

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15037

研究課題名(和文)閉経女性のエストロゲン欠乏によるサルコペニア肥満のリスク増大とNrf2の抑止効果

研究課題名(英文)Increased risk for sarcopenic obesity in post-menopausal women due to estrogen deficiency and an inhibitory effect of Nrf2 activation on sarcopenic obesity

研究代表者

山縣 憲司(YAMAGATA, Kenji)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：00420084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：p62:Nrf2 double KOマウス(DKO)のNASH表現型に関する性差を検討した。DKO マウスは若齢時から徐々に体重が増加するのに対し、マウスは30週齢以降に急激に増加した。30週齢のDKO マウスでは脂肪沈着、線維化が生じていたのに対し、マウスでは脂肪沈着はと比較し軽度であり、線維化は認められなかった。DKO では30週齢において肝細胞障害の悪化が示唆された。TNF α 、IL-1 β のmRNA発現量はDKO は8週齢で増加していた。は30週齢以降に増加を認めた。DKO マウスのNASH肝病変は マウスと比較し軽度であった。この背景には女性ホルモンが重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study investigated p62:Nrf2 double knockout mice (DKO) in terms of sex differences in the NASH phenotypes. Although male DKO gradually gained weight from an early age, female DKO was found to gain weight after 30 weeks, that is the time of menopause. In liver pathology, the tissue section from the male DKO at 30 weeks showed fat deposition and fibrosis, but that from the female DKO at 30 weeks showed mild fat deposition and no fibrosis. The blood biochemistry showed the liver cell injuries in the male DKO at 30 weeks. In male DKO, the expression levels of TNF α and IL-1 β mRNA were increased at 8 weeks, but in female DKO, the expression levels were increased after 30 weeks. The phenotypes of NASH were more mild in female than in male DKO. This may be attributed to the existence of female hormones.

研究分野：口腔外科学

キーワード：生活習慣病 性差 非アルコール性脂肪性肝炎 遺伝子改変マウス エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、食生活の欧米化による肥満人口の増加に伴い、肥満や生活習慣病を背景に肝機能異常を呈する、非アルコール性脂肪性肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis: NASH)が問題となっている。また、NASHの一部は肝硬変、肝癌まで進行するため、NASHは慢性肝疾患における最大の問題となると考えられる。このため、NASH改善に有効な予防と治療法が強く要望されており、その発症機序の解明は社会的貢献度が大きい。さらに、女性は閉経後にNASHの罹患率が急増することが分かっている。これには女性ホルモンの分泌低下が関わっているとされているが、その詳細な機序は明らかではない。

(2) 当研究室で作成した *p62:Nrf2* 遺伝子二重欠損(DKO)マウスは、通常食飼育でNASHを自然発症する疾患モデルマウスである。*p62*はストレス応答タンパク質であると同時に摂食調節機構にも関与しているため、*p62*欠損マウスは過食肥満となり、メタボリックシンドロームを発症する。また、*Nrf2*は酸化ストレスに対する生体防御の中心的役割を果たす転写因子であり、*Nrf2*欠損マウスは酸化ストレス感受性が亢進し、肝臓で炎症をきたし易くなる。*p62*と*Nrf2*の遺伝子のいずれかの単独欠損ではNASHを発症しないが、両遺伝子を同時に欠損することで初めてNASHを自然発症する。DKOマウスは、過食による肥満、インスリン抵抗性、2型糖尿病を背景に加齢とともに病態が進行するというヒトNASH病態と類似したモデルマウスである。DKOマウスのNASH発症には、過食で腸内細菌叢が変化することによるLPSの産生の増大、腸管のバリア機能低下、Kupffer細胞のLPSに対する貪食能の減弱と過剰な炎症反応が重要な因子であることが、オスマウスを用いた解析で明らかになっている。一方、DKOメスマウスの病態については今まで解析が行われていなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、DKOマウスのオスとメスのNASH病態を比較検討し、NASH発症における女性ホルモンの役割を検討した。

3. 研究の方法

野生型、DKO、の8、30、50週齢において、体重、体組成、摂餌量を測定し、経時的な肥満病態の評価を行った。肝病態については、肝病理組織から脂肪沈着、炎症性細胞浸潤、線維化を評価し、肝組織の炎症性サイトカイン(TNF、IL-1)のmRNA発現量から炎症を評価し、血液生化学(ALT、AST、ALP)から肝機能の評価した。また、糖負荷試験やインスリン抵抗性の指数であるHOMA-IRから耐糖能を評価した。さらに、腸管透過性試験、血液・糞便中LPS量測定を行い、腸管のバリア機能を評価した。

