

平成21年6月1日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590779
 研究課題名 (和文) 過栄養性脂肪肝の発症・進展に関与する新規生理活性物質の単離
 研究課題名 (英文) Isolation of physiologically active substance regarding the pathogenesis and development of fatty liver under overeating
 研究代表者
 加隈 哲也 (KAKUMA TETSUYA)
 大分大学・医学部・助教
 研究者番号：80343359

研究成果の概要：

脂肪肝に炎症を与えると、脂肪肝の程度は明らかに増悪し致死率が上昇する。その防御システムとしてアディポネクチンやヒスタミンが関与していることが確認された。一部の薬物（降圧薬と高コレステロール治療薬）において過食・高脂肪食による脂肪肝モデルマウスの糖脂質代謝および脂肪肝改善効果が観察された。Apelin という新規物質が高脂肪食負荷肥満モデルマウスの肥満症、過栄養性脂肪肝の治療に効果的であることを実証した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学2

キーワード：肥満、過栄養性脂肪肝、炎症性サイトカイン、ヒスタミン、アディポネクチン、pleiotropic 効果、Apelin

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドローム、いわゆる内臓脂肪型肥満の患者に高率に合併する病態の一つに過栄養性脂肪肝がある。脂肪肝は、単に肝臓に脂肪が蓄積した状態としてとらえられていたが、近年、アルコール性肝障害に類似した病理所見を持ち、肝硬変や肝癌に進行する非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) が含まれていることがわかってきた。

我々はこれまでに、過栄養性脂肪肝モデルマウスや NASH 患者において、組織中の内因性脂肪酸の合成促進、必須脂肪酸で炎症系の脂肪酸である ω 6 系、抗炎症系の脂肪酸である ω 3 系の脂肪酸分画が低下していること

を見いだした。

今回、過栄養性脂肪肝の発症、進展に関与する生理活性物質の単離同定、そしてその予防、治療を模索したいと考えている

2. 研究の目的

この研究の目標は、過栄養性脂肪肝の発症・進展に関与する未知の生理活性物質を単離することにある。しかし、その過程で得られた分子は、既知のものであることも考えられる。またそれは、脂肪肝から脂肪性肝炎に至るキー分子を含んでいることも予想される。

過栄養性脂肪肝モデルおよび脂肪性肝炎

モデル動物を作成し、その発症・進展に関わる生理活性物質について検討する。未知の遺伝子が単離されれば、*in vitro*での発現実験、さらに、モデル動物においてもその物質を発現させ、脂肪肝の防止あるいはそれに関係した代謝変化が改善することを確認する。

3. 研究の方法

(1) 脂肪肝発症における炎症性サイトカインの関与とその防御メカニズムについて

①11-12 週齢の雄 C57BL/6 マウスに TNF α あるいは LPS を投与し、炎症性サイトカイン投与による脂肪肝モデルを作成し、その脂肪肝発症メカニズムと抗 TNF α 抗体による脂肪蓄積の抑制を検討した。

②8-10 週齢の雄 KKAY マウスに LPS あるいは TNF α を投与し、すでに脂肪肝を発症しているモデルにさらに炎症性サイトカイン投与することで炎症の強い脂肪肝モデルを作成し、アディポネクチンによる脂肪肝抑制効果を検討した。

③8 週齢の雄 C57BL/6 マウスに LPS を投与し、急性脂肪肝モデルを作成し、ヒスタミンによる脂肪肝抑制効果を検討した。同時にヒスタミン H1 受容体欠損マウス (H1KO) とヒスタミン H2 受容体欠損マウス (H2KO) を用いて LPS 投与による急性脂肪肝発症と受容体シグナルの関与について検討した。

(2) 過栄養性脂肪肝の発症とその抑制が期待できる薬物について

①8 週齢の雄 C57BL/6 マウスに高脂肪食を投与し食事誘導性肥満モデルを作成し、テルミサルタン 5mg/kg/day の投与を 2 週間行って、肥満、インスリン抵抗性、糖脂質・エネルギー代謝、UCP1 の発現について検討した。

