

令和元年5月27日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19686

研究課題名（和文）脂肪組織のHealthy Expansionの分子機構の解明と医学応用

研究課題名（英文）Molecular mechanism of adipose tissue healthy expansion and its medical application

研究代表者

小川 佳宏（Ogawa, Yoshihiro）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：70291424

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：SGLT2阻害薬投与により健康的に増大した「脂肪組織のHealthy Expansion」では脂肪組織自体の酸化ストレスに対する還元力の増加すること、脂肪組織中のマクロファージの性質の変化に伴ってマクロファージと脂肪細胞の相互作用により新規脂肪合成の増加の可能性があることが明らかになった。又、「脂肪組織のHealthy Expansion」に伴って肝臓異所性脂肪蓄積病変であるNASHあるいはNASH肝癌の発症を遅延させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SGLT2阻害薬投与により誘導される「脂肪組織のHealthy Expansion」の分子機構として細胞間相互作用による代謝ストレス軽減と異所性脂肪蓄積病態に対する臨床応用の可能性が明らかになった。減量による体脂肪量減少一辺倒の従来の肥満症治療とは全く発想が異なる新しい生活習慣病改善手法として、脂肪組織の健康的に増大による異所性脂肪蓄積減少を目指したNASHあるいはNASH肝癌の新しい治療戦略の開発につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：SGLT2 inhibitors, an oral antidiabetic drug, promotes urinary excretion of glucose by blocking its reabsorption in the renal proximal tubules. Our data suggest that the phenotypic switch of adipose tissue macrophages (ATMs) could mediate healthy adipose tissue expansion; treatment with an SGLT2 inhibitor downregulates the gene expression of IL-15 in stromal cells (possibly ATMs) of the adipose tissue, thereby stimulating lipogenesis in adipocytes. Furthermore, SGLT2 inhibition has prevented or at least delayed the onset of NASH and eventually NASH-related hepatocellular carcinoma in association with adipose tissue healthy expansion.

研究分野：内科学、内分泌代謝学

キーワード：脂肪組織 異所性脂肪 肝臓 NASH SGLT2阻害薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者らは既に、肥満の脂肪組織において細胞死に陥った肥大化脂肪細胞をマクロファージが貪食・処理する組織像 (crown-like structure (CLS)) に着目し、これが起点となって脂肪組織に線維化が誘導されて溢れ出した過剰の脂肪が肝臓に流入して異所性脂肪蓄積 (脂肪肝) や肝機能障害をもたらすこと、この過程に結核菌の病原体センサーである macrophage inducible C-type lectin (Mincle) が関与することを証明した (*J. Leukoc. Biol.* 88: 33-39, 2010; *Nat. Commun.* 5: e4982, 2014)。一方、皮下脂肪量の減少のために肥満の診断基準を満たさないが、相対的に内臓脂肪量が増加した「隠れ内臓脂肪蓄積」を呈するやせ体型の2型糖尿病患者では、心血管イベントや脂肪肝が高頻度であることを報告した (*BMJ Open Diab. Res. Care* 3: e000081, 2015; *Cardiovasc. Diabetol.* 14: e136, 2015; *J. Diab. Investing.* 7: 607-614, 2016)。以上により、余剰エネルギーを本来貯蔵すべき脂肪組織に十分に脂肪を蓄積できない場合、異所性脂肪蓄積が促進されると考えられた。

(2) Sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) 阻害薬は腎臓の近位尿細管におけるグルコースの再吸収を阻害する経口血糖降下薬であり、余剰エネルギーの消失に伴う体重減少が期待されている。研究代表者らは既に、SGLT2 阻害薬を投与した肥満・糖尿病マウスでは、尿中グルコース排泄による血糖降下に伴って代償的に摂食量が増加するために体重が減少しないこと、脂肪組織局所では脂肪細胞の肥大化を伴う脂肪組織重量の増加があるにもかかわらず、炎症所見が乏しく、摂取エネルギーが本来蓄積すべき脂肪組織に貯蔵され、結果として脂肪肝が改善することを見出した (*PLoS ONE* 11: e0151511, 2016)。以上により、脂肪組織の増大には、1) 肥満の脂肪組織において細胞死に陥った肥大化脂肪細胞がマクロファージにより貪食・処理され、炎症慢性化と線維化が誘導される病的な場合と、2) 脂肪の貯蔵能力が増大した肥大化脂肪細胞が積極的に余剰の脂肪を取り込んでも炎症が誘導されない生理的な場合 (脂肪組織の Healthy Expansion) の2通りがあり、見かけのサイズだけでは脂肪組織機能の判定は困難である。

2. 研究の目的

本研究課題では、肥満により病的に増大した脂肪組織と SGLT2 阻害薬投与により健康的に増大した脂肪組織を比較・検討することにより、「脂肪組織の Healthy Expansion」の概念の確立とともに分子機構の解明と医学応用を目的とする。

3. 研究の方法

研究目的の達成のために、研究計画全体を (1) 脂肪組織の Healthy Expansion の医学応用に関する研究と (2) 脂肪組織の Healthy Expansion の分子機構に関する研究の2つに分けて検討した。

(1) 脂肪組織の Healthy Expansion の医学応用に関する研究

研究代表者は既に、高脂肪食を負荷したメラノコルチン4型受容体欠損マウスを用いて、脂肪組織における慢性炎症を背景として脂肪肝からヒト NASH に酷似した肝病理組織像を経て肝細胞癌を発症する新しい NASH マウスの開発に成功した (*Am. J. Pathol.* 179: 2454-2463, 2011)。更に NASH マウスあるいはヒト NASH の肝臓において肥満の脂肪組織の CLS に類似した構造物 (hepatic CLS: hCLS) を見出し、これが起点となって慢性炎症から組織線維化を発症・進展する可能性を報告した (*PLoS ONE* 8: e82163, 2013)。本研究課題では、この NASH マウスに SGLT2 阻害薬を投与し、「脂肪組織の Healthy Expansion」による脂肪肝から NASH の発症・進展の予防・治療が可能か否かを検討した。肝臓の異所性脂肪蓄積による肝実質細胞の細胞死を起点として hCLS が形成され、NASH 様の肝病理組織像 (肝細胞風船様変性、肝細胞周囲線維化、炎症細胞浸潤) を経て肝細胞癌の発症の抑制効果を検討した。即ち、長期間の SGLT2 阻害薬の投与により、「脂肪組織の Healthy Expansion」の変化と異所性脂肪蓄積抑制、NASH と肝細胞癌の発症に対する長期的な予防・治療効果を検討した。

(2) 脂肪組織の Healthy Expansion の分子機構に関する研究

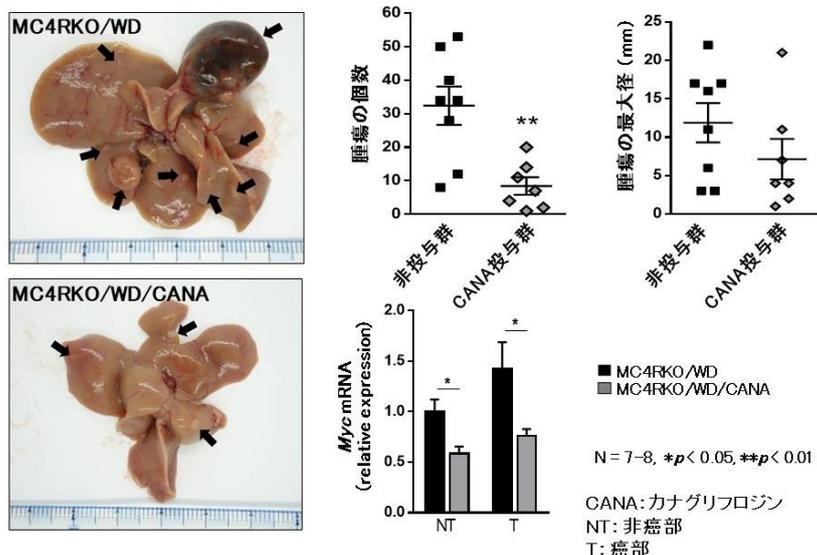
SGLT2 阻害薬を投与した肥満・糖尿病マウスの脂肪組織と肝臓、血液を採取し、DNA マイクロアレイ解析とメタボローム解析により、遺伝子発現と代謝産物の網羅的解析を実施した。遺伝子発現と代謝産物のプロファイルと血液代謝パラメーターの経時変化と相関を検討した。脂肪組織と肝臓の組織像 (脂肪組織: 脂肪細胞の肥大化、マクロファージ浸潤・線維化の程度; 肝臓: 異所性脂肪蓄積、炎症・線維化の程度) との関連を検討した。「脂肪組織の Healthy Expansion」に特徴的な遺伝子・代謝産物を選別し、3T3-L1 培養脂肪細胞を用いて脂肪細胞に対する直接作用を検討した。マウスの脂肪組織と血液サンプルを採取し、遺伝子発現プロファイルと代謝産物プロファイルと血液代謝パラメーターの経時変化と相関を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒトの病態を再現する非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) マウスに SGLT2 阻害薬カナグリフロジン投与すると代償的に摂食量が増加して体重増加の傾向が認められるが、血糖値は低下してインスリン抵抗性は改善することが明らかになった。又、精巣周囲脂肪組織重量の増加と脂肪細胞の肥大化が認められるが、炎症所見が増悪することはなく、肝臓では新規脂肪合成

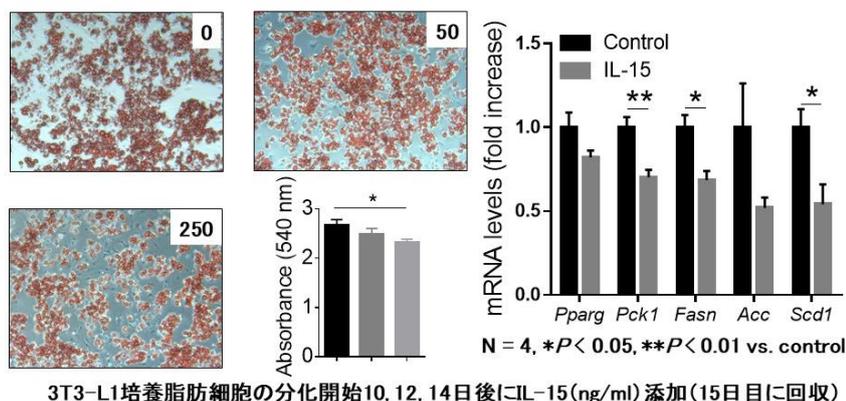
酵素あるいは炎症関連遺伝子や線維化関連遺伝子の発現の低下に伴って炎症所見と線維化が抑制されることが明らかになった（脂肪組織の Healthy Expansion）。この NASH マウスでは長期間の飼育によりほぼ全例が肝細胞癌を発症するが、1 年間の SGLT2 阻害薬投与により肝腫瘍数の減少と腫瘍の最大径は低下傾向が認められ、癌部と非癌部のいずれにおいても癌遺伝子 c-myc の発現の抑制が認められた（図 1）。以上により、脂肪組織の Healthy Expansion に伴って肝臓異所性脂肪蓄積が抑制され、脂肪肝と炎症所見・線維化に伴う NASH 肝癌の発症の遅延することが示唆された。又、SGLT2 阻害薬を投与した NASH マウスより得られる精巣周囲脂肪組織では、GSH の増加と GSSG の減少が認められ、脂肪組織の Healthy Expansion では脂肪組織において酸化ストレスに対する還元力の増加が関連する可能性が示唆された（*Sci. Rep.* 8: e2362, 2018）。

(2) SGLT2 阻害薬であるイプラグリフロジンを投与した肥満マウスの精巣周囲脂肪組織では、細胞貪食に関連



(図 1) NASHマウスにおけるSGLT2阻害薬投与実験(1年間投与)

