

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19704

研究課題名(和文)オレキシンが奏でる中枢性代謝統合による非アルコール性脂肪肝炎と肝癌の撲滅

研究課題名(英文)The role of hypothalamic orexin system in prevention of non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in diet-induced obesity

研究代表者

恒枝 宏史(TSUNEKI, Hiroshi)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授

研究者番号：20332661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：肥満に伴う非アルコール性脂肪肝炎(NASH)/肝細胞癌の発症と中枢性代謝調節を担う視床下部オレキシン系の関連を検証した。高脂肪食負荷したオレキシン欠損マウスでは過度の肥満に加え、肝臓においてNASHや肝癌の発症を認めた。肥満病態ではオレキシンの補充によりNASH発症の起点となる肝臓の小胞体ストレスや慢性炎症が軽減された。このように、脳のオレキシン作用はNASHや肝細胞癌を防止するための重要な標的であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、オレキシンの中樞作用が肥満に伴うNASHや肝細胞癌の防止に必須の役割を果たすことを見出し、脳のオレキシン神経系がNASH治療法の開発分野における新規標的であるとの概念を提起した。また、高脂肪食負荷オレキシン欠損マウスは、現代人特有の脂質摂取過剰、運動不足、および自律神経障害の複合効果に起因するNASH/肝細胞癌の病態モデル動物として、今後の治療法開発に有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of hypothalamic orexin system regulating whole-body glucose and energy metabolism in prevention of obesity-induced development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Orexin knockout mice showed severe obesity and progression of NASH and hepatocellular carcinoma (HCC) during long-term exposure to high fat diet feeding. Supplementation of orexin A prevented the key process of NASH development (i.e., endoplasmic reticulum stress and chronic inflammation in the liver) under the diet-induced obese conditions. These results suggest that central orexin system is a crucial therapeutic target for preventing NASH and HCC. Thus, orexin knockout mice are considered to be a useful animal model for the research to establish novel drug therapy against NASH and HCC.

研究分野：糖尿病・内分泌代謝学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 肝細胞癌 肥満 視床下部 オレキシン

1. 研究開始当初の背景

肥満や2型糖尿病患者の世界的な増加を背景に、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の罹患率が増加の一途を辿っている。NAFLD の大部分は、肝細胞への脂肪沈着を特徴とする比較的良質な単純性脂肪肝 (NAFL) であるが、一部は肝障害、慢性炎症、肝細胞の風船様変性、肝線維化を伴う重篤な非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) へ進展する。さらに NASH は予後不良の疾患である肝細胞がん (HCC) や肝硬変のリスクを増大させる。しかし現在、NASH 治療薬は存在せず、治療介入法としては肥満を軽減するための運動療法と食事療法が主体となっている。治療法が見出されていない原因は、NASH の発症機序が不明であるため、またその機序を研究するための動物モデルが確立されていないためである。

NASH の発症機序として、現在までの知見を基に、インスリン抵抗性、肝脂質蓄積、小胞体ストレス、酸化ストレス、自律神経機能障害など、複数の要因が関与する Multiple-hits 仮説が提唱されている。しかし、これらの因子が複合的に悪影響を及ぼす NASH 発症機序を解明することは困難であり、全容解明には至っていない。しかも、ヒトの NASH 病態を的確に反映するモデル動物が未確立であり、肝代謝経路を直接的に変容させたマウスモデル等を用いて検討せざるを得ない状況が長く続いてきた。NAFLD が肥満や2型糖尿病に関連することに着目すると、Multi-hits 仮説に関わる因子を個別に変容させた動物モデルだけでなく、現代人特有の生活習慣を反映した病態モデルの作出が急務である。

近年、肥満やそれに伴う代謝異常を防止するために、脳 (特に視床下部) を介する代謝調節機構の重要性が明らかになってきた。例えば、視床下部メラノコルチン受容体系は摂食抑制に関与しており、その経路が破綻したマウスに高脂肪食を摂取させると、脂肪の過剰摂取に伴い NASH が誘発される。そのため、脂肪の過剰摂取の観点からの NASH 研究が現在活発に行われている。一方、NASH の原因となる現代人の生活様式には、「高脂肪食の摂取」以外にも、「体を動かさない生活様式」やストレス社会の影響による「自律神経バランスの乱れ」が挙げられる。しかも、本邦や欧米諸国ではこれら3要因の影響を同時に受ける環境が拡大している。しかし、これらの複合的な影響を解析するための動物モデルは確立されていなかった。

