

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790489

研究課題名（和文）肝臓の脂肪化が炎症とインスリン抵抗性を形成する機序解明と治療法開発
 研究課題名（英文）Elucidating the mechanism by which hepatic steatosis induces inflammation and insulin resistance

研究代表者

栗田 征一郎（KURITA SEIICHIRO）

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：20436819

研究成果の概要（和文）：これまで、炎症やインスリン抵抗性（IR）は、非アルコール性脂肪肝の成因や増悪因子であることを証明してきた。本研究では、逆に肝臓の脂肪化が炎症や IR を形成する機序を探った。肝細胞（ラット H4IIEC3）に脂肪酸（Palmitate）を処置すると、ミトコンドリア ROS 産生亢進を介して JNK が活性化された。JNK が細胞に炎症やアポトーシスを誘導することがすでに知られており、この結果は、肝での脂肪化と炎症をつなぐ新しいメカニズムの一つを明らかにしたといえる。さらに、肥満状態では、肝臓のタンパク分解系の機能障害が生じ、代償的にそれらを構成する遺伝子群が協調的に亢進することが分かった。また、タンパク分解系の機能障害は、肝臓でのインスリン抵抗性を引き起した。今後さらに検討し、肝臓病としての NAFLD/NASH, IR や肝脂肪化が増悪因子である C 型肝炎, 及び IR に関連した全身病態としてのメタボリックシンドロームや 2 型糖尿病の病態解明や新たな治療法開発に貢献したい。

研究成果の概要（英文）：We have shown that inflammation and insulin resistance (IR) accelerates nonalcoholic fatty liver disease. This study examined the mechanism by which hepatic steatosis induces inflammation and IR. When we treated hepatocytes (rat H4IIEC3 cells) with fatty acid (palmitate), JNK was activated via mitochondria-derived reactive oxygen species. Since JNK induces inflammation and apoptosis, this result tied inflammation to hepatic steatosis. In addition, we showed that obesity caused dysfunction of the hepatic protein resolution system, and enhanced this gene cluster to compensate for this. The dysfunction of the protein resolution system induced hepatic IR. In the future, I hope to clarify this mechanism and develop new treatments for nonalcoholic fatty liver disease and hepatitis C, which are exacerbated by IR and hepatic steatosis, and metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus, which are systemic conditions related to IR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：肝臓病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：インスリン抵抗性，肝臓，脂肪化，炎症，ミトコンドリア，酸化ストレス，脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

これまで、我々は、炎症やインスリン抵抗性 (IR) は、非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) や非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の成因や増悪因子であることを、モデル動物による検討や臨床研究によって証明してきた。しかし、逆に「なぜ脂肪化が炎症を引き起こすのか」、「肝の脂肪化がいかなる機序で全身の IR をもたらすのか」という点は、不明なままである。本研究は、我々が初めて作成した IR を伴う NAFLD・NASH モデル動物や *in vitro* 脂肪肝・内臓脂肪型肥満モデル、我々の教室が蓄えてきた肥満症・2 型糖尿病・NAFLD 患者の肝生検サンプルや臨床情報などを用いて、肝臓の脂肪化が炎症と IR を形成する分子学的機序の解明と治療法開発を行う。これにより、炎症や IR 発症機序の上流径路を同定する。

我々はこれまでに、

- 1) NAFLD 患者の肝病理像の中でも、肝臓の脂肪化は、炎症・線維化にも増して、独立した IR の予測因子であることを明らかにした [J Gastroenterol 2007].
- 2) ヒトにおける世界最大の肝発現遺伝子情報を整備し、独自に開発した cDNA microarray および SAGE 法を駆使して、2 型糖尿病・肥満患者の肝に発現する遺伝子を包括的に解析してきた。 [Diabetologia 2004] [Diabetologia 2007]
- 3) その結果、脂肪肝を有する 2 型糖尿病患者の肝臓では糖・脂質代謝、タンパク代謝が大きく変動すること [Diabetologia 2004]、ミトコンドリアの酸化的リン酸化に関連した遺伝子群が協調的に発現亢進し [Diabetologia 2007]、このプロファイルは肝糖新生に関わる遺伝子発現と関連し、糖尿病に肥満が加わることによってさらに強調されること [第 19 回国際糖尿病学会 (IDF 2006) 南アフリカ] を明らかにした。
- 4) そこで、申請者は NAFLD モデルを用いて IR と肝病理の因果関係を解析してきた。申請者は、IR を伴い、肝細胞変性を有する NASH 動物モデルの作成に世界で初めて成功し、このモデルを使って、遺伝的及び後天的 IR は肝臓の脂肪化のみならず、炎症・線維化をも促進し、IR を改善することでそれらの NASH 肝病理が改善しうることが示した [Gastroenterology 2007].

- 5) この新しい NASH モデルの肝臓ではレニンアンジオテンシン系が亢進しており、その抑制が活性酸素種 (ROS) の産生と炎症を低減させることで、NASH の病理と IR を軽減することを見出した [JDDW シンポジウム 16: NASH 研究の新展開, 2007 年, 神戸].
- 6) また、コレステロール食によって誘導される酸化ストレスと肝臓の IR によって、マウスに肝細胞変性を伴う脂肪性肝炎を生じることを示した [Hepatology 2007].
- 7) C 型肝炎において、2 型糖尿病や IR が、慢性肝炎から肝硬変への進展を進めることを示した。 [Metabolism 2008].

これらの研究成果をふまえ、肝の脂肪化が、炎症と IR を引き起こすのではないかと、仮説を立てるに至った。その分子機構を解明し治療標的を同定することは、肝臓病としての NAFLD/NASH, IR や肝脂肪化が増悪因子である C 型肝炎、及び IR に関連した全身病態としてのメタボリックシンドロームや糖尿病の病態解明や新たな治療法開発につながるものと期待できる。

2. 研究の目的

研究期間内の目標は、肝の脂肪化が、

- (1) いかに肝臓の炎症を引き起こすか、
- (2) いかに IR を引き起こすか、の 2 点を分子学的に明らかにすることである。

この目標達成のため、これまで我々が初めて確立した種々の過栄養モデル動物 [Gastroenterology 2007] における肝臓の病理、酸化ストレス、IR を経時的に評価し、脂肪化が炎症や IR を起こす機序を探る。さらに、上記モデルマウスの肝臓に発現する遺伝子変化を DNA chip や Realtime PCR 法を用いて包括的に解析し、その分子学的機序を探る。また、我々の教室が蓄えてきた肥満症・2 型糖尿病・NAFLD 患者の肝臓発現遺伝子情報、臨床情報を駆使して、脂肪化が炎症や IR を起こす機序を検証する。

in vitro 脂肪肝・内臓脂肪型肥満モデル [第 49 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2006 年, 東京で発表] を用いて、脂肪酸が炎症・IR を生じる直接的標的経路を同定する。

さらに、同定された機序に関して、*in vitro*, *vivo* (過栄養モデル動物やノックアウト動物) で検証する。

3. 研究の方法

a) in vitro 脂肪肝モデルによる検討

脂肪酸や肝脂肪化が炎症・IRを生じる直接的標的経路を同定するため、我々は培養肝細胞を種々の脂肪酸（オレイン酸、パルミチン酸など）や中性脂肪の存在下で培養することにより、in vitro 脂肪肝モデルを確立した。このモデルを用いて、脂肪酸による炎症とIRの発現機序を探るため、インスリン刺激下のIRS-2蛋白量、リン酸化Akt、および培地中への糖放出を指標にインスリン感受性を評価する。また、SREBP1cとその標的遺伝子、JNKのリン酸化、酸化ストレスマーカー、酸化酵素、ERストレスマーカー（GRP78など）、炎症線維化マーカーのmRNA・蛋白量を定量する。ROSの産生量は酸化蛍光色素により、NADPHオキシダーゼ活性は化学発光法にて測定する。NADPHオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、NOS等の阻害薬を用いて、ROSの産生源を探る。

b) DNA chipとRealtime PCR法による代謝パスウェイの包括的解析

肝臓の脂肪化が、どのようなパスウェイを介して、炎症やIRを引き起こすかを明らかにするため、これまで我々が初めて蓄えた肥満症・2型糖尿病・NAFLD患者の肝生検サンプルや臨床情報、種々の過栄養モデル動物の肝臓に発現する遺伝子変化をDNA chipを用いて包括的に解析する。この際、骨格筋および脂肪組織の発現遺伝子プロファイルも合わせて解析し比較検討する。臓器間で共通して発現変動するパスウェイ、全く逆方向に変動するパスウェイを抽出することで、臓器間の代償関係および協調関係を明らかにする。キーとなるパスウェイに属する遺伝子発現量を標準化・平均化したmean centroid値と、組織分子マーカー・血清マーカーとの相関関係を解析する。

c) 上記で同定された分子学的機序の評価

上記で同定された分子学的機序が確かかどうか。過栄養モデル動物（高脂肪食負荷マウス）を用い、経時的に、肝病理像（スコア化）、免疫組織化学染色（マクロファージ浸潤・星細胞活性化の評価）、分子マーカー、個体としてのIR（糖・インスリン負荷試験）、酸化ストレスマーカーなどを検討する。さらに、ノックアウトマウスを用いて検討する。

4. 研究成果

まず、肝細胞へのPalmitate(PA)処置により作成したin vitro 脂肪肝モデルを用いて検討した。

PAを処置したラットH4IIEC3肝細胞ではイ

ンスリン誘導性Aktセリンリン酸化が80%、IRS2チロシンリン酸化が40%抑制された。PA処置は、JNKリン酸化を3倍に更新したため、JNK活性化経路としてGRP78mRNA発現、XBP1 splicing variantによりER stressを、セラミド合成阻害薬によりセラミド合成を検討したが、これらの経路の関与は薄かった。一方PAは細胞内ROS産生を抑制する抗酸化剤によりPAのJNKリン酸化亢進、Aktリン酸化抑制効果は、一部解除された。PA誘導ROS産生は、ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤で有意に抑制された。

以上より、肝細胞にPAを処置すると、ミトコンドリアROS産生亢進を介してJNKが活性化されることが証明された。

JNKが細胞に炎症やアポトーシスを誘導することがすでに知られており、我々のこの結果は、肝での脂肪化と炎症をつなぐ新しいメカニズムの一つを明らかにしたといえる。

次に、これまで、我々の教室が蓄えてきた肥満症・2型糖尿病・NAFLD患者の肝生検サンプルや臨床情報や高脂肪食負荷マウスを用い、肝臓の脂肪化が炎症とIRを形成する分子学的機序の解明をおこなった。また、それら肝臓に発現する遺伝子変化をDNA chipを用いて包括的に解析した。

その結果、私は、肝臓の脂肪化がIRを形成する分子学的機序の候補の1つとして、プロテアソーム機能障害を見出した。ユビキチンとプロテアソームは細胞内におけるエネルギー依存性蛋白質分解機構の中核分子であり、細胞周期・アポトーシス・代謝調節・免疫応答・シグナル伝達・転写制御・品質管理・ストレス応答・DNA修復などあらゆる細胞機能制御に中心的役割を果たしている。

そこで、まず高脂肪食負荷マウス、肥満糖尿病モデルdb/dbマウスの肝臓でのプロテアソーム活性を調べたところ、コントロールマウスに比べ各々約60%低下していた。そこでさらに、プロテアソーム機能障害されているノックアウトマウスと野生型マウスを使い、経時的に、肝病理像（電子顕微鏡）、分子マーカー、個体としてのインスリン抵抗性（糖負荷試験）などを検討した。

KOマウスは、野生型マウスに比較し、体重増加や摂食量に有意差を認めないが、空腹時高インスリン血症とブドウ糖負荷試験で耐糖能異常を認め、高脂肪食飼育でさらに重症化した。

KOマウスの肝臓では、インスリン刺激後のAktリン酸化がコントロールマウスと比較して有意に減弱していた。

肥満状態では、肝臓のプロテアソーム機能障害が生じ、代償的にユビキチン・プロテアソーム系を構成する遺伝子群が協調的に亢進することが分かった。また、プロテアソ-

ム機能障害は、肝臓でのインスリン抵抗性を引き起こすことを証明した。

今後、さらにインスリン抵抗性を誘導する分子学的機序の1つであるプロテアソーム機能障害を解明することにより、肝臓病としてのNAFLD/NASH、インスリン抵抗性や肝脂肪化が増悪因子であるC型肝炎、及びインスリン抵抗性に関連した全身病態としてのメタボリックシンドロームや2型糖尿病の病態解明や新たな治療法開発に貢献したい。

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1件)

1. Nakamura S, Kurita S. (他 8 名). Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. J Biol Chem. 2009 May 29;284(22):14809-18. Epub 2009 Mar 30. 査読あり

[学会発表] (計1件)

1. 乙田敏城, 御簾博文, 栗田征一郎, 山本美由紀, 太田嗣人, 井関尚一, 村田茂穂, 田中啓二, 金子周一, 篁 俊成. 「肥満に関連したプロテアソーム機能障害は肝臓での小胞体ストレスとインスリン抵抗性を誘導する」第21回分子糖尿病学シンポジウム, 2009年12月12日, 和歌山県立医科大学講堂(和歌山県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗田 征一郎 (KURITA SEIICHIRO)
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号: 20436819

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし