

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17517

研究課題名（和文）エリスロポエチンの非アルコール性脂肪性肝疾患の治療に対する有用性の検証

研究課題名（英文）Validation of the efficacy of erythropoietin for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease

研究代表者

都間 佑介（Tsuma, Yusuke）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・特任助教

研究者番号：60843290

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）への薬物療法は十分に確立していない。エリスロポエチン（EPO）は赤血球造血作用があり、腎性貧血などに対して用いられているが、様々なオフターゲット効果が報告されており、その一つに抗肥満・糖尿病作用がある。申請者は先行研究にてEPOがNAFLDでの脂質代謝改善を導くことを示したが、その機序は完全に解明できていない。本研究は褐色脂肪活性化がEPOのNAFLD改善作用を媒介すると仮説を立て検証を行ったが、既存の褐色脂肪活性化を導く薬剤2種類を用いた動物実験において、それらは肝臓炎症を改善せず、褐色脂肪はEPOのNAFLD改善を媒介しない可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

褐色脂肪の機能亢進/低下がNAFLDの病態の軽減/増悪に寄与する報告がある。申請者の先行研究（EPOのNAFLD改善作用）と、申請者らのグループの先行研究（EPOの褐色脂肪活性化作用）を踏まえてEPOのNAFLD改善に褐色脂肪が関与すると仮説を立て検証した。しかし、褐色脂肪活性化の作用がある既存の薬剤2種類は、肥満モデルマウスの肝臓炎症を改善しなかった。よって、EPOが直接的に肝臓に作用もしくは他臓器などを介して肝臓に作用し、NAFLD改善を導いた可能性が示唆される。EPOのNAFLDにおける臨床応用の観点において、EPOのNAFLDに対する作用機序の一つを証明した点で社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：There is no well-established drug treatment for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Erythropoietin (EPO), a glycoprotein that stimulates erythropoiesis in bone marrow, is widely used for treatment of renal anemia and anemia of prematurity. Recently, various off-target effects of EPO have been reported, including anti-obesity and anti-diabetes effects. In our previous study, we showed that EPO improves lipid metabolism in NAFLD, but the mechanism has not been fully elucidated.

In this study, we hypothesized that EPO's improvement of NAFLD is mediated by activating brown fat. However, in animal studies using two existing drugs that are known to activate brown fat, they did not reduce liver inflammation, suggesting that brown fat may not mediate the NAFLD improvement by EPO.

研究分野：小児内分泌

キーワード：エリスロポエチン 非アルコール性脂肪性肝疾患 肥満 褐色細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、食生活の欧米化や運動機会の減少により肥満は増加しており、それに伴い非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の有病率も増加傾向にある。NAFLD は進行すると非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) や肝細胞癌に至ることもあり、死亡率の増加や医療経済の圧迫といった様々な問題を生み出している。しかしながら、NAFLD の治療は食事療法と運動療法が基本となっており、有効な薬物療法は現時点では十分に確立されていない。

エリスロポエチン (EPO) は骨髄における赤血球造血を刺激するサイトカインであり、臨床的には腎性貧血や未熟児貧血の治療として用いられている。EPO は骨髄中の赤血球前駆細胞の EPO 受容体 (EPOR) に結合し赤血球造血を促進するが、EPOR は骨髄以外にも脂肪細胞、骨格筋細胞、肝細胞など全身の多くの細胞で発現していることが知られている。近年 EPO が EPOR/STAT 系を介した抗肥満効果や糖代謝改善効果を有することが報告されており、EPO の造血以外の作用が注目を集めている。EPO の代謝に与える影響として、視床下部に作用して食欲を低下させること (Teng R, *et al. Nat Commun.* 2(2011).520) や、白色脂肪組織での炎症を改善すること (Alnaeeli M, *et al. Diabetes.* 63(2014).2415-31)、肝臓に作用して糖新生を抑制すること (Hojman P, *et al. PLoS One.* 4(2009).e5894) などが報告されている。また、骨髄以外の組織で EPOR をノックアウトさせたマウスは著明な肥満、糖代謝異常を示す (Teng R, *et al. Nat Commun.* 2(2011).520) ことから、EPO/EPOR シグナルは哺乳動物の代謝内分泌作用において重要な調節系であると考えられている。これらの先行研究から、EPO/EPOR シグナルは肥満や耐糖能異常、インスリン抵抗性を示すメタボリックシンドロームや、メタボリックシンドロームの肝臓における表現型である NAFLD の形成に寄与していることが示唆される。

