

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790158

研究課題名(和文) 肝臓AhRによるエネルギー代謝調節機構

研究課題名(英文) The regulation of energy metabolism by hepatic AhR

研究代表者

和田 平 (Wada, Taira)

日本大学・薬学部・助教

研究者番号：20597398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ダイオキシン類の受容体であるAhRの糖・脂質代謝への関与が示唆されている。そこで、肝臓特異的AhR欠損(L-AhR KO)マウスを用いてエネルギー代謝におけるAhRの役割を解析した。L-AhR KOマウスは、インスリン感受性の増加を伴った体重量の減少を示した。また、その分子メカニズムとしてL-AhR KOマウスにおける血中レプチン量の増加による摂食シグナル抑制が示された。さらに、L-AhR KOマウスにおけるこれらの作用はレプチン欠損マウスにおいて消失した。これらの結果は、肝臓AhRが脂肪細胞由来ホルモンであるレプチンの発現制御を介してエネルギー代謝制御に関与していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Recent studies suggest that AhR, known as dioxin receptor, is associated with glucose and lipid metabolism. Therefore, in this study, we examined the role of AhR on energy metabolism in the liver specific knockout AhR (L-AhR KO) mice. AhR LKO mice resulted in the elevation of insulin sensitivity, leading to the decrease in the ratio of body weight gain. The reduction of food intake in AhR LKO mice resulted from the elevated serum leptin level and the increased leptin signaling in the hypothalamus. Deficiency of leptin abolished these effects in AhR LKO mice. Therefore, these results suggest that hepatic AhR is a novel factor in the regulation of energy metabolism through the modulation of leptin level.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境衛生学

キーワード：AhR メタボリックシンドローム レプチン

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドローム発症要因は食事由来の脂肪の過剰摂取をはじめとして多種多様であるが、環境汚染物質の長期曝露もそのひとつである。ベトナム退役軍人に関する疫学調査より、ダイオキシン類への曝露がメタボリックシンドローム発症のリスクファクターであることが示され、事実、ダイオキシン曝露者は健康人と比較して血糖値が1.4倍、糖尿病発症率は2.3倍、さらには血中インスリン値においては3.4倍の高値を示し、ダイオキシン類曝露によるインスリン抵抗性の誘発が疫学的に示されている (Henriksen et al. 1997)。ダイオキシン類対策特別措置法後、環境中のダイオキシン類濃度に関して、大幅な改善が見られ大気中に含まれるダイオキシン濃度は環境基準下にまで減少するに至った。しかしながら、水質ならびに底質において未だに基準値を超過する河川および海域が報告されており、今後もダイオキシン濃度の動向に注意深い監視が必要である。細胞内においてダイオキシン類はAryl hydrocarbon receptor (AhR) と呼ばれる特異的な受容体と結合する。AhR ノックアウト(KO)マウスはダイオキシン類が示す毒性の、全てではないにしろほとんどにおいて耐性を示すことから、AhRはダイオキシン類が示す毒性の発現に深く関与していると考えられる。研究代表者は以前にAhRが脂肪細胞分化を抑制することを明らかにした (Shimba, Wada, et al. 2001)。さらにTCDD曝露により誘発される脂肪肝は、脂肪酸トランスporter CD36を直接制御して脂質の取り込み促進により関与していることも明らかにしたLee, Wada, et al. 2010)。また、肝臓において糖新生並びに脂肪酸代謝に関与する遺伝子の発現量がTCDD曝露により制御を受けることが報告されている (Sato et al. 2008)。興味深いことにグルコースや変性LDLがAhRのアクチベーターとして作用することが報告され、またAhRと相互作用するタンパク質ARNTを肝臓特異的に欠損したマウスでは糖・脂質代謝に関する遺伝子発現の増加が観察される (Wang et al. 2009)。

2. 研究の目的

本研究は、ダイオキシン類の受容体として知られている Aryl hydrocarbon receptor (AhR) による肝臓での糖・脂質代謝調節機構を明らかにすることで、未だ不明な点が多いダイオキシン類のダイオキシン類の毒性発現メカニズムを明らかにするとともに環境汚染物質曝露によるメタボリックシンドローム発症メカニズムの解明を目指すものである。

3. 研究の方法

動物実験は日本大学薬学部実験動物倫理規定に基づき行った。また、マウスは1ケージあたり4-5匹に分配し、温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 10\%$ 、明暗12時間周期の条件で飼育した。マウス飼料は、通常食には

