

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08478

研究課題名(和文) 脂肪細胞のインスリン-mTOR経路による代謝調節機構とNASHの病態解明

研究課題名(英文) Study for the metabolic regulation and NASH pathophysiology through the insulin-mTOR signaling

研究代表者

細岡 哲也 (Hosooka, Tetsuya)

神戸大学・医学研究科・特命准教授

研究者番号：60590594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン抵抗性を基盤とする代謝異常や非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の病態機序には不明な点が多い。PDK1はFoxO1やmTORなどの分子に情報を伝達することによりインスリンによる代謝作用の発現を担うが、代表者はPDK1とFoxO1の脂肪細胞特異的遺伝子欠損マウスを用いた解析によりPDK1-FoxO1経路の異常が脂質メディエーターLTB4を介して全身のインスリン抵抗性を惹起することを明らかとした。また新規アディポカインTSP-1のNASH病態における意義をTSP-1欠損マウスを用いて検証した。さらに脂肪細胞におけるmTOR経路の異常が代謝異常やNASHの病態の一部に関与することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、脂肪細胞のPDK1-FoxO1と呼ばれる経路の異常が全身のインスリン抵抗性や糖代謝異常、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の原因として重要であることが解明された。さらに、インスリン抵抗性のメカニズムとして脂質メディエーターLTB4が関与すること、NASHの原因として新規アディポカインTSP-1が関与する可能性が示された。本研究によって同定された分子メカニズムは、インスリン抵抗性や糖脂質代謝異常症、NASHに対する新規治療標的に資することが期待され、臨床的に有意義な成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The pathological mechanism of metabolic disorders as well as non-alcoholic steatohepatitis (NASH) based on systemic insulin resistance remained unclear. By this study using adipocyte-specific PDK1/FoxO1 deficient mice, it was shown that dysregulation of the PDK1-FoxO1 pathway causes systemic insulin resistance through the lipid mediator LTB4. The significance of the novel adipokine TSP-1 in NASH pathology was also studied using TSP-1 deficient mice. Furthermore, downregulation of the mTOR pathway in adipocytes was shown to contribute to a part of the pathology of metabolic disorders and NASH.

研究分野：代謝学

キーワード：インスリン抵抗性 代謝異常 非アルコール性脂肪性肝炎 脂肪細胞 PDK1 FoxO1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞におけるインスリン作用障害は、代謝異常に加えて非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の病態形成に中心的な役割を担うものと考えられているが、メカニズムの詳細は不明である。脂肪細胞は、脂肪合成と分解、糖取込み、アディポカインの産生と分泌といった多彩な機能を有するが、このような機能の多くは脂肪細胞のインスリンシグナルにより制御されている。PDK1 は、その下流で働く FoxO1 や mTOR などの分子に情報を伝達することによりインスリンによる代謝作用の発現を担うインスリン作用の鍵分子である。代表者は、PDK1 の脂肪細胞特異的欠損マウス (A-PDK1KO マウス) が、インスリン抵抗性に加え NASH を呈すること、PDK1 下流の転写因子 FoxO1 の脂肪細胞特異的追加欠損マウス (A-PDK1/FoxO1DKO マウス) においてインスリン抵抗性と NASH が改善することを示した。これらの改善効果はいずれも部分的であること、脂質代謝異常は改善しないことから、mTOR 経路を含む FoxO1 以外の経路も代謝制御に関与する可能性が示された。A-PDK1KO マウスおよび A-PDK1/FoxO1DKO マウスの脂肪組織を用いたリポドーム解析により、脂質メディエーター leukotriene B₄ (LTB₄) を同定し、この脂質メディエーターが、A-PDK1KO マウスのインスリン抵抗性に関与することを明らかとした。さらに、代表者は、脂肪細胞の FoxO1 が、LTB₄ の産生酵素である 5-lipoxygenase の遺伝子転写を直接制御しており、インスリン-PDK1 経路は、FoxO1 の活性抑制を介した 5-lipoxygenase の発現調節により LTB₄ 産生を負に制御するという新たなメカニズムも同時に明らかとした。一方、LTB₄ の遺伝学的・薬理的阻害実験により A-PDK1KO マウスにおける NASH に顕著な改善が認められなかったことから、NASH の病態に関わる LTB₄ 以外の液性因子の存在が想定された。

2. 研究の目的

本研究は、NASH の病態形成に関わる脂肪細胞由来分泌因子 (アディポカイン) の同定と、代謝調節における脂肪細胞の mTOR 経路の意義の解明を目的とした。

3. 研究の方法

脂肪細胞特異的 PDK1 欠損マウス (A-PDK1KO マウス) ならびに、脂肪細胞特異的 PDK1/FoxO1 ダブル欠損マウス (A-PDK1/FoxO1DKO マウス) の脂肪組織を用いたマイクロアレイ解析により網羅的遺伝子発現解析を行った。

TSP-1 の全身性遺伝子欠損マウスは Jackson Laboratory より導入した。このマウスを A-PDK1KO マウスと交配し、TSP-1 欠損バックグラウンドの脂肪細胞特異的 PDK1 欠損マウス (A-PDK1/TSP-1DKO マウス) を作出した。

肝臓の組織評価のために、肝臓のヘマトキシリン・エオジン染色ならびにマッソントリクローム染色を行った。

肝臓および脂肪組織における遺伝子発現変化はリアルタイム PCR により解析した。

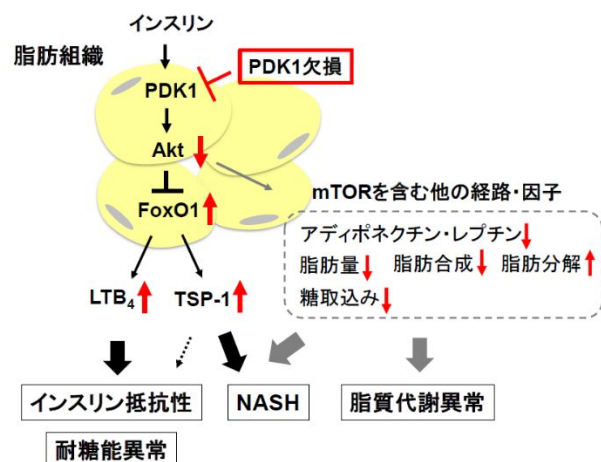
4. 研究成果

脂肪細胞の PDK1-FoxO1 経路により制御され NASH の病態に関わる新規アディポカインを同定するために、脂肪細胞特異的 PDK1 欠損マウス (A-PDK1KO マウス) ならびに脂肪細胞特異的 PDK1/FoxO1 ダブル欠損マウス (A-PDK1/FoxO1DKO マウス) の脂肪組織を用いたマイクロアレイ解析を行った。A-PDK1KO マウスにおいて増加し、A-PDK1/FoxO1DKO マウスにおいてその変化が正常化する因子のうち、最も顕著な変化を示す分泌蛋白の 1 つとして TSP-1 を見出した。リアルタイム PCR においてもマイクロアレイの結果と同様に、TSP-1 遺伝子の発現は、A-PDK1KO マウスにおいて増加し、A-PDK1/FoxO1DKO マウスにおいて正常化することが確認された。

A-PDK1KO マウスに加え、他の一般的な非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) モデルの脂肪組織における TSP-1 の発現変化についても検討したところ、KK-Ay マウスおよび高脂肪食投与マウスの脂肪組織においても TSP-1 の発現は顕著な増加を示すことを見出した。また、TSP1 の発現は、マウス組織の中では、肺を除くと脂肪組織 (内臓脂肪) に圧倒的に多いことも見出した。

そこで代表者は、TSP-1 に着目し、TSP-1 欠損マウスを用いて NASH の病態形成における TSP-1 の意義を検証した。TSP-1 欠損マウスを導入し、このマウスを脂肪細胞特異的 PDK1 欠損マウスと交配することにより TSP-1 欠損バックグラウンドの脂肪細胞特異的 PDK1 欠損マウス (A-PDK1/TSP-1DKO マウス) を作出した。20 週間の高脂肪食投与により、A-PDK1KO マウスの肝臓は明瞭な線維化を示したが、A-PDK1/TSP-1DKO マ

脂肪細胞のPDK1経路異常による代謝障害のメカニズム



ウスにおいて肝臓の線維化は有意に改善した。一方、肝臓における脂肪沈着や炎症細胞浸潤の程度は、A-PDK1KO マウスと A-PDK1/TSP-1DKO マウスの間に明瞭な差は認められなかった。肝臓の遺伝子発現変化について解析したところ、肝組織学的変化と一致して、*Col1a1*、*Col3a1*、*Timp1* などの線維化関連遺伝子の発現が A-PDK1KO マウスと比べ A-PDK1/TSP-1DKO マウスにおいて有意な低下を示した。

TGFβ は肝臓の線維化に重要な役割を担うと考えられているが、TSP1 は TGFβ に対し活性化作用を有することが知られている。我々は肝星細胞株である LX2 細胞を用いて、TGFβ 刺激あるいは TGFβ と TSP1 との共刺激を行った際の線維化に関わる遺伝子発現変化を調べた。TGFβ 刺激により線維化関連遺伝子の発現が誘導されたが、TGFβ と TSP1 との共刺激により、これらの遺伝子発現はさらに増強した。以上の結果より、TSP1 は TGFβ の作用を増強することにより肝星細胞を活性化し線維化を促進するものと考えられた。

A-PDK1KO マウスにおけるインスリン抵抗性と糖代謝異常、NASH は、A-PDK1/FoxO1DKO マウスにおいて改善するがその程度は部分的であること、また、A-PDK1KO マウスにおける脂質代謝異常は A-PDK1/FoxO1DKO マウスにおいて改善しないことから、mTOR 経路を含む他の経路の関与が想定される。A-PDK1KO マウスにおいて mTOR の活性低下が認められるが、mTOR の抑制因子である TSC1 あるいは TSC2 を追加欠損するマウスの解析により代謝調節における mTOR 経路の意義を検証する必要がある。