②8 週齢の雄 C57BL/6 マウスに高脂肪食を投与し食事誘導性肥満モデルを作成し、プラバスタチン 100mg/kg/day の投与を 4 週間行って、肥満、インスリン抵抗性、糖脂質・エネルギー代謝、UCP1 と UCP3 の発現について検討した。

(3) 過栄養性脂肪肝の抑制が期待できる新規物質について

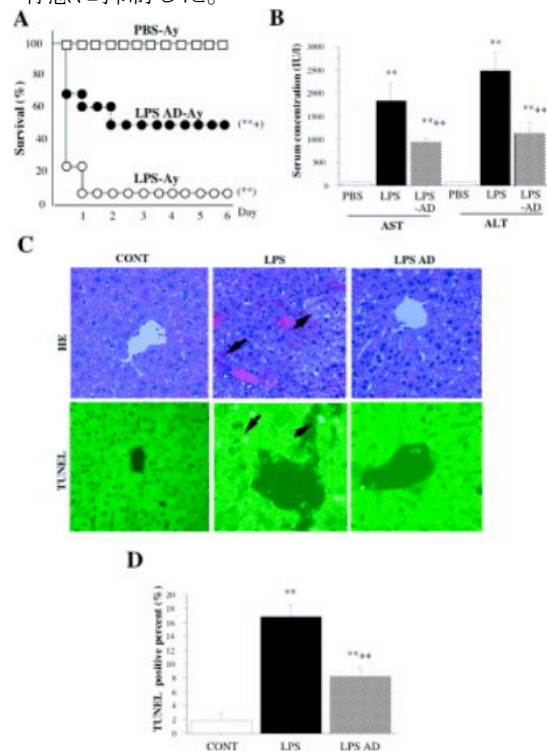
①Apelin は 7 回膜貫通型 G タンパク受容体の内因性リガンドとして胃から抽出された物質である。その発現は脳、心臓、胃、筋肉や血管系に確認されており、心機能、飲水行動、胃細胞増殖などが報告されている。最近脂肪細胞にもその受容体の発現が確認されたが、その機能については不明な部分が多い。雄 C57BL/6 マウスに高脂肪食を投与し食事誘導性肥満モデルを作成し、Apelin を 2 週間腹腔内投与したときの、摂食、体重、脂肪量、糖脂質・エネルギー代謝、UCP1 と UCP3 の発現について検討した。

4. 研究成果

(1) 脂肪肝発症における炎症性サイトカインの関与とその防御メカニズムについて

①TNF α 投与により 24 時間以内に肝臓重量は有意に増加、インスリン抵抗性の存在と肝臓への脂肪蓄積が確認され、脂肪合成示す SREBP1c や FAS の遺伝子発現が亢進していた。一方、LPS 投与による脂肪肝発症は、抗 TNF α 抗体により明らかに抑制された。

②コントロールマウスへの LPS 投与でも投与 1 週間以内にその生存率は 70% 程度となるが、KKAY マウスに LPS を投与すると、その致死率は上昇し生存率は 20% となった。AST、ALT の上昇およびアポトーシスに至った細胞数も KKAY マウスの方が有意に高く、肝障害の程度は KKAY マウスで明らかに高かった。同モデルにアディポネクチンを前投与しておくと肝障害の程度は有意に低下し、致死率は 50% までに回復した。関連図を下記に示す。アディポネクチンの投与は TNF α による肝障害も有意に抑制した。



③ヒスタミンは LPS 投与による急性脂肪肝のトランスアミナーゼの上昇とアポトーシスの程度、炎症性サイトカイン (TNF α 、INF γ) 発現を有意に抑制した。一方、H1KO では LPS 投与による肝障害はコントロールマウスのレベルと変わらず、H2KO ではその両者に比べて有意に悪化していた。また炎症性サイトカイン (TNF α 、INF γ) 発現も H2KO において有意に増加していた。さらに LPS 投与による TNF α の上昇は H2KO マウスから単離したマクロファージにおいてのみ増加した。

