

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16342

研究課題名(和文) 脂肪肝改善の新規治療戦略(IGF-I が肝細胞に及ぼす影響について)

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategies for fatty liver improvement (IGF-I effects on hepatocytes).

研究代表者

福長 健作 (Fukunaga, Kensaku)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：70746932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：成人GH分泌不全症(AGHD)では脂肪肝から肝硬変に至る可能性がある。この病態でのIGF-I補充の有効性は不明で、今回研究した。HepG2ではIGF-I刺激でABCA1(TG合成と密接に関連)発現が増加し、PI3-K/Akt/FoxO1を介してABCA1転写活性を促進した。GH分泌不全マウスの肝脂肪化にIGF-I投与で肝ABCA1発現上昇、肝脂質蓄積減少、血清TG低下、HDL上昇を認めた。さらにFoxO1の検討では2-ME2やExendin4が発現制御に関与している可能性が示唆された。今回IGF-IがAGHDの脂肪肝に対する有効な治療戦略となる可能性を基礎実験を通して証明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AGHD患者に対するIGF-Iにおける意義や詳細なメカニズムは不明で、AGHDにおける脂肪肝形成のメカニズムにおけるIGF-Iの役割を明らかにし、AGHDで引き起こされる脂肪肝/NAFLD/NASHに対し、IGF-Iを補充することで脂肪肝が改善する機序の一つを解析できた学術的意義は大きい。またAGHDにおける脂肪肝改善の新規治療戦略として、IGF-IがABCA1発現促進により、脂肪肝を抑制する可能性があるという仮説を実証し、成長ホルモン分泌不全症での臨床的課題である脂肪肝に対する有効な治療戦略となる可能性について基礎実験を通して証明できた本研究成果の社会的意義は大変大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Adult GH deficiency of secretion (AGHD) can lead to fatty liver to cirrhosis. The efficacy of IGF-I supplementation in this condition is unknown, and the relationship between IGF-I and ABCA1 (closely related to TG synthesis) expression was investigated in the present study, suggesting that ABCA1 expression increases upon IGF-I stimulation in HepG2 and may promote ABCA1 transcriptional activity via PI3-K/Akt/FoxO1. IGF-I treatment of hepatic lipolipidaemia in a GH-secretory-deficient mouse model increased hepatic ABCA1 expression, decreased intracellular lipid accumulation, decreased serum TG and increased HDL. In FoxO1 studies, 2-ME2 promoted hepatic ABCA1 expression via the PI3K/Akt/FoxO1 pathway and decreased hepatic lipid content. The possibility that IGF-I could be an effective therapeutic strategy for fatty liver in AGHD was demonstrated in this study through basic experiments.

研究分野：内分泌代謝学分野

キーワード：成人成長ホルモン分泌不全症 成長ホルモン IGF-I 脂肪肝 ABCA1 FoxO1 NAFLD/NASH

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

AGHD 患者に対する GH 補充療法はこれまで必須ではなかったと考えられてきたが、GH は成人期においても種々の代謝調節や身体・精神機能の維持に重要な役割をもつことが明らかとなってきた(Eur J Endocrinol.2007)。GH 欠乏では内臓脂肪の増加、脂質代謝異常や脂肪肝が発症し、生命予後にも影響する。また脂肪肝のみならず、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)/NASH へと進行する。NASH は単純性脂肪肝に炎症や線維化が加わり、進行性で予後不良の疾患である。詳細な機序は不明だが、GH 及び IGF-I の欠乏により TG 合成促進と肝臓への TG 蓄積、それによる脂肪肝が形成され、酸化ストレス、炎症が引き金となって steatosis から steatohepatitis、NASH へ進展するとされている(Endocr J.2012)。臨床的にも AGHD における脂肪肝、NAFLD/NASH の合併頻度が高率であることが指摘されている。AGHD において NASH を合併し、6 ヶ月の GH 治療によって一部改善を認めた症例が報告されている(Gastroenterology.2007)が GH による脂肪肝の改善は部分的であり、そのメカニズムも不明である。一方、基礎研究では IGF-I 投与が GH 欠損マウスで脂肪肝の一部を改善することが報告されている(Biochem Biophys Res Commun.2012)が、これも詳細なメカニズムは不明である。そこで GH の応答ホルモンである IGF-I に着目し、AGHD における脂肪肝形成のメカニズムにおける IGF-I の役割を明らかにし、AGHD で引き起こされる脂肪肝/NAFLD/NASH に対して、IGF-I を補充することで脂肪肝が改善する機序を解析する。一方、脂肪肝に関連しては、臨床的に脂質代謝異常(低 HDL 血症、高 TG 血症)や脂肪肝を伴う疾患としてタンジール病がある。タンジール病はコレステロール逆転送系(HDL による末梢から肝臓へのコレステロール輸送)に重要な役割を果たす膜蛋白質である ABCA1(ATP-binding cassette transporter A1: 細胞内のコレステロールを HDL 粒子に転送する)の遺伝子異常によって発症する。ABCA1 が欠損することで肝細胞での TG 合成が増加し、TG が豊富な Large size VLDL が産生・分泌される。またリポ蛋白質リパーゼ活性の低下に伴い脂質分解の抑制による著明な高 TG 血症を発症すると報告されている。また肝臓での ABCA1 発現を抑制した肝特異的 ABCA1 欠損マウスでは血清 TG 濃度が 2 倍程度に上昇するとの報告(Lipid Res.2010)があり、ABCA1 は TG 産生に密接に関わっている。以上のことから、仮説として、IGF-I が脂肪肝を改善する機序として、TG 合成と密接な関係がある ABCA1 が関与していることを推定し、IGF-I が ABCA1 発現促進により、脂肪肝/NASH を抑制するという仮説として研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、AGHD において脂肪肝/NAFLD/NASH が発症するなかで、特に肝細胞において IGF-I が脂質代謝系へどのような影響を与えるのかを、ABCA1 遺伝子を中心に明らかにすることである。また AGHD で低値となる IGF-I を補充することによる脂肪肝改善のメカニズムとして ABCA1 以下のシグナル活性化を想定し、細胞内情報伝達系の網羅的解析など分子レベルで解明を検討する。

3. 研究の方法

In vitro experiment

IGF-I が ABCA1 発現に及ぼす影響について、特に細胞内情報伝達系に焦点を当てて検討した。ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞(American Type Culture Collection 社、細胞継代数 9 ~ 35)を用いた。細胞は 7 日毎にトリプシン処理し、DMEM(5.6 mmol/l グルコース、10%ウシ胎児血清、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを添加)を用いて培養した。80%のコンフルエントに達したら、細胞を 2 回洗浄し、0.5% ウシ胎児血清 DMEM 培地で 6 時間培養した。その後、さまざまな用量の IGF-1 (R&D Systems) で 24 時間処理した。western blot 法は、15 µg のタンパク質を 7.5% SDS-PAGE で分離し、免疫プロット法のためにポリフッ化ビニリデン膜に転写した。スキムミルクでブロッキングした後、抗 ABCA1 抗体(1:200、Santa Cruz)、抗 GAPDH 抗体(1:5,000、Biomol Research)、抗 IGF-1R 抗体(1:50、Santa Cruz)、phospho-specific FoxO1 ポリクローナル抗体(1:1,000、Cell Signaling Technology)、FoxO1 抗体(1:1,000、Cell Signaling Technology)でインキュベートした。抗原抗体複合体は ECL (GE Healthcare) で可視化した。Real time PCR は LightCycler (Bio-Rad) を用いて 20 µl の容量で行った。ABCA1 遺伝子の増幅に用いたフォワードプライマーおよびリバースプライマーの配列は、それぞれ 5'-TTGAACCTTCTGGCAAATG-3' および 5'-TGGGATGCCTTCAAAC-3' であった。GAPDH をハウスキーピングスタンダードとして用いた。PCR 法を用いて得られた ABCA1 プロモーターを含む構築物(pABCA1-LUC)と、FoxO 応答配列(FRS) (GGAAAACAAA)を変異させた変異体(pABCA1-mut-LUC)を用いた。精製した ABCA1 プロモータープラスミド(0.5 µg/ウェル)を、Lipofectamine (Life Technologies) を用いて HepG2 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞は、0.5 µg/ml の IGF-1 を含む培地で、LY294002 (LY; 10 µmol/l、PI3K)、SB203580 (SB; 1 µmol/l、p38-MAPK)、H-89 (1 µmol/l、PKA)、またはビスインドリルマレイミド I (1 µg/ml、PKC) で 30 分間処理され、シグナル伝達経路の

確認を行った。

PI3K/Akt 経路の役割を確認するために、HepG2 細胞を、ABCA1 プロモータープラスミド (0.5 μ g/ウェル) と、Akt の constitutively active form (Akt-CA) PI3K の p110 触媒サブユニット (P110) または Akt のドミナントネガティブ変異体 (K197M 変異を有する Akt ; Akt-DN) をコードする発現プラスミドを共導入した。また、ABCA1 の転写における FoxO1 の役割を調べるため、ABCA1 プロモータープラスミド (0.25 μ g/ウェル) を、FoxO1 を発現するベクター (0.1 μ g/ウェル) と共に HepG2 細胞にコトランスフェクションした。

クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイは、ChIP-ITTM キット (Active Motif) を用いて、手順書に従って行った。クロマチンは 2 μ g のウサギ FoxO1 抗体 (Cell Signaling Technology) または陰性コントロール IgG で免疫沈降させた。DNA は、プライマー (フォワード 5' - AATCTCCAAGGCAGTAGGTCG-3'、リバース 5' - GAATCTCCCTCAGGACGCCAA-3') を用いて、ヒト ABCA1 プロモーター上の推定 FRS を含む領域を増幅するために、PCR によって分析した。

コレステロール含量の測定には、Shahnaz ら (Ann Clin Biochem 35: 665-670, 1998) によって開発された方法を採用した。この方法は、コレステロールエステルを酵素的に加水分解して遊離コレステロールにし、指示基質の存在下で遊離コレステロールを酵素的に酸化して蛍光産物を生成する、細胞コレステロール測定のための蛍光測定法である。

In vivo experiment

8 週齢の雄マウス (C57BL/6J、クレアジャパン) を 3 群に分けた (各群 n = 5)

(a) コントロール [高脂肪食 (HFD): 脂肪 45%、蛋白質 20%、炭水化物 35%]

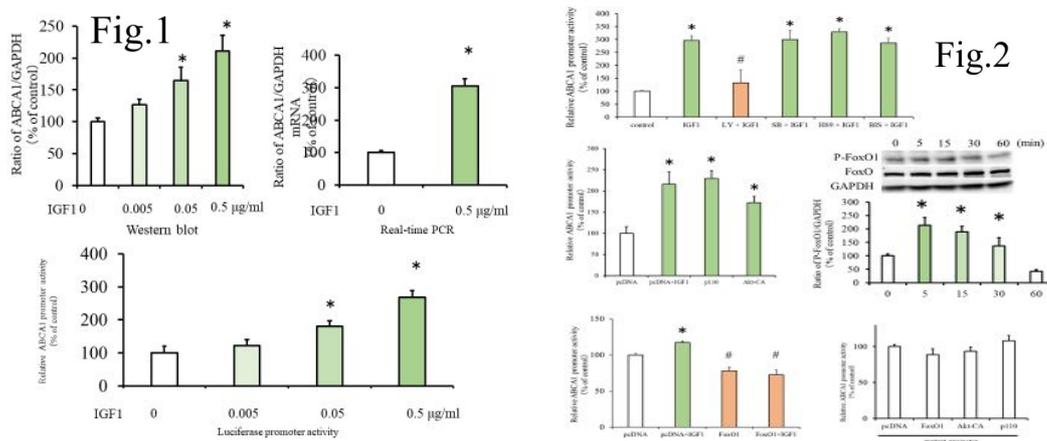
(b) HFD + ペグピソマント 10 mg/kg (PEG: 成長ホルモン受容体拮抗薬、ファイザー) 隔日投与

(c) HFD + PEG 隔日投与 + IGF1 (2.4 mg/kg) 連日投与。

PEG または IGF1 を 4 週間投与 (腹腔内注射) した後、生化学的分析、肝臓の組織学的分析、および肝臓における ABCA1 の発現解析を行った。さらに、マウス肝臓における IGF-1 受容体の発現を確認するために、普通食 (MF: 脂肪分 25%) または HFD を 4 週間与えたマウスを用いた。一次抗体として抗 IGF-1R 抗体 (1:50; Santa Cruz) を用いた。本実験で使用したプロトコルは、香川大学動物実験委員会により審査・承認された。

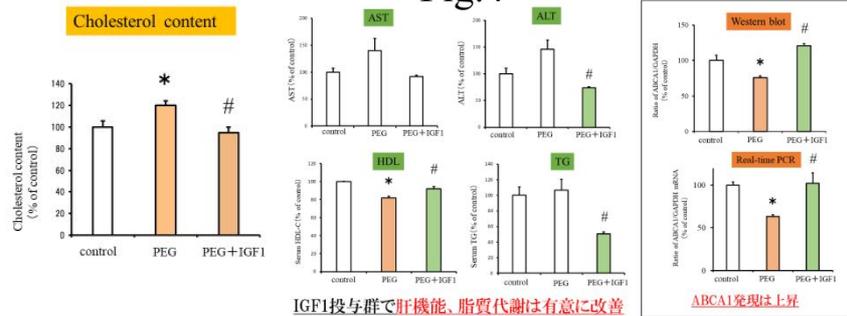
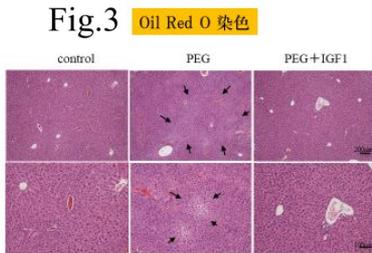
4. 研究成果

