

令和 2 年 4 月 19 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15754

研究課題名（和文）運動惹起性ヘパトカインによる新規NAFLD治療とバイオマーカーの開発

研究課題名（英文）Identification of exercise induced hepatokine for treatment of NAFLD

研究代表者

高橋 宏和（Takahashi, Hirokazu）

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） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、運動によって惹起される肝由来のligand（ヘパトカイン）に着目し、マウス運動モデルの肝組織のRNAseqの解析から新規ヘパトカインHSC70を同定した。運動療法下において、ヒトNAFLD血清におけるHSC70とCTで評価した骨格筋面積の変化は正の相関を認めた。またin vitroでは、HSC70が培養ヒト肝星細胞におけるTGFβシグナリング及びコラーゲン産生の抑制をすることを同定した。HSC70は、NAFLDに対する運動療法バイオマーカーとしてのみならず、肝線維化改善を目的とした治療応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、昨今注目されながら詳細なメカニズムが不明である「NAFLDに対する運動効果」を最先端技術によって解析し、新たな治療法とバイオマーカーの可能性を示唆し、NAFLDに対する運動療法に新たな付加価値を与えた。更に世界的な肥満人口の増加を背景に、NAFLDの有病率は世界的に高く、極めて需要の多い分野に本邦発のbreak throughの可能性、発展性、創造性をもたらす可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In the current transitional study, we identified increased HSPA8 mRNA expression in the liver of trained mice using RNAseq technique. In human NAFLD, there was positive correlation between the changes in serum HSC70 protein concentration and changes in skeletal muscle area evaluated by CT scan. In human hepatic stellate cells, HSC70 negated the increase of SMAD by TGFβ and suppressed the collagen production in vitro. HSC70 can be a biomaker of the exercise training therapy in NAFLD and its therapeutic effect on hepatic fibrosis might be expected.

研究分野：肝臓病学、代謝学

キーワード：NAFLD 運動療法 肝線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病に対する運動療法の効果は、カロリー消費や骨格筋量の増加による基礎代謝の上昇、心肺機能向上や関節可動域の保持などによる日常活動度の上昇など既知の効果にとどまらず、多臓器連関を伴って多面的であることが報告されている。非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) は生活習慣病の肝臓での表現型であり、他の生活習慣病と同様に運動療法の有効性が確立されている。一方でそのメカニズムは不明な点が多く、また運動療法のアドヒアランスは概して良好であるとは言い難い。昨今、新規 NAFLD 治療薬の開発が盛んに行われているが、既に確立されている運動療法の肝臓における効果解析は、より生理的かつ確実な治療効果を有する NAFLD 治療薬開発への展開が期待される。特に NAFLD の予後因子として報告されている肝線維化への効果は重要視されている。また NAFLD に対する運動療法の実施確認や効果を可視化する血清マーカーの開発は、運動療法のアドヒアランス向上に寄与すると考えられる。

肝臓は代謝を担う臓器であるとともに、あらゆる蛋白を合成し、その一部は肝臓及び他臓器に対して内因性に作用する。このような肝由来の ligand は「ヘパトカイン」として注目されている。運動によるヘパトカインの挙動や、ヘパトカインが NAFLD 病態に与える影響は未知である。

2. 研究の目的

本研究では、運動によって惹起されるヘパトカインに着目し、運動療法による NAFLD 改善のメカニズムの解析及び NAFLD における運動療法マーカーの開発を目的としてトランスレーショナルリサーチを行った。

3. 研究の方法

1) マウスモデルにおける解析

10 週齢の雄 C57BL/6 マウスを通常ケージ又はフリーアクセスのホイールケージで 11 日間、28 日間それぞれ飼育し、肝臓を経門脈的に還流後摘出する。Total RNA を抽出し Illumina HiSeq 2500 sequencers を用いて RNAseq を行う。通常飼育マウス肝と比較し、運動マウス肝における発現遺伝子の変化を解析する。Gene Ontology 解析及び Secreted Protein Database の検索で、運動マウス肝臓において有意に発現が上昇する、分泌タンパクをコードする mRNA を候補とし、研究対象のターゲットヘパトカインを選定する。また Pathway 解析を行い、運動マウスにおいて脂肪酸合成系、炎症、線維化に関連するシグナルの挙動を検討する。

2) ヒト NAFLD における解析

画像検査で診断された NAFLD 患者を対象に、週 23 メッツ・時の自主的運動指導を 6 か月間行う。介入前後で血清を採取する。血清ヘパトカインの変化及び腹部 CT 画像解析による腰筋群面積と、血清ヘパトカインの変化の関連を検討する。

3) in vitro における機能解析

ヒト培養肝星細胞にヘパトカインを添加し、TGF- β 刺激下でのコラーゲン産生、シグナル伝達を検討する。

4. 研究成果

1) マウスモデルにおける解析

非運動マウスと比較して、11 日間及び 28 日間の運動マウスに共通して 263 遺伝子の発現上昇を認めた。分泌タンパクを転写しうる 26 の mRNA 候補を fold change および F 値から絞り込み、Hspa8 を運動惹起性 ligand の候補遺伝子として採用した (図 1)。Hspa8 は Heat shock protein (HSP) の一種である HSC70 (heat shock cognate 70) を転写する遺伝子である。HSC70 は HSP70 ファミリーに属し、HSP70 と結合し相同的に分子シャペロンとして機能するが、生活習慣病や NAFLD との関連は解明されていない。またマウス骨格筋、脂肪組織など肝以外の臓器で Hspa8 の発現上昇を認めず、HSC70 は運動惹起性ヘパトカインと想定された。また REACTOME pathway 解析では、運動マウスにおいて脂肪酸合成系、Inflammasome pathway、TGF- β -SMAD pathway の有意な低下等を認めた。マウスにおいて運動は NAFLD の脂肪化、炎症、線維化を抑制する可能性が示唆された。

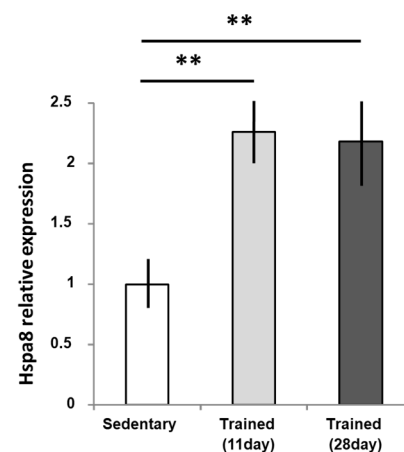


図 1. マウス肝臓 RNAseq における Hspa8 遺伝子発現. **p<0.01

2) ヒト NAFLD における解析

血中の HSC70 濃度は介入前の腹部 CT で計測した腰部骨格筋面積と有意な正の相関を呈し、また骨格筋脂肪と有意な負の相関を呈した。また運動療法における腰部骨格筋面積と血中 HSC70 の変化に正の相関を認めた(図 2)。また HSC70 増加例では肝線維化マーカーや肝脂肪化の改善を認めた(図 3)。

3) in vitro における機能解析

HSC70 はヒト培養肝星細胞における SMAD2/3 ルシフェラーゼアッセイによる検討で、TGF- β シグナリングを有意に抑制した。また HSC70 は col1a や Acta2 などコラーゲン産生関連遺伝子の発現を抑制した(図 4)。

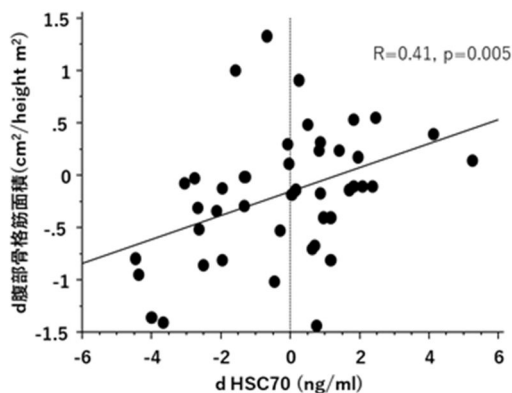


図 2. ヒト NAFLD に対する運動指導後の腰筋群面積の変化と血清 HSC70 の変化の相関

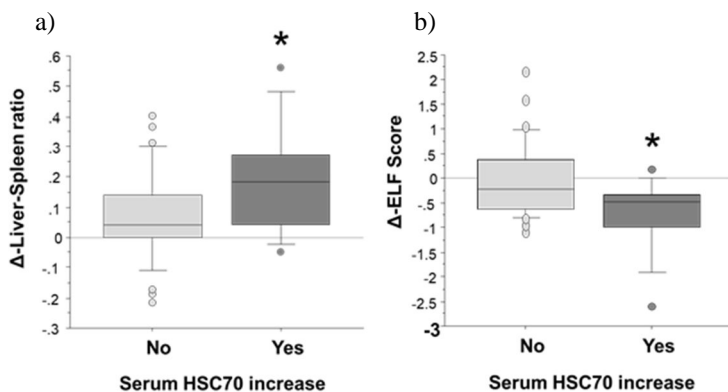


図 3. ヒト NAFLD に対する運動指導後の血中 HSC70 増加有無での a) 肝脂肪化と b) 血清線維化マーカー変化. HSC70 は baseline から 20% 以上の増加を増加群と定義. 脂肪化は CT による肝/脾 CT 値比で、線維化は ELF スコアで評価. *p<0.05

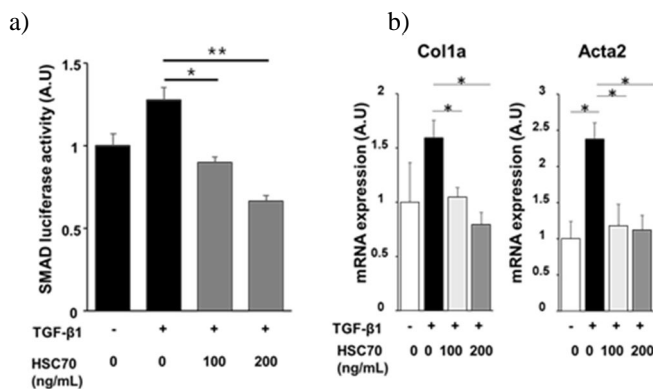


図 4. ヒト培養肝星細胞 (LX-2) における TGF- β 1 刺激の a) SMAD2/3 ルシフェラーゼアッセイ及び b) 線維化関連遺伝子発現に HSC70 が与える影響. *p<0.05 **p<0.01

以上の結果から HSC70 は運動惹起性に肝で発現し、分泌タンパクとしてヒト NAFLD の肝線維化を含む病態改善に寄与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi H, Kotani K, Tanaka K, Egucih Y, Anzai K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Therapeutic Approaches to Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Exercise Intervention and Related Mechanisms.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Endocrinol	6. 最初と最後の頁 588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2018.00588.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hirokazu Takahashi, Kenichi Tanaka, Yoichiro Kitajima, Keizo Anzai and Yuichiro Eguchi
2. 発表標題 Exercise induced hepatic HSC70 as a biomarker of exercise effect and its potential therapeutic effect on NAFLD
3. 学会等名 AASLD Liver Meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----