

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590979

研究課題名(和文)新規アディポカインBAFFが非アルコール性脂肪性肝疾患の病態に及ぼす影響

研究課題名(英文)Role of B cell activating factor in the pathogenesis of NAFLD

研究代表者

阿部 雅則 (ABE, MASANORI)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40432786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアディポカインであるB細胞活性化因子(BAFF)の脂肪性肝疾患への病態への役割について内臓脂肪組織と肝臓を中心に解析を行った。酸化ストレスにより脂肪細胞に誘導されるBAFFは内臓脂肪組織においてインスリン抵抗性を増悪させた。一方、BAFFは肝細胞の脂質代謝を調整して肝脂肪化を抑制することが明らかとなった。これらの結果から、脂肪性肝疾患の病態におけるBAFFの役割は内臓脂肪組織と肝臓で異なっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the role of B cell activating factor (BAFF), which is one of the adipokines, in the pathogenesis of fatty liver diseases, especially in visceral adipose tissue and liver. We found that oxidative stress induced BAFF expression in adipocytes, and BAFF led to impaired insulin sensitivity in visceral adipose tissue. On the other hand, BAFF had a protective role in hepatic steatosis by regulating lipid metabolism in the liver. These data indicate that the role of BAFF in the liver may differ from that in visceral adipose tissue in the pathogenesis of fatty liver diseases.

研究分野：肝臓病学

キーワード：アディポカイン 脂肪肝 インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

生活習慣の変化により肥満者が増加し、糖尿病、脂質異常症、高血圧症、糖尿病などの生活習慣病の罹患率が急増している。内臓脂肪型肥満はインスリン抵抗性を基盤としてメタボリック症候群を引き起こし、心血管疾患の主要な発症・増悪の原因の一つとなっており、内臓脂肪型肥満とインスリン抵抗性の原因の解明と、それに立脚した予防法や治療法の確立が求められている。

B cell activating factor (BAFF)はB細胞の生存、分化や活性化に関与するサイトカインである。現在までに様々な自己免疫性疾患患者およびモデルマウスを用いた研究が精力的に行われてきた。申請者は、肥満およびインスリン抵抗性の誘導に関与するBAFFの役割について以下のことを明らかにしてきた。高脂肪食事誘導性肥満マウスでは血清BAFF濃度が高値である。肥満マウスでのBAFFの発現は、他の臓器・器官に比べて内臓脂肪組織で高い。内臓脂肪組織では、浸潤細胞のみならず脂肪細胞自身がBAFFを産生している。マウスにBAFFを投与すると耐糖能異常が誘発される。しかし、脂肪細胞にBAFF産生を誘導する因子は明らかになっていない。また、BAFFがインスリン抵抗性を誘導する機序は不明である。そこで、本研究では、最初にBAFFの糖質・脂質代謝等への影響についての基礎研究を行うことを計画した。

2. 研究の目的

申請者らが同定したアディポカインであるBAFFの代謝系に対する影響の基礎的検討を行うとともに、内臓脂肪組織から門脈を介して血流を受ける肝臓に着目し、BAFFの非アルコール性脂肪性肝疾患の発症・進展における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞にBAFF発現を誘導する因子の同定

マウス培養脂肪細胞である3T3-L1細胞およびC3H/10T1/2clone8細胞において、サイトカイン(TNF- α 、IFN- γ など)、TLRリガンド(LPSなど)、酸化ストレス(H₂O₂)などの刺激を加え、脂肪細胞におけるBAFFの発現をreal-time RT-PCRで解析した。また、一部の実験では抗酸化剤であるN-acetyl-cysteine(NAC)を添加し、BAFFの発現の変化を解析した。

高脂肪食をC57BL/6マウスに8~12週間与えて作成した肥満マウスと標準食を与えたコントロールマウスを用い、酸化ストレスの指標であるmalondialdehyde(MDA)濃度とBAFF濃度との関連を解析した。

肥満マウス、コントロールマウスおよびNACを内服した肥満マウスの内臓脂肪組織、肝臓、筋肉における8-OHdG陽性細胞数を免疫染色で観察した。また、各臓器・組織にお

けるBAFF発現をreal-time RT-PCRで解析した。

(2) BAFFが脂肪細胞のアディポカイン産生および糖質・脂質代謝に与える影響の解析

マウスの臓器・組織におけるBAFF受容体(BAFF-R)の発現をreal-time RT-PCR、western blot、免疫染色で解析した。また、3T3-L1細胞におけるBAFF-Rの発現も同様に解析した。

3T3-L1細胞にrecombinant BAFFを添加し、アディポカイン・サイトカインの発現をreal-time RT-PCRで解析するとともに、培養上清中の濃度をELISAで測定した。

C57BL/6マウスにrecombinant BAFFまたはPBSを投与し、内臓脂肪組織におけるアディポカイン・サイトカインの発現をreal-time RT-PCRで解析した。

3T3-L1細胞を用いてglucose uptake assayを行いBAFF添加によるグルコースの取り込みに与える変化を解析した。また、BAFF添加後のインスリン受容体基質(IRS)のリン酸化の変化を観察した。

(3) BAFF-R欠損マウスにおける免疫および代謝への影響の解析

BAFF-R欠損マウスおよび対照であるC57BL/6マウス(コントロールマウス)に高脂肪食を摂取させた。

空腹時血糖値、インスリン値を測定するとともに、糖負荷試験、インスリン負荷試験による耐糖能とインスリン感受性の評価を行った。

内臓脂肪組織中に浸潤する炎症細胞の評価をフローサイトメトリーで行った。また、内臓脂肪組織におけるマクロファージマーカーの発現をreal-time RT-PCRで解析した。

血清ALT値を測定するとともに、肝脂肪蓄積を組織学的に評価し、肝内の中性脂肪、コレステロール含有量を解析した。

肝臓における脂質代謝(取り込み、合成、酸化、VLDL排泄)や炎症に関連する遺伝子発現をreal-time RT-PCR、western blotで解析した。

(4) 肝細胞の脂肪化に対するBAFFの影響の解析

マウス肝臓、初代培養肝細胞、高分化肝細胞株であるHepa1-6を用いてBAFF-Rの発現をreal-time RT-PCR、western blotで解析した。

Hepa1-6細胞にBAFFを添加した後、核内蛋白を抽出し、NF- κ B発現を解析した。

Hepa1-6細胞にBAFFを添加し、脂肪合成に関する遺伝子発現の変化をreal-time RT-PCRで解析した。

Hepa1-6細胞にオレイン酸を負荷して脂肪化を誘導した。この系にBAFFを添加して肝細胞内の中性脂肪量の変化を定量的に評価した。

4. 研究成果

(1) 脂肪細胞に BAFF 発現を誘導する因子の同定

3T3-L1 脂肪細胞に各種刺激を与えたところ、 H_2O_2 添加のみで BAFF 発現が濃度依存的に増加した。同様の変化は他の培養脂肪細胞である C3H/10T1/2clone8 細胞でも観察された。 H_2O_2 によりみられた BAFF 発現増加は NAC 添加により抑制された。

肥満マウスでは血清 BAFF 濃度が増加した。血清 BAFF 濃度は体重との相関はみられなかったが、MDA 濃度と正の相関がみられた。

肥満マウスの内臓脂肪組織では 8-OHdG 陽性細胞比率がコントロールマウスに比し増加していた。また、肥満マウスの内臓脂肪組織での BAFF 発現は NAC 内服によりコントロールマウスと同程度となった。

(2) BAFF が脂肪細胞のアディポカイン産生および糖質・脂質代謝に与える影響の解析

肥満マウスでは内臓脂肪組織と肝臓に BAFF-R が高発現していた。また、3T3-L1 細胞には BAFF-R の発現がみられた。

3T3-L1 細胞に BAFF を添加すると MCP-1, IL-6, レジスチンの発現が増加した。この変化は BAFF-R Fc により BAFF と BAFF-R の結合を阻害すると観察されなくなった。

BAFF を投与したマウスの内臓脂肪組織では、PBS 投与マウスの内臓脂肪組織に比し MCP-1, TNF- α , レジスチンの発現増加、アディポネクチンの発現低下がみられた。

3T3-L1 細胞に BAFF を添加するとグルコースの取り込みは阻害され、BAFF-R Fc を添加すると改善した。また、BAFF により IRS-1 のセリンリン酸化が誘導され、チロシンリン酸化が阻害された。BAFF-R Fc の添加により IRS-1 のチロシンリン酸化は改善した。

(3) BAFF-R 欠損マウスにおける免疫および代謝への影響の解析

高脂肪食摂取 BAFF-R 欠損マウスでは、コントロールマウスに比し空腹時血糖が低かった。また、高脂肪食摂取 BAFF-R 欠損マウスでは糖負荷試験による血糖値上昇が低下し、インスリン負荷試験による血糖低下率が増加した。

高脂肪食摂取 BAFF-R 欠損マウスの内臓脂肪組織ではコントロールマウスに比し浸潤するマクロファージが減少しており、とくに CD11(+) の M1 マクロファージの減少が著明であった。また、内臓脂肪組織における F4/80, CD11b, CD11c, TNF α の発現は高脂肪食摂取 BAFF-R 欠損マウスでコントロールマウスに比し低下していた。

高脂肪食摂取 BAFF-R 欠損マウスでは、コントロールマウスに比し血清 ALT 値が有意に上昇していた。両群のマウスで肝組織の炎症所見には差がなかったが、BAFF-R 欠損マウスではコントロールマウスと比べて脂肪沈

着の増悪がみられ、肝内の中性脂肪含有量が有意に増加していた。

高脂肪食摂取 BAFF-R 欠損マウスの肝臓では FAS, ACC などの脂肪合成系の遺伝子発現の増加がみられた。一方、脂肪取り込みや酸化、VLDL 排泄、炎症に関する遺伝子発現は両群で同程度であった。

(4) 肝細胞の脂肪化に対する BAFF の影響の解析

マウス肝臓、初代培養肝細胞、Hepa1-6 細胞では BAFF-R の発現がみられた。

Hepa1-6 細胞に BAFF を添加すると、NF- κ B p52 と Relb の発現誘導が増加した。

Hepa1-6 細胞に BAFF を添加すると脂肪合成に関与する遺伝子 (FAS, AC, SCD-1) の発現が低下した。この発現低下は BAFF-R Fc により BAFF と BAFF-R の結合を阻害すると回復した。

Hepa1-6 細胞へのオレイン酸負荷による中性脂肪蓄積は BAFF の添加により低下した。

以上から、アディポカイン BAFF は内臓脂肪組織において肥満に伴う酸化ストレスにより誘導され、脂肪組織に発現する BAFF-R に結合し、MCP-1, TNF- α , レジスチンなどのアディポカイン・サイトカインの誘導と、IRS リン酸化阻害によるグルコース取り込み低下を介してインスリン抵抗性を増悪させることが明らかとなった。高脂肪食摂取 BAFF-R 欠損マウスにおけるインスリン抵抗性の改善は内臓脂肪での炎症の軽減が関与していると考えられた。

一方、当初の予想に反して、高脂肪食摂取 BAFF-R 欠損マウスでは内因性の脂肪合成増加による脂肪肝の増悪がみられた。In vitro の解析から、BAFF は肝細胞の BAFF-R を介して脂肪合成を抑制していると考えられ、肥満状態では BAFF は内臓脂肪組織と肝臓で異なる役割を果たしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Chen S, Akbar SMF, Miyake T, Abe M, Al-Mahtab M, Furukawa S, Matsuura B, Hiasa Y, Onji M. Diminished immune response to vaccinations in a murine model of obesity: Role of myeloid-derived suppressor cells. *Obes Res Clin Pract.* 9: 35-44, 2015. [査読有] DOI: 10.1016/j.orcp.2013.12.006.

Abe M, Miyake T, Kuno A, Imai Y, Sawai Y, Hino K, Hara Y, Hige S, Sakamoto M, Yamada G, Kage M, Korenaga M, Hiasa Y, Mizokami M, Narimatsu H. Association between *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2 binding protein and the fibrosis stage of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 2014 Oct 18 [Epub ahead of print] [査読有] DOI:10.1007/s00535-014-1007-2.

Yamazaki T, Mori M, Arai S, Tateishi R, Abe M, Ban M, Nishijima A, Maeda M, Asano T, Kai T, Izumino K, Takahashi J, Aoyama K, Harada S, Takebayashi T, Gunji T, Ohnishi S, Seto S, Yoshida Y, Hiasa Y, Koike K, Yamamura K, Inoue K, Miyazaki M. Circulating AIM as an indicator of liver damage and hepatocellular carcinoma in humans. PLoS One. 9: e109123, 2014. [査読有] DOI: 10.1371/journal.pone.0109123.

Koizumi M, Hiasa Y, Kumagi T, Yamanishi H, Azemoto N, Kobata T, Matsuura B, Abe M, Onji M. Increased B cell-activating factor promotes tumor invasion and metastasis in human pancreatic cancer. PLoS One. 8, e71367, 2013. [査読有]

DOI: 10.1371/journal.pone.0071367.

Mori K, Yamanishi H, Ikeda Y, Kumagi T, Hiasa Y, Matsuura B, Abe M, Onji M. Oral administration of carbonic anhydrase I ameliorate murine experimental colitis induced by Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells. J Leukoc Biol. 93: 963-972, 2013. [査読有]

DOI: 10.1189/jlb.1212612.

Miyake T, Abe M, Tokumoto Y, Hirooka M, Furukawa S, Kumagi T, Hamada M, Kawasaki K, Tada F, Ueda T, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M. B cell-activating factor is associated with the histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. Hepatol Int. 7: 539-547, 2013. [査読有]

DOI: 10.1007/s12072-012-9345-8

Tada F, Abe M, Kawasaki K, Miyake T, Chen S, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M. B cell activating factor in obesity is regulated by oxidative stress in adipocytes. J Clin Biochem Nutr. 52: 120-127, 2013. [査読有]

DOI: 10.3164/jcfn.12-115.

Kasawaki K, Abe M, Tada F, Tokumoto Y, Chen S, Miyake T, Furukawa S, Matsuura B, Hiasa Y, Onji M. Blockade of B cell-activating factor signaling enhances hepatic steatosis induced by a high-fat diet and improves insulin sensitivity. Lab Invest. 93: 311-321, 2013. [査読有]

DOI: 10.1038/labinvest.2012.176.

[学会発表](計 9 件)

川崎敬太郎、阿部雅則、多田藤政、三宅映己、徳本良雄、松浦文三、日浅陽一。NAFLDの病態におけるB細胞活性化因子(BAFF)の糖代謝への影響。第1回肝臓と糖尿病・代謝研究会(2014.7.4 東京大学伊藤国際学術研究センター伊藤謝恩ホール・東京)

阿部雅則、陳式儀、姚立穎、三宅映己、川崎敬太郎、多田藤政、徳本良雄、松浦文三、日浅陽一、恩地森一。非アルコール性脂肪性肝疾患の病態における骨髄由来抑制細胞の役割。第50回日本消化器免疫学会総会(2013.8.1 東京都新宿区ホテルグランドヒ

ル市ヶ谷・東京)

川崎敬太郎、阿部雅則、徳本良雄、多田藤政、三宅映己、松浦文三、日浅陽一、恩地森一。非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の肝脂肪化におけるB細胞活性化因子(BAFF)の役割。第49回日本肝臓学会総会(2013.6.6 京王プラザホテル・東京)

川崎敬太郎、阿部雅則、三宅映己、多田藤政、徳本良雄、松浦文三、恩地森一。インスリン抵抗性および肝脂肪化におけるB細胞活性化因子(BAFF)の役割。第56回日本糖尿病学会年次学術集会(2013.5.16 ホテル日航熊本・熊本)

川崎敬太郎、阿部雅則、多田藤政、三宅映己、日浅陽一、松浦文三、恩地森一。肥満におけるB細胞活性化因子(BAFF)の肝脂肪化に対する役割。第50回日本臨床分子医学学会学術集会(2013.4.12 東京国際フォーラム・東京)

多田藤政、川崎敬太郎、阿部雅則、三宅映己、日浅陽一、松浦文三、恩地森一。NAFLDにおける内臓脂肪組織の酸化ストレスとB細胞活性化因子(BAFF)との関連。第99回日本消化器病学会総会(2013.3.21 城山観光ホテル・鹿児島)

Abe M, Miyake T, Tokumoto Y, Kawasaki K, Tada F, Hamada M, Furukawa S, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M. B cell activating factor (BAFF) is associated with the histologically severity of non-alcoholic fatty liver diseases. The 3rd Asian-Pacific Topic Conference (2012.11.3 芝パークホテル・東京)

阿部雅則、陳式儀、恩地森一。非アルコール性脂肪性肝疾患からの肝発癌における骨髄由来抑制細胞の役割。第16回日本肝臓学会大会(2012.10.11 神戸国際展示場他・神戸)

徳本良雄、三宅映己、阿部雅則、多田藤政、川崎敬太郎、濱田麻穂、日浅陽一、松浦文三、恩地森一。非アルコール性脂肪性肝疾患におけるB cell activating factor (BAFF)の意義。第48回日本肝臓学会総会(2012.6.7 石川県立音楽堂・金沢)

[図書](計 2 件)

阿部雅則、濱田麻穂、恩地森一。肥満と消化器疾患 内臓脂肪組織におけるB細胞活性化因子(BAFF)の役割。消化器内科。54: 645-649, 2012.

阿部雅則、恩地森一。生活習慣と消化器疾患・治療薬 内臓肥満。MEDICINAL. 2: 93-102, 2012.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等： なし

6．研究組織

(1)研究代表者

阿部 雅則 (Abe, Masanori)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40432786