する遺伝子発現が亢進しており、M1 マクロファージに比較して M2 マクロファージが相対的に増加することが明らかになった。更に、SGLT2 阻害薬投与に対する飢餓反応としてケトン体の増加が認められ、これに伴ってマクロファージにおける IL-15 遺伝子発現の減少とホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK; *Pck1*) と脂肪合成関連遺伝子発現の亢進が認められた。3T3-L1 培養脂肪細胞に対する IL-15 添加実験により、脂肪蓄積の減少とともに *Pck1* を含む脂肪合成酵素の遺伝子発現の低下が認められた（図 2）（*Sci. Rep.* 8: e16113, 2018）。以上により、「脂肪組織の Healthy Expansion」では、脂肪組織とマクロファージの相互作用において、脂肪組織における酸化ストレス活性が抑制され、マクロファージの形質変化が生じ、細胞死に陥った肥大化脂肪細胞に対する貪食活性が促進されること、マクロファージ由来する IL-15 の低下による脂肪細胞において脂肪合成が促進される可能性が想定され、これらにより炎症所見が軽減されて「脂肪組織の Healthy Expansion」がもたらされることが示唆された。



3T3-L1培養脂肪細胞の分化開始10, 12, 14日後にIL-15 (ng/ml) 添加(15日目に回収)

(図 2) 3T3-L1培養脂肪細胞におけるIL-15添加実験

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

K. Shiba, K. Tsuchiya, C. Komiya, Y. Miyachi, K. Mori, N. Shimazu, S. Yamaguchi, N. Ogasawara, M. Katoh, M. Itoh, T. Suganami, and Y. Ogawa. Canagliflozin, an SGLT2 inhibitor, attenuates the development of hepatocellular carcinoma in a mouse model of human NASH. *Sci. Rep.* 8: e2362, 2018.

T. Goto, M. Itoh, T. Suganami, S. Kanai, T. Sakai, M. Asakawa, I. Shirakawa, T. Yoneyama, T. Kai, and Y. Ogawa. Obeticholic acid protects against hepatocyte death and liver fibrosis in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis. *Sci. Rep.* 8: e8157, 2018.

Y. Miyachi, K. Tsuchiya, K. Shiba, K. Mori, C. Komiya, N. Ogasawara, and Y. Ogawa. A reduced M1-like/M2-like ratio of macrophages in healthy adipose tissue expansion during SGLT2

inhibition. **Sci. Rep.** 8: e16113, 2018.

[学会発表] (計11件)

小川 佳宏、臓器代謝ネットワークからみた生活習慣病の分子機構と治療戦略、**第90回日本内分泌学会学術総会** (シンポジウム) (招待講演)、2017年。

小川 佳宏、臓器代謝ネットワークからみた SGLT2 阻害薬の作用機序と「脂肪組織の Healthy Expansion」、**第60回日本糖尿病学会年次学術総会** (シンポジウム) (招待講演)、2017年。

小川 佳宏、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) : 木を診て森も診よう!、**第38回日本消化器病学会甲信越支部教育講演会** (シンポジウム) (招待講演)、2017年。

Yoshihiro Ogawa, Metabolic Organ Network in Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH), **2017 Singapore Symposium on Metabolic Diseases** (シンポジウム) (招待講演), 2017.

小川 佳宏、生活習慣病: 木を診て森も診よう!、**第108回日本消化器病学会中国支部例会・第119回日本消化器内視鏡学会中国支部例会** (特別講演) (招待講演), 2017.

小川 佳宏、生活習慣病: 木を診て森も診よう!、**第2回消化器病学会臓器間ネットワーク研究会** (招待講演) 2018.

Yoshihiro Ogawa, Obesity-induced lifestyle-related diseases: Let's see both the wood and trees!, **DMRC & Study of Drug Research of KDA** (招待講演) 2018.

Yoshihiro Ogawa, Obesity-induced lifestyle-related diseases: Let's see both the wood and trees!, **24th IUBMB Congress & 15th FAOBMB Congress** (招待講演) 2018.

小川 佳宏、生活習慣病: 木を診て森も診よう!、**第55回日本臨床生理学会総会** (招待講演)、2018.

小川 佳宏、Lifestyle-related diseases viewed through metabolic organ network、**第41回日本分子生物学会年会** (招待講演)、2018.

小川 佳宏、生活習慣病: 木を診て森も診よう!、**第46回内科学の展望** (日本内科学会) (招待講演)、2018.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

九州大学大学院医学研究院病態制御内科学 (第三内科)

<http://www.intmed3.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名: 土屋 恭一郎、伊藤 美智子、宮地 康高、柴 久美子

ローマ字氏名: Tsuchiya Kyoichiro, Itoh Michiko, Miyachi Yasutaka, Shiba Kumiko

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。