

令和元年9月10日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03255

研究課題名(和文) 運動はNrf2を活性化し組織障害因子TWEAKに誘発される肥満肝疾患を改善する

研究課題名(英文) Exercise improves obesity-related liver disease through a reduction of tissue damaging factor, TWEAK by the activation Nrf2.

研究代表者

久賀 圭祐 (Kuga, Keisuke)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60241816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：NAFLDには栄養管理のみならず、骨格筋の増加や維持に向けた運動が重要である。NAFLDに対する運動療法は、種類を問わず肝脂肪蓄積を改善すること、肝の炎症・線維化の病態改善には高強度の有酸素運動が有用であった。運動の肝病態改善のメカニズムには、インスリン抵抗性の改善に加えて、運動が誘導する転写因子Nrf2の活性化を介した抗酸化ストレス作用の発動が重要であると考えられた。また、運動より分泌されるDHEAなどのホルモンは、Kupffer細胞による腸内細菌由来のエンドトキシンの生体除去を増大させ、抗炎症作用の発動も重要であった。運動は最も基本的であり継続性のあるNAFLDの予防・治療法である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NAFLDはメタボリック症候群の肝における表現型である。NAFLDでは運動療法と食事療法が予防と治療の基本となるが、その予防や治療としての運動を含む身体活動(PA)に関するエビデンスは全般的に少ない。本研究では、肝脂肪蓄積や線維化を軽減するために必要なPAの強度、頻度、時間と種類は何かの質問に回答する成果を得た。また、マウスの動物実験より、走運動は転写因子Nrf2の活性化により生体の抗炎症酸化ストレス応答を増大させ、体重減少には依存せず、NAFLDの肝病態を改善するという新しい運動の分子メカニズムを解明した。

研究成果の概要(英文)：Not only nutritional support but also exercise for maintenance and/or increase of skeletal muscles are required in the clinical management of NAFLD. Exercise is effective to reduce liver fat contents irrespective of the exercise category. Moreover, high intense aerobic exercise is found to be effective for the improvement of oxidative liver pathological conditions. The molecular mechanism underlying the observations is an exertion of antioxidative stress action through exercise-induced activation of transcription factor Nrf2, in addition to the improvement of insulin resistance. Moreover, exercise-induced secretion of DHEA, etc. increased foreign body phagocytosis of Kupffer cells and in vivo clearance of intestinal bacteria-derived endotoxin, which in turn contributed to the improvement of inflammatory liver pathological conditions. Collectively, exercise is the most basic and continuous prevention and/or treatment of NAFLD.

研究分野：スポーツ医学

キーワード：肥満 脂肪性肝疾患 運動療法 転写因子 エンドトキシン 炎症・酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) はメタボリック症候群の肝における表現型である。日常臨床では、栄養管理のみならず、骨格筋の増加や維持に向けた運動実践の実施は重要な課題である。臨床試験の結果より、NAFLD に対する運動療法は体重減少とは独立し、種類を問わず肝脂肪蓄積を改善すること、肝の炎症・線維化の病態改善には高強度の有酸素運動が有用であることが判明している。運動療法の病態改善のメカニズムには、従来からのインスリン抵抗性の改善などに加えて、運動が誘導する抗酸化ストレス作用の発動が重要な役割を演ずると考えられる。運動実践は最も基本的であり継続性のある NAFLD の予防・治療法であるが、運動療法の NAFLD 肝病態の分子メカニズムに関するエビデンスは少ない。

2. 研究の目的

- (1) 本学主催の減量教室に参加した男性肥満者をランダムに 3 群に分け、1 週間に 3 回の頻度で 12 週間にわたるレジスタンストレーニング (RT)、高強度インターバルトレーニング (HIAT)、中強度持続性トレーニング (MICT) の前向きランダム化比較試験を実施する。運動の種類の違いが、抗酸化ストレス応答転写因子 Nrf2 の活性化に及ぼす影響について検討した。
- (2) 野生マウスと過食肥満を呈する *Sqstm1* 欠失マウスに対して 12 週間の中強度運動負荷を実施し、各組織・細胞における Nrf2 活性化を経時的に解析した。
- (3) 中強度運動負荷が NASH の病理組織学的な改善について評価した。
- (4) 腸内細菌由来のエンドトキシン (LPS) に対する生体クリアランス能力について解析した。
- (5) 各マウス肝より Kupffer 細胞 (Mφ) を分離培養する。細胞実験において、蛍光ビーズの異物貪食能、表面形質マーカー (M1細胞, M2細胞) について解析した。