申請者らの研究チームは、EPO の抗肥満効果に着目して研究を続けている。幸道らは EPO が褐色脂肪組織において EPO/EPOR シグナルを介し、Janus Activating Kinase 2 (JAK2) からシグナル伝達兼転写活性化因子 3 (STAT3) のリン酸化を亢進させることで転写調節因子 PRD1-BF-RIZ1 homologous domain containing 16 (PRDM16) の発現を増加させ、褐色脂肪組織の熱産生を亢進させることを報告した (Kodo K, *et al. PLoS One.* 12(2017).e0173661)。

その研究方向性や方法論を引き継ぐ形で、申請者は EPO の NAFLD に対する治療効果について研究を開始した。高脂肪食負荷による肥満・NAFLD モデルマウスに EPO を投与したところ、肉眼的および組織学的な脂肪肝の改善、肝臓での脂質合成の抑制、内臓脂肪での脂質分解の増加を認め、肥満によってもたらされる肝臓・内臓脂肪での炎症性サイトカインの発現増加が EPO の投与により抑制されていた。EPO 投与マウスでは活動量に変化はみられなかったものの、酸素消費量は増加しており、これらのことから内臓脂肪で脂質分解が亢進した結果、血中に放出された遊離脂肪酸は肝臓で脂質合成に利用されず、EPO の効果で熱産生が亢進している褐色脂肪組織で燃焼されたと考えられた。脂質代謝において重要な役割を果たしている STAT3、STAT5 のリン酸化が EPO 投与マウスの肝臓や内臓脂肪で亢進しており、EPO は EPOR/STAT の経路を介して脂質代謝を改善させたと考えられた。インスリン抵抗性の増大に伴った内臓脂肪組織での脂質分解の低下と肝細胞での脂質合成の増加が NAFLD の病態の中心であるとされており (Paschos P, *et al. Hippokratia.* 13(2009).9-19)、EPO は脂質代謝を改善させることで NAFLD の治療効果を示したと考えられた。上記の内容をまとめて論文報告を行ったが (Tsuma Y, *et al. Biochem Biophys Res Commun.* 509(2019)306-13)、NAFLD の改善が EPO の直接的な効果か、それとも間接的な効果なのかなど詳細が不明であった。

2. 研究の目的

近年、褐色脂肪の機能亢進/低下が NAFLD 改善/悪化とリンクするエビデンスが集積しており (Desjardins EM, et al. Curr Diab Rep. 2018)、申請者の先行研究の結果と合わせて EPO による BAT 活性化が NAFLD 改善作用に重要な役割を果たしているとの仮説を立て検証を行うことにした。また EPO の BAT への直接的な作用を調査するため、EPO のマウス不死化褐色脂肪細胞株への影響を検証した。

EPO と同様に BAT 活性化をきたすことがわかっている薬剤 X と Y を肥満モデルマウスに投与し、NAFLD 改善に寄与するか検証することにした。薬剤 X・Y とともに申請者らの研究グループにおいて過去に検証を行い、BAT 機能を亢進 (熱産生に關与する β 3 アドレナリン受容体系のシグナル伝達を活性化) することが既に立証されている薬剤である。また EPO によるマウス不死化褐色脂肪細胞株の分化増殖への影響などの検証を行う。

3. 研究の方法

(1) 薬剤 X 投与による NAFLD への影響の検証:

