

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04119

研究課題名(和文) 抗酸化ストレス応答転写因子Nrf2は肥満者におけるサルコペニアの形成を抑止する

研究課題名(英文) Nrf2, a transcription factor for anti-oxidative stress response, ameliorates sarcopenia in obese subjects.

研究代表者

正田 純一 (Shoda, Junichi)

筑波大学・医学医療系・客員教授

研究者番号：90241827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：肥満者に随伴する高LPS血症は、Gut-Muscle axisやGut-Liver-Muscle axisを介して骨格筋において炎症・酸化ストレスを惹起し、サルコペニアの形成に関与する。一方、Nrf2は、生体の酸化ストレス防御の司令塔である。本研究では、サルコペニアの抑止における筋Nrf2の役割を検討した。筋Nrf2は、肥満の病態下で、遅筋線維萎縮の抑制、筋ミトコンドリア機能の維持に寄与することが明らかになった。さらに、Nrf2を介した骨格筋の維持は、Gut-Liver-Muscle axisを介して脂肪性肝炎の抑制に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満にサルコペニアを随伴したサルコペニア肥満は生命予後が不良であり、その抑止は重要な医療課題である。本研究では、肥満者がサルコペニアに至るルートに着目し、Nrf2がサルコペニアの形成に対して防御的に機能することを明らかにした。本研究の結果は、肥満者における骨格筋劣化に対して、Nrf2を標的とした新たな予防・治療法を構築する基盤となる可能性があり、今後の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Hyper-endotoxemia associated with obesity induces an inflammatory and/or oxidative stress in skeletal muscles and thereby underlies the development of sarcopenia via gut-muscle axis or gut-liver-muscle axis. On the other hand, Nrf2 acts as an in vivo regulator for oxidative stress. In this study, the roles of Nrf2 in muscles were investigated with special reference to an inhibition of sarcopenia. In obese mice, Nrf2 contributed to inhibit the atrophic changes of slow muscle fibers and to preserve the mitochondrial function in muscles. Moreover, Nrf2-related muscle preservation also contributed to prevent steatohepatitis via gut-liver-muscle axis in the mice.

研究分野：健康応用科学

キーワード：肥満 サルコペニア Nrf2 臓器連関 非アルコール性脂肪性肝炎 NASH

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満にサルコペニアを随伴したサルコペニア肥満は、生命予後が不良の疾病病態である。代表者らによる肥満者 472 人を対象とした調査においてサルコペニア肥満の進行が疑われる患者群では、膝進展筋力の低下、筋脂肪化が認められた (*J Gastroenterol* 2018)。また、臨床病態では、高 leptin 血症と高 LPS 血症が特徴的な初見であった。血中 LPS 濃度は、サルコペニア指数 (SMI)、サルコペニア肥満指数 (SV-ratio)、膝進展筋力と負の相関を示した。

(2) 肥満者では、腸内細菌叢の変容と腸管透過性の亢進などにより代謝性高 LPS 血症を高頻度に随伴する。LPS は、マクロファージにより異物として認識され、各臓器組織で炎症・酸化ストレスを惹起する。これより、LPS は Gut-Muscle axis や Gut-Liver-Muscle axis のルートを介して炎症性の筋障害を誘導し、サルコペニア (骨格筋減少と筋力低下) の形成に関与すると推測される。サルコペニアは、Muscle-Liver axis を介して非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の発症と進展を促進させ、肥満の肝関連死のリスクを増大させる。これより、肥満者におけるサルコペニアの予防と治療は重要な医療課題である。

(3) 酸化ストレス応答性転写因子 Nrf2 は、抗酸化関連遺伝子群の発現を制御する酸化ストレス防御の司令塔である。骨格筋における Nrf2 は、抗酸化ストレス応答に加えて、筋衛星細胞の増殖・分化等の筋再生にも影響し、骨格筋量と機能の維持に重要な役割を演じている (*Free Radic Biol Med* 2014)。Nrf2 は、LPS による自然免疫系の活性化を抑止する因子であり、LPS による筋障害に対して防御的に機能していることが推測される。

