

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07070

研究課題名(和文) 運動惹起性アディポカインによる非アルコール性脂肪肝治療の探索

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategy with exercise-induced adipokine for nonalcoholic fatty liver disease

研究代表者

高橋 宏和 (Hirokazu, Takahashi)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：20607783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織は様々なアディポカインを分泌する内分泌臓器としての側面を有しているが、運動によるアディポカインの変化は未知であった。運動負荷を行ったマウス皮下脂肪及びヒト皮下脂肪を採取後、マイクロアレイを行い、運動惹起性アディポカイン候補を抽出した。更に具体的なアディポカイン候補を絞り込むために、マウスの合計走行距離との相関検討を行い、Tgfb2、Gas6、Gpx3、Lpl等を運動惹起性アディポカイン候補とし、肝細胞に与える影響を検討した。TGFB2やGPX3は肝細胞の代謝に有意な変化を認めなかったが、GAS6は肝細胞におけるミトコンドリア機能の活性化やGLUT2の増加を示す結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：It is well known that adipose tissue secretes several cytokines as known as adipokine; however, effect of exercise training on adipokine secretion remains unclear. We obtained the fat tissue from mice and human after training and performed microArray analysis to investigate the putative adipokines. We also analyzed correlation between running distance of mice and mRNA expression of putative adipokines in adipose tissue. Consequently, Tgfb2, Gas6, Gpx3 and Lpl were identified as candidates. TGFB2 and GPX3 recombinant protein failed to change glucose and lipid metabolism of hepatocytes, whereas GAS6 increased mitochondrial function and Glut2 expression.

研究分野：消化器病学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患 運動療法 肥満 糖尿病 アディポカイン

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH) はメタボリックシンドロームの肝臓での表現型と考えられ、単純性脂肪肝に始まり肝組織の炎症、線維化を合併し、肝硬変や肝癌へと進展する。NASH に対する薬物療法は未だ確立されておらず、他の生活習慣病と同様に食事・運動療法は効果的かつ数少ない治療選択肢の一つである。一方で重度の肥満や加齢に伴い、臨床的には運動療法の実施は困難を伴うケースが多く、我々の検討では NASH に対する 6 か月間の運動療法プログラムの達成率は約 30%にとどまる。運動療法が NASH に改善をもたらすメカニズムは不明な点が多い。我々はこれまでの研究でヒト、マウスにおける運動によって脂肪細胞から多数のリガンドが血中に放出され (アディポカイン)、全身および骨格筋における糖代謝や脂肪酸代謝を直接的に制御することを確認した。

2. 研究の目的

運動誘発性アディポカインが NASH 肝に及ぼす影響を検討し、運動療法が NASH に有効であるメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

ヒトおよびマウスの運動トレーニング負荷後に皮下脂肪組織を採取し、mRNA micro-Array 解析を行い、Secreted Protein Database を参照し分泌タンパクを検索する。抽出された候補とマウスモデルの走行距離との相関を解析し、候補 ligand の recombinant protein をマウス初代肝細胞および AML-12 cell に添加し、以下の実験・評価を行う。

1. 脂肪酸酸化および取り込み評価; 候補アディポカインの recombinant protein を至適濃度加えマウス初代肝細胞および AML-12 cell を培養したのち、14C でラベルされたパルミチン酸を投与し 60 分後にメディウムおよび細胞を回収する。メディウムは酢酸を用い CO₂ を発生させ、これを密閉容器内で hyamine に吸着させ 14C でラベルされた CO₂ をアイソトープカウンターでカウントする (パルミチン酸酸化の定量)。また細胞は脂肪酸取り込みを定量化するためホモジナイズし、脂質成分を除去後 14C をカウントする。

2. 脂質合成系の評価; 細胞を候補アディポカインの recombinant protein と共に培養後、mRNA を抽出し ACC, FAS, SREBP1c, CD36 等の脂肪酸代謝関連遺伝子の発現を解析する。また Oil Red O 染色で半定量的に評価する。また高脂肪食負荷マウスに対して recombinant protein を投与し、肝脂肪沈着、線維化の変化を検討する。

