

201208012B

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22年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 田 中 智 洋

平成25(2013)年3月

目 次

I. 総合研究報告

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

田中 智洋 ----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 29

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 35

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総合研究報告書

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

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った。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の結果の解釈、統合を担当し、研究分担者は、最新のオミックスサイエンスにより、胆汁酸依存性および非依存性のNASH関連分子群の同定と評価を担当した。研究代表者の研究により、初年度である平成22年度には、①胆汁酸合成制御における β Klotho / FGF19システムの中心的意義を報告(Tomiyama et al. *PNAS*, 2010)。免疫沈降-質量分析による肝臓の細胞膜画分における β Klotho結合候補分子群の同定。②マウスの脂肪肝病態における β Klothoシステムの機能異常亢進の可能性を発見。③ β Klothoはコレステロールの胆汁排泄抑制と同時に、VLDLの形での脂肪酸・コレステロールの血液中への放出を促進することを解明。④柴胡剤・熊胆剤投与マウスの胆汁分析のためのメタボロミクス解析システムを構築。⑤肝臓特異的 β klothoトランスジェニックマウスのライン樹立に成功した。続く平成23年度には、①野生型ないし 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。これらは当初の予定にはなかった成果であり、 β Klothoシグナル伝達系に対する柴胡剤・熊胆剤の作用を解析しようとする平成24年の研究計画遂行への重要な布石となった。さらに当初の作業仮説の通り、②メチオニン・コリン欠乏食(MCD)及び高脂肪食負荷マウスをモデルとした解析において、柴胡剤・熊胆剤のNASH改善作用を実証することに成功した。一方、③ 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、④ β Klothoが既に報告したコレステロールの胆汁排泄抑制作用と別にVLDLトリグリセライドの放出を促進することから、 β Klothoの発現・機能の亢進が、脂質の体内滞留を促しNASHの病態形成を促進している可能性が示唆される。実際、⑤ β kl^{-/-}にMCDによる脂肪肝を誘発すると、脂質含量や酸化ストレスマーカーの増加が対照野生型よりも経度であった。NASH病態への β Klothoの関与の検討に関しては今年度の成果として⑥肝細胞特異的 β klothoトランスジェニックマウスの樹立に成功した。その上で、(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。最終年度であった、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-βKlotho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。一方で、主に研究分担者による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が目指された。その結果、第一には、βKlotho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D2合成酵素(LPGDS)、Corin (TMPRSS10/Atrial natriuretic peptide-converting enzyme) が同定され、これら2つのタンパク質が胆汁酸依存性および非依存性のそれぞれ異なるメカニズムにより発現制御を受けていることが示された。第二に、βKlotho共役低分子化合物として本研究期間の前半で同定されていた未知ピーク(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が、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された。この分子の挙動は胆汁酸変化の下流で制御されていることがノックアウトマウス等を用いた研究により解明されたことから、βKlotho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された。哺乳類の胆汁酸代謝制御におけるβKlothoの中心的役割が確立しつつある現在、これらの研究成果はβKlothoを標的としたNASH治療法の研究開発への期待を高めるものである。以上の成果から、本研究により、胆汁酸代謝制御によるNASH治療の新しい戦略が提唱され、その代表的な具体例として漢方薬(小柴胡湯、大柴胡湯、熊胆剤)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ことは確実視されている。しかしNASHの発症メカニズムは未だ完全には明

らかではなく、有効性が確立した治療法もほとんど無い。本研究では申請者らが解明した最新のコレステロール・胆汁酸代謝制御メカニズムに立脚し、NASHの分子病態とNASH治療薬としての柴胡剤、熊胆剤の有効性および作用機序を解明することを目指した。

申請者らは、胆汁酸合成のネガティブフィードバック制御に必須の因子、 β Klothoの遺伝子をクローニングし(S Ito et al. *Mech Dev*, 2000)、 β KlothoがFGF19や胆汁酸受容体FXRと協同して個体の胆汁酸代謝を統御する巧妙な分子機構を解明した(S Ito et al. *J Clin Invest*, 2005, K Tomiyama et al. *Proc Natl Acad USA*, in press)。また、脂肪肝の発症においては核内受容体、PPAR α / γ 、FXRなどの相互作用が重要であることを示した(T Tanaka et al. *Metabolism*, 2005)。熊胆剤の主成分、ウルソデオキシコール酸は胆汁酸の一種であり、臨床研究においてヒトNASH症例に対する有効性が示された数少ない薬剤の一つでもある(J Laurin et al. *Hepatology*, 1996, ML Balmer et al. *Liver Int*, 2009)。一方、ウイルス性活動性肝炎において幅広く処方されている柴胡剤にも、胆汁酸合成調節作用が存在する(塩澤学ほか *日消外会誌*, 2000)。以上より、胆汁酸代謝制御の分子機構を縦糸、柴胡剤・熊胆剤の薬理作用を横糸とした脂肪肝研究が、NASHの病態解明と治療標的の突破口となる可能性は極めて高い。申請者らの報告を契機として胆汁酸代謝研究は国

