

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26870533

研究課題名(和文) コレステロール合成経路抑制による脂肪肝発症の新規機構の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Myeloid specific inhibition of cholesterol synthesis ameliorates insulin sensitivity and hepatic steatosis.

研究代表者

永島 秀一 (NAGASHIMA, SHUICHI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：30406136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：スタチンはコレステロール合成経路の律速酵素であるHMG-CoA還元酵素を阻害し、血中コレステロール低下作用を有するが、この作用とは独立して動脈硬化巣へのマクロファージの集積を抑制することが知られている。マクロファージ特異的にHMGRを欠損したマウスを作製し食餌性に肥満させたところ、脂肪組織のマクロファージの集積と炎症プロセスが抑制された。また脂肪組織のインスリンシグナルの賦活化により全身のインスリン抵抗性が改善した。加えて脂肪肝も改善していたが、肝臓のマクロファージの集積や炎症性には変化がなかった。免疫細胞のHMGRは全身のインスリン感受性と肝脂質代謝に影響を及ぼすことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：HMG-CoA reductase (HMGR) is the rate-limiting enzyme in cholesterol biosynthesis. HMGR inhibitors (statins) have been reported to exert cholesterol-lowering independent regression of atherosclerotic plaque by decreasing macrophage accumulation and the inflammatory process in the lesion. We hypothesized that genetically myeloid-specific inhibition of HMGR would decrease adipose tissue inflammation. As expected, diet-induced obese mice with myeloid-specific HMGR KO had lesser macrophage accumulation and expression of inflammatory cytokines in the adipose tissue compared with control mice. In insulin tolerance test, obese KO mice demonstrated improved systemic insulin sensitivity with enhanced insulin signaling in the adipose tissue. Moreover, in obese KO mice hepatic steatosis was improved without the change of hepatic inflammatory characteristics. Our data indicate the pivotal role of HMGR in innate immune cells in regulating systemic insulin sensitivity and hepatic steatosis.

研究分野：脂質代謝

キーワード：HMG-CoA還元酵素 インスリン抵抗性 糖尿病 マクロファージ スタチン

## 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝/脂肪肝炎 (NAFLD/NASH) 患者が増加しているが、この病態の理解や治療法の解明は十分ではない。加えてこれらの患者の多くが脂質異常症を有しておりコレステロール合成経路の HMG-CoA 還元酵素 (HMGCR) 阻害薬スタチンを必要とする。スタチンにより脂肪肝が悪化することはないとされている (Hepatology. 2012; 55: 2005-2013) が、我々は肝細胞特異的に HMGCR を欠損させたマウスを作製し、このマウスは顕著な脂肪肝を呈することを報告した (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012; 32: 1824-1831)。

この矛盾点から、我々は肝細胞外で脂肪肝発症に関わるとされる肝臓内のマクロファージである Kupffer 細胞や脂肪組織 (脂肪細胞及び脂肪細胞に浸潤したマクロファージ) において、HMGCR を阻害すると脂肪肝を抑制する可能性があるかと仮説を立てた。

実際に肝Kupffer細胞や脂肪組織のマクロファージの集積は脂肪肝発症に寄与していることが知られている (Diabetes. 2010; 59: 347-357) (J. Clin. Invest. 2006; 116: 1494-1505)。またスタチンは血中コレステロール低下とは独立して動脈硬化病変を退縮させる効果を有しているが、その作用の一つとして動脈硬化巣へのマクロファージの集積や炎症反応を抑制させることが知られている (Circulation. 2004; 109: II-18-II-26)。これらのことからマクロファージにおいてHMGCRを抑制すると肝Kupffer細胞や脂肪組織マクロファージのそれぞれの臓器への集積が減少して脂肪肝に抵抗性となりうると考えられるが、これを証明した研究はない。

近年スタチンの生体内代謝物のラクトン型スタチンがコレステロール合成経路外の作用によって骨格筋細胞のミトコンドリア障害を惹起するという、スタチンの非特

異的作用が報告された (Cell Metab. 2015; 22: 399-407)。従ってHMGCR抑制作用を検討するためには薬理的な非特異的作用を除外して検討する必要性がある。

## 2. 研究の目的

スタチンの薬理的な非特異的効果を除外し、かつスタチン投与のように全身ではなく生体のマクロファージ局所で HMGCR を抑制するために、遺伝学的にマクロファージ特異的に HMGCR を欠損させたマウスを作製し、肝内マクロファージである Kupffer 細胞や脂肪組織内マクロファージの表現型を調べ、脂肪肝に抵抗性であるのか、そうであればどのような機序であるのかを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

HMGCR 遺伝子の開始コドンの位置するエクソン2を含むエクソン2、3、4の上流および下流に loxP 配列を挿入した floxed HMGCR マウスに、マクロファージ特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Lysozyme-Cre トランスジェニックマウスを交配することによりマクロファージ特異的な HMGCR 欠損 (以下 KO) マウスを作製した。対照群 (以下 Control) は floxed HMGCR マウスとした。

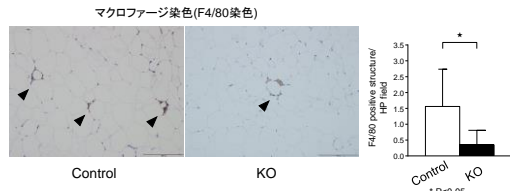
Control 群及び KO 群それぞれを通常食と高脂肪食とで 24 週間飼育し非肥満と食餌誘導性肥満モデルを作製した。これらの耐糖能、血中脂質代謝、肝臓脂質代謝、脂肪組織代謝を調べた。

## 4. 研究成果

① KO マウスマクロファージにおける HMGCR の欠損の程度は約 50%であった。

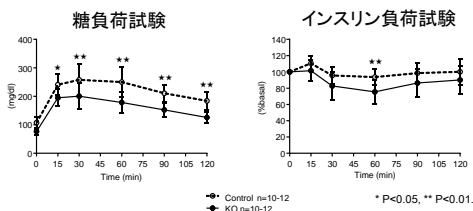
② 体重や精巣上体脂肪組織、腸間膜脂肪組織、肝臓の重量は、通常食および高脂肪食負荷のそれぞれにおいて Control 群と KO 群とで有意な差はなかった。高脂肪食負荷後の KO 群の脂肪組織においてマクロファージの集積が有意に減少していた (図 1)。一方で肝臓 Kupffer 細胞の集積には差がなかった。

図1



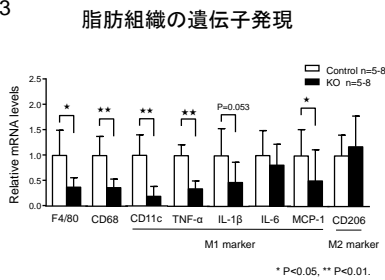
③通常食群では耐糖能や血中脂質値に差がなかったが、高脂肪食負荷後の KO 群の空腹時血糖は 29%低下し、血中インスリン値は 38%低下していた。さらに高脂肪食負荷後の糖負荷試験およびインスリン負荷試験にて評価した耐糖能およびインスリン感受性は KO 群で改善していた(図 2)。また高脂肪食負荷後の血漿脂質値にも有意な変化を認めなかった。

図2



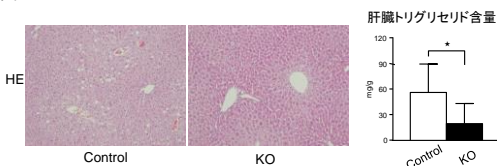
③高脂肪食負荷後の KO 群で脂肪組織の炎症性サイトカイン遺伝子発現が低下していた(図 3)。肝臓においては炎症性サイトカイン遺伝子の発現に差はなかった。

図3



④インスリン刺激による AKT のリン酸化の程度は肝臓では差がなかったが脂肪組織において KO 群で 2~3 倍増加しており、インスリンシグナリングの賦活化が示唆された。⑤高脂肪食負荷後の KO 群において肝トリグリセリド含量は 44%低下していた(図 4)

図4



以上をまとめると、マクロファージ特異的に HMGR を抑制した場合、高脂肪食負荷の条件では脂肪組織のマクロファージの集積と炎症性が減弱し、インスリンシグナルが賦活化され、全身のインスリン感受性が改善していた。肝 Kupffer 細胞の集積や肝臓の炎症性には変化がなかったことから、全身のインスリン感受性の改善が血中インスリン値の低下をもたらした、これが脂肪肝を抑制したものと考えられた。

## 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 5 件)

1. Nagashima S, Morishima K, Okamoto H, Ishibashi S. Possible involvement of PCSK9 overproduction in hyperlipoproteinemia associated with hepatocellular carcinoma: A case report. *J Clin Lipidol.* 2016; 10: 1045-9
2. Nagashima S, Yagyu H, Tozawa RI, Tazoe F, Takahashi M, Kitamine T, Yamamuro D, Sakai K, Sekiya M, Okazaki H, Osuga JJ, Honda A, Ishibashi S. Plasma cholesterol-lowering and transient liver dysfunction in mice lacking squalene synthase in the liver. *J Lipid Res.* 2015; 56: 998-1005
3. Enkhtuvshin B, Nagashima S, Saito N, Wakabayashi T, Ando A, Takahashi M, Sakai K, Yamamuro D, Nagasaka S, Tamemoto H, Ishibashi S. Successful pregnancy outcomes in a patient with type A insulin resistance syndrome. *Diabet Med.* 2015; 32: e16-9.
4. Sekiya M, Yamamuro D, Ohshiro T, Honda A, Takahashi M, Kumagai M, Sakai K, Nagashima S, Tomoda H, Igarashi M, Okazaki H, Yagyu H, Osuga J, Ishibashi

S. Absence of Ncehl augments  
25-hydroxycholesterol-induced ER  
stress and apoptosis in macrophages. J  
Lipid Res. 2014; 55: 2082-92.

5. Sakai K, Igarashi M, Yamamuro D,  
Ohshiro T, Nagashima S, Takahashi M,  
Enkhtuvshin B, Sekiya M, Okazaki H,  
Osuga J, Ishibashi S. Critical role of  
neutral cholesteryl ester hydrolase 1  
in cholesteryl ester hydrolysis in  
murine macrophages. J Lipid Res. 2014;  
55: 2033-40.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

自治医科大学・医学部・講師

永島 秀一 (NAGASHIMA SHUICHI)

研究者番号：30406136