4. 研究成果

(1) 体重、摂餌量に関して、DKOマウスは若齢時から徐々に増加するのに対し、マウスは30週齢以降に急激に増加した(図1)。体組成では、マウスは体重の増加に伴い内臓脂肪量、骨格筋量が増加していたが、マウスは30週齢以降で内臓脂肪量のみ急激な増加が認められた(図2)。

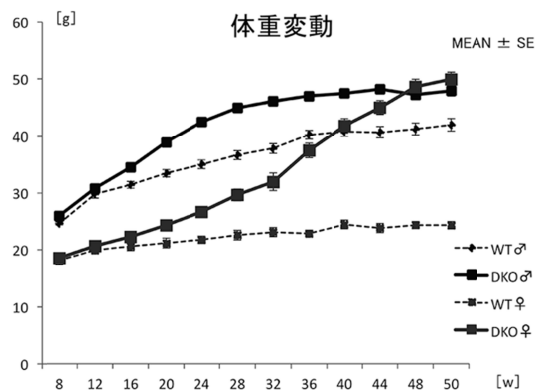


図1

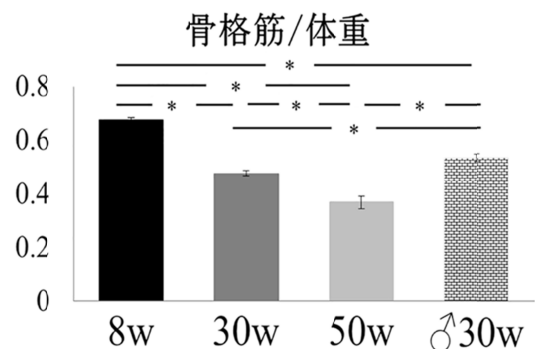


図2

(2) 肝臓病理組織所見(図3)について、8週齢ではDKO、ともに正常な組織像であった。30週齢のDKOマウスでは脂肪沈着、炎症性細胞浸潤、線維化が生じていたのに対し、マウスでは脂肪沈着はと比較し軽度であり、炎症性細胞浸潤、線維化は認められなかった。50週齢ではにおいても大滴性の脂肪沈着を認めたが、炎症性細胞浸潤、線維化はと比較し軽度であった。肝炎症性サイトカインに関して、TNF、IL-1のmRNA発現量はDKOは8週齢で野生型と比べ有意に増加していたが、DKOは8週齢では野生型と同程度であり、30週齢以降に増加を認めた(図4)。肝機能検査項目では、DKOは30週齢においてAST、ALP、が高値であり、肝細胞障害の悪化が示唆された。