内外で新たな展開を迎えつつある。しかしNASH病態における変化や漢方薬の作用標的としての意義は全く未解明であり、本研究がこの分野をリードすることは確実である。 β Klotho / FGF19 / FXRシステムが担う胆汁酸代謝制御機構のNASH病態における意義の解明と、柴胡剤・熊胆剤の作用標的分子の同定によりNASHの診断と治療が一新されるものと期待される。

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。われわれは第一に、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。第二に、古来肝疾患に対し用いられている熊胆剤、柴胡剤による胆

胆汁酸代謝調節作用に着目し、これら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的とした。

本研究では上述の独自の着想に基づいて、(1) 柴胡剤として小柴胡湯、大柴胡湯、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。さらには、胆汁酸代謝のマスターレギュレーターとしての位置が確立しつつある、FGF19- β Klothoシステムの遺伝子改変動物の新規樹立と解析により、全く新しい、「胆汁酸代謝統御によるNASH治療」の新規パラダイム樹立に向けた取り組みを行った。具体的には、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。最終年度である平成24年度においては、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し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及び安全性の検証、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。

一方、漢方薬に限らず、新たな胆汁酸介入薬によるNASH病態改善の標的分子探索として、オミックスサイエンスを駆使した研究を実施した。 β Klothoノックアウトマウスでは、胆汁酸合成酵素(Cytochrome7a1(Cyp7a1))発現に対するFGF19/15によるネガティブフィードバック制御が破綻し、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)が亢進する。また、 β Klothoノックアウトマウスではコレステロール胆石生成を誘導する餌を投与した際に、胆石が蓄積されにくいという表現型も認められる。これらのことから、 β Klothoは肝臓において、特にコレステロールを中心とする脂質代謝に寄与する因子であると考えられる。さらに、 β Klothoノックアウトマウスには野生型マウスに比べて有意に体重が少ないという興味深い表現型も認められるが、その成因は不明である。本研究では(1) β Klothoがどのような分子と関連しながら、肝臓における脂質代謝を調節するのかを解明す

ること、また、(2) 解明したシステムをモデルとして肝臓への脂肪蓄積をコントロールする新しい手法を開発することを主な目的とした。

β Klotho は、 α Klotho と構造的に類似する分子として、2000年に我々が同定した分子である。 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している。その作用機序は内分泌性線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor (FGF)) の一つであり、食事後に回腸から分泌され、門脈を介して肝臓へ至り、肝臓で胆汁酸生合成を抑制する液性因子 FGF19/15の共受容体としての働きによるものである。また、 β Klothoによる胆汁酸生合成抑制は、胆汁酸生合成全体の律速段階を司る酵素、コレステロール7 α 水酸化酵素 (Cyp7a1) に選択的なものであり、コル酸生合成に必須の酵素 (コレステロール12 α 水酸化酵素 (Cyp8b1)) に対しては相対的に弱いことを我々は明らかにしている。したがって、 β Klothoは胆汁酸プールを構成する分子種の調節にも寄与すると考えられる。

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が、 β Klothoが α 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

とを考慮に入れると、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も考えられる。なかんずく、胆汁酸と β Klothoとの深い関わりからは、 β Klothoが、胆汁酸骨格を持ち、単糖の修飾を受けた化合物の代謝に関わる可能性が示唆される。 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。最終年度である平成 24 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. 研究方法

胆汁酸は食物中の脂質及び脂溶性ビタミンのミセル化による吸収促進のために必須である一方、重要な生体材料であるコレステロールを基質として合成される。また胆汁酸の過剰は消化管（特に結腸ガン）の発ガンリスクとなることから、その合成は厳密にコントロールされている。胆汁酸は肝臓の胆汁酸受容体 FXR を介して自身の合成を抑制することが知られ、その分子メカニズムの詳細が明らかとなっている。胆汁酸はまた、遠位小腸（回腸遠位側）上皮細胞に発現する FXR

