

75. 老化関連疾患における褐色脂肪不全の意義

清水 逸平

新潟大学 大学院医歯学総合研究科 循環器内科学 先進老化制御学講座

Key words : 褐色脂肪組織, 褐色アディポカイン, 心不全, 肥満, 非アルコール性脂肪性肝炎

緒言

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¹⁾。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²⁾。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。マウスにおいて心不全や肥満モデルを作製したところ、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も生じることが明らかとなった。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(ProteinX)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ProteinX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、 β 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。

方法

1. NASH肥満マウスの作製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肥満モデルを作製した。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(Pro-fibrotic factor)があるか検証した。肥満NASHマウスやNASH患者の血液でPro-fibrotic factorの発現が上昇することを確認した。マウスにおいてPro-fibrotic factor過剰発現モデ

ルや、発現抑制モデル（全身 KO マウスや floxed マウス）を現在作製中であり、表現型を解析する予定である。肝臓の線維化は、線維芽細胞が中心的役割を担う。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コラーゲン産生が上昇するか検証した。NASH モデルマウスで Pro-fibrotic factor が肝臓の線維化を促進する詳細な分子機序を現在検証中である。

2. 不全における褐色脂肪不全の病的意義の解明

1) 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製した。心不全モデルマウスで熱産生能が低下するか検証した。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した。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した。

2) 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した。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。

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製し、心機能が改善するか検証した。

結 果

1. NASH 肥満マウスの作製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 肥満モデルを作製することができた（図 1A）。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「ProteinX」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 ProteinX 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 ProteinX の発現の上昇を認めた（図 1B、C）。そこで、マウスにおいて ProteinX 過剰発現モデルや、発現抑制モデルを作製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 ProteinX 過剰発現モデルマウスを作製したところ、肝臓の線維化が促進した（図 1D）。現在 ProteinX 全身ノックアウトマウスや Floxed ProteinX マウスを作製中であり、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 ProteinX 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（図 1E）。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 ProteinX が重要な役割を果たす可能性が示唆される。ProteinX 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。

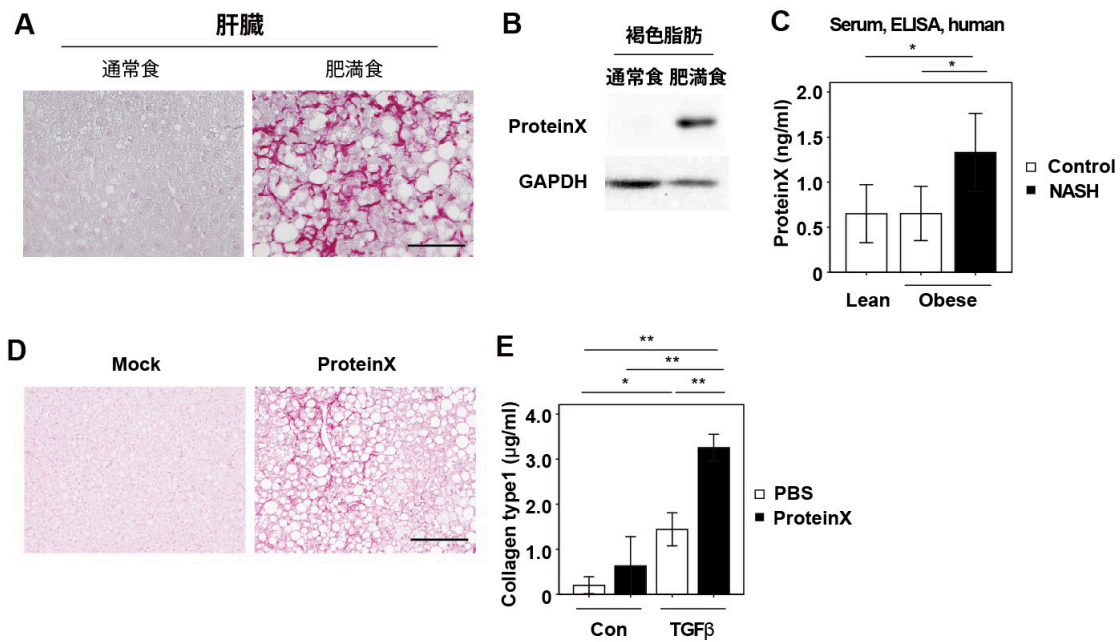


図1. 褐色脂肪由来線維化促進分子 ProteinX の肝臓線維化における意義

- (A) 肥満食投与により、肝臓で線維化が生じる（肥満 NASH モデルマウスの作製）。scale bar = 100 μ m.
- (B) 肥満ストレス負荷マウス褐色脂肪の ProteinX レベル（Westernblot）
- (C) 非肥満者（Lean）、肥満者（obese）、NASH 患者（NASH）血液中の ProteinX レベル（ELISA）（n = 29, 22, 46）、（*p < 0.05, 2 way ANOVA）
- (D) 肥満マウスに ProteinX 発現ベクター（ProteinX）を 8 週間投与すると、コントロールベクター投与群（Mock）と比較して、肝臓の著しい線維化が生じる（ピンク = 線維化領域（Picosilius 染色））。scale bar = 100 μ m.
- (E) 肝臓線維芽細胞（LX-2）に ProteinX を添加すると、上清中の type1 Collagen のレベルが上昇する（ELISA）。（* p < 0.05, ** p < 0.01, 2 way ANOVA）

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製した。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（図 2A）。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製したところ、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。

次に、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（Fig. 2B）、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製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た。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。

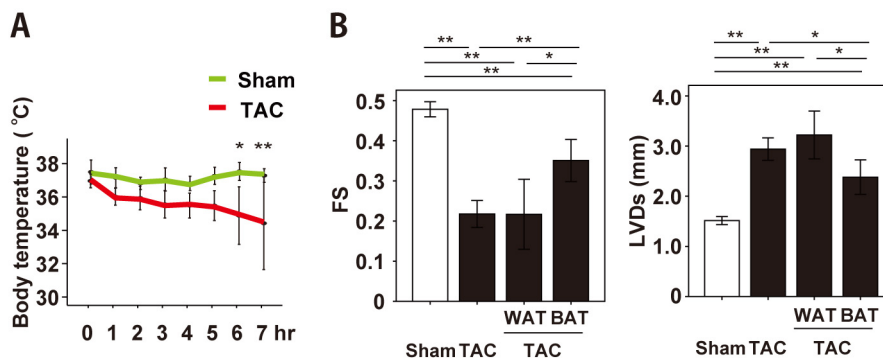


図2. 心不全における褐色脂肪不全の意義

(A) 心不全モデルマウスでは熱産生能が低下する (Sham = 偽手術群、TAC = 圧負荷モデル)。

(B) 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。(Sham = 偽手術群、TAC = 圧負荷モデル、WAT = 白色脂肪移植群、BAT = 褐色脂肪移植群、FS: Fractional shortening (左室内径短縮率)、LVDs: Left ventricular end systolic diameter (左室収縮終期径))

考 察

これまで我々が行った予備実験において、心不全時に熱産生能が低下し褐色脂肪不全が生じることや、褐色脂肪移植により圧負荷時の心機能低下が抑制されることがわかっている。褐色脂肪組織は体重あたりの重量は低いものの、熱産生器官としての機能に加え循環血液中の脂質や糖を大量に処理する活発な代謝臓器であることがわかっている。そのため、機能不全に陥ることで様々な中間代謝産物が心臓をはじめとする全身の臓器に波及し、恒常性を破綻させている可能性がある (Direct pathway; 図3)。また、褐色脂肪は全身の代謝を制御するため、心不全時に機能不全になることで全身の代謝不全が増悪し、心不全を負に制御している可能性もある (Indirect pathway; 図3)。不全褐色脂肪から心臓に波及する直接的、間接的な負の連関を明らかにすることで、褐色脂肪の恒常性維持を介した心不全の新規治療法を創出できる可能性が高い。重症心不全患者の治療は未だに困難であり、現行の手法では重症心不全患者の治療が限界に達していることは明白である。いままで着目されてこなかった全く新しい切り口で心不全の病を捉え、新たな治療法を開発することで重症心不全患者の心機能や生活の質 (QOL)、生命予後を「劇的に」改善することが本研究の最終的なゴールである。

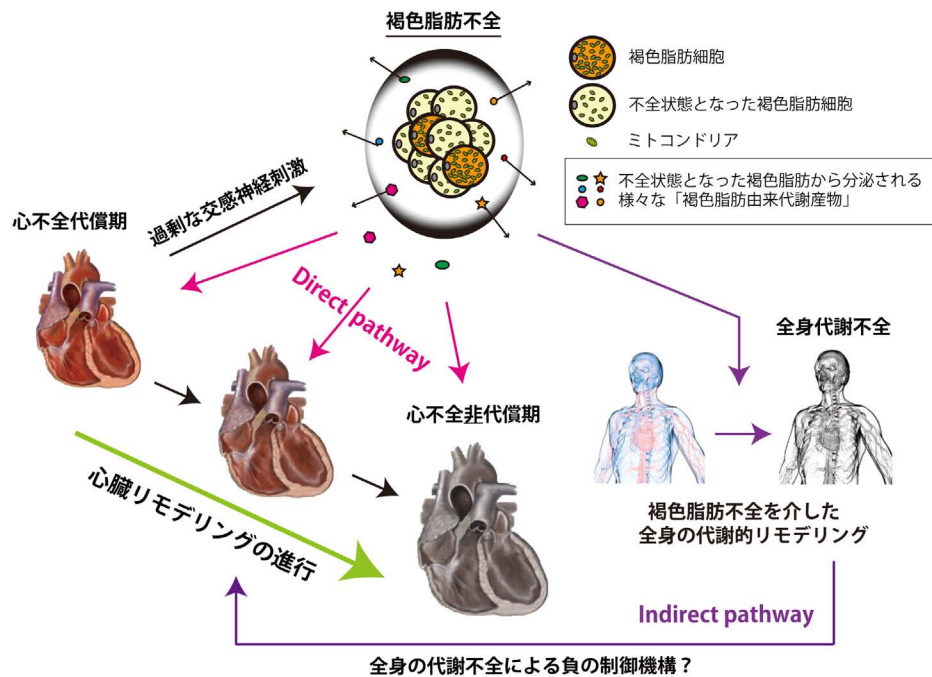


図3. 心不全における心臓－褐色脂肪連関

褐色脂肪不全を介して進行する心不全の基盤病態の解明について示す。

Direct pathway: 褐色脂肪由来代謝産物を介した心臓への直接的な負の連関

Indirect pathway: 全身の代謝不全を介した心臓への間接的な負の連関

また、肥満 NASH モデルマウスと NASH 患者の血液中で、線維化促進分泌タンパク ProteinX が2倍程度増加すること、肥満ストレス下で唯一褐色脂肪組織でのみ発現が増加することがわかった。ProteinX は肥満時に褐色脂肪組織で発現レベルが上昇し、肝臓の線維化を促進する可能性が高い。バイオマーカーとしての有用性に加え、治療標的として重要である可能性が高い（特許出願準備中：非アルコール性脂肪性肝炎治療剤）（図4）。NASH には未だ満たされない医療ニーズが存在し、疾患特異的治療法の開発は急務である。本研究をさらに発展させ、中和抗体による治療法や小分子による阻害剤を開発し、NASH の新たな治療法を創出したいと考えている。

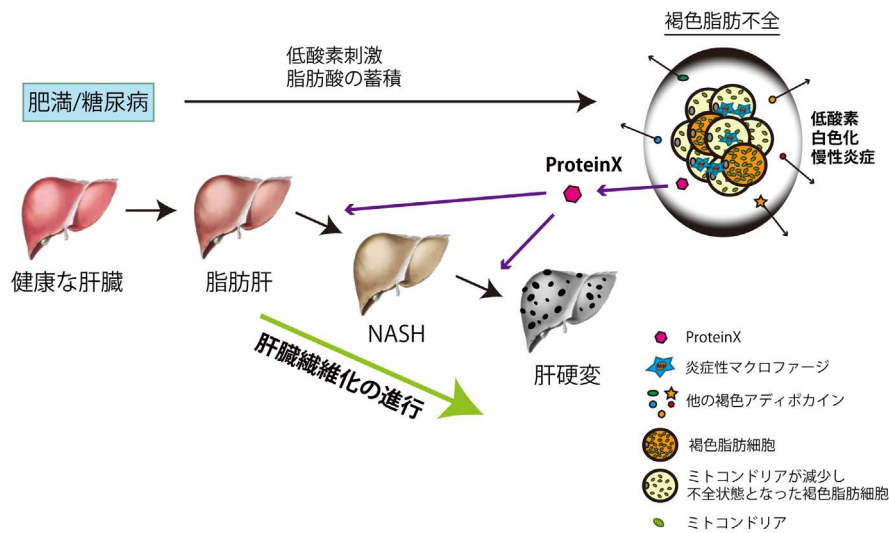


図 4. 肥満における肝臓 - 褐色脂肪関連
NASH における褐色アディポカイン ProteinX の意義

共同研究者

本研究の共同研究者は、新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器内科学の南野徹、新潟大学大学院医歯学総合研究科バイオインフォマティクス分野の奥田修二郎、慶応義塾大学先端生命科学研究の曾我朋義である。

文 献

- 1) Shimizu I, Walsh K. The Whitening of Brown Fat and Its Implications for Weight Management in Obesity. *Current obesity reports*. 2015;4(2):224-9. doi: 10.1007/s13679-015-0157-8. PubMed PMID: 26627217.
- 2) Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S, et al. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(5):2099-112. doi: 10.1172/JCI71643. PubMed PMID: 24713652; PubMed Central PMCID: PMC4001539.