

201208012A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

柴胡剤・熊胆剤による胆汁酸代謝制御の
分子機構の解明と非アルコール性
脂肪肝炎（NASH）治療への展開

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田 中 智 洋

平成25(2013)年3月

目 次

I. 総括研究報告

柴胡剤・熊胆剤による胆汁酸代謝制御の分子機構の解明と

非アルコール性脂肪肝炎（NASH）治療への展開

－非アルコール性脂肪肝炎（NASH）病態モデル動物を用いた解析－

田中 智洋 ----- 1

II. 分担研究年度終了報告

柴胡剤・熊胆剤による胆汁酸代謝制御の分子機構の解明と

非アルコール性脂肪肝炎（NASH）治療への展開

－胆汁酸受容体FXRを解析基軸としたメタボロミクス的手法による研究－

伊藤 慎二 ----- 11

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 17

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 19

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

柴胡剤・熊胆剤による胆汁酸代謝制御の分子機構の解明と
非アルコール性脂肪肝炎（NASH）治療への展開
－非アルコール性脂肪肝炎（NASH）病態モデル動物を用いた解析－

研究代表者：田中 智洋

（京都大学大学院医学研究科 メディカルイノベーションセンター 特定准教授）

B・C型肝炎ウイルス感染に起因する病態が中心であったわが国の肝疾患の疾病構造は、生活習慣病の増加に伴う非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の蔓延により大きく変貌しつつある。NASHは欧米諸国では肝硬変、肝ガンの最も高頻度な原疾患であり、わが国においても近い将来、NASHに起因する肝硬変、肝ガンの激増が予想される。しかし現在有効性が確立されたNASH治療薬は皆無で、減量指導以外に対処法は無い。本研究の特徴は、胆汁酸代謝異常としての観点からNASHの病態生理を解明し、また胆汁酸代謝に介入する方法論として、肝胆疾患に古来より用いられる、柴胡剤・熊胆剤を用いることにある。本研究代表者は非アルコール性脂肪肝炎（NASH）病態モデル動物を用いた解析の実施と、研究分担者によるメタボロミクス解析結果の解釈と統合の責任を有する。研究代表者自身の研究により、平成22年度・平成23年度には（1）柴胡剤（特に小柴胡湯）・熊胆剤の各単剤及び併用によりマウスのNASHモデルの病態が改善することの実証、（2）その作用メカニズムが、これら薬剤の胆汁酸代謝への影響を介している可能性の提唱、（3）胆汁酸代謝制御がNASHの病態生理そのものにかかわる可能性の提唱を行ってきた。平成24年度には、メチオニン・コリン欠乏餌および高脂肪食投与マウスをモデルとした柴胡剤（小柴胡湯および大柴胡湯）・熊胆剤によるNASHの病理組織像・肝遺伝子発現・血清マーカーの改善作用のPOCの確立と用量の検証、長期投与の効果、副作用の有無の検証を行い、さらにはFGF19-β Klothoの遺伝子改変動物を用いた解析により、胆汁酸やコレステロールの代謝制御が、熊胆剤・柴胡剤の作用標的として重要であることを証明した。以上より、胆汁酸代謝制御によるNASH治療の新しい戦略を提唱し、その例として漢方薬の有用性を証明することに成功した。

研究分担者

伊藤慎二

（京都大学大学院医学研究科 特定助教）

A. 研究目的

わが国では肥満・メタボリックシンドローム罹患者の増加とともに非アルコール

性脂肪肝炎(NASH)の有病率は増加の一途をたどっている。脂肪肝の病的意義は長らく疑問視されてきたが、近年になり肝生検で炎症細胞浸潤や線維化を認める脂肪肝

症例（NASH症例）では肝ガン、肝硬変への進行が高率に認められること、線維化を伴うNASH症例では10年生存率は約50%台であること（東京女子医科大学 肝臓 47(12), 2006）などが明らかとなってきた。罹患率・有病率の増加に鑑みてNASHは肝ガン、肝硬変の基盤病態として国民健康衛生上の大きな問題となりつつあるといえる。しかしNASHの発症メカニズムは未だ明らかではなく、有効性が確立した治療法も無い。

NASHの病態モデルとしては、Two-hit theory（Day et al. Gastroenterology, 1998）が広く受け入れられている。すなわち正常肝に1st hitとしての代謝異常が加わることによりNASHの1st stepとしての肝脂肪蓄積（Steatosis）が起こり、さらに2nd hitとしての免疫異常が加わることで、2nd stepとしての炎症（Inflammation）や線維化（Fibrosis）を生じ病態が進行する、という考え方である。しかし、1st hitや2nd hitの本態は明らかにはなっておらず、また1st hitと2nd hitを結びつけるメカニズムについても明らかではない。われわれはまず、これまであまり注目されてこなかった、NASHの基盤病態としての胆汁酸代謝調節異常に着目した。

胆汁酸はコレステロールの最大の排泄・クリアランス経路であるだけでなく、

食物中の脂質吸収効率を決定づける因子であるからである。実際、胆汁酸吸着レジンは脂質異常症の治療薬としてヒトにおける有効性が確立している。また、胆汁酸には、界面活性作用による腸管内での食物由来脂質のミセル化という古典的作用の他に、核内受容体FXR（Farnesoid X receptor）や膜に存在するG蛋白共役型受容体TGR5を介したシグナル伝達分子としての作用があることが近年明らかとなり、個体の脂質、エネルギー代謝の統一的制御因子としての胆汁酸の役割に注目が集まっている。さらに、胆汁酸はコレステロールを基質として多段階の酵素反応を介して合成され、コレステロールのほぼ唯一のクリアランス経路である。すなわち胆汁酸の合成・排泄の多寡は、コレステロールの体外への排泄の多寡を意味する。しかし、コレステロールの胆汁酸への転換が脂肪肝、NASHに及ぼす影響についてはこれまで多くが明らかでは無かった。

熊胆剤、柴胡剤は、古来より臨床的にも肝・消化器疾患に対して用いられてきた漢方薬であり、漢方医学的には豊富な実績を有する。しかし、これら薬剤が、（1）NASHに対して如何なる効果を示すか、（2）肝臓におけるコレステロール・胆汁酸代謝に如何なるメカニズムで如何なる作用を及ぼすか、についてはほとんど分かっていない。本研究では、研究代表者・分担者が一貫して研究してきた、コレステロ

ール・胆汁酸代謝の分子機序の観点、特に胆汁酸代謝の新しい中心的制御因子であるFGF19- β Klothoシステムに注目した観点から、柴胡剤・熊胆剤によるNASH改善の分子メカニズムに迫り、漢方薬による胆汁酸代謝制御機能を活かした、全く新しいNASHの治療戦略を提唱することを目指した。

本研究では平成23年度までに、(1)柴胡剤のうち特に小柴胡湯、熊胆剤の主成分としてウルソデオキシコール酸それぞれの単剤及び併用によるNASH治療効果に関する検討、(2)柴胡剤・熊胆剤の作用メカニズム解明のための検討、(3)FGF19- β Klothoシステムとの相互作用を基軸とした胆汁酸代謝の観点からのNASH病態解明に向けた検討、の3つの観点から研究を進めてきた。(1)では、NASH誘発モデルマウスを疾患モデルとして柴胡剤・熊胆剤によるNASHの病理組織像・肝遺伝子発現・血清マーカーの改善の有無を検証した。(2)(3)については、本研究の特徴である胆汁酸代謝の観点からのNASHと柴胡剤・熊胆剤作用の関係性の解析を実施した。平成23年度までには特に、DNAマイクロアレイを用いて β Klotho遺伝子欠損マウスの解析を行い、胆汁酸や他の脂質の代謝における変化を明らかにしていた。そこで、平成24年度には、NASHの病態モデルマウスにおける肝臓での遺伝子発現変化と、柴胡剤・熊胆剤

による治療過程で改善する変化、 β Klotho遺伝子欠損により改善ないしは増悪する変化、の3者の比較検討を行った。また、NASHの標準治療としての柴胡剤・熊胆剤の有用性を実証するために、これら薬剤の長期投与の有効性および安全性の検証、NASH改善作用の用量依存性の検討を実施した。さらには、小柴胡湯のみであった柴胡剤についての解析を、大柴胡湯を用いても実施した。

B. 研究方法

NASHの疾患・病態モデルとしては、上述の1st hitのモデルとしてマウスへの高脂肪食(HFD)負荷、2nd hitのモデルとしてはメチオニン・コリン欠乏餌(MCD)負荷が最も代表的に用いられている。そこで本研究ではこれらのモデルを用いて、柴胡剤・熊胆剤のNASHへの有効性と作用メカニズムの検討を行った。マウスの血清代謝パラメータの測定、肝臓切片のH&E染色やマッソン・トリクローム染色、酸化ストレスマーカーである4ヒドロキシノネナールの免疫染色などを行うことで病理組織学的検討を加えた。

一方、FGF19の共受容体として機能することが知られる β Klothoのノックアウトマウスでは、胆汁酸の合成・分泌・排泄が亢進していることが既に分かっている。

本研究では、胆汁酸代謝制御に中心的役割を果たすことが広く認識されつつある、FGF19- β Klotho システムの生理機能と NASH 発症との因果関係を明らかにする目的で、 β Klotho のノックアウトマウスに HFD および MCD による NASH 誘発試験を行い、野生型との差異を病理組織学的検討および遺伝子発現解析により解析した。さらには研究分担者が専門とするメタボローム解析により β Klotho ノックアウトマウスと野生型マウスのメタボローム構成を、超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) と、飛行時間型質量分析装置 (Q-ToFMS) とを組み合わせた独自のシステム (UPLC-Q-ToFMS)、さらに、多変量解析ソフトウェア (SIMCA-P+) を活用することによって網羅的に解析し、 β Klotho 依存的な量的変化を示す分子を、胆汁酸骨格の有無に関わらず広く探索した。

C. 結果と考察

平成23年度までの結果の概要

雄性 C57BL/6 マウスに 60%kcal の高脂肪食 (HFD) を 6 週間自由摂食で与えると、macrolobular lipid droplet の瀰漫性の蓄積を生じた。これに対し、同時に小柴胡湯 (ツムラ ㊟小柴胡湯) (25mg/body) をないしは熊胆剤の主な有効成分であるウルソデオキシコール酸 (Sigma-Aldrich U5127) (UDCA)

(0.5mg/body) を連日経口投与すると、脂肪滴の明らかな減少が観察され、肝脂肪化の改善が認められた。小柴胡湯と UDCA の脂肪化抑制効果は、病理組織像のスコアおよび肝トリグリセライド含量の計測による評価では、ほぼ同等であった。また小柴胡湯と UDCA の併用により、脂肪滴の蓄積はそれぞれの単独よりも明らかに著しく減少した。

次にメチオニン・コリン欠乏餌 (MCD) を同様に雄性 C57BL/6 マウスに 4 週間与えることで生じる脂肪蓄積、炎症細胞浸潤、線維化について、小柴胡湯、UDCA の効果を上記と同用量投与し検討した。その結果、MCD による肝脂質蓄積については小柴胡湯、UDCA の何れによっても抑制が認められ、UDCA の方がこの効果は顕著であった。さらに特筆すべきことは、これらの併用により脂肪滴の沈着はほとんど完全に消失した。さらに、MCD 投与マウスの肝組織切片において、特に過酸化脂質を検出するとされる酸化ストレスマーカー、4 ヒドロキシノネナールの免疫染色を行ったところ、薬剤投与群において、4 ヒドロキシノネナールの陽性領域、染色性の強度のいずれもが減少していた。さらに肝組織内の線維化の指標としてマッソン・トリクローム染色を行った。この検討でも小柴胡湯、UDCA により、明らかに線維化の減少が病理組織学的に観察された。

次に胆汁酸代謝制御において中心的役割を果たす、FGF19- β Klotho システムに関する遺伝子操作が、NASH 発症に及ぼす影響を解析する目的で、 β Klotho ノックアウトマウスに

対する MCD 投与実験を行った。その結果、 β Klotho ノックアウトマウスにおいては、胆汁酸の合成・分泌・排泄の亢進とともに、肝への脂肪蓄積が明らかに抑制されていることが明らかとなった。そこで β Klotho ノックアウトマウスでの肝脂肪化抑制作用と薬剤による NASH 改善との関連性を明らかにするため、肝遺伝子発現をマイクロアレイにより検討した。すると β klotho 遺伝子を欠損することで減少が認められる遺伝子群と UDCA 治療により発現抑制される遺伝子の多くが共通であったのに対し、小柴胡湯により抑制される遺伝子群の多くが β Klotho ノックアウトマウスで低下しているものとは異なっていた。以上の結果より、UDCA と小柴胡湯は互いに異なる機序により NASH を改善する可能性が示唆された。

さらに UPLC-Q-ToFMS および多変量解析ソフトウェアを用いた網羅的解析により、 β Klotho ノックアウトマウスに由来する尿、血清、糞便サンプル中では、多くの胆汁酸誘導体が一斉に増加していることを確認することが出来た。さらに、 β Klotho ノックアウトマウスの尿中で、餌や性別などによらず、恒常的に有意に減少（約 50%）し、なおかつ量的に豊富に存在する、非常に興味深い未知化合物（イオン 569）を見出すことに成功した。

平成 24 年度の結果

雄性 C57BL/6 マウスに対する、60%kcalHFD 6 週間および MCD 4 週間による、肝脂肪化および炎症・繊維化モデルを用いて、小柴胡湯、

大柴胡湯、UDCA の肝病理組織像と血清トランスアミナーゼ値に対する影響を複数の用量（小柴胡湯、大柴胡湯：0.01, 0.05, 0.25, 1.25, 2.5mg/g、UDCA：0.2, 1.0, 5, 25, 50mg/kg）、投与期間（3 日間, 7 日間, 18 日間, 28 日間）、投与時期（HFD ないし MCD の開始前ないしは開始と同時に投与、7 日間についてはサンプリングの直前投与も検討）により検討した。その結果、小柴胡湯による NASH 改善効果が病理組織学的ならびに血清トランスアミナーゼ値の改善として検出されるためには、HFD、MCD のいずれの NASH モデルにおいても最低、0.05mg/g、7 日間の投与が必要であることが明らかとなった。また投与時期については、HFD ないし MCD の開始時に同時に開始することが最も効果的であった。特筆すべきことに、サンプリングの直前 7 日間の投与（HFD 開始後 5 週目から、MCD 開始後 3 週目）からの投与であっても 1.25mg/g の投与では明らかに肝組織像および肝 4 ヒドロキシノネナル陽性領域の改善が認められた。一方、2.5mg/g かつ 18 日間以上の投与では、体重減少と骨格筋重量（腓腹筋）の減少が薬剤非投与群と比べて有意に大きく、解剖時の胃内容物重量が明らかに軽いことがわかった。また組織学的には空腸粘膜の萎縮が認められた。このことから、上記用量、期間では、投与時期に関わらず、副作用としての消化管症状がみられるものと推測された。一方、大柴胡湯による NASH 改善効果は小柴胡湯より軽微であり、0.25mg/g、18 日間以上の投与でのみ、効果が明らかであった。大柴胡湯の作用

は炎症、線維化に対しては明確であったが、小柴胡湯と異なり、肝脂肪化に対する改善作用はほとんど認められなかった。大柴胡湯においても2.5mg/gかつ18日間以上の投与では、骨格筋重量の減少が認められた。一方、UDCAによる作用は1.0mg/kgかつ18日間以上の投与で認められ、最大用量においても骨格筋や空腸粘膜の萎縮は認められなかった。

DNA マイクロアレイを用いた解析により、小柴胡湯やUDCAの作用を β Klotho 遺伝子欠損の効果と比較したところ、MCDにより肝臓で発現が変化する遺伝子群のうち、UDCAにより改善する遺伝子群の35%が β Klotho 遺伝子欠損によっても改善したのに対し、小柴胡湯により改善する遺伝子群のうち β Klotho 遺伝子欠損により改善した遺伝子は3%程度であり、小柴胡湯とUDCAは異なるメカニズムによりNASHを改善する可能性が示唆された。

一方、分担研究者らの解析により、 β Klotho ノックアウトマウスの肝臓において、リポカリン型プロスタグランジンD₂合成酵素(L-PGDS)、Corin (TMPRSS10/Atrial natriuretic peptide-converting enzyme)等の、遺伝子の発現が構成的に昂進していることが見いだされ、L-PGDSの遺伝子発現の上昇は胆汁酸やFXRリガンドの増加による二次的結果であり、一方、Corinの発現上昇は胆汁酸を介する二次的結果ではなく、 β Klotho 遺伝子欠損の直接的効果であると想定された。 β Klotho 遺伝子欠損により発現が変化する遺伝子群のうち、UDCAによっても同じ方向に変化する

遺伝子は驚くべきことに48%も存在するが、残る52%にはこのような胆汁酸非依存性の β Klotho 下流遺伝子群が含まれている可能性が示唆される。一方、 β Klotho ノックアウトマウスの尿中で減少している上述のイオン569は、精密質量測定、Empirical formula (経験式(元素組成))推定、タンデムマス(MSMS)による断片化パターン解析、標準品とのカラム保持時間やMSMSパターン比較等により、コール酸にグルコース1分子が付加した、コール酸グルコシドである可能性が高いと考えられた。さらに、FXR ノックアウトマウスや、胆汁酸を混餌投与することによって胆汁酸プールを β Klotho ノックアウトマウスと同程度にまで増加させた野生型マウスを用いた検討により、このコール酸グルコシドと考えられる分子は、L-PGDSやCorinとは異なり、胆汁酸プールの増加により2次的に尿中存在量が減少したものであることが示唆された。

以上を総括すると、平成22年度、平成23年度には、①肝臓への脂質蓄積プロセスにおける β Klotho / FGF19 システムの意義の解明(Tomiyama et al. PNAS, 2010)、②肝臓の細胞膜画分のプロテオミクス解析による β Klotho 結合分子群の同定、③ β klotho ノックアウトマウス(β kl^{-/-})にNASHを誘発した際の肝臓の遺伝子発現をマイクロアレイにより解析した。また、④メチオニン・コリン欠乏食(MCD)(炎症・繊維化モデル)及び高脂肪食負荷マウス(脂肪化モデル)を病態モデルとした解析において、柴胡剤・熊胆剤のNASH改善作用を実証した。

平成24年度には、⑤柴胡剤・熊胆剤投与 NASH マウスの肝臓における遺伝子発現をマイクロアレイで解析し、 β kl-/-と比較することにより、柴胡剤・熊胆剤作用がどの程度、 β klothoにより制御される胆汁酸・コレステロール代謝に依存するかを明らかにした。一方、平成23年度には、⑥ β Klothoのタンパク発現はマウスの脂肪肝において明らかに増加すること、⑦ β kl-/-の血清ではVLDLトリグリセライドレベルが減少していることを発見し、⑧ β kl-/-にMCDによる脂肪肝を誘発すると、脂質含量の減少と酸化ストレスマーカーの改善することを示した。平成24年度には、さらに本研究で新たに⑨樹立に成功した肝細胞特異的 β klothoトランスジェニックマウスを用いて肝機能、肝および血清脂質代謝、肝病理組織像を検討し、柴胡剤・熊胆剤作用との比較検討を行った。平成24年度にはさらに、⑩大柴胡湯のNASH改善効果の証明、⑪小柴胡湯、大柴胡湯、熊胆剤のそれぞれおよび併用における長期効果と副作用、用量依存性についての検証を行い、これら薬剤によるNASH治療のマウスにおけるPOCの確立に成功した。以上より、柴胡剤・熊胆剤の有効性と作用機序についての理解を深めることができた。

本研究の成果としては第一に、柴胡剤（小柴胡湯および大柴胡湯）・熊胆剤各単剤及び併用によるNASHの治療効果が複数のマウスのNASHモデルにおいて証明された。第二に、マウスモデルにおいてという制限の下で解釈せねばならないが、投与量の最適化と長期投与

の効果および安全性を証明することができた。当然ながら、ヒトにおける投与レジメン、種差、副作用など、課題は山積しているが、動物モデルにおいても有効性が実証されたNASH治療薬はほとんど無いことに鑑み、本研究の成果はNASH治療戦略に大きなインパクトを与えるものと考ええる。さらには、漢方薬の臨床使用推進の観点からも、適応拡大・新規治療法の確立に向けた大きな礎となる成果であると確信する。第三に、小柴胡湯とウルソデオキシコール酸の併用投与によるNASH治療効果が極めて強力であることを発見した。今後の治療選択肢として優れて有望と考える。第四に、肝臓における胆汁酸・コレステロール代謝の中心的制御因子であるFGF19- β Klothoシステムに関わる遺伝子改変マウスを用いた解析、漢方薬作用機序の解析の比較的検討により、共通する多くの分子が明らかとなった。これにより本研究は、柴胡剤・熊胆剤に限らず、NASHの病態生理に基づいた診断法・治療法の開発に大きく貢献するものと期待する。

D. 参考文献

1. Decreased renal α -Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion. O. Asai, K. Nakatani, ○**T. Tanaka**, H. Sakan, A. Imura, S. Yoshimoto, K. Samejima, Y. Yamaguchi, M. Matsui,

- Y. Akai, N. Konishi, M. Iwano, Y. Nabeshima, Y. Saito
Kidney Int.
81(6): 539-547, 2012
2. Relevant use of Klotho in FGF19 subfamily signaling in vivo.
K. Tomiyama, R. Maeda, I. Urakawa, Y. Yamazaki, ○**T. Tanaka**, S. Ito, Y. Nabeshima, T. Tomita, S. Odori, K. Hosoda, K. Nakao, A. Imura, Y. Nabeshima.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
107(4):1666-1671, 2010
3. Adipose tissue-specific regulation of angiotensinogen in obese humans and mice: Impact of nutritional status and adipocyte hypertrophy.
S. Yasue, H. Masuzaki, S. Okada, T. Ishii, C. Kozuka, ○**T. Tanaka**, J. Fujikura, K. Ebihara, K. Hosoda, A. Katsurada, N. Ohashi, M. Urushihara, H. Kobori, N. Morimoto, T. Kawazoe, M. Naitoh, M. Okada, H. Sakaue, S. Suzuki, K. Nakao.
Am. J. Hypertens. 23(4):425-431, 2010
4. Glucocorticoid reamplification within cells intensifies NFkB and MAPK signaling and reinforces inflammation in activated preadipocytes.
T. Ishii-Yonemoto, H. Masuzaki, S. Yasue, S. Okada, C. Kozuka, ○**T. Tanaka**, M. Noguchi, T. Tomita, J. Fujikura, Y. Yamamoto, K. Ebihara, K. Hosoda, K. Nakao.
Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.
298(5):E930-E940, 2010
5. Adipose-tissue-specific dysregulation of angiotensinogen by oxidative stress in obesity.
S. Okada, C. Kozuka, H. Masuzaki, S. Yasue, T. Ishii-Yonemoto, ○**T. Tanaka**, Y. Yamamoto, M. Noguchi, T. Kusakabe, T. Tomita, J. Fujikura, K. Ebihara, K. Hosoda, H. Sakaue, H. Kobori, M. Ham, Y. S. Lee, J. B. Kim, Y. Saito, K. Nakao.
Metabolism 59(9):1241-1251, 2010
6. 「β Klotho による代謝恒常性制御」
○**田中智洋**, 鍋島陽一
実験医学(羊土社) Vol.31 No.5(増刊): 76-82, 2013
7. 「心腎連関解明の新しい分子標的α Klotho」
○**田中智洋**, 鍋島陽一
Cardiovascular Frontier (メディカルレビュー社) 3(1): 30-37, 2012
8. 「メタボリック症候群と病理」 Klotho ファミリーによる代謝の統合的制御
○**田中智洋**, 鍋島陽一
病理と臨床 (文光堂) 28(9):924-931, 2010
9. 「肥満症第2版—基礎・臨床研究の進歩」
中枢メラノコルチン系 (POMC/α-MSH)

- 田中智洋、益崎裕章、中尾一和
日本臨床（日本臨床社）
 68(Suppl.2):75-82, 2010
10. メタボリックシンドロームのマスターレギュレーターとしてのPPAR γ
 ○田中智洋、益崎裕章、細田公則、中尾一和
日本臨床(日本臨床社) 68(2):203-209, 2010
11. メタボリックシンドロームシリーズ
 「レプチンのトランスレシヨナルサイエンス メタボリックシンドロームの治療戦略」田中智洋（著書・分担執筆）診断と治療社 監修 松澤祐次、編集 中尾一和 2012
 第5章 レプチンのトランスレシヨナルサイエンスーレプチン実用化に向けてーレプチンの発見ー意義とその特徴 pp130-136
12. 田中智洋（著書・分担執筆）摂食調節
 最新内分泌代謝学（印刷中）

般演題口演)

3. 小林加奈子、田中智洋、鍋島陽一
 アルブミンプロモーターを用いた β -klotho トランスジェニックマウスの作製と表現型の解析
 第30回内分泌代謝学サマーセミナー（群馬）、2012/7/12-14（一般演題ポスター）
4. 田中智洋、小林加奈子、鷺田美和、伊村明浩、鍋島陽一
 3T3-L1 脂肪細胞の栄養分子応答性に関する検討
 第33回 日本肥満学会 京都 2012/10/12（一般演題ポスター）
5. 田中智洋
 β Klotho による栄養代謝制御の全貌解明を目指して
 第22回糖尿病セミナー UP-TO-DATE (岡山)、2012/9/13（招請講演）

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

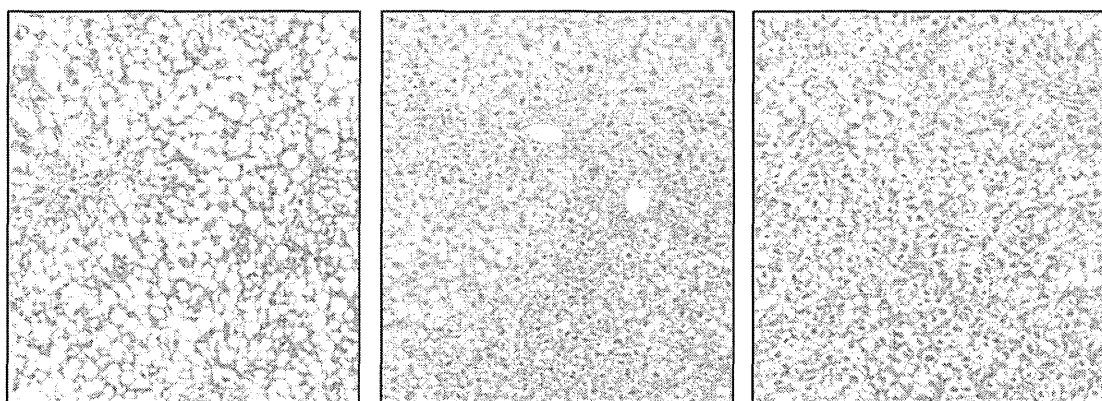
学会発表

1. 田中智洋
 脂肪細胞は何を感じ、どう変化するのかー β クロト分子の機能解析からのこころみ
 文部科学省特別経費プロジェクト学術講演会（沖縄）、2012/2/9（招請講演）
2. 田中智洋
 脂肪細胞における β Klotho 機能の探索
 THE 4th Brainstorming Medical Conference（東京）、2012/5/27（一

(参考図)

高脂肪食負荷NASHモデルにおける効果(脂肪化)

6週齢雄性C57BL/6Jマウスに5週間高脂肪食(HFD)を給餌
治療群は小柴胡湯0.4g/kg/day、UDCA 35mg/kg/day相当を混餌投与



HFD (60%kcal fat)

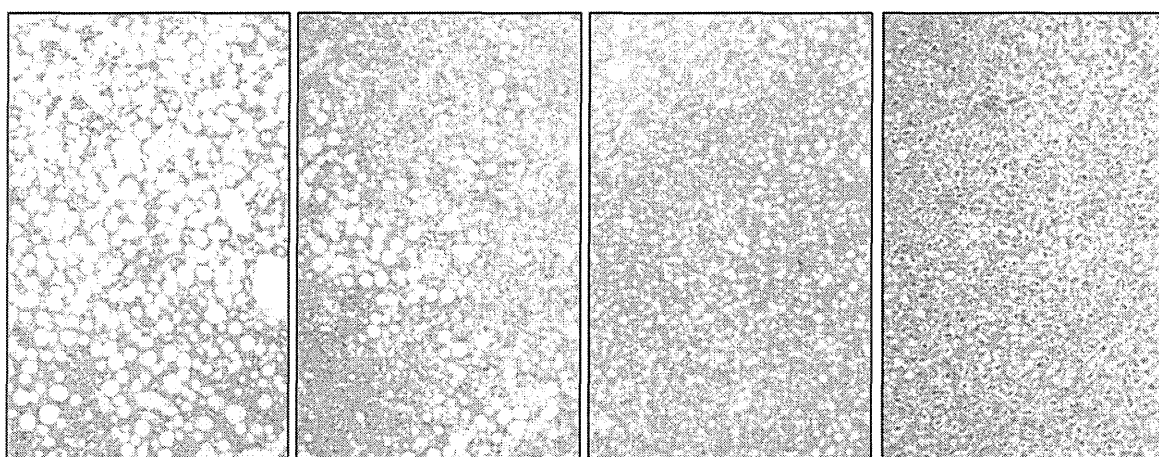
+ 小柴胡湯

+ ウルソデオキシ
コール酸 (UDCA)

小柴胡湯、熊胆剤の主成分UDCAの投与で肝脂肪化の改善を認めた
(H&E x100)

メチオニン・コリン欠乏食NASHモデルにおける効果(脂肪化)

6週齢雄性C57BL/6Jマウスに4週間メチオニン・コリン欠乏食(MCD)を給餌
治療群は小柴胡湯0.4g/kg/day、UDCA 35mg/kg/day相当を混餌投与



MCD (ad lib.)

+ 小柴胡湯

+ UDCA

+ 小柴胡湯・
UDCA併用

小柴胡湯、熊胆剤の主成分UDCAの投与で肝脂肪化の改善を認めた
(H&E x100)

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

柴胡剤・熊胆剤による胆汁酸代謝制御の分子機構の解明と

非アルコール性脂肪肝炎（NASH）治療への展開

—FGF19/15- β Klothoによる胆汁酸代謝制御を解析基軸としたメタボロミクスの手法による研究—

分担研究者：伊藤 慎二（京都大学大学院医学研究科 助教）

NASHの激増にもかかわらず現在有効性が確立されたNASH治療薬は皆無で、減量指導以外に対処法は無い。本研究の特徴は、胆汁酸代謝異常としての観点からNASHの病態生理を解明し、また胆汁酸代謝に介入する方法論として、肝胆疾患に古来より用いられる、柴胡剤・熊胆剤を用いることにある。本研究分担者が従事した研究は、トランスクリプトミクスおよびメタボロミクスを併用したトランスオミックスサイエンスの手法により、胆汁酸代謝と関連する、あるいは関連しないNASH病態分子を明らかにし、漢方薬による治療標的に関する新規情報を得ることを目的とした。本年度の成果として第一には、 β Klotho共役タンパク質としてリポカリン型プロスタグランジンD 2合成酵素（L-PGDS）、Corin（TMPRSS10/Atrial natriuretic peptide-converting enzyme）を同定し、これら2つのタンパク質が異なるメカニズムにより発現制御を受けていることを示した。第二に、 β Klotho共役低分子化合物として、昨年度の同定していた未知ピーク（イオン569）がコール酸グルコシドである可能性が高いことを精密質量測定、Empirical formula（経験式（元素組成））推定、タンデムマス（MSMS）による断片化パターン解析、標準品とのカラム保持時間やMSMSパターン比較等により明らかにした。さらに、この分子の挙動は胆汁酸変化の下流にあることを解明した。本研究により、 β Klothoによる胆汁酸依存性および非依存性代謝制御機構の一端が明らかとなった。研究代表者により、胆汁酸代謝制御を介した柴胡剤・熊胆剤によるNASHの治療効果が明らかとなっていることから、本研究により、 β Klothoあるいはその関連分子群が全く新しいNASHの治療標的となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

β Klotho は、 α Klotho と構造的に類似する分子として、2000年に我々が報告した分子である（参考文献1、2）。 β Klotho

の主な発現組織は肝臓、脂肪組織、膵臓であり、肝臓においては内分泌性線維芽細胞増殖因子（fibroblast growth factor（FGF））の一つFGF19/15の共受容体として機能し、胆汁酸生合成のネガティブフィードバック制御における中心的な役割

を果たす。そのため β Klotho ノックアウトマウスでは、肝細胞における胆汁酸生合成（コレステロールの胆汁酸への変換）が亢進し、胆汁酸プールの増大、血中コレステロールの減少など、肝臓や全身における脂質代謝が大きく変化する（参考文献3、4）。したがって β Klotho が周縁の共役分子（群）と協働しながら、非アルコール性脂肪肝炎（Nonalcoholic steatohepatitis (NASH)）、非アルコール性脂肪肝（Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)）といった肝疾患の病態形成に関与する可能性が想定される。しかしながら、 β Klotho が FGF や FGF 受容体以外に、実際にどのようなタンパク質（群）と共役し、肝臓や個体レベルでの代謝調節に寄与するのかについては、現在のところ全く分かっていない。一方で、 β Klotho には FGF とは独立的な機能を持つ可能性も想定されている。たとえば、 α Klotho は、ステロイド環を持つ分子に単糖（グルクロン酸）が付加された類ステロイド化合物と結合し、配糖体と単糖との間の結合を加水分解する活性を示すことが知られているが（参考文献5）、 β Klotho が Klotho と類似する構造を持つことや、胆汁酸がステロイド環を持つ化合物であることを考慮すると、配糖体ステロイドの代謝が Klotho ファミリー分子に共通する役割である可能性が考えられる。たとえば、胆汁酸骨格を持ち、単糖の修飾を受けた化合物が β Klotho の直接的な標的分子であ

る蓋然性は高いと思われる。我々は、本研究の初年度までに、マウス肝臓で β Klotho と共役するタンパク質の候補を、遺伝子改変マウスと cDNA マイクロアレイ解析を組み合わせた網羅的解析によって複数見出した。また、2年目までには、質量分析装置と多変量解析ソフトウェアとを組み合わせた新しい網羅的代謝産物解析手法である“Metabolomics 解析”によって、 β Klotho と共役する小分子化合物の候補を見出すことに成功した。3年目である今年度までには、これまでに見出した β Klotho と共役する可能性があるタンパク質や化合物の挙動をより詳細に解析し、“ β Klotho システム”の実体を解明することを目指した。

B. 結果と考察

1) β Klotho 共役タンパク質の解析

我々は β Klotho ノックアウトマウスと野生型マウスの肝臓における遺伝子発現プロファイルを cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に比較した。特に、餌の種類や性別に関わらず、安定して β Klotho 依存的な発現量の変化を示す遺伝子を探したところ、 β Klotho ノックアウトマウスの肝臓において、リポカリン型プロスタグランジン D 2 合成酵素（L-PGDS）、

Corin (TMPRSS10/Atrial natriuretic peptide-converting enzyme) 等の、遺伝子の発現が構成的に昂進していることを見出した。次に、これらの分子の発現が β Klotho 欠損の直接的な影響によって変化しているのか、あるいは β Klotho ノックアウトマウスにおいて胆汁酸が過生成されていることなどの、2次的、3次的な間接的影響によって変化しているのかを、1次胆汁酸の1種であるコール酸を混餌投与することによって胆汁酸プールを増大させた野生型マウス、胆汁酸をリガンドとする核内受容体型転写因子 Farnesoid X receptor (FXR) を欠損するマウス (FXR ノックアウトマウス)、肝臓特異的に FXR を欠損するマウス等を用いて調べた。興味深いことに、L-PGDS、Corin とともに、心臓において強く発現することが知られている分子であり (参考文献 6、7)、 β Klotho ノックアウトマウス肝臓におけるこれらの分子の mRNA 発現量は、野生型マウスに比べて著しく亢進してはいるものの、心臓における発現と比べれば極めて低いことが分かった。また、胆汁酸を混餌投与することによって胆汁酸プールを β Klotho ノックアウトマウスと同程度にまで増加させたマウスの肝臓においては、L-PGDS や Corin の発現量は野生型マウスと同程度であった。したがって L-PGDS や Corin の発現量の変化は、 β Klotho ノックアウトマウスにおいて、胆汁酸プールが増大したことによる間接的影響による

ものではないことが分かった。次に、FXR ノックアウトマウスや、肝臓特異的 FXR 欠損マウスの肝臓における L-PGDS や Corin の発現量を調べた。まず、L-PGDS について調べたところ、L-PGDS の発現量は FXR を欠損する肝臓において劇的に減少しており、逆に合成 FXR リガンドである GW4064 を投与したマウスの肝臓においては著明に亢進することが分かった。したがって、L-PGDS は今までに知られていない新しい FXR 標的遺伝子であり、 β Klotho ノックアウトマウスにおける L-PGDS 発現の亢進は、FXR リガンドとなる胆汁酸類縁化合物が β Klotho ノックアウトマウスにおいて増加したことによる結果であることが示唆された。一方で、Corin についても同様に調べたところ、Corin の発現量は FXR を欠損する肝臓において有意に増加していること、合成 FXR リガンドである GW4064 を投与したマウスの肝臓においては変化しないことが分かった。この結果の解釈は困難であるが、 β Klotho ノックアウトマウスにおける Corin の発現亢進は、胆汁酸や FXR リガンドが増加することに起因する2次的結果ではなく、 β Klotho が欠損したことによる直接的な結果である可能性が示唆される。

2) β Klotho 共役化合物の解析

四重極一飛行時間型 (Q-ToF 型) 質量分析装置および多変量解析ソフトウェアを用いた網羅的解析により、 β Klotho ノックアウトマウスの尿中で、餌や性別などによらず、恒常的に有意に減少 (約 50%) し、なおかつ量的に豊富に存在する、非常に興味深い未知化合物 (イオン 569 : 分子量 569 の未知化合物) を見出すことに成功した。精密質量測定、Empirical formula (経験式 (元素組成)) 推定、タンデムマス (MSMS) による断片化パターン解析、標準品とのカラム保持時間や MSMS パターン比較等を行ったところ、イオン 569 は、コール酸にグルコース 1 分子が付加した、コール酸グルコシド (参考文献 8) である可能性が最も高いことが分かった。次に、イオン 569 の尿中存在量が β Klotho の直接的な影響によって変化しているのか、あるいは β Klotho ノックアウトマウスにおいて胆汁酸が過生成されていることなどの、2 次的な影響によって変化しているのかを、1) と同様に、FXR ノックアウトマウスや、胆汁酸を混餌投与することによって胆汁酸プールを β Klotho ノックアウトマウスと同程度にまで増加させた野生型マウスを用いることによって調べた。その結果、イオン 569 の尿中存在量は、FXR ノックアウトマウスでは野生型マウスと変わらなかったが、胆汁酸混餌投与により胆汁酸プールを β Klotho ノック

アウトマウスと同程度にまで増加させた野生型マウスにおいては有意に減少することが分かった。したがって、 β Klotho ノックアウトマウスにおけるイオン 569 の減少は、胆汁酸プールが増加したことによる間接的な影響によって生じた結果であり、 β Klotho の酵素としての働きなど、 β Klotho 自身の直接的影響による変化ではないことが示唆された。

C. 結語

我々は新しい脂質代謝制御分子である β Klotho と共役する分子を探索することを介して、肝臓や全身における β Klotho の作用機序を今までとは違うアプローチによって解明し、肝臓における脂質代謝の理解につなげることを目指した。しかしながら、本研究期間では、新しい β Klotho 共役分子の候補をごく少数見出すことしかできず、それらの characterization もあまり進めることができなかった。今後は、今回見出した β Klotho 共役分子を起点として、“ β Klotho システム” の理解を深めると同時に、同システムが NASH や NAFLD といった脂質代謝異常に起因する肝臓疾患の病態形成に寄与するかどうか、もし寄与するとすれば、どのような機序で寄与するのか、あるいは、同システムが肝臓脂質代謝疾患の治療戦略に活用できるか等について、 β Klotho ノックアウトマウスや FXR ノックアウトマウス

といった動物モデルを活用しながら、さらに検討を進めていきたい。

D. 参考文献

1. β Klotho の同定とその機能
伊藤慎二
内分泌・糖尿病科 (科学評論社)、平成20年、第26巻、第6号、562-573頁
2. Molecular cloning and expression analyses of mouse β klotho, which encodes a novel Klotho family protein
Shinji Ito, Satoko Kinoshita, Norihiko Shiraishi, Satoshi Nakagawa, Susumu Sekine, Toshihiko Fujimori, Yo-ichi Nabeshima
Mechanisms of Development, 2000; 98: 115-119
3. Impaired negative feedback suppression of bile acid synthesis in mice lacking β Klotho.
Shinji Ito, Toshihiko Fujimori, Akiko Furuya, Junko Satoh, Yoko Nabeshima, Yo-ichi Nabeshima
The Journal of Clinical Investigation, 2005; 115(8): 2202-2208
4. Relevant use of Klotho in FGF19 subfamily signaling system *in vivo*.
Ken-ichi Tomiyama, Ryota Maeda, Itaru Urakawa, Yuji Yamazaki, Tomohiro Tanaka, Shinji Ito, Yoko Nabeshima, Tsutomu Tomita, Shinji Odori, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao, Akihiro Imura, Yo-ichi Nabeshima.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2010; 107(4): 1666-1671
5. Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing beta-glucuronides
Osamu Tohyama, Akihiro Imura, Akiko Iwano, Jean-Noel Freund, Bernard Henrissat, Toshihiko Fujimori, Yo-ichi Nabeshima
Journal of Biological Chemistry, 2004; 279: 9777-9784
6. Expression of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) in human heart and its accumulation in the coronary circulation of angina patients
Yutaka Eguchi, Naomi Eguchi, Hiroshi Oda, Kousuke Seiki, Yoshiyuki Kijima, Yasuhiko Matsu-ura, Yoshihiko Urade, Osamu Hayaishi
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1997; 94(26): 14689-14694
7. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme
Wei Yan, Faye Wu, John Morser, Qingyu Wu
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000; 97(15): 8525-8529
8. Evidence for bile acid glucosides as normal constituents in human urine
H.-U. Marschall, B. Egestad, H. Matern, S. Matern, J. Sjøvall
FEBS Lett., 1987; 213(2): 411-414

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍（田中智洋）

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
田中智洋	1)レプチンの発見 —意義とその特徴	中尾一和	レプチンのトランスレシ ョナルサイエ ンス メタボ リックシンド ロームの治療 戦略	診断と治 療社	東京	2012	130-136
田中智洋	第7章肥満症とや せ 摂食調節	中尾一和	最新内分泌代 謝学	診断と治 療社	東京	2013	431-436

雑誌（田中智洋）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
田中智洋 鍋島陽一	β Klothoによる代謝恒常性制御	実験医学 (羊土社)	Vol.3 1 No.5 (増刊)	76-82	2013

Experimental Medicine

実験医学

別刷

 羊土社

[発行元]

株式会社 羊土社

〒101-0052

東京都千代田区神田小川町2-5-1

TEL 03(5282)1211(代表)

FAX 03(5282)1212

E-mail eigyo@yodosha.co.jp

URL <http://www.yodosha.co.jp/>

© YODOSHA CO. LTD.

本誌に掲載する著作物の複製権・上映権・演説権・公衆送信権(送信可能化権を含む)は(株)羊土社が保有します。本誌を無断で複製する行為(コピー、スキャン、デジタルデータ化など)は、著作権法上での限られた例外(「私的使用のための複製」など)を除き禁じられています。研究活動、診療を含み業務上使用する目的で上記の行為を行うことは大学、病院、企業などにおける内部的な利用であっても、私的使用には該当せず、違法です。また私的使用のためであっても、代行業者等の第三者に依頼して上記の行為を行うことは違法となります。

©COPY <(株)出版者著作権管理機構 委託出版物> 本誌の無断複製は著作権法上での例外を除き禁じられています。複写される場合は、そのつど事前に、(株)出版者著作権管理機構(TEL 03-3513-6969, FAX 03-3513-6979, e-mail: info@jcopy.or.jp)の許諾を得てください。

4. β Klothoによる代謝恒常性制御

田中智洋, 鍋島陽一

副甲状腺、腎臓、脈絡叢に発現する膜タンパク質。αKlothoは、カルシウム、リン、ビタミンDの恒常性維持に必須の分子であり、発見から10年余を経て代謝制御における生理機能の全貌が解明されつつある。βKlothoは、αKlothoとアミノ酸配列、ドメイン構造上高い相同性を有するホモログで肝臓、膵臓、脂肪組織に高濃度の発現を認めることからエネルギー代謝制御における機能が示唆される。最近の研究により、βKlothoは肝細胞におけるFGF19シグナル伝達に必須であり、FGF19によるコレステロールからの胆汁酸合成の抑制に寄与することが示された。さらに結合分子からは、βKlothoがFGFシグナルの受容に留まらず、栄養分子の膜輸送やミトコンドリアのエネルギー産生と物理的、機能的に共役する可能性が示され、臓器連関に基づくエネルギー代謝恒常性維持機構における意義が解明されつつある。

はじめに

αklotho遺伝子変異マウスは、若齢より皮膚萎縮、

脱毛、骨密度の低下、性腺萎縮、動脈石灰化、血管内皮機能障害、肺気腫などヒトの老化に類似した多彩な表現型を示し短命である¹⁾。このことから、αKlothoは

[キーワード&略語]

コレステロール、胆汁酸、エネルギー代謝、FGF19サブファミリー、プロテオーム

βkl KO: βklotho knockout mouse (ベータクロトノックアウトマウス)

FGF: fibroblast growth factor (線維芽細胞増殖因子)

FGFR: fibroblast growth factor receptor (線維芽細胞増殖因子受容体)

FXR: farnesoid X receptor (ファルネソイドX受容体)

KLrP: Klotho-related protein (クロトー関連タンパク質)

LRH-1: liver receptor homolog-1

NaK: Na, K-ATPase (ナトリウムカリウムATPアーゼ, ナトリウムポンプ)

NaPi: Na-dependent phosphate transporter (ナトリウム依存性リン酸トランスポーター)

NCX: Na/Ca exchanger (ナトリウムカルシウム交換体)

SHP: small heterodimer partner

VDR: vitamin D receptor (ビタミンD受容体)

VLDL: very low density lipoprotein (超低比重リポタンパク質)

β Klotho as a novel regulator of energy homeostasis

Tomohiro Tanaka¹⁾²⁾/Yo-ichi Nabeshima¹⁾: Foundation for Biomedical Research and Innovation¹⁾/Medical Innovation Center, Kyoto University Graduate School of Medicine²⁾ (公益財団法人先端医療振興財団先端医療センター¹⁾/京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター²⁾)