を介して門脈血中への FGF19 の分泌を誘導し、FGF19 は肝細胞膜上の β Klotho を受容体としてシグナルを伝え、新たな胆汁酸合成を抑制することが本研究の研究代表者・研究分担者らの研究によって明らかとなった。われわれが作製した β Klotho 遺伝子欠損マウスでは胆汁酸合成のネガティブフィードバック機構の破綻と同時に、高脂肪食による脂肪肝発症への抵抗性が観察される。また脂肪肝の病態では β Klotho 発現が亢進する現象を既に発見しており、 β Klotho が胆汁酸代謝と脂肪肝感受性を結ぶ分子である可能性が強く示唆された。

本研究では、 β Klotho 遺伝子欠損マウスや、本研究で新たに開発した、肝臓特異的（アルブミンプロモーター） β Klotho 過剰発現マウスを作製しこれらに NASH 病態を栄養学的に誘発して解析することにより、胆汁酸代謝調節作用を有する柴胡剤・熊胆剤の NASH に対する治療効果とその標的分子を解明した。研究代表者（田中）がモデル動物の解析と総括を、研究分担者（伊藤）がメタボロミクス解析を、大学院生・実験補助員からなる研究協力者 2 名が β Klotho 過剰発現マウスの作製と解析、漢方薬投与を担当した。

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 ヒドロキシノネナルその他の免疫染色を行うことにより病理組織学的検討を加えた。また長期投与実験では、肝臓以外に、脳、腎臓、皮膚、肺、心臓、骨格筋(腓腹筋)、脂肪組織を採取し、病理組織学的異常の有無を検索した。

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。

初年度である平成 22 年度には、①肝臓における β Klotho 結合分子の探索、② β Klotho を仲立ちとする肝臓と脂肪組織の機能連関の可能性の探索、③ β Klotho による肝 VLDL 放出制御の可能性の検討、④肝臓特異的 β klotho トランスジェニックマウスのライン樹立、を行った。

- ① 雄性C57/BL6マウスないしは、 β klotho 遺伝子欠損マウス各4匹を安楽死・脱血した後肝臓を採取し、スクロース密度勾配法により細胞膜を含むミクロソーム画分を精製、これをNonidet P-40®により可溶化した後、抗 β Klotho抗体により免疫沈降、共沈物をSDS-PAGEで展開後トリプシン抽出し、全ゲルをLC/MS/MSにより解析した。 β Klotho遺伝子欠損マウス由来の共沈物、コントロール用抗体の免疫共沈物をネガティブコントロールとして肝臓における β Klotho結合分子を探索した。
- ② 高脂肪食負荷、*ob/ob*マウス、*db/db*マウス等肥満と同時に肝脂肪蓄積を発症するマウスモデルにおいて肝臓および白色脂肪組織での β Klotho発現をウエスタンブロット法により検討した。
- ③ 高脂肪食を負荷することで雄性C57/BL6マウスないし β klotho遺伝子欠損マウスに高脂血症を誘導し、血清をHPLCで各リポタンパク分画に分離した後化学発色法により脂質濃度を測定した。

④ マウスアルブミンプロモーターの下流に β klotho全長cDNAないしは β Klotho-eGFP融合タンパク質をコードしたcDNAをつなぐコンストラクトを作製しC57BL/6Jマウスの受精卵の核にマイクロインジェクションすることにより、肝細胞で β Klothoないし β Klotho-eGFP融合タンパク質を過剰に発現するトランスジェニックマウスを作製した。

平成23年度には

- ① 生型ないし 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。
- ② メチオニン・コリン欠乏食(MCD)及び高脂肪食負荷マウスをモデルとした解析において、柴胡剤・熊胆剤のNASH改善作用の実証を目指した。
- ③ β Klothoのタンパク発現をマウスの脂肪肝において解析した
- ④ β Klothoが既に報告したコレステロールの胆汁排泄抑制作用と別にVLDLトリグリセライドの放出促進する可能性を探索し、 β Klothoの発現・機能の亢進が、脂質の体内滞留を促しNASHの病態形成を促進している可能性を検証した。
- ⑤ β kl^{-/-}にMCDによる脂肪肝を誘発し、脂質含量や酸化ストレスマーカーの増加の有無を対照野生型と比較した。
- ⑥ 肝細胞特異的 β klothoトランスジェニック

クマウスの樹立に成功した。

- ⑦ β Klotho が特定の標的化合物の選択的代謝を介して、肝機能、脂質代謝等を調節し、生体恒常性維持システムに寄与する可能性を探るとともに、 β Klotho やその周縁の共役化合物群によって構成されるシステムが、脂肪肝炎(NASH)の予防、治療を志向した創薬標的として活用できる可能性について検討することを目指した。

平成24年度には、平成22年度、平成23年度の成果を踏まえメチオニン・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の証明を目指した。

なお、本研究では個人情報の取扱いや、ヒト被検者・ヒト由来試料を用いた研究は行っていない。また、実験動物を用いる研究に際しては「動物の愛護及び管理に関する法律」、「同施行規則(平成18年1月)」、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年文部科学省告示第71号)および「京都大学における動物実験の実施に

関する規則」(平成19年2月)を遵守した。

さらに京都大学動物実験委員会の承認の元に実施し、3Rの精神に則って必要頭数と動物に与える苦痛を最小限にとどめるよう最善を尽くす。遺伝子改変マウスを用いる研究、培養哺乳類細胞や大腸菌等への遺伝子導入を伴う研究においては「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法)」及び関係法令を遵守し遺伝子組換え実験区画内で実施した。

C. 結果と考察

上記方法により平成22年度には以下の研究成果を得た。

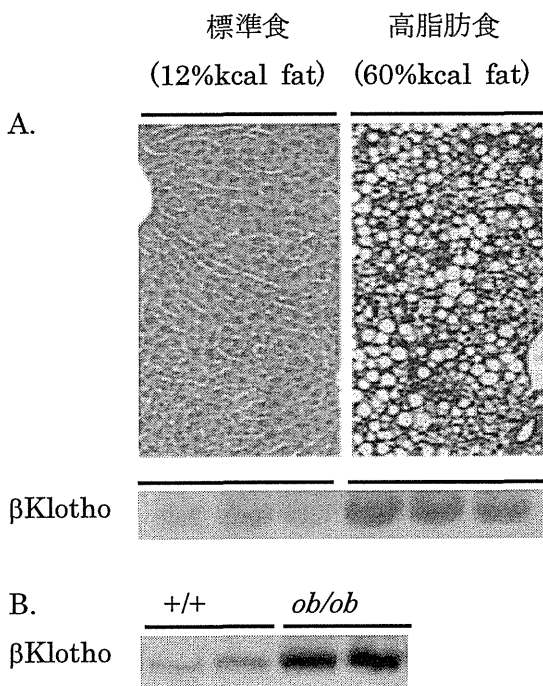
- ① 胆汁酸合成制御における β Klotho / FGF19 システムの中心的意義を報告(Tomiyama et al. *PNAS*, 2010)。免疫沈降-質量分析による肝臓の細胞膜画分における β Klotho 結合候補分子群の同定。
- ② マウスの脂肪肝病態における β Klotho システムの機能異常亢進の可能性を発見。
- ③ β Klothoはコレステロールの胆汁排泄抑制と同時に、VLDLの形での脂肪酸・コレステロールの血液中への放出を促進することを解明。
- ④ 肝臓特異的 β klothoトランスジェニックマウスのライン樹立に成功。

それぞれの詳細は下記の通りである。

- 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に成功し、その一部を論文として報告した(Tomiyama et al. *PNAS*, 2010)。より詳細な分子メカニズムの解明のため、肝臓の細胞膜画分のライセートを用いたプロテオミクス解析により β Klotho と結合しているタンパク質分子候補リストの作成に成功した。これは β Klotho シグナル伝達系に対する柴胡剤・熊胆剤の作用を解析しようとする平成24年の研究計画遂行への重要な布石となる。
- ② β Klotho の mRNA・タンパク発現は肥満・脂肪肝を示す多くの病態マウスの白色脂肪組織で著しく減少することを我々は以前から見出していたが、今回、高脂肪食負荷マウス、*ob/ob* マウス、*db/db* マウスの脂肪肝において明らかに増加することを発見した(図1)。
- ③ β Klotho はコレステロールの胆汁排泄抑制とは別に、VLDLとしてのトリグリセライドの血中放出を促進することを明らかにした(図2)。
これらの研究成果は、 β Klothoによる脂質代謝制御マシナリーの機能亢進が、脂質の体内滞留を促し、NASHの病態形成のファーストステップとしての肝脂質蓄積を増悪させている可能性を示唆する。