(1) 肝細胞における IGF-1 刺激に伴う ABCA1 蛋白、ABCA1 mRNA について western blot 法、real-time PCR での検討では ABCA1 発現が増加した (Fig.1)。(2) IGF-1 を HepG2 に加えて ABCA1 転写活性の変化を測定したところ、IGF-1 は ABCA1 転写活性を促進した。また細胞内情報伝達系について、各種の細胞内情報伝達系の阻害薬を使用し細胞内シグナル伝達経路を確認したところ、IGF-1 は PI3-K を介して ABCA1 発現を制御している可能性が示唆された (Fig.2)。また PI3K/Akt pathway のコンポーネント、p110、Akt constitutive active form を遺伝子導入すると ABCA1 転写活性は有意に上昇し、Akt-dominant negative form を導入すると、IGF-1 による ABCA1 転写活性は抑制された。また、Akt が FoxO1 をリン酸化し、FoxO1 を核内から細胞質内へ移行させることで不活性化させる (Genomics.1998) との報告から FoxO1 に着目したところ、PI3K/Akt pathway の下流である FoxO1 過剰発現細胞では ABCA1 発現は抑制されていた (Fig.2)。IGF-1 は ABCA1 遺伝子を抑制的に制御している FoxO1 をリン酸化することで、FoxO1 は核内から核外へ誘導することで ABCA1 の発現を制御している可能性が考えられた。(3) FoxO1 に対する siRNA 法による細胞内 knock down を行った細胞では、IGF-1 応答による ABCA1 発現誘導、Akt-CA、p110 の ABCA1 遺伝子転写活性化は消失した (Fig.2)。これらの結果より IGF-1 は PI3-K/Akt/FoxO1 を介して ABCA1 発現を制御している可能性が考えられた。(4) HepG2 における IGF-1 刺激時の細胞内コレステロール汲み出しについての検討では、IGF-1 は肝細胞で脂質蓄積を減少させ、この変化は PI3-K 経路の阻害剤により抑制された (Fig.3)。



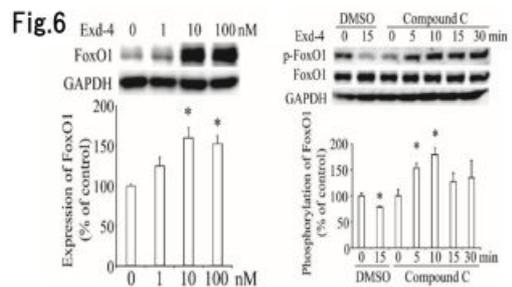
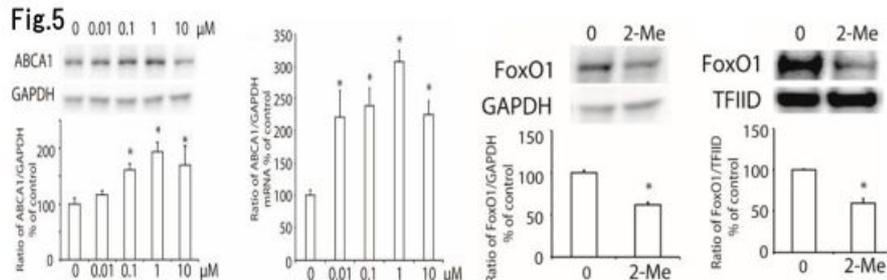
マウスにおいてペグピソマント (PEG: Growth Hormone 受容体拮抗剤) を皮下注射すると血中 IGF-1 濃度が用量依存的に抑制され、肝細胞組織においても IGF-1 濃度が低下する。PEG を使用

