

機関番号： 34306
 研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 平成21年度～平成22年度
 課題番号： 21790666
 研究課題名（和文） 肝鉄過剰蓄積を伴うNAFLDモデルマウスの解析とレチノイドによる除鉄効果の検討
 研究課題名（英文） Investigation of the effect of retinoids on hepatic iron overload in a mouse NAFLD model.
 研究代表者
 土谷 博之（TSUCHIYA HIROYUKI）
 京都薬科大学・薬学部・講師
 研究者番号： 00403402

研究成果の概要（和文）： 脂肪肝やインスリン抵抗性を持つ非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）患者において肝鉄過剰が、高頻度で見出されている。研究代表者は、この肝鉄過剰が脂質代謝異常と密接な関係にあることを見出した。以前の研究で研究代表者は、レチノイドは肝鉄代謝制御作用を持つことを明らかにしており、NAFLDモデルマウスに対するレチノイドの影響を調べた。その結果、さらにレチノイドは、インスリン抵抗性をレプチン依存的に改善することを見出した。

研究成果の概要（英文）： Hepatic iron overload in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients with steatosis and insulin resistance has been frequently observed in clinical settings. In this study, I found the close association between the iron overload and aberrant lipid deposition in the liver. Since I have previously clarified that retinoids have a potent effect on the hepatic iron metabolism, the pathological effect of a retinoid in mice with NAFLD was investigated. Consequently, the retinoid was found to markedly improve the insulin resistance in the mouse model in a leptin-dependent manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

キーワード： 1. レチノイン酸、2. 鉄代謝、3. NAFLD、4. インスリン抵抗性、5. 肝鉄過剰沈着、6. NASH、7. レプチン、8. 肝脂肪沈着

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は、単純脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎（NASH）からなる疾患概念である。一般に単純脂肪肝は临床上問題が少ないとされているが、単純性脂肪肝から派生するNASHは、肝硬変や肝癌への進行が報告されており、肝疾患関連死の減少においてNAFLDの早期

治療法の確立は非常に重要である。現在、単純脂肪肝からNASHへの進展には酸化ストレスの関与が示唆されており、これを制御することでNAFLDに対する治療効果が期待できると考えられている。

近年、NAFLD患者で肝鉄過剰蓄積が高頻度に観察されることから(World J Gastroenterol 2008; 14:4745-4752)、NAFLDにお

ける酸化ストレスの一要因として肝貯蔵鉄が注目されている。一方、研究代表者は、レチノイドによる肝鉄量減少作用と、これに伴う肝臓内酸化ストレス低下作用を明らかにした(Tsuchiya H, et al., *Gastroenterology*, 136, 341-350, 2009)。

2. 研究の目的

そこで本研究は、レチノイドによる肝鉄代謝を標的としたNAFLD新規治療法の開発を目標とした。

まず肝鉄過剰がどのようなメカニズムで生じるのかを明らかにするため、脂質代謝およびインスリン感受性に注目し、鉄代謝との関連を検討した。

続いて、NAFLDモデルマウスに *all-trans* レチノイン酸 (ATRA) を投与し、肝鉄量、脂質代謝、インスリン抵抗性について検討した。

3. 研究の方法

(1) NAFLDモデルマウスの構築

マウスはC57BL/6Jマウス(オス、5週齢)を使用した。1週間の馴化期間の後、コリン欠乏食を12週間与えた。一方、ATRAの効果に関する検討では、高脂肪高フルクトース食(HFHF_r食)を16週間与えた後、4群に分け、それぞれに通常食(N)、ATRA添加通常食(NA)、HFHF_r食(F)、ATRA添加HFHF_r食(FA)、を4週間与えた。

(2) 遺伝子発現解析

遺伝子発現量は、Real-time RT-PCRまたはWestern blot法により評価した。

(3) 鉄および脂質の定量

組織および細胞内の非ヘム鉄は、バソフェナントロリンによる比色法により定量した。

遊離脂肪酸(NEFA)、トリグリセリド(TG)および総コレステロール(TChol)は、NEFA C-テストワコー、トリグリセライド E-テストワコー、コレステロール E-テストワコー(和光純薬工業)によってそれぞれ定量した。

(4) 血糖値、血清インスリンおよびアディポサイトカインの定量

血糖値は、尾静脈血より採血し、グルコメーター(ニプロ)により測定した。摂食時血糖値は、1、2、3、4週目に、空腹時血糖は4週目において、それぞれ測定した。

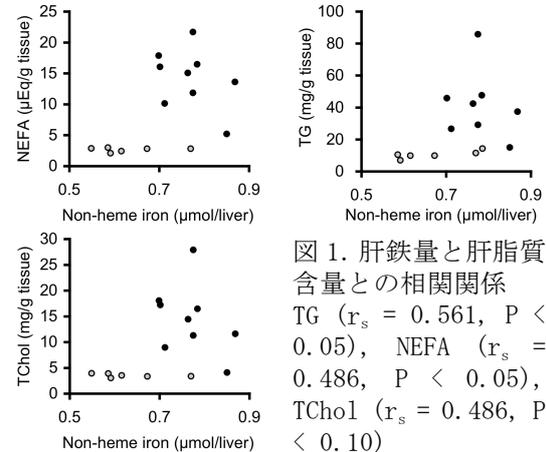
心臓より採取した血液を一晩氷上において、遠心分離により血清を回収した。血清インスリンおよびレプチン濃度は、ELISA法(株式会社シバヤギ)により定量した。

4. 研究成果

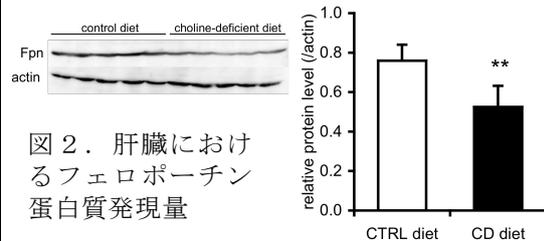
(1) コリン欠乏食誘導NAFLDモデルマウスに

おける鉄代謝と脂質代謝異常の関わり

コリン欠乏食を与えたNAFLDモデルマウスの肝鉄量および脂肪含量を定量した結果、肝鉄量と、NEFA、TG、TCholの肝含量に有意な正の相関が認められた。(図1)



さらに遺伝子発現を調べたところ、鉄代謝関連遺伝子と脂質代謝関連遺伝子の発現量は有意な正の相関関係を示し、特にフェロポーチンの発現減少はこのモデルマウスにおける鉄過剰の主要な原因であることが示唆された。



(2) 高脂肪・高フルクトース食による肝鉄過剰蓄積を伴うNAFLDモデルマウスの構築

HFHF_r食を与えてから、2、4、8、12、16、20週における肝組織中の非ヘム鉄量を測定した。その結果、HFHF_r食を与えたマウスでは2週目から8週目までの単位重量あたりの肝組織中非ヘム鉄含量は有意に亢進していた。しかしながら、脂肪肝によって肝臓の肥大化が生じるに伴い、鉄含有量は減少し、コントロール群とほぼ変わらない状態になった(図3)。そこで、肝臓における鉄過剰の時間経過と脂肪沈着の時間経過を比較したところ、脂肪沈着に先んじて肝鉄過剰が生じていることがわかった(図3)。このことから鉄の過剰沈着が脂質代謝以上を引き起こしている可能性が示唆された。

(3) 鉄による肝細胞インスリンシグナル伝達への影響

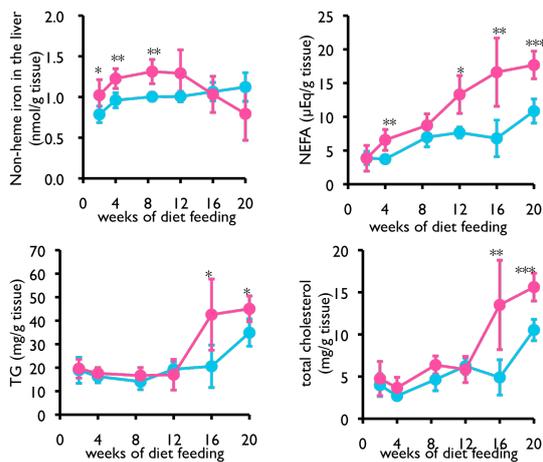


図3. HFHFr 食を与えたマウスにおける肝臓中鉄含量と脂質含量の変化

HFHFr 食群マウスでは、肝脂肪化に先だつて肝鉄量が増加することが明らかとなった。そこで、ヒト肝癌由来細胞株である HuH7 細胞を用いて、鉄と脂肪酸処理を、順序を変えて処理した。しかしながら、鉄処理後の細胞内脂肪含量、脂肪酸処理後の細胞内鉄含量ともに影響はなかった。そこでこの細胞におけるインスリンシグナル伝達因子の解析を行ったところ、鉄処理によって AKT のリン酸化が有意に亢進していることが明らかとなった。このことから、鉄は、AKT を活性化させることによって、インスリンシグナル伝達にネガティブフィードバックを誘導している可能性が示唆された。

(4) レチノイン酸による NAFLD モデルマウスに対する肝鉄量減少効果の検討

HFHFr 食を 16 週間与えたマウスに、さらに 4 週間レチノイド添加食を与え、20 週で臓器の回収および、肝臓中の非ヘム鉄量を行うこととした。しかしながら、HFHFr 食群では脂肪化にともなう肝肥大により ATRA 添加食群は脂肪肝の改善による肥大化の抑制により、単位重量あたりの肝組織中非ヘム鉄含量は HFHFr 食を与えたマウスで減少してしまい、

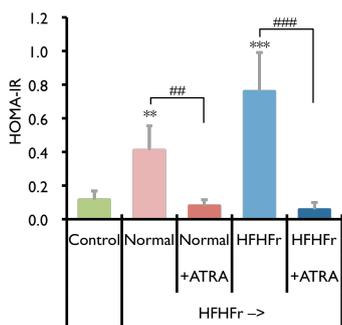


図4. ATRA による HFHFr 食誘導 NAFLD モデルマウスのインスリン抵抗性の改善

期待していた ATRA の肝鉄量抑制効果は認めることができなかった。しかしながら、マウス 1 個体の肝臓あたりの非ヘム鉄量は、ATRA 添加食群で約 60%まで減少していた。

一方、このとき ATRA 添加食を与えたマウスでは、肝脂肪沈着の有意な減少やインスリン抵抗性の改善などの効果を認めた (図4)。

(5) ATRA によるインスリン改善作用のメカニズムの解明

HFHFr マウスにおいて ATRA はインスリン抵抗性改善を介して鉄代謝の正常化をもたらしている可能性が示唆されたため、ATRA によるインスリン抵抗性メカニズムについて解明を試みた。その結果、ATRA はアディポサイトカインの一つである、レプチンに依存して肝臓におけるインスリン感受性を亢進している可能性が強く示唆された。

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 3 件)

- ① 土谷博之、他、Iron state in association with retinoid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease、Hepatology Research、査読有、40、2010、1227-1238
- ② 土谷博之、他、A close association of abnormal iron metabolism with steatosis in the mice fed a choline-deficient diet、Biological & Pharmaceutical Bulletin、査読有、33、2010、1101-1104

[学会発表] (計 5 件)

- ① 土谷博之、他、レチノイドによる NAFLD モデルマウスのインスリン抵抗性改善作用、第 46 回日本肝臓学会総会、2010 年 5 月 27-28 日、山形
- ② 土谷博之、他、レチノイン酸によるインスリン抵抗性改善作用:肝発癌抑制の一作用機序、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22-24 日、大阪
- ③ 土谷博之、他、レチノイン酸によるインスリン抵抗性改善作用メカニズムの解明、第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2010 年 10 月 30 日、枚方

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: レチノイン酸受容体リガンドによるイ

ンスリン抵抗性改善作用

発明者：汐田剛史、土谷博之

権利者：国立大学法人鳥取大学

種類：特許

出願番号：特願 2010-93241

出願年月日：平成 22 年 4 月 14 日

国内外の別：国内

○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

土谷 博之 (TSUCHIYA HIROYUKI)

京都薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00403402

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：