まとめ：脂肪肝は炎症性サイトカインにより急性発症することが確認され、またすでに脂肪肝を発症しているモデルではその程度は明らかに増悪し致死率が上昇する。その防御システムとしてアディポネクチンが働いていること、また従来から当科が研究してきたヒスタミン作用不全は炎症性サイトカインによって生じる急性脂肪肝の発症に寄与していること。さらにヒスタミンの投与により肝障害の程度を軽減できることが確認された。これらの知見は、脂肪肝から NASH への進展に炎症性サイトカインが関与していることが唱われているが、そのメカニズム、予防、治療に迫る知見の一つになるものと考えている。

(2) 過栄養性脂肪肝の発症とその抑制が期待できる薬物について

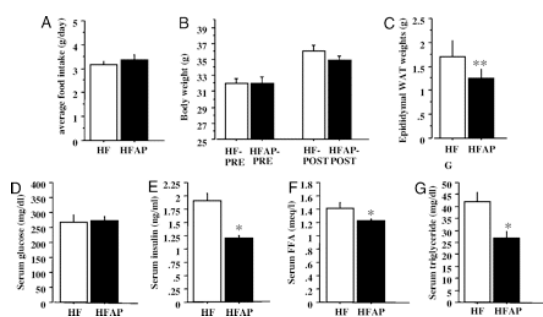
①テルミサルタンの投与は食事誘導性肥満モデルマウスの内臓および皮下脂肪、体重を有意に減少させた(食事量によらず)。同時に、インスリン抵抗性改善、アディポサイトカインの発現変化(アディポネクチンの上昇、レジスチンの低下)を介して、糖脂質代謝を有意に改善した。また肝臓に蓄積した脂肪量の減少が確認され、筋肉とともに非脂肪組織での脂肪蓄積まで減少することが判明した。その作用には酸素消費量の増加と呼吸商の低下、および褐色脂肪組織の UCP1 の発現増加といったエネルギー消費亢進による可能性が推察された。

②プラバスタチンの投与は食事誘導性肥満モデルマウスの副睾丸周囲脂肪、体重増加量を有意に減少させた(食事量によらず)。同時に、インスリン感受性の亢進、アディポサイトカインの発現変化(アディポネクチンの上昇、レジスチンの低下)が観察され、肝臓および筋肉に蓄積した脂肪量の減少が認められた。また酸素消費量の増加と呼吸商の低下が認められたが、褐色脂肪組織の UCP1 の発現および筋肉の UCP3 の発現には変化がなかった。

まとめ：過栄養性脂肪肝モデルマウスに、すでに臨床で使用されている薬物、1：テルミサルタン(アンジオテンシン II 受容体拮抗薬)、2：プラバスタチン(スタチン系薬物)の投与を行ったところ、糖脂質改善、エネルギー代謝亢進作用を示し、脂肪量減少、体重減少とともに肝臓に蓄積した脂肪の減少効果が観察された。これらの知見は、降圧薬と高コレステロール治療薬といった従来の目的を超えた pleiotropic 効果を示したものと考えられる。肥満に立脚した過栄養性脂肪肝の予防、治療に際し、治療薬の選択に示唆を与えるものと考えている。

(3) 過栄養性脂肪肝の抑制が期待できる新規物質について

①Apelin の腹腔内投与ではその血中濃度は1時間後がピークで6時間もするとほぼ消失すること、また用量依存性に体重抑制効果をもつことを preliminary に確認し、 $0.1 \mu\text{mol/kg}$ の投与で体重増加がほぼ抑制されていたので、同量を使用して実験を行った。まずコントロールマウスに14日間腹腔内投与したところに、内臓皮下脂肪ともに有意に低下し、脂肪細胞のサイズの減少、中性脂肪含量の低下が観察された。またインスリン感受性の亢進と血中の中性脂肪の低下が認められた。一方、高脂肪食負荷肥満モデルマウスでも同様に検討したところ、やはり副睾丸周囲脂肪量の減少、インスリン抵抗性の改善、血中の中性脂肪および遊離脂肪酸の低下が認められた。関連図を下記に示す。



またアディポネクチンの増加、レプチンの低下、褐色脂肪組織の UCP1 発現の亢進、筋肉の UCP3 発現の亢進が認められた。さらに、直腸温の上昇、酸素消費量の増加、呼吸商の低下が観察された。

まとめ：Apelin は高脂肪食負荷肥満モデルマウスの脂肪量の減少、インスリン抵抗性の改善、血中の中性脂肪および遊離脂肪酸の低下に加え、アディポネクチンの増加、レプチンの低下、エネルギー代謝亢進作用を示した。これらの結果は Apelin が肥満症、過栄養性脂肪肝の治療に効果的であることを示している。今後は Apelin による肝臓の脂肪燃焼作用について検討したいと考えている。

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 8 件、全て査読あり)

① Araki K, Masaki T, Katsuragi I, Kakuma T, Yoshimatsu H. Effects of pravastatin on obesity, diabetes, and adiponectin in diet-induced obese mice. *Obesity* (Silver Spring). 2008 Sep; 16(9): 2068-2073.

② Gotoh K, Fukagawa K, Fukagawa T, Noguchi H, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu

H. Hypothalamic neuronal histamine mediates the thyrotropin-releasing hormone-induced suppression of food intake. *J Neurochem.* 2007 Nov; 103(3): 1102-1110.

③ Endo M, Masaki T, Seike M, Yoshimatsu H. TNF-alpha induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). *Exp Biol Med (Maywood).* 2007 May; 232(5): 614-621.

④ Higuchi K, Masaki T, Gotoh K, Chiba S, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology.* 2007 Jun; 148(6): 2690-2697.

⑤ Araki K, Masaki T, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Telmisartan prevents obesity and increases the expression of uncoupling protein 1 in diet-induced obese mice. *Hypertension.* 2006 Jul; 48(1): 51-57.

⑥ Okamoto K, Kakuma T, Fukuchi S, Masaki T, Sakata T, Yoshimatsu H. Sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1 expression in brain is affected by age but not by hormones or metabolic changes. *Brain Res.* 2006 Apr 7; 1081(1): 19-27.

⑦ Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Noguchi H, Kakuma T, Endo M, Seike M, Watanabe T, Yoshimatsu H. The role of histamine H1 receptor and H2 receptor in LPS-induced liver injury. *FASEB J.* 2005 Aug; 19(10): 1245-1252.

⑧ Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, Yoshimatsu H. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology.* 2004 Jul; 40(1): 177-184.

[学会発表] (計3件)

① 織部淳哉、清家正隆、加隈哲也、原中美環、岡本健二郎、吉松博信. 肥満糖尿病マウスにおいてチアゾリジン誘導体による脂肪肝増悪の機序. 第44回日本肝臓学会総会. 2008 6.5-6.6. 愛媛.

② 織部淳哉、清家正隆、加隈哲也、荒川光江、遠藤美月、吉松博信. 肥満糖尿病マウスにおけるチアゾリジン誘導体の肝臓、代謝への影響. 第43回日本肝臓学会総会. 2007 5.31-6.1. 東京.

③ 織部淳哉、清家正隆、針里栄、井上恵、

姫野克郎、高橋祐幸、加隈哲也、吉松博信. 糖尿病合併脂肪肝症例と非脂肪肝症例の予後の検討. 第93回日本消化器病学会総会. 2007 4.19-21. 青森.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加隈 哲也 (KAKUMA TETSUYA)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：80343359

(2) 研究分担者

吉松 博信 (YOSHIMATSU HIRONOBU)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00166993

清家 正隆 (SEIKE MASATAKA)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：40253794