2. 研究の目的

我々はこれまで、視床下部オレキシン系が自発運動の促進、睡眠・覚醒リズムの維持、自律神経バランスの調節に加え、血糖恒常性やインスリン感受性の維持にも寄与する神経ペプチドであることを報告した。現代社会において、肝インスリン抵抗性を増加させる主な要因としては加齢、肥満、うつが挙げられるが、オレキシン欠損マウスはいずれの環境下でも過度のインスリン抵抗性を示した。その機序として、オレキシン欠損に伴い脳-肝連関を担う自律神経系調節が破綻し、肝臓の小胞体ストレスが増加して、インスリン抵抗性が生じることを報告した。また、高脂肪食を負荷するとオレキシン欠損マウスは過度の肥満を呈した。しかし、オレキシン欠損と NASH 発症との関連は今後の課題として残されていた。オレキシン欠損マウスに認められる自発運動の低下と自律神経の失調は、上述した現代人の生活様式「体を動かさない生活様式」と「自律神経バランスの乱れ」に対応する。したがって、オレキシン欠損マウスに高脂肪食を摂取させると、現代人の生活様式「高脂肪食の摂取」も含めた現代人特有の生活様式の3つの特徴を併せ持つ動物モデルとなると考えられた。しかも、オレキシン欠損マウスの高脂肪食摂取量は野生型マウスと差がないので、従来のメラノコルチン受容体系変異マウスのような過食モデルとは異なる。そのため、食事の量ではなく質の変化が解析可能になると考えられた。そこで本研究では、オレキシン欠損マウスに高脂肪食を長期間負荷し、NASH や肝細胞癌の進展防御におけるオレキシンの役割を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

オレキシン欠損マウスおよび野生型マウスに高脂肪食を長期間負荷し、食餌性肥満を誘発した。NASH 病態を評価するため、ヒト NASH 病理診断法 [NAFLD activity score (NAS) および Fibrosis stage 解析] に基づき肝臓の組織学的解析を行った。NASH 進展に関与する因子の状態を解析するため、肝臓や脂肪組織における遺伝子発現変化を RT-qPCR 法、タンパク発現変化を western blot 法で解析した。肝臓の小胞体ストレスを評価するためには、24 時間絶食したマウスに2時間再摂食させ、組織を採取した。オレキシンの急性作用を検証するためには、オレキシン A を脳室内に単回投与し、15-30 分後に組織を採取した。また、薬理遺伝学 (DREADD) 実験として Orexin-flippase マウスの視床下部内に AAV(9)-CMV-dFRT-hm3Dq-mCherry を発現させ、clozapine N-oxide (CNO, 1 mg/kg) を腹腔内投与し、30 分後に組織を採取した。オレキシンの長期的補充効果を検証するためには、高脂肪食を8週間負荷したオレキシン欠損または野生型マウスにオレキシン A を覚醒期初期 (zeitgeber time 14) に5日間脳室内投与した。さらに、内因性オレキシン作用を評価するため、オレキシン遺伝子ヘテロ欠損マウスとオレキシン遺伝

子ホモ欠損マウスに高脂肪食を負荷し、代謝表現型を比較した。

4. 研究成果

高脂肪食負荷したオレキシン欠損マウスの代謝表現型を野生型マウスと比較解析した。高脂肪食を短期間(4-8週間)負荷した場合、オレキシン欠損マウスは著明な体重増加、白色脂肪と肝重量の増加、インスリン抵抗性、肝臓における脂肪合成遺伝子の発現増加を認めた。この段階では、肝臓の炎症マーカー遺伝子の発現に変化を認めなかった。このように、高脂肪食負荷の初期段階では、オレキシン欠損マウスは過度の肥満を呈し、インスリン抵抗性が増加して単純性脂肪肝(NAFL)の状態となった。

オレキシン欠損マウスの摂食量やエネルギー消費量は野生型マウスと同等であり、自発運動量の低下が高脂肪食負荷オレキシン欠損マウスの肥満の主因であった。

高脂肪食を9週間負荷すると、オレキシン欠損マウスの肝臓では慢性炎症マーカーの発現量が増加し、高脂肪食を16週間負荷するとオレキシン欠損マウスの肝臓では著明な脂肪蓄積、線維化マーカーの遺伝子発現量の増加、およびNASスコアの増加を認めた。高脂肪食を24週間負荷すると、オレキシン欠損マウスの肝臓では病理組織解析にてNASスコアの増加と著明な線維化を認めた。高脂肪食を52週間負荷すると、さらに高度の肝線維化が認められただけでなく、肝癌が発生し、肝臓組織の非癌部においても肝癌マーカー遺伝子の発現増加を認めた。このように、長期間の高脂肪食負荷に伴い、オレキシン欠損マウスの肝臓ではNASHや肝癌の発症が誘発された。したがって、オレキシンの中枢作用はNASHや肝細胞癌の防御に必須の因子であることが示された。

そこで、オレキシンの中枢作用がNASH防止効果を発揮する機序について、NASHの主要因の一つである肝臓の小胞体ストレスを指標に解析した。視床下部オレキシン神経の薬理遺伝学的な活性化やオレキシンAの脳室内投与は急性的に肝臓内のmTORシグナルを活性化し、小胞体ストレス緩和機構(小胞体分子シャペロン機構)の誘導に関わるXbp1s mRNAの発現量を増加させた。高脂肪食負荷条件下でも、オレキシンAの脳室内投与は急性的に肝臓mTORシグナルを活性化し、オレキシンAの5日間連日投与は肝臓の慢性炎症マーカーの発現量を低下させた。mTOR阻害薬ラパマイシンを前処置すると、orexin A連日投与による肝臓の慢性炎症の改善効果が消失した。また、高脂肪食負荷オレキシン欠損マウスの脳室内にオレキシンAを5日間連日投与すると、肝臓の小胞体ストレスおよび慢性炎症のマーカー遺伝子の発現量が低下した一方、自律神経遮断薬ヘキサメトニウムを共処置するとオレキシンAによる改善効果は消失した。これらの結果から、オレキシンの中枢作用は自律神経を介して肝小胞体ストレス緩和機構であるmTOR-XBP1s経路を活性化し、過度の小胞体ストレスや慢性炎症を防止することが示された。

さらに長期的なオレキシン作用の意義を検証するため、高脂肪食を9週間負荷し、野生型、オレキシン遺伝子ヘテロ欠損、およびオレキシン遺伝子ホモ欠損マウスの代謝表現型を比較した。その結果、高脂肪食負荷オレキシン遺伝子ホモ欠損マウスで認められた重度の肥満、インスリン抵抗性、肝臓・白色脂肪組織重量の増加、および肝臓の炎症は、高脂肪食負荷オレキシン遺伝子ヘテロ欠損マウスではいずれも著明に低下した。野生型とオレキシン遺伝子ヘテロ欠損マウスにおいてはこれらの指標に差がなかった。したがって、比較的低濃度(ヘテロ欠損程度)の内因性オレキシンが、高脂肪食負荷条件下で過度の体重増加および肝臓の慢性炎症の増悪を防止することが示された。

以上の結果から、オレキシンの中枢作用は自発運動の促進を介して肥満を防止するとともに、自律神経系を介して脳肝連関を促進し、肝臓の小胞体ストレスを緩和することでNASHやHCCの発症を防止することが明らかになった。したがって、脳のオレキシン神経系は肥満・2型糖尿病に伴うNASHや肝細胞癌に対する予防や治療のための重要な標的であると考えられる。高脂肪食負荷オレキシン欠損マウスは、現代人特有の生活習慣である「脂質の過剰摂取」、「体を動かさない生活様式」、および「自律神経バランスの乱れ」の三要因を併せ持つモデルであり、これまで検証困難であった過食・運動不足・ストレス過多の複合効果で発症するNASH・肝細胞癌に対する効果的な治療法の開発に利用可能と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuneki H, Maeda T, Takata S, Sugiyama M, Otsuka K, Ishizuka H, Onogi Y, Tokai E, Koshida C, Kon K, Takasaki I, Hamashima T, Sasahara M, Rudich A, Koya D, Sakurai T, Yanagisawa M, Yamanaka A, Wada T, Sasaoka T.	4. 巻 41
2. 論文標題 Hypothalamic orexin prevents non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in obesity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111497 ~ 111497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111497	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 Tsuneki H, Sugiyama M, Ito T, Sato K, Matsuda H, Onishi K, Yubune K, Matsuoka Y, Nagai S, Yamagishi T, Maeda T, Honda K, Okekawa A, Watanabe S, Yaku K, Okuzaki D, Otsubo R, Nomoto M, Inokuchi K, Nakagawa T, Wada T, Yasui T, Sasaoka T.	4. 巻 4
2. 論文標題 Food odor perception promotes systemic lipid utilization.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 1514 ~ 1531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42255-022-00673-y	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10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山聖典, 恒枝宏史, 佐藤清史, 今 寛太, 和田 努, 笹岡利安.
2. 発表標題 オレキシン受容体拮抗薬レンボレキサントによる2型糖尿病マウスの睡眠障害と代謝障害の改善効果.
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田貴大, 恒枝宏史, 杉山聖典, 石塚日菜子, 高田慎治郎, 和田 努, 笹岡利安.
2. 発表標題 視床下部オレキシンの中枢作用は食餌性肥満に伴う非アルコール性脂肪肝炎および肝細胞癌進展を防御する.
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maeda T, Tsuneki H, Sugiyama M, Ishizuka H, Takata S, Wada T, Sasaoka T.
2. 発表標題 Hypothalamic orexin prevents the development of non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in mice fed high fat diet.
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田貴大, 恒枝宏史, 杉山聖典, 石塚日菜子, 高田慎治朗, 和田 努, 笹岡利安.
2. 発表標題 視床下部オレキシンの中枢作用を介した肝ERストレス適応調節による非アルコール性脂肪肝炎および肝細胞癌の進展防御機構.
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田貴大, 恒枝宏史, 杉山聖典, 石塚日菜子, 和田 努, 笹岡利安.
2. 発表標題 視床下部オレキシンの作用増強による中枢神経を介したNASH/HCC進展の防御機構.
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田貴大, 恒枝宏史, 杉山聖典, 石塚日菜子, 高田慎治朗, 和田 努, 笹岡利安.
2. 発表標題 視床下部オレキシンの活性化によるNASHおよびHCCの進展防御.
3. 学会等名 第95回日本糖尿病学会中部地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹岡利安, 前田貴大, 和田 努, 恒枝宏史.
2. 発表標題 視床下部神経ペプチドオレキシンの睡眠と覚醒の制御によるインスリン抵抗性と非アルコール性脂肪肝の改善.
3. 学会等名 第36回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湯舟香春, 恒枝宏史, 杉山聖典, 山岸永和, 大西兼悟, 和田 努, 笹岡利安.
2. 発表標題 嗅覚系を介した食前後の脂質利用の調節機構とその生理的意義の解明.
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第133回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山聖典, 恒枝宏史, 湯舟香春, 山岸永和, 永井真華, 佐藤清史, 松田樹大, 大西兼悟, 和田 努, 笹岡利安.
2. 発表標題 嗅覚系を起点とした中枢性脂質代謝調節による2型糖尿病の防止機構.
3. 学会等名 第32回分子糖尿病学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹岡利安, 前田貴大, 杉山聖典, 石塚日菜子, 和田 努, 恒枝宏史.
2. 発表標題 オレキシンの覚醒と活動性の中枢性調節による非アルコール性脂肪肝と肝癌の防御.
3. 学会等名 第40回日本内分泌代謝学サマーセミナー
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

富山大学 薬学部 病態制御薬理学研究室 研究紹介
<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/clinphar/index-j.html>

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
研究分担者	笹岡 利安 (SASAOKA Toshiyasu) (00272906)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授 (13201)	

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