4 週齢 C57BL/6 雄性マウスに高脂肪食 (60%fat kcal) を 8 週間与え肥満モデルマウスとした。高脂肪食を開始後 4 週の時点で、浸透圧ポンプを麻酔下にて植え込み、薬剤 X の持続投与を 4 週間行った。コントロール群には偽手術を行った。グルコース負荷試験 (GTT)、インスリン負荷試験 (ITT) による耐糖能とインスリン抵抗性の評価を行い、最終的に 12 週齢の時点で、マウスを安楽死させ、心臓採血と肝臓を含めた各種臓器の採取を行った。各種臓器は重量測定後に液体窒素にて凍結後 -80℃ に保管した。また各種臓器をホルマリン固定し H&E 染色を行った。後日、肝臓から RNA を抽出し cDNA 作成後に real time PCR 法にて炎症誘発性遺伝子 (F4/80、TNF α 、IL6、MCP 1、CCR 2、CD11c、Caspase1) の発現量を測定した。

(2) 薬剤 Y 投与による NAFLD への影響の検証:

4 週齢 C57BL/6 雄性マウスに高脂肪食 (60%fat kcal) を 8 週間与える群 (コントロール群) と、高脂肪食に薬剤 Y を混合し与える群に分けた。最終的に 12 週齢の時点で、マウスを安楽死させ、心臓採血と肝臓を含めた各種臓器の採取を行った。各種臓器は重量測定後に液体窒素にて凍結後 -80℃ に保管した。また各種臓器をホルマリン固定し H&E 染色を行った。後日、肝臓から RNA を抽出し cDNA 作成後に real time PCR 法にて炎症誘発性遺伝子 (F4/80、MCP 1、CCR 2、TNF α) の発現量を測定した。

(3) in vitro 実験にて EPO による褐色脂肪細胞への影響の検証:

分化成熟した褐色脂肪細胞をコントロール群、EPO 投与群に分け、薬剤投与後の EpoR 下流のシグナル伝達系の mRNA や蛋白の発現を比較する。RNA silencing により EpoR をノックダウンさせた褐色脂肪細胞を作成し、EPO 投与によるシグナル伝達の変化について、mRNA や蛋白の発現量を wild type と比較する。分化誘導の過程で EPO を添加し、前駆褐色脂肪細胞の増殖/分化への影響も検証する。

4. 研究成果

(1) 薬剤 X 投与による NAFLD への影響の検証:

薬剤 X は体重と食餌摂取量に影響を与えなかった。薬剤 X は、GTT における血糖値の低下と、ITT における血糖値の低下を導き、耐糖能とインスリン感受性を改善することが示唆された。薬剤 X は H&E 染色像にて、褐色脂肪組織の脂肪滴量を減少させ、褐色脂肪の Lipolysis を亢進させていることが示唆された。薬剤 X は肝臓における炎症誘発性遺伝子の発現量を有意に変化させなかった。以上より褐色脂肪組織の活性化は必ずしも NAFLD の病態改善に寄与しないことが示唆された。

(2) 薬剤 Y 投与による NAFLD への影響の検証:

薬剤 Y は食餌摂取量に影響しないが、コントロール群に比べて体重増加を有意に抑制した。薬剤 Y は内臓脂肪量を有意に低下した。薬剤 Y は肝臓重量に影響しなかった。肝臓の H&E 染色像にて薬剤 Y は脂肪滴量に変化をもたらさなかった。薬剤 Y は肝臓における炎症誘発性遺伝子の発現量に有意には影響しなかった。

(3) in vitro 実験にて EPO による褐色脂肪細胞への影響の検証:

前駆褐色脂肪細胞を分化成熟させた後に、特徴的な多房性の脂肪滴を有した細胞が観察でき

分な細胞量が得られたと考えられる。しかし蛋白抽出後の Western blot 法によって褐色脂肪特異的分子である Uncoupling protein1 の検出ができず、抽出過程に何らかの問題が存在する可能性が考えられ、現在原因を究明中である。

研究成果(1) (2)から、in vivo にて褐色脂肪組織の活性化は必ずしも NAFLD 改善に寄与しない可能性が示唆された。ただし、EPO と薬剤 X,Y による褐色脂肪組織活性化の機序が異なることに起因する可能性は除外できない。EPO 投与が褐色脂肪除去モデルマウスの肝臓へどのような影響を及ぼすかなど今後検証予定である。また、今回用いた高脂肪食では、肝臓への脂質負荷などが十分でなく NAFLD モデルというには不十分な可能性がある。今後、コリン欠乏高脂肪食飼料などの特殊食を与えた NAFLD モデルマウスでの検証を考慮している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------