3. ミトコンドリア機能の評価; 細胞を候補アディポカインの recombinant protein と共に培養後に Seahorse analyzer を用いてミトコンドリア呼吸能を評価する。また細胞 RNA を抽出しミトコンドリア機能に関連する遺伝子群を PCR で評価する。

4. 糖新生 (肝糖放出) の評価; 細胞をアディポカインの recombinant protein で培養後に適量の基質を含んだグルコース free のメディウムに交換後、4-6 時間後にメディウムを回収。メディウム中のグルコース濃度 (肝細胞から放出されたグルコース) を定量測定し、細胞数または細胞蛋白量で normalize する。糖新生および糖取り込みに関連する遺伝子・蛋白群を PCR、ウェスタンブロット等で評価する。

4. 研究成果

1) ヒトおよびマウスの mRNA micro-Array の結果から 10 の運動惹起性アディポカイン候補を抽出した。マウス走行距離との相関は走行距離との相関検討を行った。この結果、Tgfb2 (r=0.720, p=0.0001), Gas6 (r=0.635, p=0.0008), Gpx3 (r=0.603, p=0.0018), Lpl (r=0.611, p=0.0005) などが有意な正の相関を呈した。この結果から、相関駅数の高い Tgfb2 および Gas6 でスクリーニングを行った。

2) TGF- β 2 による肝脂肪酸代謝の変化

マウス初代肝細胞に TGF- β 2 を 24 時間添加し脂肪酸酸化と取り込みを評価したところそれぞれで有意な変化を認めなかった (図 1)。また脂質合成および取り込みに関連する遺

図 1. TGF- β 2 による肝細胞における脂肪酸代謝の変化

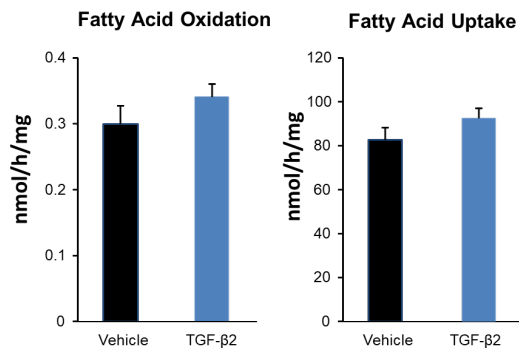
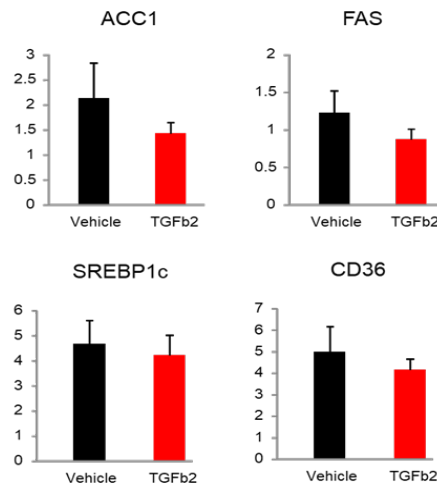


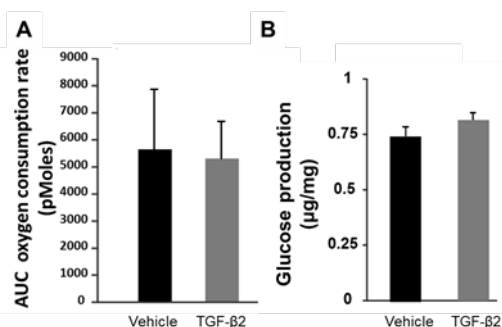
図 2. TGF- β 2 による肝脂質代謝関連遺伝子発現の変化



伝子を PCR で確認したところ有意な変化を認めなかった (図 2)。

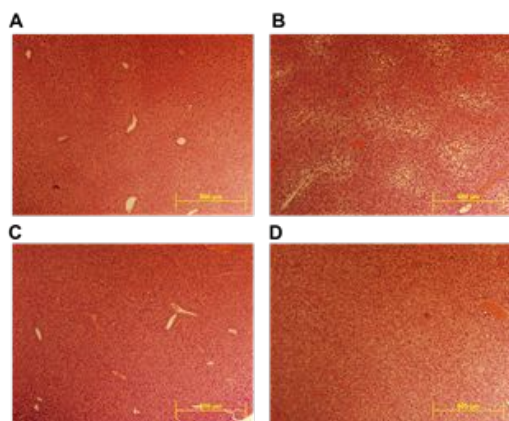
更に Seahorse analyzer によるミトコンドリア呼吸能の評価においても有意な変化を認めなかった (図 3A)。また解糖系、糖取り込み、糖新生 (図 3B) に関連する酵素の遺伝子発現においても有意な変化を認めなかった。以上の結果から TGF- β 2 は肝細胞の脂質および糖代謝には直接的な影響を及ぼさないと考えられた。