3. 研究の方法

(1) 臨床試験：

同意取得時の年齢が 20 歳以上、60 歳未満の男性、body mass index (BMI) が 25 以上の者、医師から運動を禁止されていない者、定期的な運動習慣がない者を対象とした。レジスタンストレーニング (RT)、中強度有酸素性トレーニング (MICT)、高強度有酸素性トレーニング (HIIT) の 3 群にランダムに割り付けた。介入期間は 3 ヶ月間、週 3 回であり、運動によるエネルギー消費量は RT 群と HIIT 群が約 170-180 kcal/回、MICT 群が約 360 kcal/回に設定した。体重、除脂肪量と体脂肪量 (DEXA)、有酸素性能力 (VO_2max) を測定し、早朝空腹時採血を行い、各種 NAFLD の病態因子を測定した。Transient elastography にて肝脂肪化 (CAP) と弾性度 (LSM) を測定した。Kupffer 細胞の異物貪食能はソナゾイドによる造影超音波を用いて評価した。また、末梢単核球を採取し各種因子の遺伝子発現を解析した。

(2) 動物実験：

走運動実験

1 週間の予備飼育後、マウスを 3 ヶ月の安静群 (3moR)、3 ヶ月の運動群 (3moTr) の 2 つのグループに分けた。運動群では小動物用トレッドミルを用いて運動負荷を行った。すべての動物実験は筑波大学における動物実験委員会の承認を得て、筑波大学動物実験取扱規定、動物の愛護及び管理に関する法律、実験動物の飼育及び保管ならびに苦痛の軽減に関する基準に準拠して行った。

標本のサンプリング

運動負荷終了から 24 時間後に体重、肝臓、精巣上体脂肪、骨格筋 (ヒラメ筋、腓腹筋、足底筋、前脛骨筋) の湿重量の測定と標本のサンプリングを行った。動物用 X 線 CT 装置による画像解析により骨格筋、内臓脂肪、皮下脂肪重量を推定した。血清標本は $-80^{\circ}C$ で保管した。

肝臓からの非実質細胞分画の分離調製と異物貪食の解析

Kupffer 細胞の貪食能を解析するために、運動負荷の終了から 1 日後に肝臓より非実質細胞分画を分離調製した。Kupffer 細胞の異物貪食能はフローサイトメトリーにて解析した。Latex beads を $0.57 \mu\text{g/body weight}$ 量で尾静脈から投与し、5 分後に Kupffer 細胞を単離した。その後、Kupffer 細胞の表面マーカーである F4/80 陽性細胞における latex beads を貪食した Kupffer 細胞の割合と、latex beads の蛍光強度を測定した。Kupffer 細胞の異物貪食に関与する表面タンパク分子の発現レベルはフローサイトメトリーにて解析した。

免疫組織化学

肝組織を採取し PBS で洗浄した後、4% パラホルムアルデヒドに浸し、24 時間後に 70% エチルアルコールで脱水した後に、パラフィンに包埋した。肝組織は $3 \mu\text{m}$ 厚のスライスにした。F4/80

anti-body を 4°C でオーバーナイトした。翌日洗浄を行い、ビオチン化ラット抗体に 30 分浸した。マイヤーヘマトキシリンで対比染色を行なった。蛍光顕微鏡を用いて観察した。

生体の LPS クリアランスの測定

運動負荷の終了から 24 時間後に、尾静脈より LPS を 0.01 μg/g body weight の容量で投与した。投与前、投与後 1.5, 3.0, 6.0, 12.0 時間のタイムポイントで血中 LPS 濃度の測定をおこなった。

サイトカイン、ステロイドホルモンとアディポカインの測定

サイトカイン (TNF-α, IL-6, and IL-10), testosterone, estradiol, corticosterone, DHEA, leptin, adiponectin の血清濃度をそれぞれ測定キットにて測定した。

細胞実験

マウス Mφ細胞株 (RAW264.7) を DMEM (Nacalai Tesque), 5% CO₂, 湿度 95%, 37°C の環境で培養した。2.5 × 10⁵ 個の RAW264.7 を 6 well プレートに播種し、24 時間のインキュベーション後、貪食能の解析を行った。0, 1.0, 5.0, 10.0 ng/ml の濃度の DHEA を添加し、12 時間培養した。Latex beads を 0.66 μl/ml の濃度になるように添加し、12 時間培養した。latex beads の蛍光強度をフローサイトメトリーにて解析した。

