

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870343

研究課題名(和文) 脂質バイオロジーから見るナトリウム利尿ペプチドのNASH抑制効果の検討

研究課題名(英文) Inhibitory effect of natriuretic peptides on the onset of NASH from a viewpoint of lipid biology

研究代表者

園山 拓洋 (Sonoyama, Takuhiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70582112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスを用いた検討、培養細胞を用いた検討により、ナトリウム利尿ペプチドは肝臓に直接作用し、脂肪酸合成関連遺伝子発現の低下、脂肪酸酸化関連遺伝子発現の上昇を介して肝臓における脂肪蓄積に対して抑制的に作用する可能性が示された。また、ナトリウム利尿ペプチドは脂肪酸合成とは独立してマウス肝臓の膜リン脂質に影響する可能性が示唆された。これらの検討により、ナトリウム利尿ペプチドが非アルコール性脂肪肝炎の形成におけるfirst hit、second hitをとともに阻害する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Natriuretic peptides were shown to directly act on hepatocytes and to reduce hepatocellular lipid accumulation by downregulating the expression of genes associated with fatty acid synthesis and upregulating the expression of genes associated with fatty acid oxidation, from our in vivo and in vitro experiments. Moreover, it was suggested that natriuretic peptides might affect the fatty acid composition of membrane phospholipid independently of the effect on fatty acid synthesis or oxidation.

These data taken together suggest that natriuretic peptides have an inhibitory effect on both the first hit and the second hit during the onset of non-alcoholic steatohepatitis.

研究分野：内分泌・代謝

キーワード：ナトリウム利尿ペプチド 非アルコール性脂肪肝炎 脂肪肝 質量分析

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝(Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)は、メタボリックシンドロームの肝臓における表現型であり、過剰蓄積した脂質が脂肪毒性を呈して肝臓におけるインスリン抵抗性の原因となっている。NAFLDの一部は非アルコール性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis; NASH)に移行するが、NASHは肝硬変や肝細胞癌の発症につながるため、その治療や発症予防は極めて重要である。NASHの成立機序としては、肝細胞への脂肪蓄積(first hit)に続き、各種ストレスに伴う肝細胞障害、炎症(second hit)が必要であるとする two hit theory が主流である。NASHの成立における second hit の要因として、ミトコンドリア機能障害による Reactive oxygen species(ROS)の産生過剰による酸化ストレスの亢進が重要と考えられている。ROSによるNASHの成立に関しては細胞膜リン脂質側鎖脂肪酸の過酸化による過酸化脂質の生成、及びそれに引き続く脂質過酸化の連鎖反応による細胞膜障害が重要な役割を果たしていると考えられる。

近年、質量分析をはじめとする脂質メタボミクス分析技術の発展により、脂質、特に脂肪酸の質の変化が疾病の成立、進展に重要な役割を果たしていることが知られるようになってきており、細胞膜を形成するリン脂質の脂肪酸組成も多様性を示すことが報告されている。ROSによる過酸化反応は、二重結合を持つ不飽和脂肪酸、特に多価不飽和脂肪酸が最も過酸化反応を受けやすいことが知られているように、脂肪酸の種類による差異がみられる。したがって、NAFLDのNASHへの進展に関しても膜リン脂質の脂肪酸組成の変化が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)は主としてそれぞれ心房、心室において産生、分泌される

心血管ホルモンである。疫学調査にてナトリウム利尿ペプチドと肥満、メタボリックシンドロームとの関連が示唆されているが、我々はBNP過剰発現トランスジェニックマウスを用いて、BNPが高脂肪食負荷による肝臓の脂肪蓄積に対して抑制的に作用することを既に示している。また、我々は、四塩化炭素投与による肝線維化モデルにおいて、BNPが肝線維化に対しても抑制的に作用することを示しており、BNPをはじめとするNPファミリーは、NASHの成立過程における first hit(脂質の蓄積)、second hit(酸化ストレス)の両者に対して抑制的に作用すると考えられる。

2. 研究の目的

上記の背景の中で、我々は、ナトリウム利尿ペプチドが直接的に肝臓に作用して肝臓における脂質代謝を変化させ、更に膜リン脂質の脂肪酸組成を変化させることによって、NASHにおける first hit、second hit に対してともに抑制的に作用するという仮説を立てた。

