗性を改善し、耐糖能異常、高脂血症、脂肪肝を改善した。以上の結果から、SP は食事誘発性のメタボリックシンドローム病態を改善する効果的な薬剤となる可能性が示唆された。

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 2 件)

- 1) Wada T, Ohshima S, Fujisawa E, Koya D, Tsuneki H, Sasaoka T. Aldosterone inhibits insulin -induced glucose uptake by degradation of insulin receptor substrate (IRS) 1 and IRS2 via a reactive oxygen species-mediated pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology*, 150: 1662-9, 2009
- 2) Wada T, Kenmochi H, Miyashita Y, Sasaki M, Ojima M, Sasahara M, Koya D, Tsuneki H,

Sasaoka T. Spironolactone improves glucose and lipid metabolism by ameliorating hepatic steatosis and inflammation, and suppressing enhanced gluconeogenesis induced by high-fat and high-fructose diet. *Endocrinology*, 2010 *in press*

[学会発表] (計 4 件)

- 1) Wada T, Kenmochi H, Miyashita Y, Sasaki M, Tsuneki H, Sasahara M, Sasaoka T.: Spironolactone ameliorates glucose and lipid metabolism by suppressing enhanced gluconeogenesis and hepatic inflammation with fatty liver in mice with diet-induced metabolic syndrome. The 2nd International Aldosterone Forum in Japan, 2009, 5, 16-17, Tokyo.
- 2) Wada T, Kenmochi H, Miyashita Y, Sasaki M, Sasahara M, Tsuneki H, Sasaoka T.: Spironolactone improves glucose and lipid metabolism by ameliorating hepatic steatosis, inflammation, and suppressing enhanced gluconeogenesis induced by high-fat and high-fructose diet. 第 2 回 Insulin Resistance in Metabolic Disease Forum, 2009, 10, 31, Tokyo
- 3) 宮下佑介、和田努、剣持弘樹、佐々木元大、恒枝宏史、笹原正清、笹岡利安: 高脂質高フルクトース負荷マウスのメタボリックシンドローム病態に対する抗アルドステロン薬の改善効果. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010, 5, 27-29, 岡山 (予定)
- 4) Wada T, Miyashita Y, Sasaki M, Kenmochi H, Sasahara M, Tsuneki H, and Sasaoka T.: Spironolactone improves glucose and lipid metabolism and ameliorates hepatic steatosis induced by high-fat and

high-fructose diet. American Diabetes Association's 70th Scientific Sessions, 6, 25-29, 2010, Orlando, FL, USA (予定)

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 努 (WADA TSUTOMU)

富山大学・医学薬学研究部・助教

研究者番号: 00419334

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし