

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22898

研究課題名（和文）マイオカインによる臓器相関に着目した新規NAFLD治療ターゲットの探索

研究課題名（英文）Exploration of novel NAFLD therapeutic targets focusing on myokine-induced organ crosstalk

研究代表者

今井 則博（Imai, Norihiro）

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：40877081

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：非アルコール性脂肪性肝疾患に対する有効な治療法の開発が急務である。本研究では新たにマイオカイン関連6因子(Angptl4, Bdnf, Cxcl1, Igf1, IL-6, Pgc1a)がマウスモデルにおける脂肪肝、インスリン抵抗性の増悪に関連していることを見出した。さらに培養細胞を用いた検討にてAngptl4、Cxcl1およびBdnfは肝細胞内のミトコンドリアの基礎呼吸酸素消費量および最大呼吸酸素消費量、ATP産生を調整していることを明らかとした。本研究結果により骨格筋より分泌されるマイオカインを主軸とした、脂肪肝、肥満に対する新たな治療ターゲットが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニアは加齢や病気により骨格筋量が減少した状態であり、末期肝硬変患者の約60%に認められる予後不良因子である。また近年の研究により非アルコール性脂肪性肝疾患の悪化リスク因子でもあることが明らかとなっている。さらに骨格筋はマイオカインと総称されるペプチドの分泌を通じて、肝臓を含む全身の代謝臓器との臓器間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たしている。本研究の目的は脂肪肝の発症過程において、その病態に関与するマイオカインの機能解明を通じて、脂肪肝、肥満に対する新たな治療ターゲットを探索することである。

研究成果の概要（英文）：There is an urgent need to develop effective therapies for non-alcoholic fatty liver disease. In this study, we found that six myokine-related factors (Angptl4, Bdnf, Cxcl1, Igf1, IL-6, and Pgc1a) were associated with fatty liver and exacerbated insulin resistance in a mouse model. Furthermore, in cultured cells, Angptl4, Cxcl1, and Bdnf were found to regulate basal and maximal respiratory oxygen consumption and ATP production of mitochondria in hepatocytes. The results of this study reveal a new therapeutic target for fatty liver and obesity based on myokines secreted from skeletal muscle.

研究分野：消化器内科学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患 マイオカイン ミトコンドリア代謝

## 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は慢性肝疾患の中で最も有病率が高く、先進国における人口の約 30% が罹患しているとされている。NAFLD は糖尿病・脂質異常・高血圧等の生活習慣病との合併が多く認められ、その一部が肝硬変・肝細胞癌に進行する非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) を発症する。NAFLD、NASH に対する有効な治療法は食事、運動療法以外にまだなく、その開発が急務である。一方、サルコペニアは加齢や病気により骨格筋量が減少した状態であり、末期肝硬変患者の約 60% に認められる予後不良因子である。また近年の研究により NAFLD の悪化リスク因子でもあることが明らかとなっている。さらに骨格筋はマイオカインと総称されるペプチドの分泌を通じて、肝臓を含む全身の代謝臓器との臓器間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たしている。近年、研究代表者はマウスモデルにおいて、骨格筋における脂肪酸の酸化が臓器を超えて脂肪肝、インスリン抵抗性、肥満の発症に関与していること、また骨格筋が代謝状態に応じて複数のマイオカインを分泌し肝臓からの VLDL (very low-density lipoprotein) 分泌を調節していることを明らかにした (Figure 1. The Liver Meeting 2018, 2019)。これらの知見は骨格筋の脂肪酸代謝が全身の糖代謝、脂質代謝において重要な役割を果たしていること、骨格筋がマイオカインを通じて過栄養時の脂肪肝、肥満の発症に寄与していることを示唆している。

## 2. 研究の目的

サルコペニアに代表される骨格筋の異常は、多くの病態とかがわっていることが明らかになっており、その背景として複数のマイオカインが全身の代謝調節因子として報告されている。しかし脂肪肝や肥満の発症に直接影響するマイオカインの報告は限られており、その病態意義ははまだ明らかではない。本研究の目的は脂肪肝の発症過程において、その病態に関与するマイオカインの機能解明を通じて、脂肪肝、肥満に対する新たな治療ターゲットを探索することである。

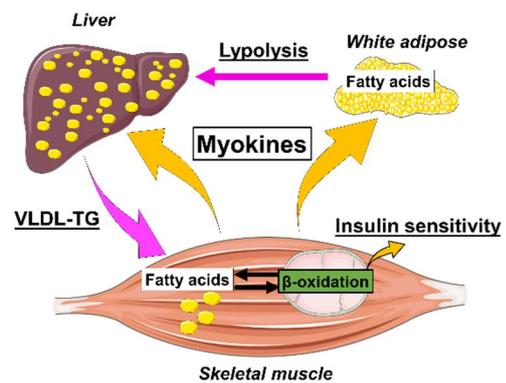


Figure 1.

## 3. 研究の方法

### (1) マウス脂肪肝研究における代謝閾値の同定および候補マイオカイン因子の同定

87 匹の C57BL/6J マウスに対し 60% 高脂肪食 (D12492: Research Diet) を用いて 12 週間の飼育を行った。体組成分析装置 (EchoMRI) を用いて脂肪量・除脂肪量を測定した。肝脂肪蓄積は病理での脂肪化と肝組織中の脂質の定量によって評価した。血漿中の脂質、グルコース、インスリン、肝酵素をそれぞれ評価した。肝組織・骨格筋における mRNA の発現量について qPCR を用いて解析した。

### (2) マイオカインによる肝細胞代謝の変化

(1) の結果、骨格筋内のマイオカインに関連する 6 因子 (Angptl4, Bdnf, Cxcl1, Igf1, IL-6, Pgc1a) が肥満、インスリン抵抗性、および脂肪肝の増悪に関与していることが同定された。しかしながらマイオカインがもたらす組織間の相互作用は不明な点が多く、また詳しい分子作用機序は不明であるため、上記の因子について、主に培養系を用いて肝細胞への影響を明らかにすることを目的とした。同定したマイオカインに関連する因子のうち肝細胞への影響が十分に解明されていない 4 因子 (Angptl4, Bdnf, Cxcl1, IL-6) について、肝細胞への影響を明らかにするため、培養肝細胞 Hepa1-6、および筋芽細胞 C2C12 を用いたコンディションメディウム実験系の確立・最適化を行った。esiRNA を用いて C2C12 細胞に対し標的マイオカインのノックダウンを行ったのちに筋管細胞への分化誘導を行いマイオカイン関連因子について筋管形成におよぼす影響を形態学的に評価した。さらにコンディションメディウム実験系を用いて、マイオカイン関連因子の肝細胞代謝への影響を Seahorse XFe24 Flux Analyzer (Agilent) を用いて評価した。

## 4. 研究成果

### (1) マウス脂肪肝研究における代謝閾値の同定および候補マイオカイン因子の同定

高脂肪食 12 週飼育後のマウス体重は 31.1g から 52.2g の広い範囲で正規分布を示した (mean ± SD; 42.3 ± 4.3g)。体組成における脂肪量と除脂肪量は共に体重に対し直線的な相関を示した一方、肝臓重量は体重に対して明確な二相性の線形相関を示した。41.6g の体重閾値以下では肝重量は体重に比較し平坦な線形相関を呈し (0.052 g 肝臓 / g 体重)、41.6g を超えると線形相関の傾きは 4.2 倍急峻となった (0.221 g 肝臓 / g 体重)。肝重量は肝組織中の中性脂肪量と病理上の脂肪化と強い正の線形相関を示し、41.6g の体重閾値は肝組織での 31% の脂肪肝に対応していた (Figure 2-A, B)。肝臓重量は体重や脂肪量と比較し、ALT (r = 0.53)、肝中性脂肪量 (r = 0.66)、および血漿インスリン値 (r = 0.71) との間で強い正の相関を示した (Figure 2-B)。また体重 41.6g は血漿中のコレステロール、遊離脂肪酸、グルコースの値、および肝臓内での脂肪酸と脂肪滴の代謝に関連する因子 (AOX, CD36, FATP1, CIDEA) の発現レベルにおいて有意な差を隔てる閾値であった。脂肪肝マウスモデルにおいて 31% の肝脂肪化が二つの異なる代謝状態を隔てる閾値であることを明らかにした。ヒトとは異なりこの閾値を超えるとマウスの

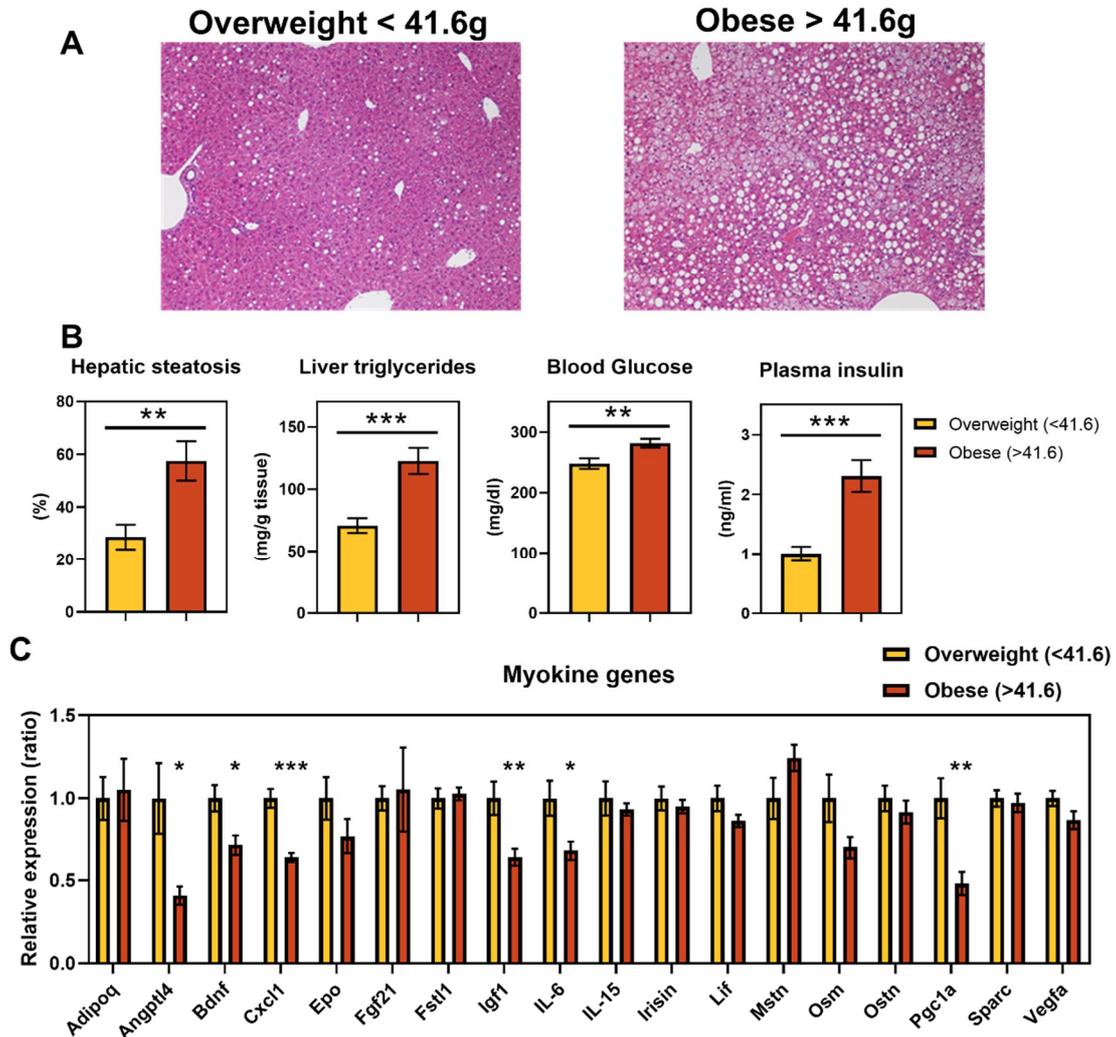


Figure 2.

肝脂肪蓄積は体脂肪量に強く依存するようになり代謝状態が直線的に悪化する。これらの知見によりマウスを用いた脂肪肝研究において細分化したデータの解釈が可能となると考えられる。

またこのカットオフを用いてマウスを過体重(overweight 41.6g 未満)、肥満(obese 41.6g 以上)の二群に大別し、その骨格筋におけるマイオカインの発現について qPCR を用いて解析を行い、新たにマイオカイン関連 6 因子(Angptl4, Bdnf, cxcl1, Igf1, IL-6, Pgc1a)がマウスモデルにおける脂肪肝、インスリン抵抗性の増悪に関連していることを見出した(Figure 2-C)。これらの知見は骨格筋が栄養状態に応じてマイオカインを分泌することで、肝臓および脂肪組織との臓器相関を調整し、脂肪肝の病態形成に関わっていることを示唆している。

## (2) マイオカインによる肝細胞代謝の変化

(1)の研究結果、60%高脂肪食マウス脂肪肝モデルにおいて骨格筋内のマイオカインに関連する因子が肥満、インスリン抵抗性、および脂肪肝の増悪に関与していることを個体レベルで明らかにしてきた。上記の因子について、主に培養系を用いて肝細胞への影響を明らかにすることを目的とした。同定したマイオカインに関連する因子のうち肝細胞への影響が十分に解明されていない 4 因子(Angptl4, Bdnf, Cxcl1, IL-6)について、肝細胞への影響を明らかにするため、培養肝細胞 Hepa1-6、および筋芽細胞 C2C12 を用いたコンディションメディウム実験系の確立・最適化を行った。esiRNA を用いて C2C12 細胞に対し標的マイオカインのノックダウンを行ったのちに、筋管細胞への分化誘導を行いマイオカイン 4 因子について筋管形成におよぼす影響を形態学的に評価した。さらにコンディションメディウム実験系を用いて、マイオカイン 4 因子の肝細胞代謝への影響を Seahorse XFe24 Flux Analyzer(Agilent)を用いて評価した。

マイオカイン 4 因子(Angptl4, Bdnf, Cxcl1, IL-6)のノックダウンは、それぞれコントロールと比較筋管細胞への分化誘導に明らかな差を認めなかったが、SeahorseXFe24 を用いた細胞外フラックス解析において Angptl4 および Cxcl1 をノックダウンした C2C12 筋管細胞の培養上清は培養肝細胞 Hepa1-6 のミトコンドリアの基礎呼吸酸素消費量および最大呼吸酸素消費量を有意に抑制していること、さらに肝細胞の ATP 産生を有意に抑制していることを明らかとした(Figure 3-A,B)。一方、Bdnf をノックダウンした C2C12 筋管細胞の培養上清は培養肝細胞 Hepa1-6 のミトコンドリアの最大呼吸酸素消費量を有意に亢進することが明らかとなった(Figure 3-A,B)。本研究結果により骨格筋より分泌されるマイオカインを主軸とした、脂肪肝、肥満に対する新たな治療ターゲットが明らかとなった。

<引用文献>

**Imai N**, Nicholls HT, Alves-Bezerra M, Li Y, Ivanova AA, Ortlund EA, Cohen DE. Up-regulation of thioesterase superfamily member 2 in skeletal muscle promotes hepatic steatosis and insulin resistance in mice. *Hepatology*. 2022 Jan;75(1):154-169. doi: 10.1002/hep.32122. Epub 2021 Dec 8. PMID: 34433228.

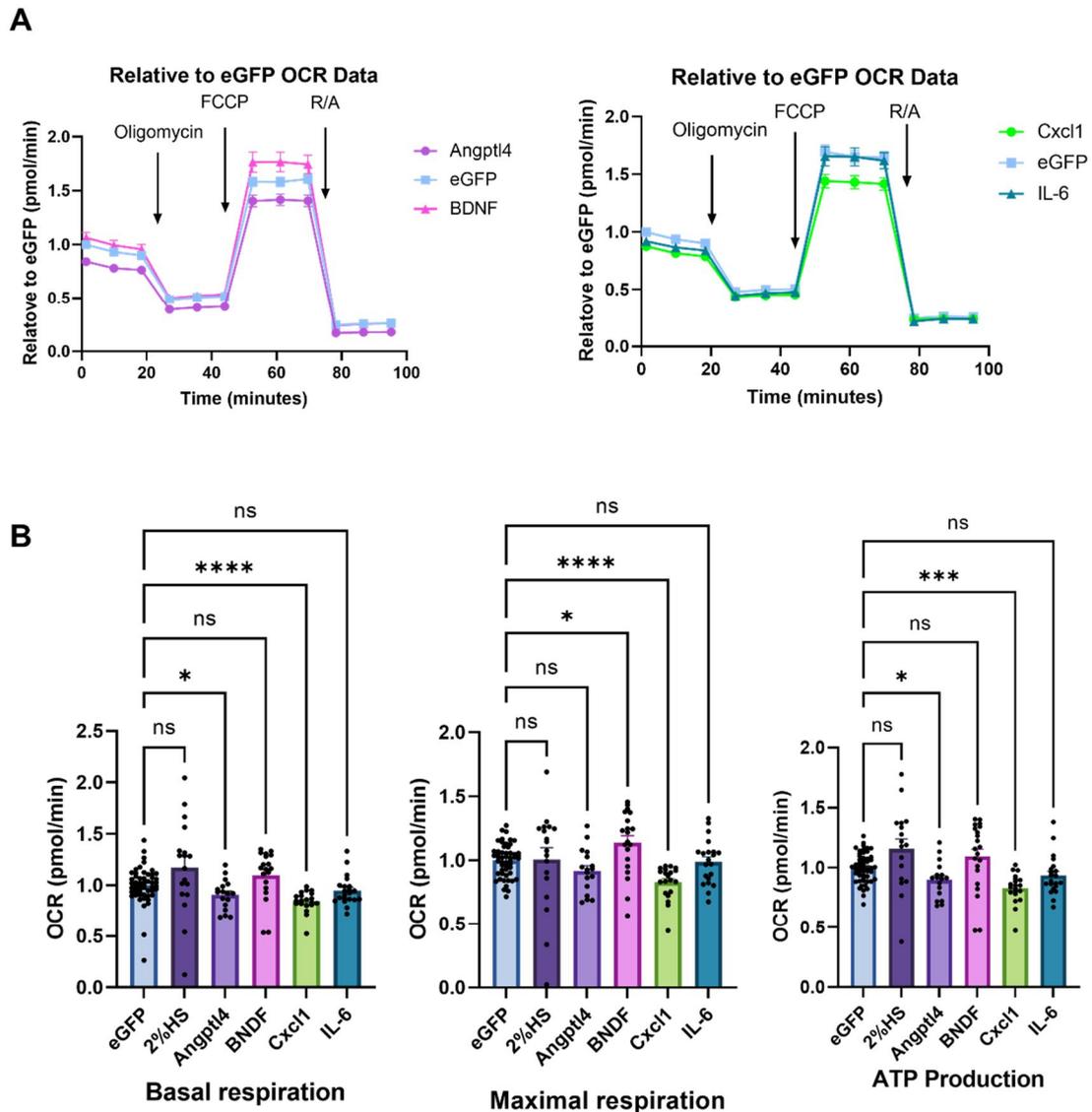


Figure 3.

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 Imai Norihiro, Nicholls Hayley T., Alves Bezerra Michele, Li Yingxia, Ivanova Anna A., Ortlund Eric A., Cohen David E.	4. 巻 75
2. 論文標題 Up regulation of thioesterase superfamily member 2 in skeletal muscle promotes hepatic steatosis and insulin resistance in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 154 ~ 169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep.32122	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Norihiro Imai
2. 発表標題 MODELING NAFLD IN HIGH FAT FED MICE: IDENTIFICATION OF A THRESHOLD VALUE FOR HEPATIC STEATOSIS AND METABOLIC DYSFUNCTION
3. 学会等名 The Liver Meeting 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井則博、David E. Cohen
2. 発表標題 マウス脂肪肝研究における代謝閾値の同定
3. 学会等名 第57回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

〔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
研究協力者	Cohen David  (Cohen David)	Brigham and Women's Hospital 1・Division of Gastroenterology, Hepatology & Endoscopy・Chief	

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