して肝臓での GH 欠乏状態を再現し、脂質代謝に与える影響、また GH 受容体拮抗剤投与時に IGF-I を投与することで起こる変化について、病態解析モデルとしてメカニズムを解析した。結果として、血清では IGF-I 投与群で有意に HDL の上昇、TG の低下を認めた。また IGF-I 投与群で肝臓での ABCA1 蛋白、mRNA 発現は上昇した(Fig.4)。また PEG 投与により脂肪肝となった肝細胞では IGF-I 受容体の発現が亢進し、肝臓の HE 染色では PEG により肝細胞の脂肪化が occur (成長ホルモン分泌不全症に伴う脂肪肝の再現)、その変化は IGF-I 投与群で改善し、細胞内脂質蓄積を減少させた(Fig.4)。これらの結果からは、IGF-I が ABCA1 の発現を促進し、血清 TG が低下し、脂肪肝が改善した可能性が示唆され、IGF-I が GH とは独立して 肝臓での脂質代謝に重要な役割を果たす可能性が高いことが示唆された。ABCA1 遺伝子を抑制的に制御している FoxO1 をリン酸化することで ABCA1 の発現を upregulate しているという点より、ABCA1 発現と FoxO1 には密接な関係性があると考えられた。これらの結果を受け、FoxO1 をリン酸化する chemical compound の検索として、より詳細に FoxO1 に関する様々な検討を行うため、さらなる解析を行った。



2-Methoxyestradiol (2-ME2:エストロジオールの代謝産物で脂肪肝からの保護作用が報告されている)が FoxO1 に関連するかについて研究を行ったところ、2-ME2 は肝細胞において PI3K/Akt/FoxO1 経路を介して ABCA1 発現を upregulate し、肝細胞の脂質含有量を減少させた (Fig.5)(Nutrients. 2022 Jan 11;14(2):288.).

これらの過程で、細胞の脂肪毒性に関する研究も平行して行い、Exendin-4 (GLP-1 受容体作動薬)が血管内皮細胞において AMPK/FoxO1 経路を介して HDL 受容体である hSR-BI/CLA-1 発現を増加させて eNOS を活性化することで血管内皮機能保護効果をもたらす可能性 (Fig.6)(Curr Issues Mol Biol. 2022 Nov 3;44(11):5474-5484.)や、膵 細胞において高血糖状態にて細胞内脂肪蓄積が生じ、K-877 (選択的 PPAR アゴニスト)が ABCA1 の発現を制御することにより細胞内脂肪蓄積を改善し、インスリン分泌に影響を及ぼす可能性についても報告した (Biomed J Sci & Tech Res. 2024 56(2):47904-13.).



このように、ABCA1 は様々な細胞における脂質流出において重要な制御因子であり、この調節には FoxO1 が密接に関与していることが明らかになった。今回の研究課題であった、AGHD における脂肪肝改善の新規治療戦略として検討を行った IGF-I での検討では、IGF-I が ABCA1 発現促進により、脂肪肝を抑制する可能性があるという仮説を実証し、成長ホルモン分泌不全症での臨床的課題である脂肪肝に対する有効な治療戦略となる可能性について基礎実験を通して証明できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Lyu Jingya, Imachi Hitomi, Fukunaga Kensaku, Sato Seisuke, Kobayashi Toshihiro, Saheki Takanobu, Japar Salimah, Iwama Hisakazu, Matsumura Yuta, Ozaki Miyo, Yoshimura Takafumi, Murao Koji	4. 巻 44
2. 論文標題 Exendin-4 Increases Scavenger Receptor Class BI Expression via Activation of AMPK/FoxO1 in Human Vascular Endothelial Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Issues in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 5474 ~ 5484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cimb44110370	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ibata Tomohiro, Lyu Jingya, Imachi Hitomi, Fukunaga Kensaku, Sato Seisuke, Kobayashi Toshihiro, Saheki Takanobu, Yoshimura Takafumi, Murao Koji	4. 巻 14
2. 論文標題 Effects of 2-Methoxyestradiol, a Main Metabolite of Estradiol on Hepatic ABCA1 Expression in HepG2 Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 288 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu14020288	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukunaga Kensaku	4. 巻 56
2. 論文標題 Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Modulator K-877 Stimulated the Expression of ABCA1 in Pancreatic Beta Cells in a Glucotoxic State	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biomedical Journal of Scientific & Technical Research	6. 最初と最後の頁 47904 ~ 47913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26717/BJSTR.2024.56.008829	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	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 福長健作
2. 発表標題 希少糖D-アルロースが糖代謝に与える影響と課題について
3. 学会等名 日本糖尿病学会中国四国地方会第60回総会 シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福長健作;井上侑香;高場萌;吉村崇史;佐伯岳信;佐伯直;小林俊博;井町仁美;村尾孝児
2. 発表標題 膵細胞においてペマフィブラートがABCA1発現、インスリン分泌に及ぼす影響について
3. 学会等名 第66回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐伯岳信;井上侑香;吉村崇史;佐伯直;小林俊博;福長健作;井町仁美;村尾孝児
2. 発表標題 GLP-1がHUVECにおけるSRB1/CLA1発現へ及ぼす影響について
3. 学会等名 第96回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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