

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893080

研究課題名(和文) 老化関連疾患における、褐色脂肪不全を介した全身の代謝的リモデリング機構の解明

研究課題名(英文) The pathological role of brown adipose tissue dysfunction in age related disorders.

研究代表者

清水 逸平 (Shimizu, Ippei)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・特任准教授

研究者番号：60444056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、心不全時に生じる過剰な交感神経刺激により褐色脂肪不全が生じること、褐色脂肪移植により心不全が改善することがわかり、その詳細な分子機序を現在も解析しているところである。肥満に伴い非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の発症が増加するが、非侵襲的な診断法や特異的な治療法がなく、いまだ満たされない医療ニーズが存在する。本研究により、肥満ストレス下で褐色脂肪組織において線維化促進分子(OAFP)が存在することがマウスモデルで確認され、NASH患者や肥満NASHモデルマウスの血液中で2倍程度の上昇を確認することができた。OAFPによりNASHが増悪する詳細な機序を解析中である。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence indicates that brown adipose tissue (BAT) is the critical regulator for systemic metabolic dysfunction. Our results suggested that BAT dysfunction develops upon left ventricular pressure overload in a murine heart failure model, and causal for the progression of heart failure. BAT transplantation ameliorated cardiac dysfunction. We are currently examining to find a novel metabolites involved in disturbing cardiac metabolism with metabolome analyses. We also found that in dietary obese model, obesity associated pro-fibrotic protein (OAFP) is produced and secreted predominantly from BAT and promotes fibrosis in the liver. OAFP level in the serum was also increased in non alcoholic steatohepatitis (NASH) patients, and OAFP gain of function model promoted fibrosis in the liver. Further studies would elucidate the pathological role of OAFP in NASH.

研究分野：循環器

キーワード：褐色脂肪 心不全 肥満 NASH 褐色アディポカイン

1. 研究開始当初の背景

全身の脂肪は大きく、「白色」脂肪と「褐色」脂肪に大別することができる。私はこれまで、肥満や心不全時に白色脂肪不全を介して全身の代謝異常が生じ、これらの疾患の病態が負に制御されることを明らかにしてきた。褐色脂肪はかつて小動物や乳幼児に主に存在すると考えられていたが、最近、成人にも存在することが報告され、全身の代謝を制御する可能性を秘めた臓器であることがわかってきた。褐色脂肪組織は体重あたりの重量は低いものの、循環血液中の脂質や糖の除去に多大な貢献をしていることが報告されている。肥満により褐色脂肪の機能が低下する分子機序は不明であったが、最近私は低酸素シグナルを介して褐色脂肪組織の白色化と機能不全が生じ、全身の代謝異常が惹起されることを明らかにした。これまでの実験において行ったDNAマイクロアレイやメタボローム解析で得られた網羅的データをバイオインフォマティクス的手法で解析したところ、褐色脂肪組織は全身の恒常性を制御する活発な内分泌・代謝臓器であることがわかった。マウスに心不全や肥満モデルを作成したところ、低酸素や過剰な交感神経ストレス、肥満ストレスにより褐色脂肪組織の構造的リモデリングに加え、代謝的、機能的リモデリングが生じることも明らかとなった。予備実験の結果、機能不全に陥った褐色脂肪組織に由来する様々な代謝物質や機能性タンパク質(褐色アディポカイン)が遠隔臓器の代謝的、構造的リモデリングを引き起こす可能性が強く示唆されている。そこで、本研究において、心不全や肥満関連疾患、中でも非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の病態における褐色脂肪由来物質の病的意義の解明を目指すこととした。近年、メタボリック症候群の肝臓における表現型とされる非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)及びNASH患者の増加を認める。NAFLDの約10%は肝硬変、肝細胞癌へと進行しうるNASHに分類されるが、患者数の増加が社会問題となっている。肝臓の慢性炎症と線維化がNASHの病態で重要であるが、線維化が進行する分子機序は殆どわかっていない。予備実験にて、肥満ストレス下の褐色脂肪組織で線維化促進アディポカイン(obesity associated pro-fibrotic protein (OAFP))の発現が増加することがわかった。そこで我々は、褐色脂肪に由来すると考えられるOAFPが肝臓の線維化を促進し、NASHの病態を増悪すると考え本研究にて検証すること

とした。

重症心不全は未だに生命予後が非常に悪く、拮抗薬をはじめとする薬剤に加え、心臓再同期療法(CRT)、補助人工心臓(LVAD)や心臓移植等の集学的治療が必要となる大変困難な病態である。既存の治療コンセプトに基づく管理は既に限界に達しており、これまでとは全く異なる視点から心不全の疾患概念を再構築し、次世代の心不全治療法を開発することが急務である。本研究において、心不全の病態を全身の代謝異常という観点から捉え、主要代謝臓器の制御を介した次世代の心不全治療概念や治療法の確立を目指すこととした。体温の低下が心機能低下や心不全の予後不良因子であることが報告されている。そこで、特に、熱産生器官という機能に加え、最近全身の代謝を制御する臓器として注目されている褐色脂肪組織に着目し、心不全時に生じる褐色脂肪不全の分子機序と病態生理学的意義を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

褐色脂肪組織はこれまで単なる熱産生器官と考えられてきたが、DNAや代謝物質の網羅的データをバイオインフォマティクスの手法で解析したところ、全身の恒常性を制御する活発な内分泌・代謝臓器としての側面をもつことが明らかとなった。これまでの予備実験の結果、様々なストレスにより機能不全に陥った褐色脂肪に由来する生理活性物質が遠隔臓器の代謝的、構造的リモデリングを引き起こす可能性が強く示唆されていた。そこで本研究において、特に心不全や非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)に着目し、機能不全に陥った褐色脂肪由来生理活性物質によりこれらの疾患の病態が負に制御される分子機序の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) NASH肥満マウスの作成と標的アディポカインの機能解析:

野生型マウスに高脂肪食(肥満食)負荷を行い、NASH肥満モデルを作成する。NASH肥満モデルマウスの褐色脂肪組織で上昇する線維化促進分泌型タンパク質(obesity associated pro-fibrotic protein (OAFP))があるか検証する。肥満NASHマウスやNASH患者の血液でOAFPの発現が上昇することを確認する。マウスにおいてOAFP過剰発現モデルや、発現抑制モデル(全身KOマウスやflxedマウス)を作成し表現型を解析する。肝臓の線維化は、線維芽細胞が中心的役割を担う。肝臓線維芽細胞株に線維化促進分泌型タンパク質を添加することでカラー

ゲン産生が上昇するか検証し、NASHモデルマウスでOAFPが肝臓の線維化を促進する詳細な分子機序を検証する。

(2) 心不全における褐色脂肪不全の病的意義の解明

褐色脂肪不全発症機序の解明

左室圧負荷や心筋梗塞を用いてマウス心不全モデルを作成する。心不全モデルマウスで熱産生能が低下するか検証する。また、過剰な交感神経シグナルにより褐色脂肪細胞不全が生じるか評価する。褐色脂肪を支配する交感神経を除いたマウスに心不全を生じさせたモデルや、褐色脂肪細胞株による培養系実験も用い、心不全における褐色脂肪組織の交感神経シグナルの病的意義を検証する。

心不全における褐色脂肪不全の病的意義の解明

心不全モデルマウスに褐色脂肪移植を行い、心機能が改善するか検証する。心不全時に機能不全に陥った褐色脂肪組織内に蓄積する代謝物質をメタボローム解析で評価する。

褐色脂肪を支配する交感神経を除いたマウスに心不全モデルを作成し、心機能が改善するか検証する。

4. 研究成果

(1) NASH肥満マウスの作成と標的アディポカインの機能解析:

野生型マウスに8ヶ月高脂肪食(肥満食)負荷を行うと著しい肥満に加え肝臓の線維化が生じ、NASH肥満モデルを作成することができた。肥満マウスモデルの褐色脂肪組織を用いたDNAマイクロアレイの結果得られた候補分子のうち、肥満ストレス下で褐色脂肪組織特異的に発現が上昇する線維化促進分泌型タンパク質「OAFP」に着目し、肥満 NASH 肝臓線維化 肝硬変という一連の病態に褐色脂肪から分泌されるOAFPが関与するか検証することとした。肥満NASHマウスの褐色脂肪組織や血液、NASH患者の血液でOAFPの発現の上昇を認めた。そこで、マウスにおいてOAFP過剰発現モデルや、発現抑制モデルを作成し表現型を解析することとした。肥満マウスにPlasmid筋肉注射にてOAFP過剰発現モデルマウスを作成したところ、肝臓の繊維化が促進した。現在OAFP全身ノックアウトマウスやFloxed OAFPマウスを作成中であり、完成後詳細な解析を行う予定である。肝臓の線維化は、線維芽細胞が中心的役割を担う。そこで、肝臓線維芽細胞株にOAFPを添加したところ、上清

中のCollagen type1aが上昇することを確認することができた。以上のことから、NASHの病態において線維化促進分泌型タンパク質OAFPが重要な役割を果たす可能性が示唆される。OAFPが肥満ストレスに伴い褐色脂肪組織で発現レベルが上昇する詳細な分子機序を検証することが今後の課題である。

(2) 心不全における褐色脂肪不全の病的意義の解明

左室圧負荷を用いてマウス心不全モデルを作成した。圧負荷心不全モデルマウスでは褐色脂肪組織の細胞死が増加し、熱産生能が低下することから、心不全時には褐色脂肪不全が生じると考えられた。心筋梗塞モデルマウスにおいても褐色脂肪組織の細胞死が増加し、熱産生能が低下することを確認することができた。また、カテコラミン長期投与モデルを作成したところ、心機能が低下しないものの褐色脂肪組織の細胞死が増加し、熱産生能が低下することから、心不全時には過剰な交感神経刺激により褐色脂肪不全が生じると考えられる。

また、心不全時に機能不全に陥った褐色脂肪組織内に蓄積する代謝物質をメタボローム解析で評価したところ、様々な代謝異常が生じることがわかった。現在心不全時に、心筋代謝障害を惹起する代謝物質の同定を行っているところである。心不全モデルマウスに褐色脂肪移植を行うと心機能が改善すること、褐色脂肪を支配する交感神経を除神経したマウスに圧負荷モデルを作成すると心機能低下が改善することがわかった。これらの結果から心不全時には褐色脂肪不全が生じ、褐色脂肪で処理される何らかの代謝経路の異常が生じ、心筋代謝の恒常性を負に制御する代謝物質が褐色脂肪から漏出することで心筋代謝リモデリングが進行する可能性が高いと考えられる。以上の結果は、褐色脂肪の恒常性を制御することで心不全の病態が改善する可能性を示唆しており、詳細な分子機序の解明の検証を継続して行っているところである。

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2件) 全て査読あり

1. Shimizu I, Walsh K. *Curr Obes Rep.* 2015 June 4;(2):224-229. Whitening of brown fat and implications for weight management in obesity.
2. Shimizu I, Yoshida Y, Minamino T*.

Int Heart J. (IF 1.073) 2015 May 13;56(3):255-9. Pathological role of adipose tissue dysfunction in cardio-metabolic disorders.

〔学会発表〕(計4件)

1. **清水逸平**、吉田陽子、南野徹、ワークショップ、心不全、肥満における脂肪不全の意義、第38回日本分子生物学会年会、2015年12月2日、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)
2. **Shimizu I**, Symposium, The pathological role of aging signaling in cardio-metabolic disorders. Annual Summer Symposium of the Basic Science study group, branch of the Korean Society of Cardiology, 2015, August 21-22, Osong(Korea).
3. **Shimizu I**, Symposium, The pathological role of aging signaling in heart failure. 28th Spring Congress of Korean Diabetes Association, 2015, May7-9, Gwangju, (Korea).
4. **Shimizu I**, Invited lecture, The pathological role of adipose tissue dysfunction in cardio-metabolic disorders. Inje University, 2015, May6, Busan, (Korea).

〔図書〕(計2件)

1. **清水逸平**、南野徹、メディカルレビュー社、Anti Aging Medicine、褐色脂肪とアンチエイジング、2015年Vol.11、No4、65-69
2. **清水逸平**、南野徹、血管医学、老化疾患における血管代謝ニッシェの変容と臓器記憶の形成、2015年12月Vol16/No.4、43-47

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：非アルコール性脂肪性肝炎治療剤

発明者：清水逸平、南野徹

権利者：国立大学法人新潟大学

種類：特許

番号：特願2015-202418

出願年月日：平成27年10月13日

国内外の別：国内

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 逸平 (Shimizu Ippei)

新潟大学医歯学総合研究科 特任准教授

研究者番号：60444056

(2)研究分担者 該当なし

(3)連携研究者 該当なし