

# 研究成果報告書

「非アルコール性脂肪性肝炎における新規アディポカインの意義と分子機構の解明」

神戸大学大学院医学研究科

細岡 哲也

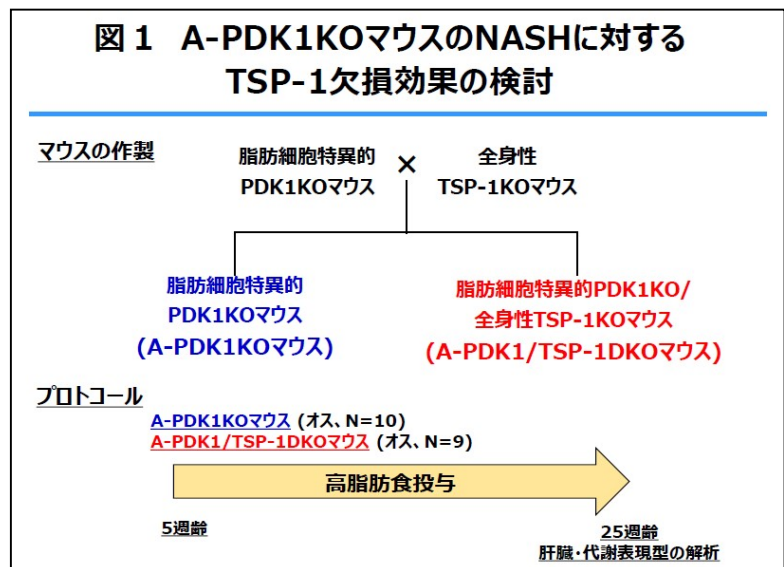
## 研究の背景と目的

非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）は、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の10-20%を占め、肝硬変や肝がんなどの重篤な病態へと進展し得る予後不良な慢性肝疾患である。NASH患者数は、人口の2~3%と推計されており、今後さらに増加すると考えられている。NASHは肥満に高率に合併することから、その病態に脂肪組織-肝臓連関の異常が関与すると想定されているが、NASHのメカニズムは不明であり、特異的な治療薬の開発にも至っていない。

肥満の脂肪組織において認められるインスリン作用障害、すなわち脂肪組織におけるインスリン抵抗性は、全身のインスリン抵抗性や糖脂質代謝異常に加え、NAFLD/NASHの病態にも関与するものと考えられている。研究代表者は、これまでに、インスリンシグナルの鍵キナーゼであるPDK1 (3'-phosphoinositide-dependent kinase 1) の脂肪細胞特異的欠損マウス (A-PDK1KOマウス) を作成し、本マウスがインスリン抵抗性、高血糖に加えNASHを呈すること、PDK1下流の転写因子FoxO1を脂肪細胞特異的に追加欠損するマウス (A-PDK1/FoxO1DKOマウス) において、インスリン抵抗性、高血糖に加えNASHが改善することを示した。そして、両マウスを用いたリピドーム解析により脂質メディエーターLTB<sub>4</sub>を同定し、脂肪細胞のPDK1-FoxO1経路が5-lipoxygenaseの転写調節によりLTB<sub>4</sub>の産生を抑制するという新たなメカニズムを示した (Hosooka T et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 117: 11674-11684, 2020.)。しかしながら、LTB<sub>4</sub>の薬理的・遺伝学的な阻害実験において、A-PDK1KOマウスのインスリン抵抗性は改善したが、NASHに顕著な改善は認められなかったことから、NASHの病態にはLTB<sub>4</sub>以外の液性因子が関与することが示唆された。本研究では、脂肪細胞のPDK1-FoxO1経路により制御されNASH病態に関与するアディポカインの同定を目指した。

## 研究方法・研究内容

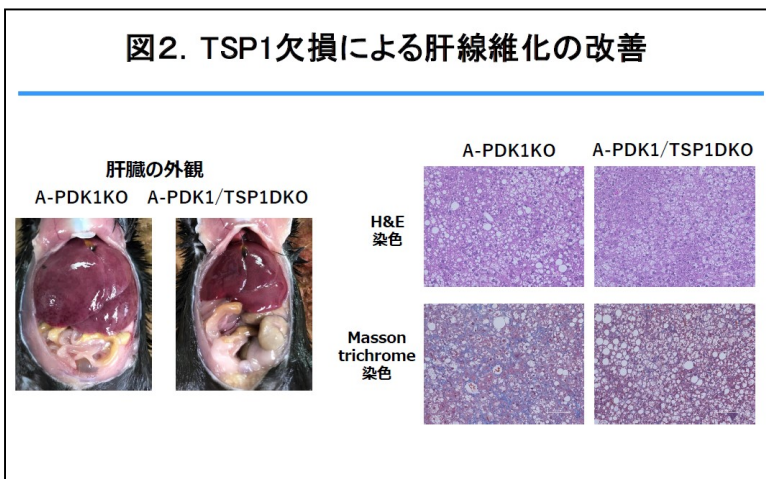
脂肪細胞のPDK1-FoxO1経路とNASHとを繋ぐ遠隔メカニズムを明らかにするために、NASHを示す脂肪細胞特異的PDK1欠損マウス (A-PDK1KOマウス) および、NASHが改善する脂肪細胞特異的PDK1/FoxO1ダブル欠損マウス (A-PDK1/FoxO1DKOマウス) の脂肪組織を用いたマイクロアレイ解析を行った。その結果、A-PDK1KOマウスにおいて発現が増加し、NASHの改善を示すA-PDK1/FoxO1DKOマウスに



