

マウスにおける食事誘導性体重変化時の
脂肪肝感知ヘパトカイン LECT2 の急速な反応

Rapid response of the steatosis-sensing hepatokine LECT2 during
diet-induced weight cycling in mice

金沢大学大学院自然科学研究科自然システム学専攻

近本 啓太

Dieting is an effective treatment for overnutrition diseases, such as type 2 diabetes and fatty liver. However, dieting often leads to repeated cycle of weight loss and regain. Little report is available as rapid responding serum markers of overnutrition that predict weight change during dieting induced weight loss and regain.

The present findings confirm that leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2), an obesity-associated hepatokine, is rapid responding overnutrition markers during diet-induced cycles of weight loss and gain. When diets were switched from a high fat diet (HFD) to a regular diet (RD) in obese mice, body weight decreased slowly but serum LECT2 levels decreased rapidly. Similarly, when diets were switched from a RD to a HFD in lean mice, body weight was elevated slowly but serum LECT2 levels increased by 1.6 times within 4 days. Serum LECT2 levels showed positive correlate with body weight, serum insulin levels, serum glucose levels and liver triglyceride content but not with adipose tissue weight.

These data demonstrate that serum LECT2 levels change prior to body weight change in response to switches diets and suggests that measurement of serum LECT2 levels may be clinically useful for dieting management in obesity.

【背景】

肥満症や糖尿病に対する治療において、運動療法や食事療法は非常に効果的である。食事療法や運動療法は体重減少を誘導するが、その後に再び体重が増加するリバウンドがたびたび起こる。リバウンドは生体に悪影響を与えるといわれるが、その逆の報告もあり、リバウンドが善なのか悪なのかは未だに決着がつかない。また、食事療法は有益な効果が期待されるが、食事制限を行ってもその効果が実感できず、モチベーションが続かずにやめてしまう方もいる。そのため、モチベーションの維持のために食事療法の効果を鋭敏に反映する過栄養マーカーが求められている。そこで、肥満と関連するヘパトカイン **Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2)** に注目した。これまでの研究で **LECT2** は肥満者の肝臓でその発現が上昇し、骨格筋特異的にインスリン抵抗性を示すことが明らかにされている (F Lan, H Misu, K Chikamoto *et al. Diabetes*, 2014)。この報告では **LECT2** 発現制御の研究から、**LECT2** は高脂肪食摂取や摂食後にその発現が増大し、運動後では発現が低下していることを示した。さらに **LECT2** の発現は生体内でエネルギーセンサーとして働く **AMP-activated kinase (AMPK)** のリン酸化レベルと相反していることを発見し、**LECT2** は生体内のエネルギー状態を反映していることを示した。これらの結果は、**LECT2** は肥満時における過栄養マーカーとして応用できることを示唆する。しかしながら、これまでに、食種変更による急激な体重変化時における **LECT2** 濃度変化は検討されていない。

インスリンは、膵臓から分泌され、血糖値を抑制するホルモンである。これまでの研究でインスリンは **H4IIEC3** 細胞において濃度依存的に **Lect2** 遺伝子発現を抑制し、かつ短時間の処置でも **Lect2** 遺伝子発現を抑制することを示した。しかしながら、これまでにインスリンによる **LECT2** 発現制御の詳細なメカニズムは解明されていない。

【目的】

本研究では、マウスに給餌する食種を変更することで体重を変化させるリバウンドモデルマウスを作成し、食種変更時の血中 **LECT2** 濃度変化及びリバウンドが生体に与える影響明らかにする。さらに加えて、インスリンによる **LECT2** 発現制御の詳細なメカニズムを解明する。

【実験方法】

マウスに3ヶ月間高脂肪食(HFD)を摂食させた後、飼料を正常食(RD)に1ヶ月間変更し、さらにその後高脂肪食を40日間食べさせたリバウンドモデルマウスを作成した。

- ①リバウンドモデルマウスにおいて食種変更時の体重変化及び血中 LECT2 濃度変化を検討した。
- ②実験終了後リバウンドモデルマウスから、肝臓、脂肪、血液を採取し、リバウンドが生体に及ぼす影響を検討した。
- ③実験終了後リバウンドモデルマウスにおいて、血中 LECT2 濃度と相関する肥満パラメータの探索を行った。
- ④LECT2 プロモーター領域を導入した LECT2 プロモーターレシフェラーゼベクターを作成し、インスリンによる LECT2 転写活性を評価した。さらにマウスから初代培養肝細胞を単離し、インスリンによる *Lect2* 遺伝子発現抑制を評価した。

【結果】

1.食種変更時における体重変化と血中 LECT2 変化

マウスの食餌を HFD から RD に切り替えたとき、切り替え後体重はなだらかに減少し切り替え後 30 日で RD 群と同等まで低下した。一方で、血中 LECT2 濃度は切り替え後急激に減少し、10 日目には RD 群と同等まで低下した。食餌を 1 ヶ月間の RD から HFD に切り替えたとき、切り替え後体重はなだらかに上昇し切り替え後 40 日で HFD 群と同等まで上昇した。一方で、血中 LECT2 濃度は切り替え後急激に上昇し、切り替え後 4 日目には RD 群比較すると約 1.6 倍まで上昇した。

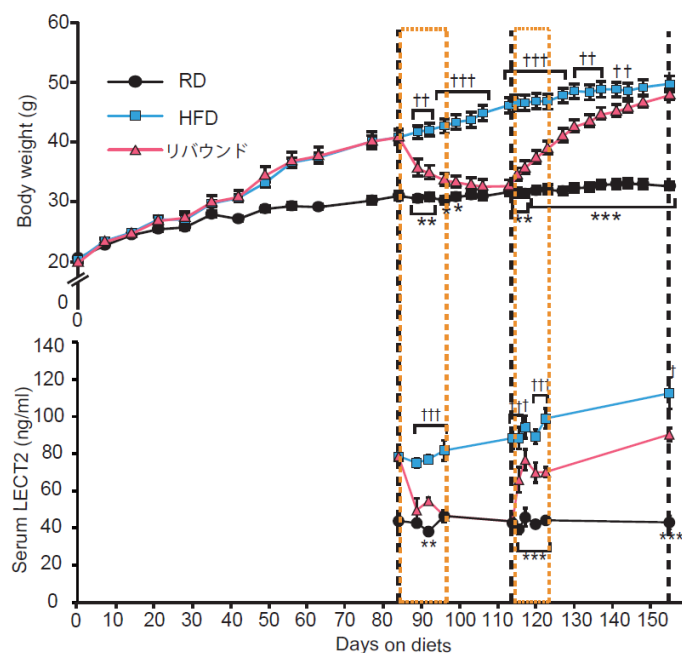


Figure 1.食種変更中のマウス体重変化と血中 LECT2 濃度変化

2, リバウンドが生体に及ぼす影響

リバウンド群では、HFD 群と比較して *Lect2* 遺伝子発現の低下、肝臓における中性脂肪の蓄積の改善、血中インスリン値の低下傾向を確認した。一方でリバウンド群では、HFD 群と比較して、脂肪組織重量の増加を確認した。

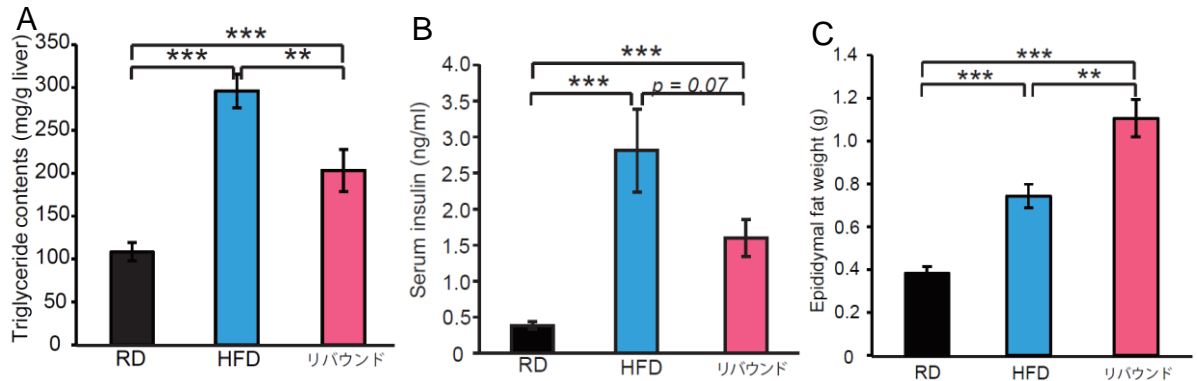


Figure 2. リバウンドが生体に及ぼす影響

A 肝臓中性脂肪含有量 B: 血中インスリン濃度 C: 内臓脂肪重量

3, 血中 LECT2 濃度と相関する肥満パラメータの探索

血中 LECT2 濃度は、体重、血中インスリン濃度、血中グルコース濃度、肝臓中性脂肪含有量と正相関することを確認した。特に肝臓中性脂肪含有量とは強い正相関を示した。一方で、血中 LECT2 濃度は内臓脂肪重量と相関を示さなかった。

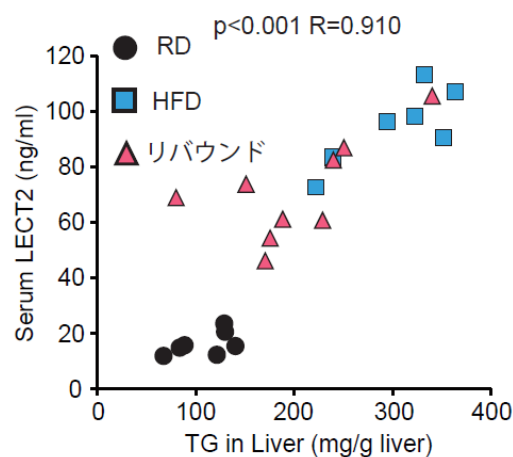


Figure 3. リバウンド実験後の血中 LECT2 濃度と肝臓中性脂肪含有量の相関

4, インスリンによる LECT2 発現抑制の検討

LECT2 プロモーターの上流-4200 までを導入した LECT2 プロモータールシフェラーゼベクターを用いた検討では、インスリンによる作用領域は確認されなかった。また、初代培養肝細胞において、食後状態をミミックした細胞では、インスリンは *Lect2* 遺伝子発現を上昇させた。

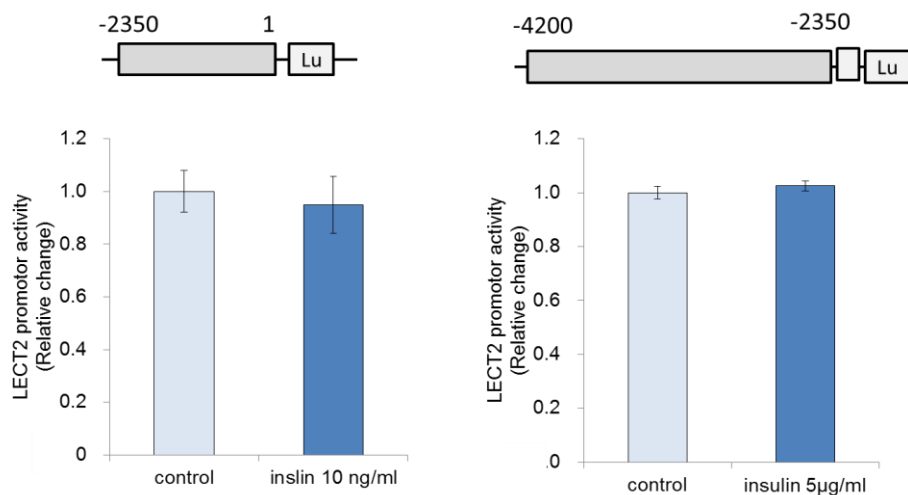


Figure 4. インスリン処置による LECT2 プロモーター活性の検討

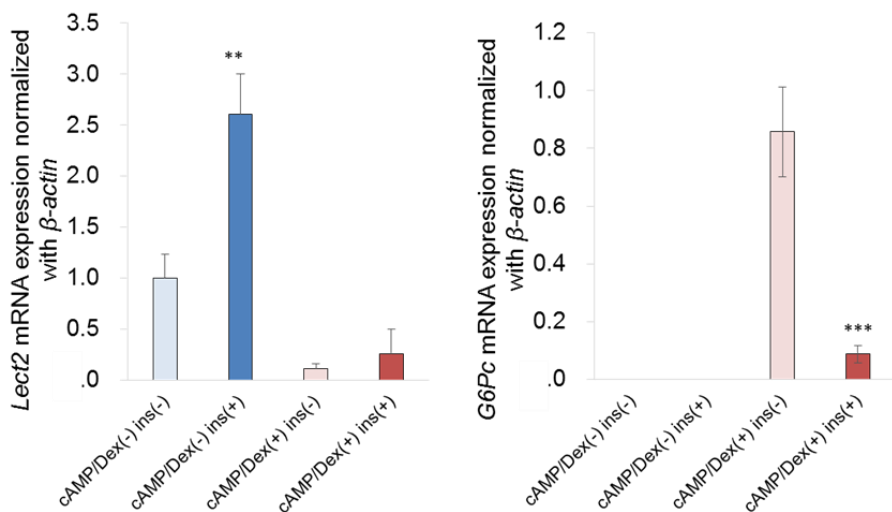


Figure 5. 初代培養肝細胞におけるインスリンの LECT2 発現への影響

【考察】

- ①食種変更時に、血中 LECT2 濃度は体重よりも早期にダイナミックに変化した。この結果は、LECT2 は食種変更を鋭敏に感知する過栄養マーカーであることを示唆する。
- ②リバウンド後では、脂肪肝やインスリン抵抗性が改善し、脂肪蓄積が増悪した。この結果は、リバウンドは生体に良い影響を与える反面、悪い影響も与え、それは臓器毎に異なることを示唆する。
- ③血中 LECT2 濃度は肝臓中性脂肪含有量と強い正相関を示した。この結果は、LECT2 は脂肪肝の程度を判別できる脂肪肝マーカーとなり得る可能性を示唆する。
- ④LECT2 プロモーター上のインスリン作用領域は、-4200 bp 内には確認できなかった。この結果は、さらに上流の位置にインスリン作用領域が存在することを示唆する。また、初代培養肝細胞において食後をミミックした細胞では、インスリンは LECT2 発現を上昇させた。この結果は、食後状態時にはインスリンは LECT2 産生を上昇させることを示唆する。

【総括】

本研究結果は LECT2 が過栄養マーカー及び脂肪肝マーカーとして応用出来る可能性を示唆する。リバウンドは臓器毎に異なる影響を与えることを示唆する。食後状態時ではインスリンは LECT2 発現を上昇させることを示唆する。

学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

マウスにおける食事誘導性体重変化時の脂肪肝感知へパトカイン LECT2 の急速な反応

2. 論文提出者 (1) 所 属 自然システム学 専攻

(2) 氏 名 ちかもと けいた
近本 啓太

3. 審査結果の要旨（600～650 字）

提出学位論文について第 1 回論文審査会（予備審査）を平成 28 年 12 月 21 日に開催し、審査の基本方針を決定した。それに基づいて平成 29 年 2 月 6 日に開催した公聴会での口頭発表および質疑応答の結果を踏まえ、その後開催した第 2 回論文審査委員会において下記の通り決定した。肥満と関連するへパトカイン Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) は高脂肪食摂取や摂取後にその発現が増大し、運動後では低下していることがわかっているが、食種変化による急激な体重変化時における LECT2 の濃度変化は報告されていない。近本氏はマウスに高脂肪食を 3 ヶ月摂取させた後に、1 ヶ月通常食に切り換え、更にその後高脂肪食を 4 0 日間摂取させるリバウンドマウスを作成し、インスリン濃度の変化ならびに LECT2 の変動を測定した。その結果 1) 高脂肪食から通常食に変えた時に体重減少より早く LECT2 濃度が低下し、2) 通常食から高脂肪食に変えた時には LECT2 濃度は急速に増大した。3) LECT2 の濃度は体重、血中インスリンやグルコース濃度、肝臓中性脂肪含有量とも正相関を示した。これらの研究を通して得られた研究成果は LECT2 が過栄養及び脂肪肝マーカーとして応用出来る可能性を示唆するものである。また、リバウンドが臓器ごとに異なる影響を与える可能性を示すものであり、今後の研究の発展は臨床応用面においても期待できるものである。これらの成果は博士（工学）の学位を与えるに十分なものであると判定した。

4. 審査結果 (1) 判 定（いずれかに○印） 合格 ・ 不合格
(2) 授与学位 博士（工学）