固形 NMF を用い、高脂肪食には High fat diet 32 を用いて自由摂取とした。肝臓特異的 AhR 欠損(L-AhR KO)マウスは AhR^{fllox} マウスおよび肝臓特異的 Cre 発現マウスとの交配により作製した。血液生化学的検査は常法に従い測定を行った。また、視床下部におけるレプチンシグナル活性については、STAT3 のリン酸化を指標にウエスタンブロット法を用いて行った。

3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化誘導は、細胞をコンフルエントになるまで培養し、デキサメタゾンおよびイソブチルメチルキサンチンを添加して行った。さらに、mRNA 遺伝子発現量については、脂肪細胞より Total RNA を抽出して逆転写反応により cDNA を作成し、RT-qPCR 法により測定を行った。

4. 研究成果

肝臓特異的 AhR 欠損(L-AhR KO)マウスは、摂食量の低下ならびに体重増加率の減少を示した。また、エネルギー消費量の増加(酸素消費量および二酸化炭素排出量の増加)ならびに熱産生の増加を示した。さらに、その分子メカニズムとして血中レプチン量の増加(図1)に伴い、良好な耐糖能およびインスリン感受性の亢進が示された。

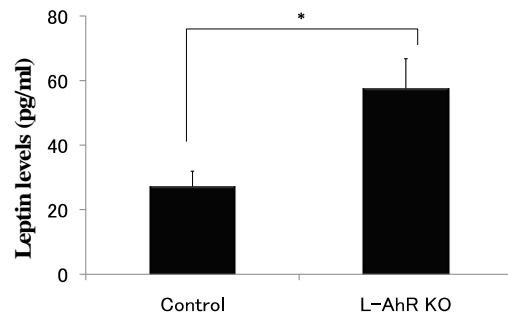


図1. 血漿中レプチン濃度

以上をふまえ、本研究は、肝臓 AhR の全身エネルギー代謝制御メカニズムを L-AhR KO マウスを用いて検討をした。

L-AhR KO マウスにおける脂肪組織由来ホルモンであるレプチン量の増加は、肝臓 AhR 遺伝子による肝臓/脂肪組織間クロストーク制御の可能性を示唆している。そこで、肝臓 AhR に制御を受ける液性因子が脂肪細胞でのレプチン発現制御を行っているか否かを検討した。L-AhR KO マウスの血清を 3T3-L1 脂肪細胞に処理したところ、コントロールマウス由来の血清を処理した 3T3-L1 脂肪細胞と比較してレプチン mRNA 発現増加が示された。このことより、肝臓 AhR は液性因子を介して脂肪細胞におけるレプチン発現量を調節する新たな分子制御メカニズムの存在が示唆された。

レプチンは視床下部においてレプチン受

容体に結合し、その下流に存在する STAT3 活性（リン酸化）を介して摂食に関連する神経ペプチドを制御している。そこで、L-AhR KO マウスに摂食量の減少は、血中レプチン量の増加に伴った視床下部でのレプチンシグナルの増強作用であるか否かを STAT3 ウエスタンブロット法により検討した。その結果、L-AhR KO マウスの視床下部における STAT3 のリン酸化（活性化）は、コントロールマウスのそれに比較して有意な増強を示した。すなわち、L-AhR KO マウスの視床下部におけるレプチンシグナル活性が増強されていることが明らかになった。

次いで、L-AhR KO マウスにおいて観察された体重増加の抑制（図 2）摂食量の減少、エネルギー消費量の増加、良好な耐糖能、インスリン感受性の亢進（図 3）は、増加した血中レプチン量の増加に依存していると考え、レプチンを欠く Ob/Ob マウスを用いて解析を行った。

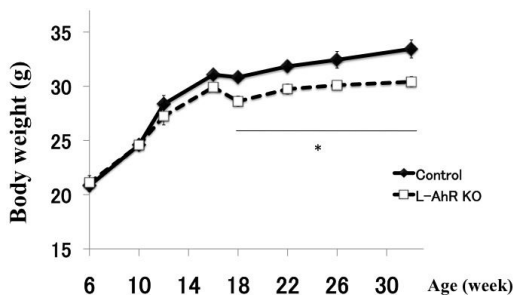


図2. 体重の変化

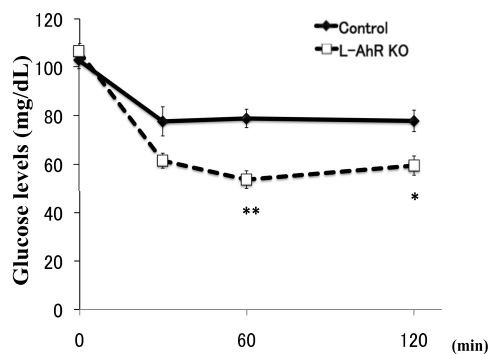


図3.インスリン感受性試験

まず初めに、L-AhR KO マウスを Ob/Ob マウスと交配させることによりレプチン作用が消失した L-AhR KO マウスを作製した。そこで、Ob/Ob L-AhR KO マウスにおける体重増加率（図 4）および摂食量を検討したところ、Ob/Ob コントロールマウスとの間に違いは認められなかった。また、グルコース負荷試験およびインスリン負荷試験により、Ob/Ob L-AhR KO マウスにおける耐糖能ならびにインスリン感受性（図 5）を検討したところ、Ob/Ob Control マウスのそれらとの間に差異