4. 研究成果

臨床試験

3 ヶ月間の運動実践により、RT, HIAT, MICT の 3 群において $\dot{V}O_{2max}$ は有意に増加したが、HIIT と RT 群の増加量が MICT に対して有意であった。3 群の有意な体重変化は認められなかったが、身体組成において、HIIT と RT 群が有意な除脂肪量の増加、3 群において体脂肪量が有意に減少した。RT, HIAT, MICT の 3 群のすべてにおいて、体重および内臓脂肪の減少を伴わずに、NAFLD の肝脂肪蓄積は同等の減少が認められた。肝脂肪蓄積は運動トレーニングの種類とそれらの強度に依存せずに改善することが判明した (図 1)。また、HIAT にのみ NAFLD の肝硬度の改善が認められた。Kupffer 細胞の貪食機能も高強度運動のみで改善が認められた。末梢血単核球における転写因子 Nrf2 の活性化によると推測される抗酸化ストレス応答遺伝子 (ヘムオキシゲナーゼ-1) の発現増加が認められた (図 1)。さらに、末梢血単核球の解析では、3 群とも介入前後の比較において脂肪酸代謝 (SREBP-1, FAS), M1 Mφの表面マーカー (CD11b), 炎症・免疫反応分子 (TLR4, CD14) の発現レベルが減少していた。まとめると、HIAT は NAFLD における肝の炎症病態を抑える方向に働くものと推測された。NAFLD の肝線維化の抑止に有用である。その背景には Kupffer 細胞の貪食機能とそれによる LPS の減少による炎症反応の改善が生じていると考えられた。HIAT は肝硬度が増している進行した脂肪肝に対して有用な運動プログラムであると考えられた。さらに、脂肪肝における肝病態の改善を得るためには、規則的な運動を実施し、徐々に運動強度を増加させることが重要であると考えられた。

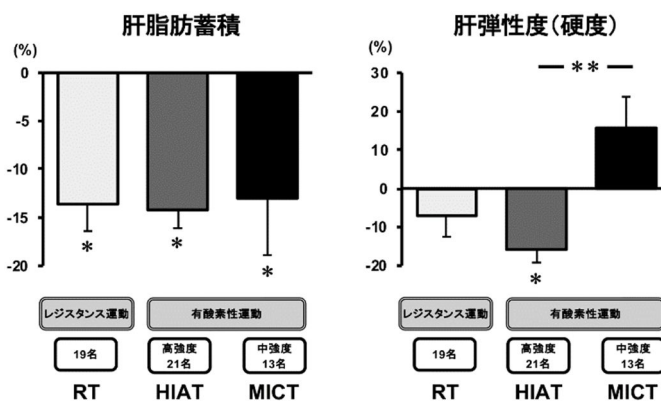


図 1: 運動の種類と肝病態 (脂肪蓄積, 肝硬度) の関係
*, 介入前後で有意差あり; **, 運動プログラムの群間で有意差あり

動物実験

運動負荷による Nrf2 活性化の *in vivo* imaging (OKD48-Tg マウス: Keap1-Nrf2 経路と発光蛋白質のルシフェラーゼを利用し、酸化ストレス・Nrf2 活性化を可視化できる) を実施したところ、走運動により、肝臓、内臓脂肪、骨格筋における Nrf2 の活性化が確認された (図 2)。

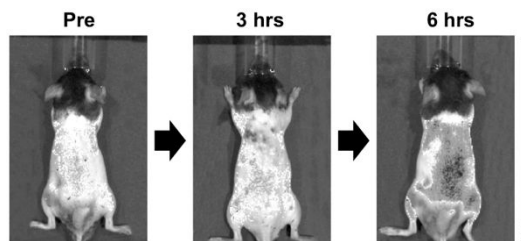


図 2: 運動負荷による Nrf2 活性化の *in vivo* imaging

In vivo 実験 野生マウスに 3 ヶ月間の走運動を負荷したところ、血中 LPS 濃度の AUC は、安静群に比して運動群では有意に減少した (図 3)。LPS 投与 1.5 時間後の TNF-α, IL-6 濃度は、安静群に比して運動群で低値を示した。Kupffer 細胞の beads 貪食能は運動群において増加した (図 4)。また、運動群において CD68, MARCO, SR-A の発現レベルは有意に増加した。各種ステロ

イドホルモンの血中濃度の変動を測定した結果、DHEA のみが運動群で増加した。In vitro 実験 RAW264.7 に DHEA (10μg/ml) を添加すると、beads 貪食能は増大し、LPS 添加による NfκB-p65 のリン酸化は有意に抑制された。中強度運動の継続は DHEA の産生増加を介して、Kupffer 細胞

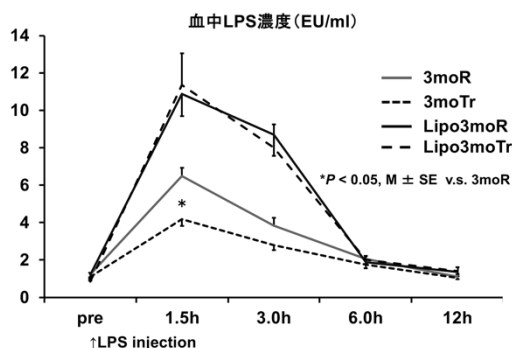


図3 : LPS に対する生体クリアランス

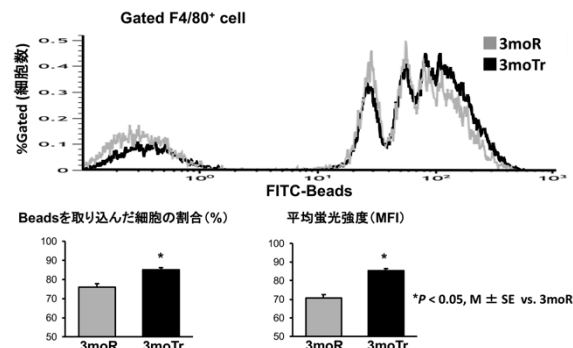


図4 : 運動負荷が Kupffer 細胞貪食能に及ぼす影響 貪食能の向上による LPS クリアランスの増大と炎症

症応答の低下を誘導した。本効果は運動が NAFLD の病態改善に有用である分子メカニズムの一つであると考えられた。

同様の走運動を過食肥満マウスの *Sqstm1* 欠失マウスの負荷したところ、Kupffer 細胞の beads 貪食能と貪食能活性マーカーである CD68 陽性細胞の割合は、WT に比して *Sqstm1* 欠失 rest において低値を示したが、運動負荷により増大した。Kupffer 細胞表面における CD11b 陽性細胞率は WT に比して *Sqstm1* 欠失 rest で増加したが、*Sqstm1* 欠失 exe では抑制された。CD206 陽性細胞率は群間で差を認めなかった。TLR4 陽性細胞率は WT に比して *Sqstm1* 欠失 rest において増加し、*Sqstm1* exe においては低値を示した。Adiponectin は *Sqstm1* 欠失 rest と *Sqstm1* 欠失 exe の両方で低値を示した。一方、DHEA は WT に比して *Sqstm1* 欠失 rest で低値を示したが *Sqstm1* 欠失 exe で増加した。

高カロリー食を摂餌させた *Sqstm1* 欠失 exe では、*Sqstm1* 欠失 rest と比較して体重・皮下脂肪量の増加が抑制され、肝腫大が有意に改善した。内臓脂肪量、骨格筋量は差が認められなかった。SAF score において、肝脂肪化に差は認められず、炎症および線維化の改善が認められた(図5)。門脈血 LPS 濃度は *Sqstm1* 欠失 rest で上昇し、*Sqstm1* 欠失 exe で低下傾向を示した。また、末梢血においても LPS は低下傾向を示した。継続的走運動は、高脂肪食摂餌 *Sqstm1* 欠失マウスの脂肪性肝炎、特に炎症と線維化の病態を改善した。継続的走運動は腸内環境の変化や Kupffer 細胞機能の改善を介して、代謝性 LPS 血症による肝への炎症性障害の軽減により、脂肪性肝炎を改善させた可能性が示唆された。

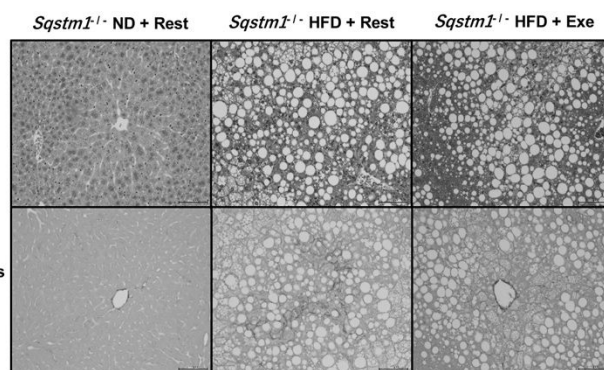


図5 : 高カロリー食を摂餌させた *Sqstm1* 欠失マウスの肝病理組織

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計16件)

1. Shida T, Oshida N, Oh S, Okada K, Shoda J. Progressive reduction in skeletal muscle mass to visceral fat area ratio is associated with a worsening of the hepatic conditions of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2019; 12: 495-503 (査読有)。
2. Oh S, Oshida N, Someya N, Maruyama T, Isoobe T, Okamoto Y, Kim T, Shoda J.: Whole body vibration for patients with nonalcoholic fatty liver disease: a 6-month prospective study. *Physiol Reps*, 2019; 7: e14062 (査読有)。
3. Omori S, Uchida F, Oh S, So R, Tsujimoto T, Yanagawa T, Sakai S, Shoda J, Tanaka K, Bukawa H. Exercise habituation is effective for improvement of periodontal disease status: a prospective intervention study. *Ther Clin Risk Manag* 2018; 14: 565-574 (査読有)。

4. Shida T, Akiyama K, Oh S, Sawai A, Isobe T, Okamoto Y, Ishige K, Mizokami Y, Yamagata K, Onizawa K, Tanaka H, Iijima H, Shoda J. Skeletal muscle mass to visceral fat area ratio is an important determinant affecting hepatic conditions of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2018; 53: 535-547 (査読有) .
5. Ishii T, Tachikawa H, Shiratori Y, Hori T, Aiba M, Kuga K, Arai T. What kinds of factors affect the academic outcomes of university students with mental disorders? A retrospective study based on medical records. *Asian J Psychiatr* 2018; 32: 67-72 (査読有) .
6. Sumitomo N, Baba R, Doi S, Higaki T, Horigome H, Ichida F, Ishikawa H, Iwamoto M, Izumida N, Kasamaki Y, Kuga K, Mitani Y, Musha H, Nakanishi T, Yoshinaga M, Abe K, Ayusawa M, Hokosaki T, Kato T, Kato Y, Ohta K, Sawada H, Ushinohama H, Yoshida S, Atarashi H, Hirayama A, Horie M, Nagashima M, Niwa K, Ogawa S, Okumura K, Tsutsui H. Guidelines for Heart Disease Screening in Schools - Digest Version. *Circ J*. 2018; 82 :2385-2444 (査読有) .
7. Igarashi M, Nogami A, Kurosaki K, Hanaki Y, Komatsu Y, Fukamizu S, Morishima I, Kaitani K, Nishiuchi S, Talib AK, Machino T, Kuroki K, Yamasaki H, Murakoshi N, Sekiguchi Y, Kuga K, Aonuma K. Radiofrequency catheter ablation of ventricular tachycardia in patients with hypertrophic cardiomyopathy and apical aneurysm. *JACC Clin Electrophysiol* 2018; 4 :339-350 (査読有) .
8. Akiyama K, Warabi E, Okada K, Shoda J. Deletion of both p62 and Nrf2 spontaneously leads to development of nonalcoholic steatohepatitis. *Experimental Animals* 2018; 67: 201-18 (査読有) .
9. Oh S, Han G, Kim B, Shoda J. Regular Exercise as a Secondary Practical Treatment for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Exercise Medicine* 2018; 2:4 doi.org/10.26644/em. 2018.004 (査読有) .
10. Oh S, So R, Shida T, Matsuo T, Kim B, Akiyama K, Isobe T, Okamoto Y, Tanaka K, Shoda J. High-Intensity Aerobic Exercise Improves Both Hepatic Fat Content and Stiffness in Sedentary Obese Men with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Reps* 2017; 7: 43029 (査読有) .
11. Komine S, Akiyama K, Warabi E, Oh S, Kuga K, Ishige K, Togashi S, Yanagawa T, Shoda J. Exercise training enhances *in vivo* clearance of endotoxin and attenuates inflammatory responses by potentiating Kupffer cell phagocytosis. *Sci Reps* 2017; 7: 11977 (査読有) .
12. Oh S, Komine S, Warabi E, Akiyama K, Ishii A, Ishige K, Mizokami Y, Kuga K, Horie M, Miwa Y, Iwawaki T, Yamamoto M, Shoda J. Nuclear factor (erythroid derived 2)-like 2 activation increases exercise endurance capacity via redox modulation in skeletal muscles. *Sci Reps* 2017; 7: 12902 (査読有) .
13. Kaneshiro T, Yoshida K, Sekiguchi Y, Tada H, Kuroki K, Kuga K, Kamiyama Y, Suzuki H, Takeishi Y, Aonuma K. Crucial role of pulmonary vein firing as an initiator of typical atrial flutter: Evidence of a close relationship between atrial fibrillation and typical atrial flutter. *J Arrhythmia* 2017; 32 : 67-72 (査読有) .
14. Tsuneoka H, Takagi M, Murakoshi N, Yamagishi K, Yokoyama Y, Xu D, Sekiguchi Y, Yamasaki H, Naruse Y, Ito Y, Igarashi M, Kitamura A, Okada T, Tanigawa T, Kuga T, et al. Long-Term Prognosis of Brugada-Type ECG and ECG With Atypical ST-Segment Elevation in the Right Precordial Leads Over 20 Years: Results From the Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS). *J Am Heart Assoc* 2016; 115: e002899 (査読有) .
15. Doki K, Sekiguchi Y, Kuga K, Aonuma K, Homma M. β 1-Adrenergic Arg389Gly polymorphism affects the antiarrhythmic efficacy of flecainide in patients with coadministration of β -blocker. *Pharmacogenetics and Genomics* 2016; 26: 481-485 (査読有) .
16. 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* 2016; 74 : 9-17 (査読有) .