本研究において、脂肪細胞の PDK1-FoxO1 経路異常による NASH の病態に TSP-1 が関与することが明らかとなった。本分泌蛋白は NASH を惹起する新規アディポカインである可能性が想定される。今後、TSP-1 を標的とする NASH に対する新規治療薬の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hosooka Tetsuya, Hosokawa Yusei, Matsugi Kaku, Shinohara Masakazu, Tamori Yoshikazu, Aoki Chikako, Matsui Sho, Sasaki Tsutomu, Kitamura Tadahiro, Kuroda Masashi, Sakaue Hiroshi, Nabatame Yuko, Itoh Yoshito, Yamaguchi Kanji, Hayashi Yoshitake, Nakae Jun, Yokomizo Takehiko, Seino Susumu, Kasuga Masato, Ogawa Wataru	4. 巻 117
2. 論文標題 The PDK1-FoxO1 signaling in adipocytes controls systemic insulin sensitivity through the 5-lipoxygenase?leukotriene B4axis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 11674 ~ 11684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1921015117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nabatame Yuko, Hosooka Tetsuya, Aoki Chikako, Hosokawa Yusei, Imamori Makoto, Tamori Yoshikazu, Okamoto Ogura Yuko, Yoneshiro Takeshi, Kajimura Shingo, Saito Masayuki, Ogawa Wataru	4. 巻 1
2. 論文標題 Kruppel like factor?15 regulates fuel switching between glucose and fatty acids in brown adipocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13511	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kuramoto Naoki, Nomura Kazuhiro, Kohno Daisuke, Kitamura Tadahiro, Karsenty Gerard, Hosooka Tetsuya, Ogawa Wataru	4. 巻 11
2. 論文標題 Role of PDK1 in skeletal muscle hypertrophy induced by mechanical load	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83098-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoshino Kei, Hosooka Tetsuya, Shinohara Masakazu, Aoki Chikako, Hosokawa Yusei, Imamori Makoto, Ogawa Wataru	4. 巻 557
2. 論文標題 Canagliflozin ameliorates hepatic fat deposition in obese diabetic mice: Role of prostaglandin E2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 62 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.04.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirata Yu, Nomura Kazuhiro, Senga Yoko, Okada Yuko, Kobayashi Kenta, Okamoto Shiki, Minokoshi Yasuhiko, Imamura Michihiro, Takeda Shin'ichi, Hosooka Tetsuya, Ogawa Wataru	4. 巻 4
2. 論文標題 Hyperglycemia induces skeletal muscle atrophy via a WWP1/KLF15 axis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.124952	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Okada Kumiko, Hosooka Tetsuya, Shinohara Masakazu, Ogawa Wataru	4. 巻 505
2. 論文標題 Modulation of lipid mediator profile may contribute to amelioration of chronic inflammation in adipose tissue of obese mice by pioglitazone	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 29 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.09.081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizusaki Nao, Nomura Kazuhiro, Hosooka Tetsuya, Shiomi Masashi, Ogawa Kazuo, Tsunoda Tetsuto, Tamori Yoshikazu, Ogawa Wataru	4. 巻 65
2. 論文標題 The Novel Lipid-Lowering Drug D-47 Ameliorates Hepatic Steatosis and Promotes Brown/Beige-Like Change of White Adipose Tissue in Db/Db Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kobe J Med Sci.	6. 最初と最後の頁 E36-E43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 4件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 細岡哲也, 小川渉
2. 発表標題 脂肪細胞におけるインスリン作用不全と非アルコール性脂肪性肝炎
3. 学会等名 第6回肝臓と糖尿病・代謝研究会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田久美子, 細岡哲也, 篠原正和, 小川渉
2. 発表標題 ピオグリタゾンによる脂質メディエータープロファイルの変化は肥満マウスの脂肪組織における慢性炎症の改善に關与する
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 生天目侑子, 細岡哲也, 青木智佳子, 小川渉
2. 発表標題 KLF15はPDK4の発現調節を介して褐色脂肪細胞の解糖を抑制する
3. 学会等名 第24回アディポサイエンス・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 生天目侑子, 細岡哲也, 青木智佳子, 小川渉
2. 発表標題 KLF15はPDK4の発現調節を介して褐色脂肪細胞の解糖を抑制する
3. 学会等名 第40回日本肥満学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細岡哲也
2. 発表標題 糖尿病とサルコペニア
3. 学会等名 第56回日本糖尿病学会近畿地方会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hosooka T, Ogawa W
2. 発表標題 Insulin Signaling in Adipocytes Controls Systemic Insulin Sensitivity through the 5-L0-LTB4 Axis.
3. 学会等名 The 78th Scientific Sessions of the American Diabetes Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細岡哲也, 小川渉
2. 発表標題 脂肪細胞のインスリンシグナルによる脂質メディエーター制御
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細岡哲也, 小川渉
2. 発表標題 脂肪細胞のインスリンシグナルによる脂質メディエーター調節を介するインスリン感受性調節機構
3. 学会等名 第39回日本肥満学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芳野啓, 細岡哲也, 篠原正和, 小川渉
2. 発表標題 カナグリフロジンによるNAFLD改善効果のメカニズムの解明
3. 学会等名 第41回日本肥満学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 細岡哲也、小川渉	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 実験医学増刊 個人差の理解へ向かう肥満症研究	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
	米国	ハーバード大学	コロンビア大学