

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860690

研究課題名(和文) 運動による肝臓の代謝調節機構およびIL-6/STAT3/FGF21の役割の解明

研究課題名(英文) The exercise regulated hepatic metabolism and the role of IL-6/STAT3/FGF21

研究代表者

小林 正稔 (Kobayashi, Masatoshi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30396725

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)：本研究は運動による肝臓の代謝改善の分子機構を、特に運動により骨格筋から分泌されるIL-6と、肝臓で代謝を改善させるSTAT3およびFGF21に着目して明らかにし、運動模倣薬治療の端緒となることを目的とした。

その結果、運動は肝臓のIRS-2を上昇させると同時に、STAT3のリン酸化が亢進させること、また肝臓のFGF21の発現が運動によって増加すること、またこれがあらかじめIL-6の中和抗体の投与によりキャンセルされることを見出した。これら運動による肝臓の代謝改善の分子機構を、IL-6、STAT3およびFGF21等に注目し、in vitroおよびin vivoにおいてさらなる解析を行っている。

研究成果の概要(英文)： Exercise can improve hepatic metabolism. We investigate its mechanism focusing on IL-6, which is excreted from skeletal muscle by exercise, and on STAT3 and FGF21, which activate hepatic glucose and lipid metabolism, and explore an exercise-mimetic treatment.

We found that exercise increase the hepatic IRS-2 and phosphorylation of STAT3 in mice. Exercise also increases hepatic FGF21 expression, which was canceled by neutralization with anti-IL-6 antibody. We are investigating further mechanism by which exercise improve hepatic metabolism through IL-6/STAT3/FGF21 in vitro and in vivo.

研究分野：肥満、糖尿病

キーワード：運動 肝臓 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

近年肥満、糖尿病の増加が社会問題となっている。これらの背景には、高脂肪食に代表されるような食事の欧米化に加えて、運動量の減少も大きな要因となっていると考えられている。また生活習慣病の発症には、加齢が大きな要因となるが、加齢が肥満やインスリン抵抗性を招くメカニズムとして、筋肉量の減少(サルコペニア)の関与が指摘されつつある。従って、運動不足に陥りやすい現代社会において、また高齢化が進む現代において、いかに運動を実践するかということは、肥満および加齢関連疾患の対策上、非常に重要な問題であるが、加齢や健康状態によって運動療法が困難な場合や、実際には運動習慣を習慣づけることは困難な場合が少なくない。従って、運動による抗肥満・抗加齢・抗生活習慣病のメカニズムが明らかにすることによって、それらの分子を標的にするような薬剤を開発することができれば、運動効果を模倣するような恩恵に与ることができると期待される。

我々は、マウスを用いた運動実験により、肝臓のインスリン抵抗性が改善されるメカニズムの一つとして、運動によって全身で増加した何らかの因子が、肝臓のインスリン受容体基質-2(IRS-2)を増加させると同時に、STAT3 のリン酸化を亢進させることを見出した(図1)。また我々はこれまでに、肝臓のIRS-2を上昇させるメカニズムの一つとして、IL-6がsignal transducer and activator of transcription-3(STAT3)を活性化することが重要な役割を担っていることを明らかにしてきた¹。

一方、近年、肝臓で主に発現しているFGF21が、脂肪燃焼促進、糖新生を抑制する作用を持っており、糖脂質代謝を制御する重要な因子であることが明らかになりつつあり、また肥満関連疾患の治療標的としても注目を集めている。褐色脂肪組織(BAT)においては、IL-6によってFGF21の分泌が促進するという報告もあり²、我々は、肝臓の代謝が運動によって改善するメカニズムの一つとして、IL-6 - FGF21という経路が存

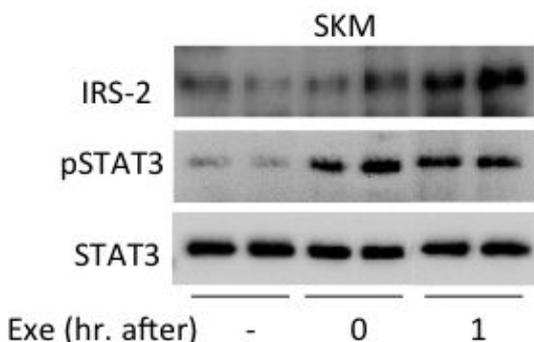


図1. C57BL/6 マウスに、単回のトレッドミル運動をさせることにより、肝臓において IRS-2 の上昇および、STAT3 のリン酸化の亢進が認められた。

在するのではないかと仮説を立てた。実際、マウスに単回のトレッドミル運動をさせる予備検討を行うと、肝臓で FGF21 の発現が上昇することを見出した。

そこで我々は、運動が肝臓の代謝を改善するメカニズムを、主に IL-6, STAT3, FGF21 といった分子に着目して明らかにし、将来的にはこれらの分子または経路を標的とする運動模倣薬の開発に繋がりたいと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究は運動が肝臓の糖代謝や脂質代謝を改善させるメカニズムを明らかにすることを目的とした。特に、運動によって骨格筋から分泌された IL-6 が、肝臓で代謝を改善させる可能性を我々は見出したこと、および IL-6 は肝臓の STAT3 のリン酸化を亢進させることにより代謝を改善させること、また IL-6 が FGF21 を制御する可能性があることから、これらの分子の役割を中心に、運動による肝臓の代謝調節機構を明らかにする。そして将来的には、これらの分子および作用経路の治療標的としての可能性を検討し、運動模倣薬の端緒を見出すことを目指した。

具体的に、本研究期間には、次の3点の検討を目指した。

- 1). 運動による骨格筋由来の IL-6 は、STAT3 経路を介して、肝臓の代謝を改善するか？
- 2). 運動による骨格筋由来の IL-6 が肝臓に与える影響は、FGF21 がその効果を担っているか？
- 3). STAT3 は FGF21 を制御するか (IL-6 - STAT3 - FGF21 という経路が存在するか)？

主に以上の仮説を検証しながら、運動が IL-6 によって肝臓の代謝を改善するメカニズムの検討を行った。

3. 研究の方法

運動が肝臓の代謝を改善する機序の一つとして、骨格筋から分泌された IL-6 による肝臓の STAT3 および FGF21 への作用を中心に検討した。In vivo においては、肝臓特異的 STAT3 欠損の影響について、Alb-Cre:STAT3-Flox マウスおよび Cre 発現アデノウイルス静注 STAT3-Flox マウスを用いて運動させることにより、糖代謝や脂質代謝の変化に伴い、FGF21 がどのように変化しているか、およびどの程度寄与しているか等を検討する。In vitro においては、培養肝細胞株や、初代肝細胞に対して、IL-6 で刺激することにより、細胞の代謝と FGF21 がどのように変化するか検討する。また STAT3 の gain of function および loss of function によっても同様の検討を行う。さらにプロモーターアッセイにより、STAT3 が FGF21 の転写を制御する可能性も検討する。

・ in vivo における肝臓特異的 STAT3 欠損

の運動効果の解析

運動によって骨格筋から分泌された IL-6 が、肝臓の代謝を改善させるメカニズムについて、in vivo で解析する。第一に我々が既に発表したデータ 1 と、最近の予備検討 (図 1、図 2) から、運動による IL-6 の作用は肝臓における STAT-3 を介する可能性があるため、これを下記の肝臓特異的 STAT3 欠損のマウスモデルを用いて検証する。また同時に、FGF21 の変化を評価することにより、IL-6 による肝臓の代謝改善作用が FGF21 によって担われている可能性を検討する。

(ア) Alb-Cre:STAT3-Flox マウス

(イ) Cre 発現アデノウイルス静注 STAT3-Flox マウス

(ア)においては、Cre-LoxP システムを用いて、アルブミンプロモーター下に Cre レコンビナーゼを発現するマウスと、STAT3 の Flox マウスをかけあわせて、肝臓特異的 STAT3 欠損マウスを作成し、このマウスを運動させ、肝臓における糖代謝および脂質代謝への影響をみると同時に、FGF21 の mRNA および蛋白の変化を検討する。

しかしながら、生下時より遺伝子が欠損した場合、様々な代償的な代謝変化の結果しか見られない可能性がある。そこで (イ) の実験系においては、STAT3 の Flox マウスに Cre レコンビナーゼを発現させるアデノウイルスを静注し、比較的急速に肝臓特異的な STAT3 を欠損させた上で、運動実験を行うことにより、二次的な代謝変化をある程度排除して観察することを目的とする。

これら in vivo における 2 つの実験系の結果を相補的に解釈し、運動による STAT3、FGF21 を介した、肝臓の代謝改善の可能性について検討する。

また、ATF-4 を介して運動がマウスおよびヒトの FGF21 を増加させるという報告もあるため 5、STAT3 経路と比較してその寄与の大きさも検討する。

in vitro/ex vivo における運動効果の分子メカニズムの解明

1) 肝細胞における IL-6 刺激実験

下記の肝細胞をレコンビナント IL-6 で刺激することにより、糖代謝・脂質代謝の変化にあわせて、FGF21 の mRNA および蛋白レベルの変化を調べる。

(ア) 培養肝細胞株 (Fao, HepG2 細胞など)

(イ) 初代培養肝細胞

2) STAT3 の gain of function および loss of function の実験を、下記のアデノウイルスを用いて、上記 1) と同様の方法で行う。

(ア) Constitutively Active STAT3 (CA-STAT3)

(イ) Dominant Negative STAT3 (DN-STAT3)

3) loss of function の実験については、必要に応じ下記の初代培養肝細胞の実験系も考慮する

(ア) Alb-Cre:Stat3-flox マウスからの初代培養肝細胞

(イ) Cre 発現ウイルスを感染させた Stat3-flox マウスの初代培養肝細胞

4) 骨格筋細胞との共培養または conditioned media 添加実験

上記の実験について、骨格筋からの IL-6 を含む液性因子が、肝臓の代謝を変化させるより生理的な条件を再現させる実験として (或は IL-6 単独での変化が乏しい場合) レコンビナント IL-6 による刺激だけでなく、培養骨格筋細胞株 (C2C12 細胞など) との共培養、または骨格筋細胞の培養上清 (conditioned media) の添加実験を考慮する。

5) IL-6 による FGF21 の制御メカニズム (STAT-3 による転写制御) の検討

我々はデータベース検索から、FGF21 のプロモーター領域に複数の STAT3 結合モチーフを見出しており、リン酸化された STAT3 が FGF21 の転写を調節している可能性がある。STAT3 による FGF21 の転写制御は未だ報告されていないため、これを検証する。FGF21 のプロモーター領域をクローニングし、プロモーターアッセイを行う。

4. 研究成果

我々は、運動が肝臓の IRS-2 を上昇させると同時に、STAT3 のリン酸化が亢進すること、また肝臓の FGF21 の発現が運動によって増加することを見出していたが、さらに、あらかじめ抗 IL-6 抗体の静脈内投与によって血中の IL-6 を中和しておくと、安静時においては FGF21 の発現が上昇し、一方で運動による FGF21 の発現上昇作用は減弱する傾向が認められた。すなわち肝臓において IL-6 が FGF21 を制御する可能性が示唆された (図 2)。

H27 年度 (最終年度) 我々は、運動によって増加する IL-6 による肝臓の代謝改善作用が、STAT-3 を介する可能性を in vivo において検証するため、肝臓特異的 STAT3 欠損 (Alb-Cre:Stat3-flox) マウスを運動させ、