本仮説の検証のため、主としてマウスを用いた検討を行った。

3. 研究の方法

BNP過剰発現トランスジェニックマウス(BNP-Tg)に対して高脂肪食を負荷し、肝臓における脂質の蓄積と脂質代謝に関連する遺伝子の発現を評価した。

マウス肝細胞由来培養細胞である Hepa1-6 を用いて、ANPが脂質代謝に関連する遺伝子の発現に与える影響を評価した。

マウスにANPを投与し、ANPがマウス肝細胞の膜リン脂質(フォスファチジルコリン)の脂肪酸組成に対して与える影響をLC/MS/MSを用いて評価した。

4. 研究成果

BNP-Tg と野生型マウス(WT)に対して8週齢より高脂肪食を負荷したところ、既報と同様にBNP-TgではWTに比較して体重増加の抑制を認めた(Figure 1 (a))。

マウスを解剖して肝臓の評価を行ったところ、20週齢の時点で、1)マウスの肝臓の重量はBNP-TgでWTに比較して有意な低下を認め(Figure 1(b))、2)肝臓内のトリグリセリド含有量もBNP-Tgで有意な低下を認めた。(Figure 1 (c))。

この時点で、肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現をqPCRにて定量的に評価したところ、脂肪酸合成に関与する遺伝子(SREBP-1、FAS)の発現は有意な低下を認め(Figure 2)、逆に脂肪酸酸化に関連する遺伝子(PPAR、CPT1a)の発現は上昇する傾向を認めた(Figure 2)。

これらの事実より、BNPをはじめとするナトリウム利尿ペプチドが肝臓において脂肪酸合成を抑制して食餌誘導性のNAFLDに対して抑制的に働く可能性があると考えられた。

次に、ナトリウム利尿ペプチドの肝細胞に対する直接的な作用を評価するため、マウス肝細胞由来細胞Hepa1-6を用いた検討を行った。

Hepa1-6に対してANPを添加したところ、ANPは濃度依存的に脂肪酸合成関連遺伝子の発現を低下させ、逆に脂肪酸酸化関連遺伝子の発現を上昇させた(Figure 3)。このANPの作用は、ANPの下流分子であるcGMPの阻害薬を添加することによって阻害された(Figure 3)。以上より、ナトリウム利尿ペプチドが肝細胞に直接的に作用してNASHのfirst hitである脂肪の蓄積に対して抑制的に作用することが示唆された。

次に、ナトリウム利尿ペプチドが肝細胞の膜リン脂質に与える影響を評価するため、高

脂肪食負荷野生型マウスに対するANPの腹腔内投与実験を行った。

野生型マウスに対して高脂肪食負荷を4週間行ったのちに、高脂肪食を継続しながら浸透圧ポンプを用いて2週間のANP腹腔内投与(1.5 µg/kgBW/h)を行った。

ANP投与マウスではVehicle投与マウスと比較して血中ANPの上昇、血圧の低下を認め、腹腔内投与したANPがマウス体内で作用していることを確認した。ANP投与マウスでは、Vehicle投与マウスと比較して体重、肝重量、肝臓内トリグリセリド含有量に有意な差を認めなかった。

これらのマウスの肝臓より脂質を抽出してLC/MS/MSを使用した質量分析法により、フォスファチジルコリン(PC)の脂肪酸組成を評価した。

Figure 4に示すように、Vehicle投与群と比較してANP投与群でPC分子種の変動が散見された。これらの変動するPC分子種のうち、ANP投与群で増加しているものは、炭素鎖長が20、不飽和結合数が2の脂肪酸と炭素鎖長が20、不飽和結合数が4の脂肪酸が結合したPC(以下、PC(20:2,20:4)のように表記)をはじめとして、PC(18:1,20:5)、PC(18:2,22:4)など、不飽和結合数の合計が多い分子種に多く見られた。

ANP2週間投与では肝重量や肝臓内の脂質蓄積そのものには変化が見られないことを考慮すれば、この結果は、ナトリウム利尿ペプチドが脂肪酸合成とは独立して膜脂質の組成に影響を及ぼす可能性を示唆するものと考えられた。

上記の検討により、ナトリウム利尿ペプチドがNASH形成におけるfirst hit(脂肪蓄積)に関して抑制的に作用することが示され、また、膜リン脂質の組成も変化させることから、second hitに対する影響も有する可能性が示唆された。

Figure 1 BNP-Tg と野生型マウスの体重、肝重量、肝内トリグリセリドの週齢による変化

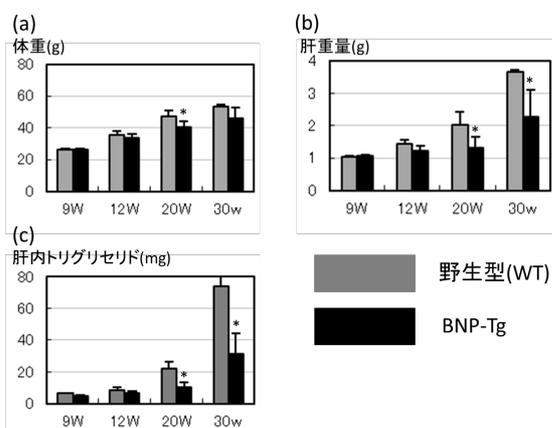


Figure 2 20 週齢 BNP-Tg と野生型マウスの肝臓における脂質代謝関連遺伝子の変化

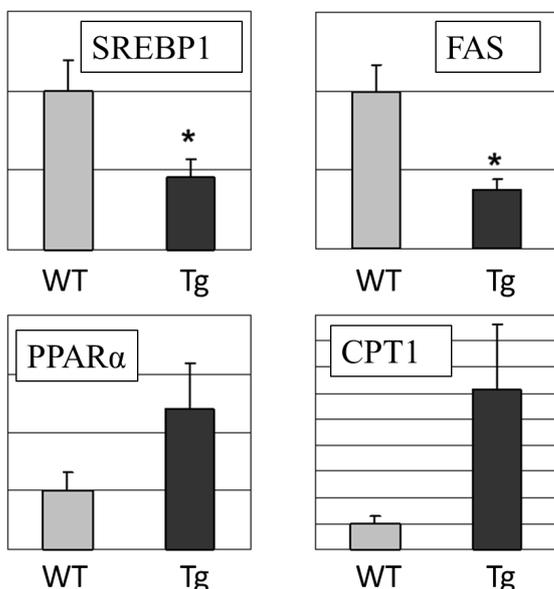
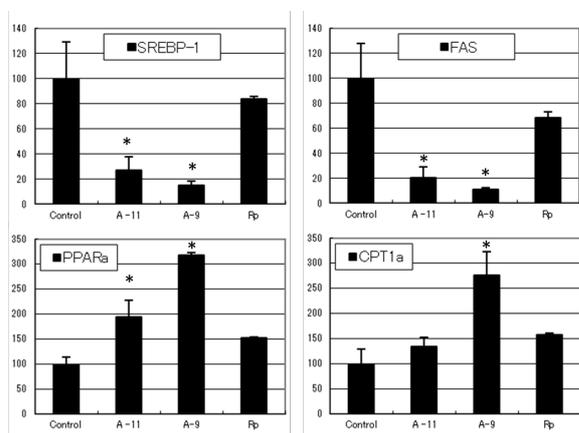
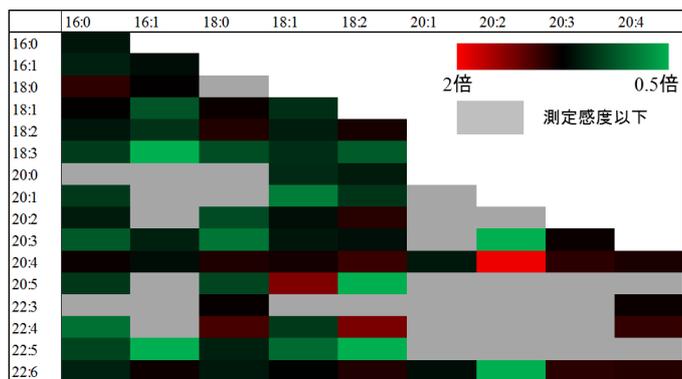


Figure 3 マウス肝細胞由来細胞 Hepa1-6 細胞への ANP 添加の脂質代謝関連遺伝子に対する効果



A-11: ANP 10^{-11} M A-9: ANP 10^{-9} M
 Rp: RP-8-Br-cGMP (cGMP阻害薬)を添加後にANP 10^{-9} Mを添加
 * p<0.05

Figure 4 ANP 投与マウスと Vehicle 投与マウスの膜リン脂質(フォスファチジルコリン)の脂肪酸組成に対する影響



フォスファチジルコリンの脂肪酸組成別の、ANP投与群のVehicle投与群に対する比(ANP投与群/Vehicle投与群)。赤のセルが上昇、緑のセルが低下を示す。

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 3 件)

1. Sonoyama T, Sone M, Tamura N, Honda K, Taura D, Kojima K, Fukuda Y, Kanamoto N, Miura M, Yasoda A, Arai H, Itoh H, Nakao K.

Endocrine Connections. 3:173-179, 2014.
 doi: 10.1530/EC-14-0086

(査読有)

2. Honda K, Sone M, Tamura N, Sonoyama T, Taura D, Kojima K, Fukuda Y, Tanaka S, Yasuno S, Fujii T, Kinoshita H, Ariyasu H, Kanamoto N, Miura M, Yasoda A, Arai H, Ueshima K, Nakao K.

Journal of Hypertension. 31:2010-2017, 2013.
 doi: 10.1097/HJH.0b013e3283635789.

(査読有)

3. 園山 拓洋、中尾 一和 肥満・肥満症の調節、発症に関わる因子 ナトリウム利尿

ペプチド系 日本臨床 72 巻増刊 4 最新肥満症学 145-149, 2014

(査読無)

http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/z_mokuji/7205himan.html

[学会発表](計 9 件)

1. 園山 拓洋、曾根 正勝、本田 恭子、田浦 大輔、小嶋 勝利、犬塚 恵、金本 巨哲、田村 尚久、中尾 一和

ヒト ES 細胞/iPS 細胞のステロイド産生細胞への分化誘導法の開発

第 86 回日本内分泌学会学術集会

2013/4/25-27 (仙台市)

2. 園山 拓洋、田中 智洋、沢田 啓、井上 雅文、城 孝尚、河野 裕翔、中尾 一和

高脂肪食負荷マウスの視床下部弓状核のトランスクリプトーム解析

第 87 回日本内分泌学会学術集会

2014/4/24-26 (福岡市)

3. 園山 拓洋、田中 智洋、沢田 啓、井上 雅文、城 孝尚、河野 裕翔、中尾 一和

高脂肪食負荷マウスの視床下部弓状核のトランスクリプトーム解析

第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会

2014/5/22-24 (大阪市)

4. Takuhiro Sonoyama, Masakatsu Sone, Kyoko Honda, Daisuke Taura, Katsutoshi Kojima, Megumi Inuzuka, Naotetsu Kanamoto, Naohisa Tamura, Kazuwa Nakao

Differentiation of Human ES/iPS Cells into Steroid-Producing Cells

ICE/ENDO 2014

2014/6/21-24 (Illinois, USA)

5. 園山 拓洋、田中 智洋、沢田 啓、井上 雅文、河野 裕翔、中尾 一和

高脂肪食負荷による食欲制御機構破綻のメカニズム解明の試み~トランスクリプトーム解析を中心として~

第 32 回内分泌代謝学サマーセミナー

2014/7/10-12 (山梨県南都留郡)

6. Sonoyama T, Tamura N, Miyashita K, Sone M, Taura D, Inuzuka M, Honda K, Kojima K, Nakao K.

Inhibition of Fatty Liver and Liver Fibrosis by Brain Natriuretic Peptide.

The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014

2014/9/10-14 (Kyoto, Japan)

7. Sonoyama T, Tanaka T, Inoue M, Ogino Y, Guo T, Nakao K.

Transcriptome Analysis of Arcuate Nucleus from Mice Fed a High-Fat Diet.

The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014

2014/9/10-14 (Kyoto, Japan)

8. Sonoyama T, Tanaka T, Inoue M, Ogino Y, Guo T, Nakao K.

Transcriptome Analysis of Arcuate Nucleus from Mice Fed a High-Fat Diet.

生命医薬情報学連合会 2014

2014/10/2-4 (仙台市)

9. 園山 拓洋、田中 智洋、沢田 啓、井上 雅文、河野 裕翔、中尾 一和

高脂肪食負荷による食欲制御機構破綻のメカニズム解明の試み~トランスクリプトーム解析を中心として~

第 35 回日本肥満学会

2014/10/24-25 (宮崎市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

<http://www.tk.med.kyoto-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

園山 拓洋 (SONOYAMA TAKUHIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70582112