図 3 TGF- β 2 によるミトコンドリア呼吸能の変化



一方で高脂肪食負荷マウスに対する TGF- β 2 の 2 週間持続投与で、肝組織における中性脂肪量及び脂肪化領域 (図 4) は有意に減少した。更に同マウスは耐糖能の改善を認めており、肝に対する効果は二次的なものと考えられ、現在脂肪組織や骨格筋に対する TGF- β 2 の効果を検討中である。また TGF- β ファミリーは肝線維化への影響が報告されているが、TGF- β 2 投与によってマウス肝組織における肝線維化の変化を認めなかった (図 5)。

図 4 TGF- β 2 による高脂肪食マウスの脂肪肝改善 (HE 染色)

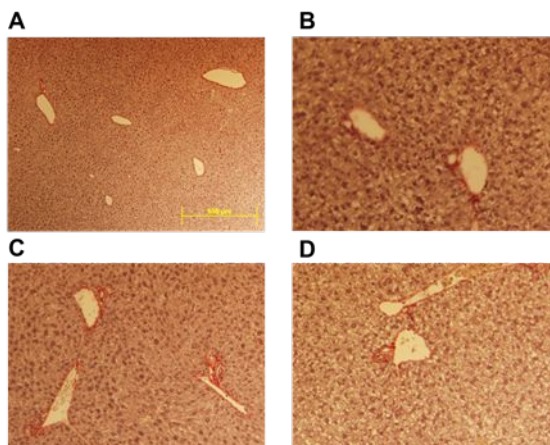


A) 通常食・vehicle 投与、B) 高脂肪食・vehicle 投与、C) 通常食・TGF- β 2 投与、D) 高脂肪食・TGF- β 2 投与。

次にアディポカイン候補の上位である Gas6 について検討を行った。Gas6 の recombinant protein (100 ng/ml) を AML12 培養肝細胞に

添加し、1 時間、6 時間、12 時間、24 時間で GLUT2) および PGC1 の発現を qPCR で確認したところ、それぞれにおいて時間依存的な発現上昇を認め、現在 in vivo での検討を継続して行っている。

図 5 TGF- β 2 による高脂肪食マウスの肝線維化評価 (Sirius red 染色)



A) 通常食・vehicle 投与、B) 高脂肪食・vehicle 投与、C) 通常食・TGF- β 2 投与、D) 高脂肪食・TGF- β 2 投与。

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 1 件)

1. Stanford KI, Lynes MD, Takahashi H, et al. 12,13-diHOME: An Exercise-Induced Lipokine that Increases Skeletal Muscle Fatty Acid Uptake. *Cell Metab.* 2018;27:1111-20.

[学会発表](計 3 件)

1. 高橋宏和, 江口有一郎, Goodyear Laurie, 安西慶三. 運動惹起性アディポカインの探索. 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2017.
2. 高橋宏和. 運動惹起性アディポカインの探索. 第 9 回分子骨格筋代謝研究会. 2017 年.
3. 高橋宏和, 江口有一郎, Goodyear Laurie, 安西慶三. 脂肪組織における運動効果と運動惹起性アディポカインの探索. 第 37 回日本肥満学会. 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋宏和 (TAKAHASHI, Hirokazu)

佐賀大学 医学部 助教

研究者番号: 20607783

(2) 研究協力者

田中 賢一 (TANAKA, Kenichi)

佐賀大学医学部 内科学講座 肝臓・糖尿病・内分泌内科
研究者番号：なし

Laurie J Goodyear
Joslin Diabetes Center
Section on Integrative Physiology and Metabolism
Harvard Medical School
研究者番号：なし

Xue Ruidan
Division of Metabolism and Endocrinology
Fudan University
研究者番号：なし