〔学会発表〕（計7件）

1. 岡田浩介, 志田隆史, 正田純一. 骨格筋減少と内臓脂肪増加の体組成異常は非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) を悪化進展させる. 第54回肝臓学会総会 2018.06.14-6.15.

2. 小峰昇一, 岡田浩介, 藤 栄治, 正田純一. 過食肥満マウスにおける継続的走運動は Kupffer 細胞の異物貪食能の増大と形質変化を誘導する. 第 42 回肝臓学会東部会 2018.12.07-12.08.
3. 呉 世昶, 正田純一. NAFLD の運動療法による病態改善効果とヘパトカイン, マイオカイン, アディポカインの変動. 第 42 回肝臓学会東部会 2018.12.07-12.08.
4. 久賀圭祐. 大学における心臓検診. シンポジウム 11 (III-S11) 『学校心臓検診今後の問題』 第 53 回日本小児循環器学会総会学術集会 2017.7.7-7.9.
5. 久賀圭祐. 保健管理業務で望まれている IT 化は何か. シンポジウム 1 『情報技術 (IT) を保健センター業務に活用する』 第 18 回フィジカルヘルスフォーラム 2016.03.17-3.18.
6. 久賀圭祐, 吉原正治, 三宅 仁, 前田健一, 川村祐一郎, 高橋裕子, 富樫 整, 林 多喜王. 大学保健管理における IT 化のメリットと課題. 保健管理業務の情報処理に関する特別委員会 第 54 回全国大学保健管理研究集会 2016.10.05-10.06.
7. 岡本祐子, 諸岡治美, 簗原豪人, 坂寄俊子, 井上由美, 川崎由紀子, 黒堀沙織, 坂本 透, 金子 剛, 榎本真美, 久賀圭祐, 太刀川弘和. 保健管理センター内科における留学生受診者の現状. 第 54 回全国大学保健管理研究集会/2016.10.5-10.6.

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：柳川 徹
 ローマ字氏名：Yanagawa Toru
 所属研究機関名：筑波大学
 部局名：医学医療系
 職名：教授
 研究者番号：10312852

研究分担者氏名：酒井 俊
 ローマ字氏名：Sakai Satoshi
 所属研究機関名：筑波大学
 部局名：医学医療系
 職名：講師
 研究者番号：30282362

研究分担者氏名：磯辺智範
 ローマ字氏名：Isobe Tomonori
 所属研究機関名：筑波大学
 部局名：医学医療系
 職名：教授
 研究者番号：10312852

研究分担者氏名：藤 栄治
 ローマ字氏名：Warabi Eiji
 所属研究機関名：筑波大学
 部局名：医学医療系
 職名：講師
 研究者番号：70396612

研究分担者氏名：正田純一
 ローマ字氏名：Shoda Junichi
 所属研究機関名：筑波大学
 部局名：医学医療系
 職名：教授
 研究者番号：90241827