④ 胆汁中への脂質排泄制御の本質的重要性が認識されたことから、肝臓特異的 β klotho トランスジェニックマウスのラインの樹立を行い、これに成功した。

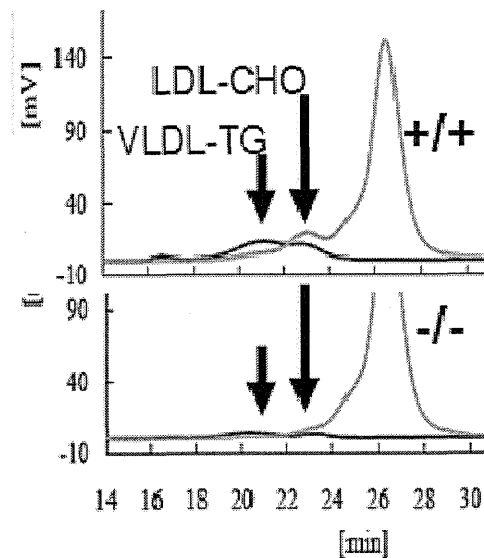
図 1. 高脂肪食負荷マウス、*ob/ob*マウスの脂肪肝では、 β Klothoの発現亢進を認め、 β Klotho/FGF19システムの機能亢進が示唆された



12 週間の高脂肪食負荷後の肝組織像(H&E)と肝臓での β Klothoのタンパク発現(A)、10 週齢の野生型同胞(+/+)および *ob/ob* マウスの肝臓での β Klothoのタンパク発現(B)

図 2

β klotho ノックアウトマウスの肝臓ではコレステロールの胆汁排泄の低下とともに VLDL-トリグリセライドの血中放出低下が示された



4週間の高脂肪食負荷後の血漿リポタンパク質を HPLC により分析。下段の β klotho ノックアウトマウス(-/-)では上段の野生型同胞(+/+)と比較して明らかな VLDL-トリグリセライドと LDL-コレステロールの低下が認められる。

続いて、平成 23 年度は以下の研究成果を得た。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が、同時に小柴胡湯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 (UDCA) を経口投与すると、脂肪滴の明らかな現象が観察され、肝脂肪化の改善が認められた。

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と炎症性変化について検討した。その結果、MCD による肝脂

質蓄積については UDCA の方が程度は強いものの、いずれの薬剤によっても脂肪滴の減少が認められ、これらの併用で脂肪滴の沈着はほとんど完全に消失が認められた。さらに、MCD 投与マウスの肝組織切片において、酸化ストレスマーカー（特に過酸化脂質を検出するとされる）である、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。

以上、初年度及び二年次の成果を総括すると、平成 22 年度には、当初の計画通り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に成功し、その一部を論文として報告した (Tomiya et al. *PNAS*, 2010) 。

より詳細な分子メカニズムの解明のため、②肝臓の細胞膜画分のプロテオミクス解析により β Klotho 結合分子群を明らかにし、平成 23 年度には③野生型ないし 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。これらは当初の予定にはなかった成果であり、 β Klotho シグナル伝達系に対する柴胡剤・熊胆剤の作用を解析しよう

とする平成24年の研究計画遂行への重要な布石となった。

平成23年度にはさらに当初の作業仮説の通り、④メチオニン・コリン欠乏食(MCD)及び高脂肪食負荷マウスをモデルとした解析において、柴胡剤・熊胆剤のNASH改善作用を実証することに成功した。一方、⑤ 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、⑥ β Klotho が既に報告したコレステロールの胆汁排泄抑制作用と別に VLDL トリグリセライドの放出を促進することから、 β Klotho の発現・機能の亢進が、脂質の体内滞留を促し NASH の病態形成を促進している可能性が示唆される。実際、⑦ β kl^{-/-} に MCD による脂肪肝を誘発すると、脂質含量や酸化ストレスマーカーの増加が対照野生型よりも程度であった。NASH 病態への β Klotho の関与については⑧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解析を進める。以上の①～⑧が本研究事業による初年度及び次年度における研究成果である。これら検討により、柴胡剤、熊胆剤のそれぞれ単独及び併用による有効性が証明できた。

すなわち平成23年度までには以下の成果が得られたことになる。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⑨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。

これらを踏まえて行った平成 24 年度の研究により以下の成果を得た。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 ヒドロキシノネナー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つ

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、研究分担者らの解析により、 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 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上昇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二次的に尿中含量が減少したものであることが示唆された。

研究分担者の研究は、特に、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ができず、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。

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する。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 システムに関す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 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
7. 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**
8. 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**
9. 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**
10. 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**
11. 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**
12. 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
13. Evidence for bile acid glucosides as normal constituents in human urine
H.-U. Marschall, B. Egestad, H. Matern, S. Matern, J. Sjovall
FEBS Lett., 1987; 213(2): 411-414
14. 「 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
15. 「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
16. 「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
17. 「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
18. 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
19. 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」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ョナルサイエンス—レプチン実用化に向けて— レプチンの発見—意義とその特徴 pp130-136
20. 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)
- 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— β クロトー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、鷲田美和、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)