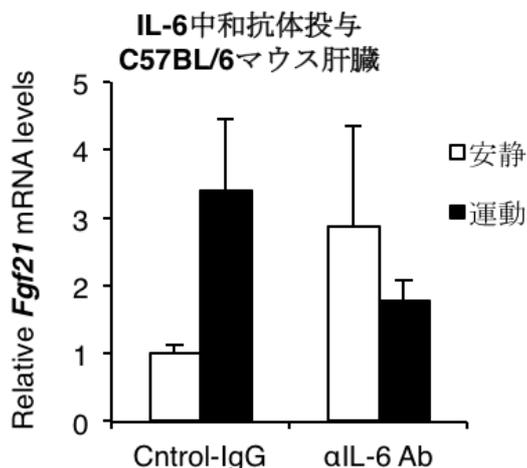


図 2. 単回のトレッドミル運動により、肝臓において FGF21 の発現が上昇した。この変化は IL-6 中和抗体の投与によりキャンセルされた。

肝臓における糖代謝および脂質代謝への影響と、FGF21 の mRNA および蛋白の変化を検討した。

また、STAT3 の Flox マウスに Cre レコンビナーゼを発現させるアデノウイルスを静注し、比較的急速に肝臓特異的に STAT3 を欠損させることにより、二次的な代謝変化をある程度排除した条件下でも同様の運動実験を行っている。

さらに、ラット肝芽腫細胞およびマウス初代培養肝細胞をレコンビナント IL-6 で刺激することによる、糖代謝・脂質代謝および FGF21 への影響を検討している。そしてこれらの結果が、Alb-Cre:Stat3-flox マウスからの初代培養肝細胞や、Stat3-flox マウス初代培養肝細胞への Cre 発現ウイルスの感染により、STAT3 を欠損させた場合、どのように変化するか検討している。

また逆に、アデノ CA-STAT3 を用いた in vitro および ex vivo における肝細胞での STAT3 過剰発現の影響も検討中である。

また、FGF21 のプロモーター領域に複数の STAT3 結合モチーフが認められることから、リン酸化された STAT3 が FGF21 の転写を調節している可能性があるため、FGF21 のプロモーター領域をクローニングし、プロモーターアッセイにて検討中である。

さらに、同様の実験を、Dominant Negative STAT3 (DN-STAT3) を発現するアデノウイルスを、野生型マウスに静注することにより、肝臓における STAT3 ノックダウンの影響について検討中である。

また逆に、Constitutively Active STAT3 (CA-STAT3) を、野生型マウスに静注することによる肝臓における STAT3 過剰発現の、代謝および脂質代謝、また FGF21 発現への影響を検討中である。

<引用文献>

1. Awazawa M, et al. Cell Metab. 2011;13:401-12.
2. Stanford KI, et al. J Clin Invest. 2013;123:215-23.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

- ・小林正稔、窪田直人、小林直樹、大杉満、笹子敬洋、戸辺一之、門脇孝、植木浩二郎：「肥満抵抗性動物モデルを用いた脂肪肝制御の検討」、第 29 回 日本糖尿病合併症学会、2014 年 10 月 3 日、都市センターホテル(東京)

〔図書〕(計 5 件)

- ・小林正稔、植木浩二郎：科学評論社、ホル

モン作用と臓器相関 FGF21 による代謝制御、内分泌・糖尿病・代謝内科 2013.2、53-59

- ・小林正稔、植木浩二郎：ニューサイエンス社、インスリン作用伝達の分子機構、Medical Science Digest 40 (1)、2014.06 274-277
- ・小林正稔、植木浩二郎：大道学館、インスリン抵抗性改善薬。臨牀と研究 92(1) 2015.01、23-30、
- ・小林正稔、植木浩二郎：日本臨牀社、糖尿病治療薬の薬効と適応基準 インスリン非分泌系薬 チアゾリジン薬。日本臨牀 73(3)、2015.03、402-408

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://dm.umin.jp/dmsd/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 正稔 (KOBAYASHI, Masatoshi)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30396725

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：