

# NASH の病態に関わる新規アディポカインの同定

## 静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府栄養生理学研究室

細岡 哲也

背景：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。NAFLD/NASH の病態に、脂肪組織におけるインスリン抵抗性が関与するものと考えられているが、その分子メカニズムの詳細は不明である。

研究代表者は、インスリン作用の発現に中心的な役割を担う分子 PDK1 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と糖脂質代謝異常に加え 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脂肪細胞特異的 PDK1/FoxO1 ダブル欠損マウス（A-PDK1/FoxO1DKO マウス）において一部の代謝異常が改善することを示した。さらに、両マウスを用いたリポドーム解析により脂質メディエーター LTB4 を同定し、この脂質メディエーターが全身のインスリン抵抗性に関与することを見出した（Hosooka T et al, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117: 11674-11684, 2020.）。一方で、LTB4 の薬理的・遺伝的な阻害実験において、A-PDK1KO マウスの NASH に顕著な改善が認められなかったことから NASH の病態には LTB4 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 経路と NASH の病態とを繋ぐ新規アディポカインの同定を目指した。

結果・方法：脂肪細胞の PDK1-FoxO1 経路と NASH とを繋ぐメカニズムを明らかにするために、NASH を示す A-PDK1KO マウスおよび、NASH が改善する 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、A-PDK1/FoxO1DKO マウスにおいて、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。

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

図1. TSP1欠損による肝線維化の改善

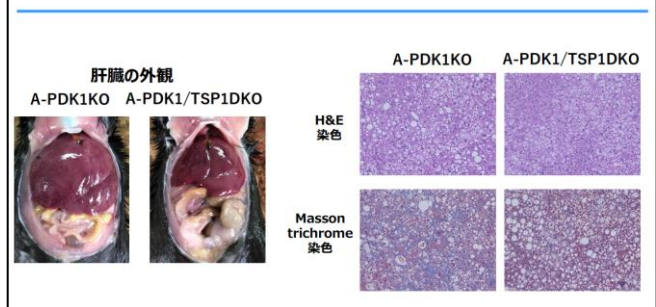
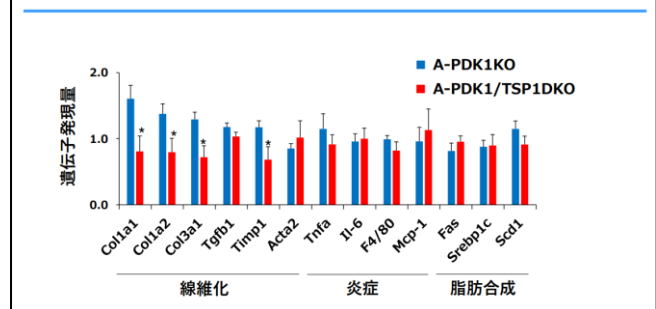


図2. TSP1欠損による肝線維化関連遺伝子の発現量低下

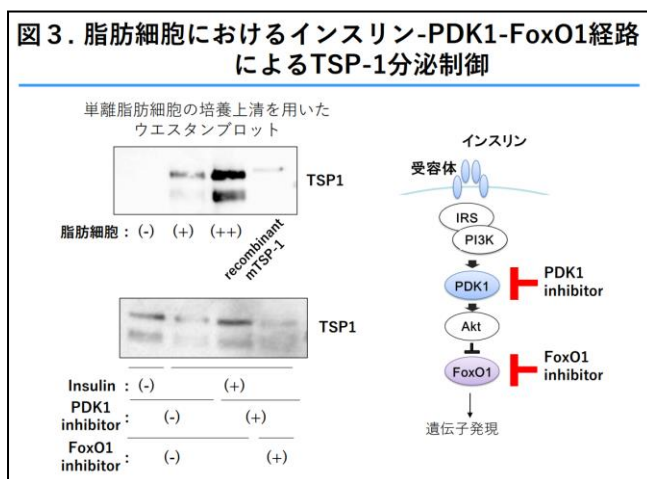


導入し、A-PDK1KO マウスとの交配により、TSP-1 欠損バックグラウンドの脂肪細胞特異的 PDK1 欠損 (A-PDK1/TSP-1DKO) マウスを作成した。20 週間の高脂肪食投与により A-PDK1KO マウスの肝重量は著しく増加し、組織学的には、脂肪沈着、炎症細胞浸潤、肝細胞のバルーニングに加え、明瞭な線維化を示した (図 1)。一方、A-PDK1/TSP-1DKO マウスにおいて、脂肪沈着、炎症、バルーニングに変化はなかったが、線維化に関しては顕著な改善が認められた (図 1)。このような組織学的な変化と一致して、Coll1a1、Coll1a2、Col3a1 などの線維化関連遺伝子の発現が、A-PDK1KO マウスと比べ A-PDK1/TSP-1DKO マウスにおいて有意な低下を示した (図 2)。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。

肝臓における線維化の病態において、TGFβによる肝星細胞の活性化が重要な役割を担うことが知られている。代表者は、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、LX-2 細胞において、線維化関連遺伝子の発現を誘導したが、TSP-1 は、TGFβ依存的な線維化関連遺伝子の発現誘導をさらに増強した。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。

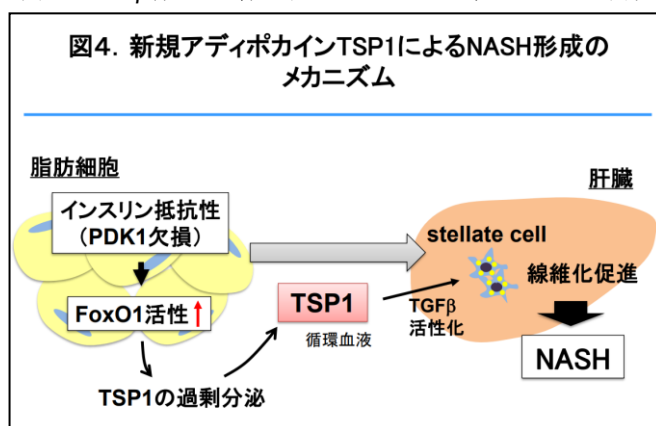
次に、代表者は、マウス単離脂肪細胞を用いた解析により脂肪細胞から TSP-1 が分泌されるかどうかを検証した。

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 3)。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 3)。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 3)。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 3)。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制御されることが明らかとなった。



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 3)。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 3)。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制御されることが明らかとなった。

結論・考察：本研究において、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を明らかとした。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を同定した。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 4)。最近、マウスのみならずNASH患者において、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の病態にも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。

#### 論文・総説

1. Imi Y, Ogawa W, Hosooka T, Insulin resistance in adipose tissue and metabolic diseases. *Diabetol Int.* 2022; 14: 119-124.
2. 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.
3. 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.
4. 細岡哲也, 伊美友紀子, 細川友誠, 今森真, 小川渉: 脂肪組織インスリン抵抗性とNAFLD/NASH, 綿田裕孝編, *糖尿病・内分泌代謝科 NAFLD合併糖尿病* 55: p468-476, 2022年.
5. 細岡哲也, 小川渉: 脂肪細胞機能不全と糖尿病, 阪上浩編, *月刊糖尿病 脂肪細胞・アディポサイトカインと糖尿病* 14: p6-13, 2022年

#### 学会発表

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.
2. 今森真, 細岡哲也, 細川友誠, 小川渉: 脂肪組織のPDK1-FoxO1経路とNASHを繋ぐメカニズムの解明, 第23回・24回日本病態栄養学会年次学術集会(京都), 2022年1月28-30日
3. 細岡哲也: 脂肪組織のPDK1-FoxO1経路と代謝制御, 第42回日本肥満学会/第39回日本肥満症治療学会(横浜), 2022年3月26日.
4. 今森真, 細岡哲也, 細川友誠, 小川渉: 脂肪組織のPDK1-FoxO1経路を介したNASH発症進展機構の解析, 第65回日本糖尿病学会年次学術集会(神戸), 2022年5月12-14日
5. 今森真, 細岡哲也, 細川友誠, 小川渉: 脂肪組織のPDK1-FoxO1経路とNASHを繋ぐメカニズムの解析, 第35回日本糖尿病・肥満動物学会(web開催), 2022年5月21-22日
6. 今森真, 細岡哲也, 細川友誠, 山口寛二, 伊藤義人, 小川 渉: 脂肪組織のPDK1-FoxO1経路とNASHを繋ぐメカニズムの解析, 肝臓と糖尿病代謝研究会, ワークショップ「糖代謝と肝疾患」, 2022年6月25日(奈良)
7. 細岡哲也: 脂肪組織インスリン抵抗性と代謝疾患, 第96回日本糖尿病学会中部地方会、シンポジウム「2型糖尿病研究UPDATE—病因から病態まで」(富山), 2022年11月20日.

#### 謝辞

本研究に対し、多大なご支援を賜りました公益財団法人アステラス病態代謝研究会に心より感謝申し上げます。