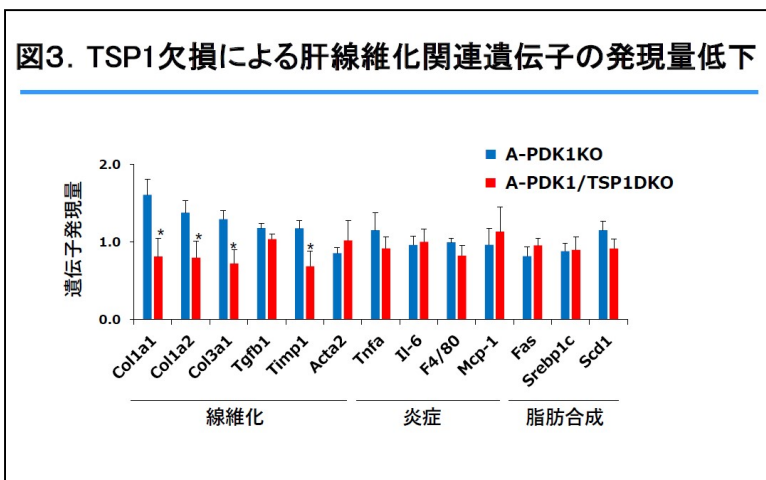
において、その変化が正常化する因子として、マトリックス細胞タンパク質TSP-1を見出した。TSP-1は、マウス組織のうち、脂肪組織とりわけ内臓脂肪組織に発現が多く、肺以外の他の組織には発現が少ないという特徴的な発現分布を示した。さらに、A-PDK1KOマウス以外の一般的なNAFLDモデルマウスである高脂肪食摂取マウスおよびKK-Ayマウスの脂肪組織において、TSP-1遺伝子発現の顕著な増加が認められた。

研究代表者は、NASHにおけるTSP-1の病態生理学的意義を検証するために、Jackson Laboratoryより全身性TSP-1ノックアウトマウス (Stock No: 006141) を導入し、A-PDK1KOマウスとの交配により、TSP-1欠損バックグラウンドの脂肪細胞特異的PDK1欠損 (A-PDK1/TSP-1DKO) マウスを作成した (図1)。

20週間の高脂肪食投与によりA-PDK1KOマウスの肝重量は著しく増加し、組織学的に明瞭な線維化を示したが、A-PDK1/TSP-1DKOマウスにおいて肝重量の有意な低下と肝線維化の顕著な改善が認められた (図2)。



このような組織学的な変化と一致して、Col1a1、Col3a1、Timp1などの線維化関連遺伝子の発現が脂肪細胞特異的PDK1欠損マウスと比べA-PDK1/TSP-1DKOマウスにおいて有意に低下した (図3)。



以上の結果から、TSP-1は、NASHにおける肝線維化の病態に関与することが明らかとなった。TSP-1による肝線維化のメカニズムを明らかにするために、ヒト肝星細胞株LX-2細胞を用いた解析を行った。

TGFβは、肝臓における線維化病態に中心的な役割を担うと考えられているが、TSP-1は、LX-2細胞において、TGFβ依存的な線維化関連遺伝子の発現誘導を増強した。このことから、TSP-1はTGFβによる肝星細胞の活性化を増強することにより肝線維化を促進するものと考えられた。