(3) 耐糖能に関しては、共に8週齢時点では正常で、30週齢以降から異常が見られた(図5)。

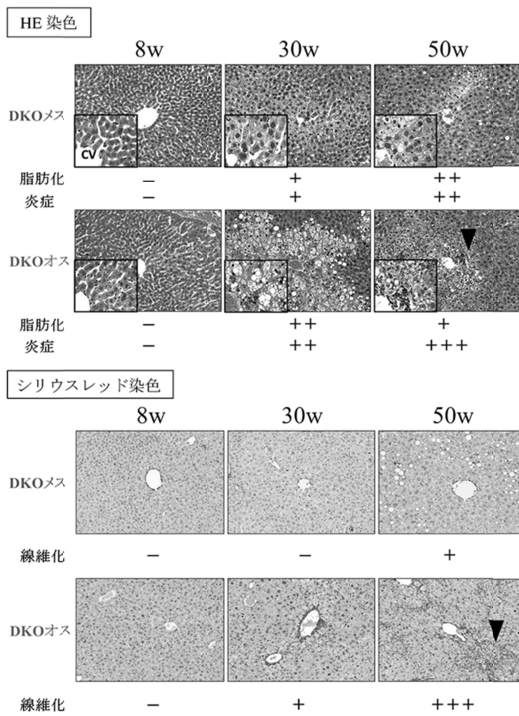


図 3

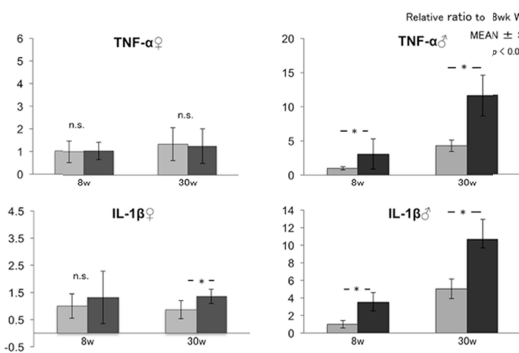


図 4

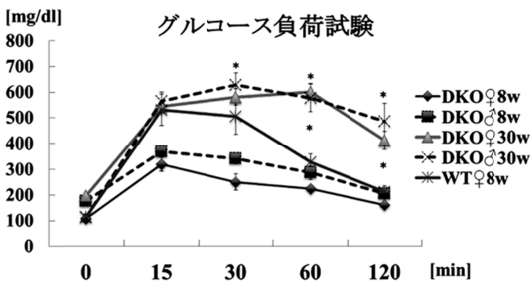


図 5

(4)腸管透過性は8週齢時点でDKO マウスと同様に も亢進していた。さらに、DKOの血清・糞便中 LPS 量も DKO と同程度まで増加していた。

(5)DKO マウスは、 マウスと比べ過食による肥満が抑制され、肝臓の脂肪沈着、炎症性細胞浸潤、線維化が軽度であった。その機序として、女性ホルモンが、過食の抑制や、腸管から流入する LPS が惹起する炎症の抑制に関わっていることが推測された。

(6)DKO マウスの NASH 肝病態は、オスと比較し、メスで軽度であり、ヒトと同様の性差が認められた。本モデルマウスは性差医学の

観点からも優れたモデル動物である。性差が生じるメカニズムを解明することで、NASHの新しい治療法の開発に繋がる可能性がある。(本研究の成果は論文作成中である)。

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 10 件)

- (1) Yamagata K, Ohki K, Uchida F, Kanno N, Hasegawa S, Yanagawa T, Bukawa H. Rare Primary Neuroendocrine Tumor (Typical Carcinoid) of the Sublingual Gland. Case Reports in Dentistry 2016 7462690, 2016. (査読有)
- (2) Yamagata K, Nagai H, Baba O, Uchida F, Kanno N, Hasegawa S, Yanagawa T, Bukawa H. A Case of Brain Abscess Caused by Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. Case Reports in Dentistry 2016 7038618, 2016. (査読有)
- (3) Baba O, Hasegawa S, Nagai H, Uchida F, Yamatoji M, Kanno NI, Yamagata K, Sakai S, Yanagawa T, Bukawa H. MicroRNA-155-5p is associated with oral squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis. J Oral Pathol 45: 248-255, 2016. (査読有)
- (4) Oh S, So R, Shida T, Matsuo T, Kim B, Akiyama K, Isoke T, Okamoto Y, Tanaka K, Shoda J. High-intensity aerobic exercise improves both hepatic fat content and stiffness in sedentary obese men with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized controlled study. Sci Rep 7: 43029, 2016. (査読有)
- (5) Ito S, Kimura S, Warabi E, Kawachi Y, Yamatoji M, Uchida F, Ishibashi-Kanno N, Yamagata K, Hasegawa S, Shoda J, Tabuchi K, Sakai S, Bukawa H, Sekido M, Yanagawa T. p62 modulates the intrinsic signaling of UVB-induced apoptosis. J Dermatol Sci 74: 9-17, 2016. (査読有)
- (6) Oh S, Tanaka K, Chiaki K, Tsujimoto T, So R, Shida T, Shoda J. Total Volume of Moderate-Vigorous Physical Activity a Week is an Important Factor Improving the Pathophysiology of Obesity-Related Liver Disease. Hepatology 61: 1205-15, 2015. (査読有)
- (7) Yamaguchi T, Yokoyama Y, Ebata T, Matsuda A, Kuno A, Ikehara Y, Shoda J, Narimatsu H, Nagino M. Verification of WFA-Sialylated MUC1 as a Sensitive Biliary Biomarker for Human Biliary Tract Cancer. Ann Surg Oncol 23: 671-677, 2016. (査読有)
- (8) Horie M, Warabi E, Komine S, Oh S, Shoda J. Cytoprotective Role of Nrf2 in Electrical

Pulse Stimulated C2C12 Myotube. PLoS One. 10: 12, 2015. (査読有)

- (9) 鈴木英雄, 山縣憲司, 柳川 徹 開業歯科医のための全身医学 UPDATE . 歯界展望 126: 1052-57, 2015. (査読無)
- (10) 吉本 尚, 柳川 徹, 山縣憲司, 大澤 亮 . 連載 歯科医院のための内科学講座 3rd BP 製剤を飲んでいる患者が来た・・・どうしたらいいの? . 補綴臨床 48: 400-413, 2015. (査読無)

〔学会発表〕(計5件)

- (1) Miho Ikeuchi, Eiji Warabi, Tsugumi Nagaoka, Syunichi Ariizumi, Masakazu Yamamoto, Junichi Shoda. The effect of female hormones on NAFLD in p62 knockout mice. 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (国際学会) 2016年02月23日~2016年02月23日 Tokyo, Japan.
- (2) Kentaro Akiyama, Eiji Warabi, Kosuke Okada, Syunnichi Ariizumi, Masakazu Yamamoto, Junichi Shoda. p62:Nrf2 double knockout mice develop steatohepatitis through the serum endotoxin overload. 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (国際学会) 2016年02月23日~2016年02月23日 Tokyo, Japan.
- (3) 池内美穂, 藤 栄治, 柳川 徹, 石井哲郎, 正田純一. 雌性 p62 遺伝子欠損マウスの表現型の解析と中高齢女性におけるメタボリック症候群の発症機序の解明 第51回日本肝臓学会総会 2015年05月21日~2015年05月22日 日航ホテル熊本, 熊本, 熊本市.
- (4) Kenji Yamagata, Toru Yanagawa, Hiroki Bukawa. A case of squamous cell carcinoma with neuroendocrine differentiation in the floor of mouth. 4th Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology (国際学会) 2015年06月03日~2015年06月06日 Kobe, Japan.
- (5) Junya Iijima, Kenji Yamagata. Cetuximab and radiotherapy for maxillary adenoid cystic carcinoma: A case report. 4th Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology (国際学会) 2015年06月03日~2015年06月06日 Kobe, Japan.

〔図書〕(計8件)

- (1) 川本 徹, 山本雅一, 正田純一. メディカルビュー社 肝胆膵 HER family: 肝内胆管癌の potential drug targets 107-114, 2016.
- (2) Shoda J, Warabi E, Okada K, Yamamoto M. Springer New Horizon of Herbal Medicines 207-224, 2016.
- (3) 正田純一. 日本臨床 生活習慣と胆道癌 膵癌・胆道癌 814-818, 2015.
- (4) 正田純一. 日本臨床 胆管細胞がんの疫学

最近肝癌学 65-71, 2015.

- (5) 正田純一. 中外医学社(東京) 胆汁酸とその分画 新・検査値のみかた 218-19, 2015.
- (6) Shoda J, Ohkohchi N. NOVA Science Publishers Epidemiology and Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. In: Hepatocellular Carcinoma 1-23, 2014.
- (7) 正田純一, 田中喜代次. 体力科学 肥満・生活習慣病と肝胆道疾患, 運動による予防と治療 総ページ数 158, 2014.
- (8) 正田純一. 中外医学社(東京) 生活習慣と胆道癌-胆管癌集団発症への対策も含めて Annual Review 消化器 2014 258-262, 2014.

〔産業財産権〕

○取得状況(計1件)

名称: 非アルコール性脂肪性肝炎および肝腫瘍自然発症モデルとしての p62 : Nrf2 遺伝子二重欠損マウスおよび該マウスを用いた方法

発明者: 藤 栄治, 正田純一, 岡田浩介, 柳川 徹, 山本雅之

権利者: 国立大学法人 筑波大学

種類: 発明特許

番号: 第 6020791

取得年月日: 平成 28 年 10 月 14 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山縣 憲司 (YAMAGATA Kenji)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 00420084

(2) 研究分担者

堀江 正樹 (HORIE Masaki)
筑波大学・医学医療系・研究員
研究者番号: 00723769

柳川 徹 (YANAGAWA Toru)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号: 10312852

磯辺 智範 (ISOBE Tomonori)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 70383643

藤 栄治 (WARABI Eiji)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 70396612

正田 純一 (SHODA Junichi)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 90241827