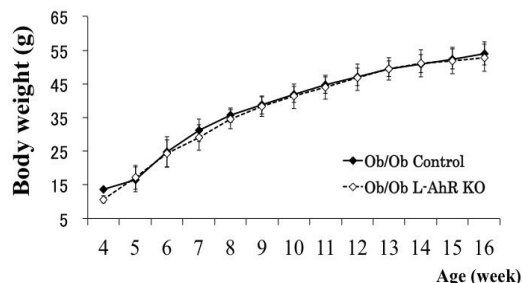


図 4. Ob/Ob L-AhR KOマウスの体重変化

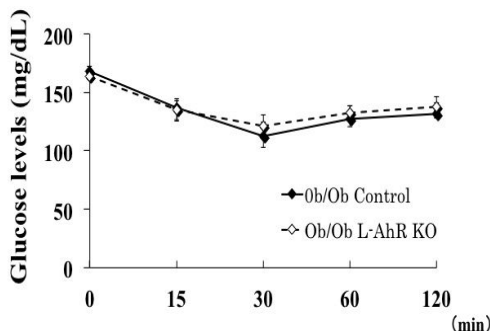


図 5. Ob/Ob L-AhR KOマウスのインスリン感受性

は認められなかった。さらに、脂肪組織重量、血中インスリンならびにアディポネクチン量においても両群間に有意な違いは認められなかった。すなわち、L-AhR KO マウスにおけるエネルギー代謝の亢進はレプチン作用を介していることが明らかとなった。また、高脂肪食飼育した L-AhR KO マウスの体重量および血中レプチン量においてコントロールマウスとの間に違いは認められなかった。このことは、肝臓 AhR に制御を受ける液性因子は食餌に由来する可能性が示唆された。現在、その詳細な解析を行っている。

以上の結果から、肝臓 AhR は液性因子を介して脂肪細胞のレプチン発現制御により、摂食機能を調節するとともに、インスリン感受性などの全身性のエネルギー代謝制御に関与していることを明らかにした。本研究は、今後増加することが懸念されるメタボリックシンドロームやその構成要因である肥満、糖尿病、高脂血症などの発症メカニズムに新たな概念を導入するのみならず、新規治療薬（AhR アンタゴニスト）の開発の基盤を提示するものである。

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4件)

