

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23659470

研究課題名（和文） メタボリック症候群と非アルコール性脂肪肝炎の発症機構

研究課題名（英文） Pathogenesis of metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

和田 淳 (WADA JUN)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30294408

研究成果の概要（和文）：Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (*Pemt*)の発現が肥満マウス肝臓で上昇することを見出した。*Pemt* ノックアウトマウスに高脂肪高蔗糖食を負荷したところ肥満と脂肪組織の増大が著明に改善し、インスリン抵抗性が改善され血糖が低下するが、脂肪肝炎を来し肝硬変や腺腫を発症することが判明した。*Pemt* 活性の低下は非アルコール性脂肪肝炎の発症に深く関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We identified mRNA expression of Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (*Pemt*) was up-regulated in the liver tissue of obese mice. Body weight and accumulation of adipose tissues were prominently reduced in high fat-high sucrose induced obese *Pemt* knockout mice and insulin resistance was significantly improved. However, these animals developed severe steatohepatitis and ultimately liver cirrhosis and adenomas. The reduction of *Pemt* activity is involved in the development of non-alcoholic steatohepatitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：脂肪肝炎、*Pemt*、脂肪肝炎、メタボリックシンドローム、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノラミン

1. 研究開始当初の背景
2 型糖尿病動物モデルマウスのインスリン標的臓器の発現プロファイル解析によって肥満において発現が亢進する遺伝子を検索し、phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (*Pemt*)を同定した。*Pemt* は肝臓における phosphatidylcholine (PC) 生合成酵素であり、PEMT 経路は PC 合成のマイナー経路として

知られている。KKAy マウスを用いて shRNA アデノウイルスにより肝臓の *Pemt* をノックダウンすると、随時および空腹時血糖は低下し、また糖負荷試験における血糖値の低下を認めた。また体重増加も抑制され、血清中性脂肪値や肝臓の中性脂肪含量が低下した。この *Pemt* ノックダウンマウスの肝臓では Akt リン酸化が亢進しており、インスリン感受性

が改善していた。

2. 研究の目的

2 型糖尿病動物モデルマウスのインスリン標的臓器の発現プロファイル解析によって肥満において発現が亢進する遺伝子を検索し、phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (*Pemt*)を同定した。*Pemt* は肝細胞の小胞体に局在する phosphatidylcholine (PC)生合成酵素であり、*Pemt* 経路はPC合成のマイナー経路として知られている。本研究では *Pemt* のメタボリックシンドロームにおける意義について検討する。

3. 研究の方法

Pemt KO マウスに高脂肪高蔗糖食を負荷し、野生型、ヘテロ、ホモノックアウトマウスで糖代謝・脂質代謝を検討しNASHの経過を検討した。さらに肝癌の発生については90週齢の長期にわたって検討した。

4. 研究成果

5週・25週までHF食で飼育すると、*Pemt*^{+/-}、*Pemt*^{-/-}の体重増加は *Pemt*^{+/+}と比較して夫々~17%、22%抑制された。内臓脂肪重量も *Pemt*^{-/-}では *Pemt*^{+/-}と *Pemt*^{+/+}と比較して有意に減少し、また脂肪細胞サイズの縮小も認められた。糖負荷試験およびインスリン負荷試験を行うと、*Pemt*^{+/+}マウスに比べて、*Pemt*^{+/-}マウスでは糖代謝の改善が認められ、さらに *Pemt*^{-/-}マウスでは、より強いインスリン抵抗性の改善と血糖の低下が認められた。HF 飼育 *Pemt*^{-/-}マウスでは体重当たりの摂餌量が多い一方で、酸素消費量も増加していた。ところが *Pemt*^{-/-}では著しい肝脾腫を呈し、肝組織では大脂肪滴や細胞浸潤・アポトーシス細胞や強い線維化を伴う脂肪肝炎・肝硬変を呈し、ALTが上昇していた。また cyclinD1 の著しい発現亢進を認めた。さらに高脂肪食飼育 *Pemt*^{-/-}マウス肝臓では DNA メチルが亢進し

ていた。一部のマウスでは腫瘍形成を認め、60週齢まで観察すると100%の *Pemt*^{-/-}の肝臓に多発性の腫瘍が出現し、90週齢では発癌も認めた。*Pemt* 阻害は肥満における体重や脂肪増加の抑制に対しては有効であるが、内臓脂肪および肝組織の脂質分布異常をきたし、腫瘍形成を伴う著しい脂肪肝炎を呈することが明らかとなった。

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17件)

- ① Kurose Y, Wada J, Kanzaki M, Teshigawara S, Nakatsuka A, Murakami K, Inoue K, Terami T, Katayama A, Watanabe M, Higushi C, Eguchi J, Miyatake N, Makino H. Serum galectin-9 levels are elevated in the patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *BMC Nephrol* 14, 23, 2013 (査読有)
- ② Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Tagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as a ligand for cell-surface GRP78/VDAC complex. *Circ Res* 112(5), 771-780, 2013 (査読有)
- ③ Sato-Horiguchi C, Ogawa D, Wada J, Tachibana H, Kodera R, Eguchi J, Nakatsuka A, Terami N, Shikata K, Makino H. Telmisartan attenuates diabetic nephropathy by suppressing oxidative stress in db/db mice. *Nephron Exp Nephrol* 121(3-4), e97-e108, 2013 (査読有)
- ④ Murakami K, Wada J, Ogawa D, Horiguchi CS, Miyoshi T, Sasaki M, Uchida HA,

- Nakamura Y, Makino H. The effects of telmisartan treatment on the abdominal fat depot in patients with metabolic syndrome and essential hypertension: Abdominal fat Depot Intervention Program of Okayama (ADIPO). *Diab Vasc Dis Res* 10(1), 93-96, 2013 (査読有)
- ⑤ Inoue J, Wada J, Teshigawara S, Hida K, Nakatsuka A, Takatori U, Kojo S, Akagi S, Nakao K, Miyatake N, McDonald JF, Makino H. The serum vaspin levels are reduced in Japanese chronic hemodialysis patients. *BMC Nephrol* 13(1), 163, 2012 (査読有)
- ⑥ Tachibana H, Ogawa D, Matsushita Y, Bruemmer D, Wada J, Teshigawara S, Eguchi J, Sato-Horiguchi C, Uchida HA, Shikata K, Makino H. Activation of liver x receptor inhibits osteopontin and ameliorates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 23(11), 1835-1846, 2012 (査読有)
- ⑦ Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Horiguchi CS, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Yagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin is an adipokine ameliorating ER stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex. *Diabetes* 61(11), 2823-2832, 2012 (査読有)
- ⑧ Kanzaki M, Wada J, Kikumoto Y, Akagi S, Nakao K, Sugiyama H, Makino H. The therapeutic potential of synthetic human atrial natriuretic peptide in nephrotic syndrome: a randomized controlled trial. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 5, 91-96, 2012 (査読有)
- ⑨ Kawai D, Takaki A, Nakatsuka A, Wada J, Tamaki N, Yasunaka T, Koike K, Tsuzaki R, Matsumoto K, Miyake Y, Shiraha H, Morita M, Makino H, Yamamoto K. Hydrogen-rich water prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis and accompanying hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology* 56(3), 912-921, 2012 (査読有)
- ⑩ Teshigawara S, Wada J, Hida K, Nakatsuka A, Eguchi J, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Iseda I, Matsushita Y, Miyatake N, McDonald JF, Hotta K, Makino H. Serum vaspin concentrations are closely related to insulin resistance and rs77060950 at SERPINA12 genetically defines distinct group with higher serum levels in Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 97(7), E1202-1207, 2012 (査読有)
- ⑪ Kanzaki M, Wada J, Sugiyama K, Nakatsuka A, Teshigawara S, Murakami K, Inoue K, Terami T, Katayama A, Eguchi J, Akiba H, Yagita H, Makino H. Galectin-9 and T cell immunoglobulin mucin-3 pathway is a therapeutic target for type 1 diabetes. *Endocrinology* 153(2), 612-620, 2012 (査読有)
- ⑫ Hida K, Poulsen P, Teshigawara S, Nilsson E, Friedrichsen M, Ribel-Madsen R, Grunnet L, Lund SS, Wada J, Vaag A. Impact of circulating vaspin levels on metabolic variables in elderly twins. *Diabetologia* 55(2), 530-532, 2012 (査読有)
- ⑬ Nakatsuka A, Wada J, Hida K, Hida A, Eguchi J, Teshigawara S, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Ogawa D, Kagechika H, Makino H. RXR

antagonism induces G0/G1 cell cycle arrest and ameliorates obesity by up-regulating the p53-p21^{Cip1} pathway in adipocytes. *J Pathol* 226(5), 784-795, 2012 (査読有)

- ⑭ Ogawa D, Asanuma M, Miyazaki I, Tachibana H, Wada J, Sogawa N, Sugaya T, Kitamura S, Maeshima Y, Shikata K, Makino H. High glucose increases metallothionein expression in renal proximal tubular epithelial cells. *Exp Diabetes Res* 2011:534872, 2011 (査読有)
- ⑮ Takatori Y, Akagi S, Sugiyama H, Inoue J, Kojo S, Morinaga H, Nakao K, Wada J, Makino H. Icodextrin increases technique survival rate in peritoneal dialysis patients with diabetic nephropathy by improving body fluid management: a randomized controlled trial. *Clin J Am Soc Nephrol* 6(6), 1337-1344, 2011 (査読有)
- ⑯ Matsushita Y, Ogawa D, Wada J, Yamamoto N, Shikata K, Sato C, Tachibana H, Toyota N, Makino H. Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ Inhibits Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy Through Anti-Inflammatory Mechanisms in Mice. *Diabetes* 60(3): 960-968, 2011 (査読有)
- ⑰ Sato C, Shikata K, Hirota D, Sasaki M, Nishishita S, Miyamoto S, Kodera R, Ogawa D, Tone A, Kataoka HU, Wada J, Kajitani N, Makino H. P-selectin glycoprotein ligand-1 deficiency is protective against obesity-related insulin resistance. *Diabetes* 60(1):189-99, 2011 (査読有)

[学会発表] (計3件)

- ① Wada J: Identification of transmembrane proteins expressed in adipocytes under

obese-state and the roles of soluble forms in fat accumulation. International Symposium for the Study of Obesity “Translational Science and Epidemiology on Adipomedicine; From Lipodystrophy to Obesity”, Oct 13, 2012, Shiran Kaikan of Kyoto University, Kyoto

- ② 和田淳 : PEMT deficiency protects from obesity and insulin resistance, but induces severe steatohepatitis. シンポジウム3 : 慢性炎症とインスリン抵抗性 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 2012年5月17日 横浜
- ③ 和田淳 : コレクトリンとprimary cilia シンポジウム Ciliopathies; Ciliaは細胞のconductor 第54回日本腎臓病学会学術集会 2011年6月15日 横浜

[図書] (計1件)

- ① 和田淳 : 尿検査の意義－蛋白尿－、南山堂、糖尿病×CKD診療ガイド、2012年、10-11 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 淳 (WADA JUN)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 : 30294408

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし