

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08779

研究課題名(和文) 骨格筋・肝軸からみた脂肪肝抑制因子の同定

研究課題名(英文) Molecular pathology of fatty liver disease learned from the muscle-liver axis

研究代表者

田中 宏樹 (Tanaka, Hiroki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：70596155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本邦を含む先進国では非アルコール性脂肪肝炎(NASH: Non-alcoholic steatohepatitis)の罹患率が増加している。NASHが進行すると肝硬変、肝癌が発生するため早期に治療介入する必要があるが、肝病態に直接的に介入する治療法は確立していない。本研究では、NASHの病態進行には加齢や運動不足による骨格筋量減少(サルコペニア)が関連していることに着目し、骨格筋・肝連関から病態の解明さらに治療への応用を試みた。その結果、マウス脂肪肝・廃用性筋萎縮モデルにおける解析から骨格筋由来から分泌されるFGF9により、NASHの治療が可能であることを示唆するデータが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、NASHの治療においては食事制限や適度な運動の指導が主なものであり、肝臓の病態に直接的に介入する治療法は確立していなかった。この研究で骨格筋由来から分泌されるFGF9がNASHの治療に有効であることが示唆された。これにより本結果が臨床応用に結びつけば、高齢者や運動習慣が身につけにくい脂肪性肝疾患患者に対して直接的に肝臓の病態を改善させる治療法を確立することが期待できる。我が国において高齢社会、食生活の欧米化、運動不足によりメタボリックシンドロームの増加が深刻な問題となっていることを考慮すると、重要な研究結果が得られたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The prevalence of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is increasing in developed countries including Japan. There are no effective therapeutic strategies for NASH, while the advancing of the disease state further results in severe situations such as hepatic cirrhosis and liver cancer. In this study, we focused on the evidence that shows the exacerbation of NASH is strongly correlate with sarcopenia which is caused by aging and inactivity. Using a murine model of NASH/sarcopenia, we found that FGF9 that is secreted from skeletal muscle might have a therapeutic function in NASH.

研究分野：病理学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎

1. 研究開始当初の背景

本邦では食生活の欧米化、運動不足に伴い、メタボリックシンドロームの増加が深刻な問題となっている。非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease) は、飲酒習慣がないにもかかわらず、アルコール性肝障害に類似した脂肪性肝障害を呈する症候群であり、罹患率が増加の一途をたどっている。さらに、NAFLDが重症化し肝組織に壊死・炎症や線維化を伴う脂肪肝炎を認めるものを非アルコール性脂肪肝炎 (NASH: Non-alcoholic steatohepatitis) と呼ぶ。本邦では健診受診者のNAFLDの頻度は10~30%とされており、その10~20%はNASHに進行することから、一般人口におけるNASHの有病率は1~3%程度と推測される。NASHはさらに肝硬変、肝癌へと進行することが多いため、深刻な生活習慣病の一つと位置付けられる。これまで本邦での肝癌の発生はウイルス型肝炎 (B型、C型) とアルコール性肝炎から発生するものが多く、特にC型肝炎から発生するものが70%以上を占めてきた。近年、C型肝炎の治療が飛躍的に向上したことに伴い、それから発生する肝癌も減少してきている。一方で、NAFLDの罹患率が増え、NAFLDからの肝癌発症が増加してきている (平成27年度「肝がん白書」日本肝臓学会)。従って、今後の肝癌対策としてNAFLDを早期に発見し、治療に介入することが重要な課題である。NAFLDに対する治療は食事・運動指導などによって過剰栄養を改善し肝組織への脂肪蓄積を予防することを目的とし、肝障害に直接的に介入する治療法は確立していない。

近年、NAFLDの病態進行は加齢や運動不足による骨格筋量減少と関連していることが報告されている (Hong H.C. *et al.* Hepatology 59(5):1772-8.2014)。これらの知見は、臨床においてCT、MRIを利用した画像解析データから明らかにされているが、それぞれの臓器でどのような分子動態の変化が起きているのかは明らかにされていない。

肝臓と骨格筋は食事に由来するエネルギーを消費する2大臓器と言える。肝臓は、薬物代謝やエネルギー代謝調節の中心的臓器で、常に様々な酵素反応にエネルギーを消費している。また、余剰な糖質、アミノ酸、脂質は肝細胞内においてグリコーゲンや中性脂肪として蓄積される。骨格筋はエネルギーを利用して運動器官として働くだけでなく、近年、内分泌器官としての機能も注目されている (Pedersen B.K. *et al.* Nat Rev Endocrinol 3;8:457-6.2012)。それは骨格筋組織において運動負荷により筋繊維が損傷を受け、それに反応して筋衛星細胞が筋芽細胞へ分化・増殖し組織が再生され骨格筋量が増加する。この筋繊維の損傷と再生のサイクルの過程で様々なサイトカイン等の蛋白質が分泌され、パラクライン作用により他臓器が様々な影響を受けるためである。

2. 研究の目的

NAFLDに対する運動療法では、骨格筋のエネルギー消費を亢進させ肝臓への脂肪蓄積を予防するだけでなく、骨格筋由来の何らかの液性因子を介して肝障害を改善させていることが示唆される。しかしながら、骨格筋と肝組織の相互作用に関する詳細な分子機構は十分に解明されていない。各臓器に関する知見を個別に見ると、例えば、運動負荷後の骨格筋からサイトカインの一種であるIL-6が分泌されることが知られている (Pedersen B.K. *et al.* Physiol Rev 88: 1379-1406, 2008)。IL-6は肝組織においては肝再生を促して肝障害を改善させるという報告がある一方で、肝組織内への炎症細胞浸潤を即して炎症を増悪させるという報告もあり、コンセンサスが得られていない。すなわち、運動負荷後に両組織においてどのような分子動態の変化が現れるのかを同時かつ網羅的に解析しなければ、詳細な相互作用は明らかにできないと考えられる。申請者はこれまでにマウスやヒトNASH生検試料を対象とした網羅的遺伝子発現解析を行い、脂肪性肝疾患の増悪に関わる分子機構を明らかにしてきた (Tanaka H. *et al.* AASLD the liver meeting 2014, Boston, MA, USA / Sawada K. *et al.* Hepatol Res. 2014 Aug;44(8):920-34.)。これらの実績を活用し、本研究では骨格筋と肝組織の相互作用に関わる分子機構に着目し以下のことを明らかにすることを目的とした。

- 1.) 骨格筋由来のどのような因子が脂肪性肝障害を改善させるのか?
- 2.) それらの因子によりNALFDの肝組織のどのような代謝・シグナル伝達経路が影響を受けるのか?
- 3.) 骨格筋由来の脂肪肝抑止因子をマウス脂肪肝モデルに投与すると、肝病変は改善するのか?

3. 研究の方法

マウス NASH/サルコペニアモデルを作成し、肝臓、骨格筋の病理組織学的変化を観察するとともに、それぞれの臓器における網羅的遺伝子発現解析を行った。これらの結果をもとに解析ソフトウェアを用いてパスウェイ解析等を行い、肝臓と筋組織の相互作用におけるキー分子やシグナル伝達・代謝経路を同定した。これらの解析から骨格筋由来の分子を同定して、脂肪を負荷したマウス初代培養肝細胞に加えて培養し、蓄積した脂肪の減少を観察した。さらにマウス NASHモデルに対して、この骨格筋由来分子を投与して NASH 病態の改善が見られるかどうかを解析した。

4. 研究成果

マウスに高脂肪食を与えて誘導した脂肪肝モデルを、尾懸垂飼育装置を用いて一週間飼育し肝、ヒラメ筋、血液を採取した。また、コントロールとして同脂肪肝モデルを通常飼育した個体から同サンプルを採取した。それぞれの臓器について組織学的評価を行なうとともにRNAを採取し、RNAシーケンシングによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

尾懸垂飼育した脂肪肝モデルマウスにおいて、ヒラメ筋繊維の萎縮、肝組織における脂肪の増加、血清トランスアミナーゼ活性の上昇が観察された。網羅的遺伝子発現解析では、肝組織における増殖関連転写因子の発現低下(Jun, Nfkb2)、ヒラメ筋組織における筋繊維構成蛋白質(Acta1, Tpm1)、脂肪酸代謝酵素(Acadm, Lpl)、組織修復関連増殖因子(Fgf9)の発現低下が認められた。FGF9タンパク質をあらかじめ脂肪を負荷したマウス初代培養肝細胞に加えると、細胞内の脂肪が減少した。さらにマウスNASHモデルにFGF9を投与するとNASHの病態が改善した。

これらの結果は尾懸垂飼育により廃用性筋萎縮が誘導され、その影響によりヒラメ筋組織における脂肪酸の利用が低下し、肝組織への蓄積が亢進したことを示している。また、FGF9は肝再生に重要な役割を果たすことが報告されている。ヒラメ筋の廃用性筋萎縮により筋組織から分泌されるFGF9が低下し、肝病変の進行に関連していると考えられた。廃用性筋萎縮は脂肪酸代謝の低下による代謝バランスの破綻をもたらし、さらにFGF9の分泌低下による肝再生抑制という内分泌機能の異常によってNAFLDの病態を修飾していることが示唆された。

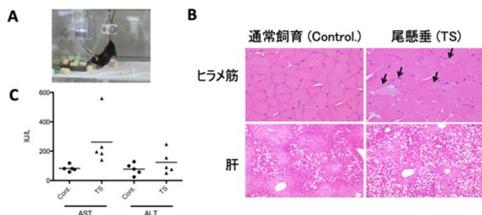


図1 A: マウス尾懸垂飼育装置。16週間、高脂肪食を与えたNASHモデルマウスを1週間尾懸垂飼育しサルコペニアを誘導した。B: NASH/サルコペニアマウスの肝、ヒラメ筋組織。尾懸垂飼育により肝臓の脂肪化が亢進し、ヒラメ筋が萎縮している。C: 肝障害を示す血清中肝臓酵素AST/ALTの活性が通常飼育と比較し、尾懸垂飼育したマウスの血清中で高くなった。

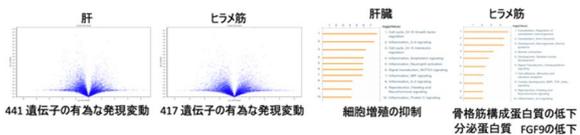
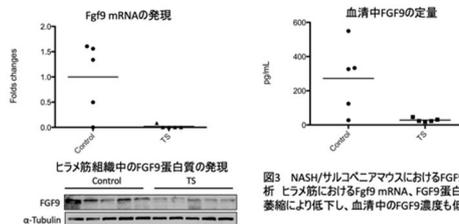


図2 NASH/サルコペニアマウスの肝、ヒラメ筋組織におけるRNA-seqによる遺伝子発現解析の結果、ヒラメ筋における分泌蛋白質FGF9が低下していることが明らかとなった。

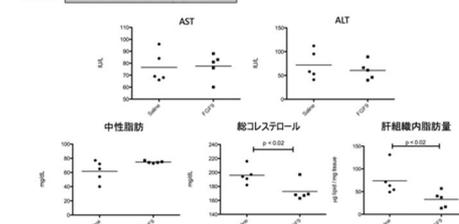


図3 NASH/サルコペニアマウスにおけるFGF9発現解析。ヒラメ筋におけるFgf9 mRNA、FGF9蛋白質は筋萎縮により低下し、血清中のFGF9濃度も低下した。

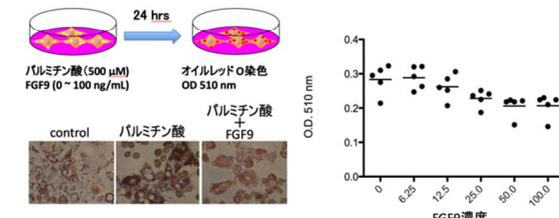


図4 マウス初代培養細胞に脂肪酸を加えて培養し、培養液にFGF9を投与した。その結果、肝細胞に蓄積する脂肪量が増えたFGF9の量に依存して減少した。



図5 マウスNASHモデルにおけるFGF9投与による治療効果の解析。マウスNASHモデルに対してFGF9を21日間腹腔内投与した(200 ng/head/day)。血清中AST/ALTの活性は変化しないが、生理食塩水投与群(Saline)と比較し、FGF9投与群(FGF9)では総コレステロールが低下し、肝臓内の脂肪も減少した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 肝細胞における脂肪蓄積量を低減させるための脂肪低減剤及び血中コレステロール低減剤	発明者 2017	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2017/30941	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 肝細胞における脂肪蓄積量を低減させるための脂肪低減剤及び血中コレステロール低減剤	発明者 田中宏樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2017/30941	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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	奥田 勝博 (Okuda Katsuhiko) (00389115)	旭川医科大学・医学部・助教 (10107)	
研究分担者	浅利 優 (Asari Masaru) (40360979)	旭川医科大学・医学部・准教授 (10107)	
研究分担者	清水 恵子 (Keiko Shimizu) (90312462)	旭川医科大学・医学部・教授 (10107)	