1. Wada, T., Sunaga, H., Ohkawara, R., and Shimba, S. Aryl hydrocarbon receptor modulates NADPH oxidase activity via

- direct transcriptional regulation of p40phox expression. *Mol Pharmacol.* 査読有 Vol.83 (2013), 1133-1140
2. Swanson, H.I., **Wada, T.**, Xie, W., Renga, B., Zampella, A., Distrutti, E., Fiorucci, S., Kong, B., Thomas, A.M., Guo, G.L., Narayanan, R., Yepuru, M., Dalton, J.T., and Chiang JY. Role of nuclear receptors in lipid dysfunction and obesity-related diseases. *Drug Metab. Dispos.* 査読有 Vol.41 (2013), 1-11
 3. 時計遺伝子による代謝調節とメタボリックシンドローム **和田平**、**榛葉繁紀** 肥満研究(日本肥満学会)査読有 Vol.18 (2012), 21-26
 4. Estrogen sulfotransferase inhibits adipocyte differentiation. **Wada, T.**, Ihunnah, C.A., Gao, J., Chai, X., Zeng, S., Philips, B.J., Rubin, J.P., Marra, K.G., and Xie, W. *Mol. Endocrinol.* 査読有 Vol. 25(2011), 1612-1623
- 〔学会発表〕(計 18 件)
1. 吉田賢心、**和田平**、**榛葉繁紀**「時計遺伝子 BMAL1 による胆汁酸の代謝及び排泄機構の調節」(第 12 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2013 2013 年 9 月 14 日 東京)
 2. 宮田和希、**篠塚達也**、**内山由貴**、**和田平**、**榛葉繁紀**「SOCS3 を介した Aryl hydrocarbon receptor(AhR) による肝脂肪毒性の制御」(第 18 回アディポサイエンス研究会 2013 年 8 月 24 日 大阪)
 3. 大友麻衣子、石井孝幸、**和田平**、**榛葉繁紀**「脂肪細胞の分子時計システムによる血中有利脂肪酸量の制御」(第 18 回アディポサイエンス研究会 2013 年 8 月 24 日 大阪)
 4. 石井孝幸、大友麻衣子、**和田平**、**榛葉繁紀**「脂肪細胞の分子時計システムによる摂食ならびに耐糖能の制御」(第 18 回アディポサイエンス研究会 2013 年 8 月 24 日 大阪)
 5. **和田平**、戸田知里、**榛葉繁紀**「時計遺伝子 BMAL1 による肝インスリンシグナル伝達経路の調節」(第 133 回日本薬学会 2013 年 3 月 30 日 神奈川)
 6. **和田平**、**内山由貴**、**白崎春野**、**須永洋**、**榛葉繁紀**「肝臓特異的 AhR 欠損マウスの高脂肪食誘導による脂肪肝発症メカニズム」(第 7 回炎症・脂質代謝・メタボリサーチフォーラム 2013 年 2 月 9 日 東京)
 7. 鈴木英美、市橋裕也、**和田平**、**榛葉繁紀**「骨格筋特異的に概日リズムを欠損させたマウスにおける筋組織タイプとエネルギー代謝の変化」(第 17 回アディポサイエンス研究会 2012 年 8 月 25 日 大阪)
 8. **篠塚達也**、**内山由貴**、**須永洋**、**和田平**、**榛葉繁紀**「肝 Aryl hydrocarbon receptor (AhR) によるエネルギー代謝の臓器間クロストーク制御」(第 17 回アディポサイエンス研究会 2012 年 8 月 25 日 大阪)
 9. **和田平**、戸田知里、**榛葉繁紀**「時計遺伝子 BMAL1 による Akt を中心とした肝シグナル伝達の調節」(第 17 回アディポサイエンス研究会 2012 年 8 月 25 日 大阪)
 10. **和田平**、**内山由貴**、**白崎春野**、**須永洋**、**榛葉繁紀**「脂肪肝の発症過程における AhR の役割」(第 132 回日本薬学会 2012 年 3 月 29 日 北海道)
 11. **和田平**、**須永洋**、**内山由貴**、**榛葉繁紀**「レプチンの分泌を促し抗肥満作用を有する肝由来液性因子の存在」(第 132 回日本薬学会 2012 年 3 月 29 日 北海道)
 12. **和田平**、**内山由貴**、**白崎春野**、**須永洋**、**榛葉繁紀**「肝臓特異的 AhR 欠損マウスの高脂肪食誘導による脂肪肝発症メカニズム」(第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 15 日 神奈川)
 13. **和田平**、**内山由貴**、**白崎春野**、**須永洋**、**榛葉繁紀**「肝臓特異的 AhR 欠損マウスの高脂肪食誘導による脂肪肝発症メカニズム」(第 22 回日本レチノイド研究会学術集会 2011 年 11 月 12 日 東京)
 14. **和田平**、**大川原礼子**、**榛葉繁紀**「NADPH オキシダーゼ p40phox サブユニットの転写制御における Aryl hydrocarbon receptor の関与」(フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー 2011 年 10 月 27 日 金沢)
 15. 原田綾香、**和田平**、**榛葉繁紀**「高塩分食負荷における臓器特異的な生化学的変化と摂食調節」(第 16 回アディポサイエンス研究会 2011 年 8 月 20 日 大阪)
 16. 狩野理奈、**和田平**、**榛葉繁紀**「脂肪組織における Aryl hydrocarbon receptor」(第 16 回アディポサイエンス研究会 2011 年 8 月 20 日 大阪)
 17. **和田平**、**内山由貴**、**須永洋**、**榛葉繁紀**「肝 Aryl hydrocarbon receptor(AhR) によるエネルギー代謝の臓器間クロストーク制御」(第 16 回アディポサイエンス研究会 2011 年 8 月 20 日 大阪)
 18. 狩野理奈、**和田平**、**榛葉繁紀**「The role of aryl hydrocarbon receptor(AhR) in the adipose tissue」(シンポジウム 褐色脂肪研究の新展開 2011 年 6 月 19 日 北海道)
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://www.pha.nihon-u.ac.jp/eisei.html>

(1)研究代表者

和田 平 (Wada Taira)

日本大学・薬学部・助教

研究者番号：20597398