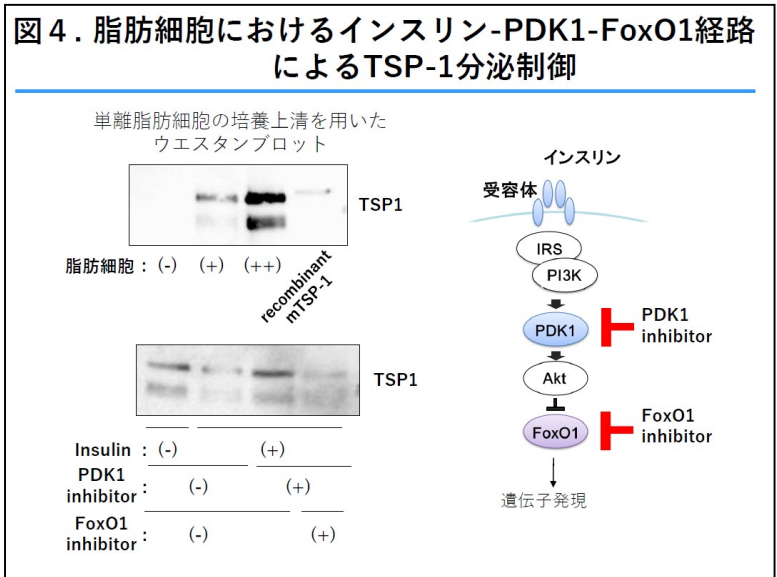
代表者は、マウス単離脂肪細胞を用いた解析により脂肪細胞からTSP-1が分泌されるかどうかを検証した。単離脂肪細胞の培養上清を用いたウエスタンブロットにおいて、細胞量依存的に培養上清中にTSP-1が検出された (図4)。すなわち、TSP-1は脂肪細胞から分泌され、アディポカインとして他臓器に作用を及ぼす可能性が示唆された。さらに、脂肪細胞におけるTSP-1の発現と分泌の制御メカニズムについても解析を行った。脂肪細胞におけるTSP-1遺伝子発現は、インスリン濃度依存的に強く抑制された (図4)。また、この変化と一致して、単離脂肪細胞から培養上清中へのTSP-1分泌は、インスリンにより顕著に抑制された (図4)。このようなインスリン依存的なTSP-1分泌の抑制は、PDK1阻害薬によりキャンセルされたが、PDK1阻害薬とFoxO1阻害薬との共処理により再度抑制を示した (図4)。以上の結果から、TSP-1の発現と分泌は、

PDK1-FoxO1軸を介するインスリン作用により負に調節されることが明らかとなった。

### 研究成果

本研究では、独自に樹立した脂肪細胞特異的遺伝子欠損によるNASHモデルマウスを用いた解析によりTSP-1を同定し、この分子が肝星細胞に対するTGFβ作用を増強することにより、NASHの肝線維化形成に重要な役割を担うことが明らかとなった。さらに、TSP-1は脂肪細胞から分泌される新規アディポカインであること、脂肪細胞におけるTSP-1の発現と分泌は、PDK1-FoxO1経路を介するインスリン作用により制御されることも同時に明らかとなった。

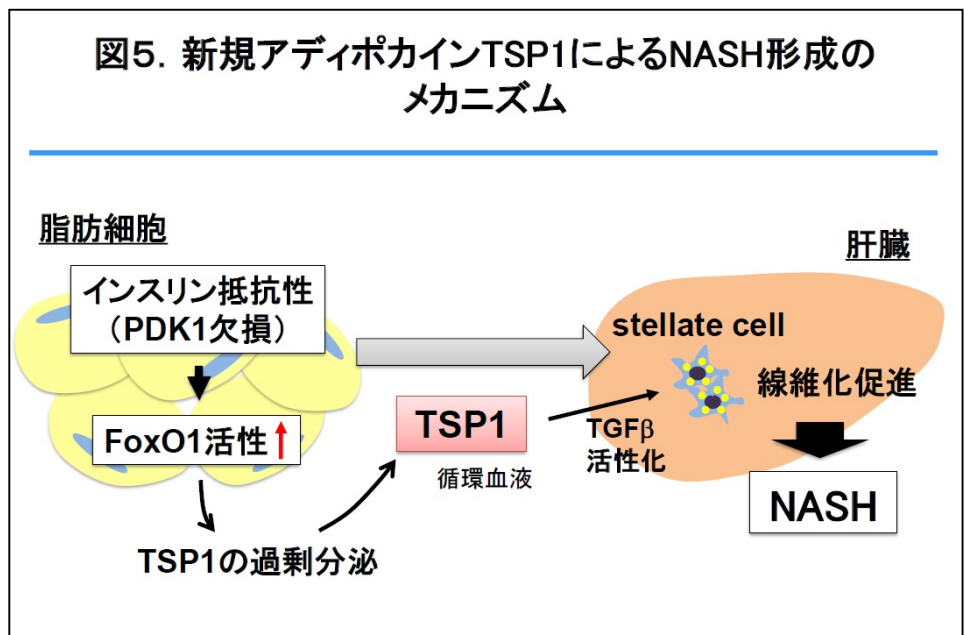
本研究により、TSP-1が、脂肪組織におけるインスリン抵抗性とNASHとを繋ぐ新規アディポカインであることが示された (図5)。最近の研究において、マウスのみならずヒトにおいても、肥満や2型糖尿病などの代謝異常とともにNASHにおいてTSP-1の血中レベルが増加することが報告されており、TSP-1はヒトのNASHの病態に密接に関与するものと推定される。すなわち、TSP-1は、NASHに対する新たな治療標的に資する可能性がある。



### 生活や産業への貢献および波及効果

NASHは、アルコールや肝炎ウイルスなどの原因がないにもかかわらず、肝臓における脂肪沈着、肝細胞の風船様変性、炎症細胞浸潤、線維化などの変化を来し、肝硬変や肝臓癌に進展しうる予後不良な疾患である。NASH患者数は、国内325万人 (2018年)、米国2500万人 (2017年) と推計され

ており、今後さらに増加すると考えられている。このような背景から、国内外のさまざまな研究機関や製薬企業においてNASHに関する研究が進められているが、現在まで特異的な治療薬の開発には至っていない。本研究では、NASHが脂肪組織のインスリン抵抗性と密接に関



連することに着目し、独自に作成した脂肪細胞特異的遺伝子欠損マウスの解析により新規アディポカインTSP-1を同定し、TSP-1ノックアウトマウスを用いた研究によりこのアディポカインがNASHの線維化に関与することを証明した。本研究は、NASHに対する新たな治療薬の開発に直結する可能性があることから、その学術的な意義に加え、臨床的に極めて有意義な成果をもたらしたものと考えられる。今後、TSP-1を標的としたNASHに対する新たな治療法の開発が期待される。

## 研究発表

### 論文

1. Yoshida N, Yamashita T, Osone T, Hosooka T, Shinohara M, Kitahama S, Sasaki K, Sasaki D, Yoneshiro T, Suzuki T, Emoto T, Saito Y, Ozawa G, Hirota Y, Kitaura Y, Shimomura Y, Okamatsu-Ogura Y, Saito M, Kondo A, Kajimura S, Inagaki T, Ogawa W, Yamada T, Hirata KI. Bacteroides spp. promotes branched-chain amino acid catabolism in brown fat and inhibits obesity. *iScience*, 24, 103342, 2021.
2. Yoshino K, Hosooka T (co-first and corresponding author), Shinohara M, Aoki C, Hosokawa Y, Imamori M, Ogawa W. Canagliflozin ameliorates hepatic fat deposition in obese diabetic mice: Role of prostaglandin E2. *Biochem Biophys Res Commun.*, 557, 62-68, 2021.
3. Kuramoto N, Nomura K, Kohno D, Kitamura T, Karsenty G, Hosooka T, Ogawa W. Role of PDK1 in skeletal muscle hypertrophy induced by mechanical load. *Sci Rep.*, 11, 3447, 2021.
4. Nabatame Y, Hosooka T (co-first author), Aoki C, Hosokawa Y, Imamori M, Tamori Y, Okamatsu-Ogura Y, Yoneshiro T, Kajimura S, Saito M, Ogawa W. Kruppel-like factor 15 regulates fuel switching between glucose and fatty acids in brown adipocytes. *J Diabetes Investig.*, 12, 1144-1151, 2021.

### 総説

1. 細岡哲也, 小川渉：脂肪細胞のPDK1-FoxO1経路と代謝異常，*糖尿病学2021*，門脇孝，山内敏正編，診断と治療社，p50-57，2021年。
2. 細岡哲也，小川渉：脂肪組織のインスリン抵抗性と代謝異常，個人差の理解へ向かう肥満症研究，梶村真吾，小川佳宏，矢作直也編，39，p122-127，2021年。

## 学会発表

### 招請講演

1. 細岡哲也：脂肪組織のPDK1-FoxO1経路と代謝制御，第7回群馬大学生体調節研究所内分泌代謝シンポジウム（前橋），2021年9月9日（ハイブリッド開催）。
2. 細岡哲也：褐色脂肪組織におけるエネルギー基質利用変換の制御機構，シンポジウム11「Adipobiology-ベージュ細胞の謎に迫る」，第64回日本糖尿病学会年次学術集会，2021年5月20-22日（web開催）。

### 一般口演

1. 芳野啓，細岡哲也，篠原正和，小川渉：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，第64回日本糖尿病学会年次学術集会，2021年5月20-22日（web開催）。

2. 細川友誠, 細岡哲也, 篠原正和, 小川渉: 脂肪細胞特異的LTA4H過剰発現は肥満による代謝障害の発症を抑制する, 第64回日本糖尿病学会年次学術集会, 2021年5月20-22日 (web開催).
3. 芳野啓, 細岡哲也, 篠原正和, 小川渉: 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, 第41回日本肥満学会, 2021年3月20-21日 (web開催)
4. 吉田尚史, 山下智也, 細岡哲也, 北浜誠一, 篠原正和, 廣田勇士, 小川渉, 平田健一: 腸内細菌制御による褐色脂肪組織の分岐鎖ケト酸代謝異常の改善により肥満が改善する, 第41回日本肥満学会, 2021年3月20-21日 (web開催).