### 2. 研究の目的

本研究では、肥満者に随伴する腸内細菌叢の変容、腸管透過性の亢進、代謝性高 LPS 血症による自然免疫の活性化を介したサルコペニアの形成に対して、Nrf2 が果たす役割とそのメカニズムを解明することを目的とした。さらに、Nrf2 によるサルコペニアの抑止を介した NASH の抑制効果についても検討した。

### 3. 研究の方法

本研究では、骨格筋における Nrf2 の機能を解析するため、全身 Nrf2 遺伝子欠失 (Nrf2-KO) マウスをベースに、筋細胞にのみ Nrf2 を発現する筋細胞特異的 Nrf2 遺伝子レスキューマウス (Nrf2-筋レスキューマウス) を新たに作製した。Nrf2-KO マウスと Nrf2-筋レスキューマウスに高脂肪/果糖食を 24 週間摂餌させ、体組成、骨格筋重量と筋力、骨格筋の病理学的変化 (HE 染色、コハク酸デヒドロゲナーゼ; SDH 染色, Slow-skeletal myosin heavy chain/Laminin2 $\alpha$  二重染色) を比較解析した。また、Muscle-Liver axis の視点から、肝病態を病理学的 SAFscore にて評価し、肝組織における炎症・線維化関連因子の発現レベルに関しては、定量的 PCR にて解析した。組織のタンパク発現レベルは Western blotting にて解析した。

### 4. 研究成果

(1) Nrf2-KO マウスと Nrf2-筋レスキューマウスの間で、体重、体組成、四肢の骨格筋重量と握力に変化は認められなかった。骨格筋 (前脛骨筋) の病理学的解析において、HE 染色で両群の形態的な変化は認められず、全てのマウスで形態的異常は認められなかった (図 1)。しかし、Slow-skeletal myosin heavy chain/Laminin 2 $\alpha$  抗体を用いた免疫二重染色において、Nrf2-筋レスキューマウスでは Type1 線維 (遅筋) の割合と面積が有意に増加していた (図 1)。また、ミトコンドリアの含有量と活性を反映するコハ

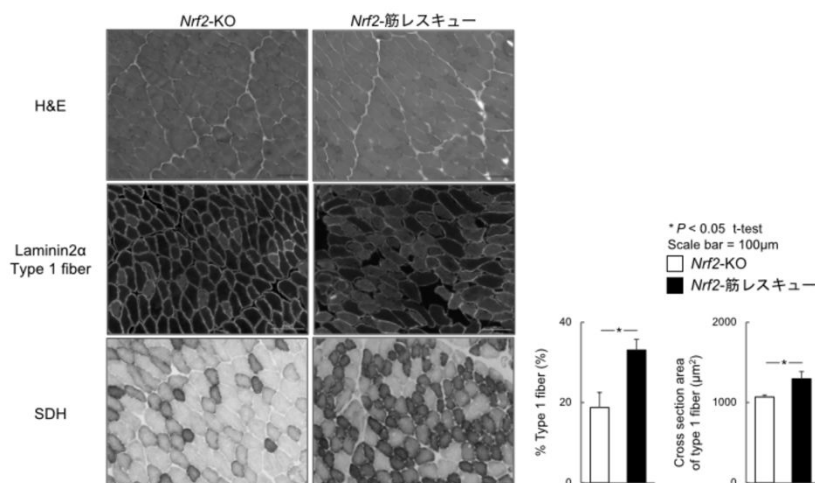


図 1: 骨格筋病理の変化

ク酸脱水素酵素 (SDH) 染色強度は *Nrf2*-筋レスキューマウスで高値であり, ミトコンドリア機能の維持が示唆された. *Nrf2*-筋レスキューマウスの骨格筋組織では, *Nrf2* 下流の抗酸化因子 NQO1 の発現が増加していた (図 2).

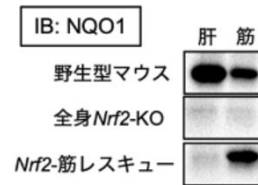


図 2: 骨格筋における NQO1 発現

(2) SAF score による NASH の病理学的評価において, *Nrf2*-筋レスキューマウスの肝では *Nrf2* を欠損しているにもかかわらず, 肝の炎症・線維化が強力に抑制されていた (SAF score; *Nrf2*-筋レスキュー vs *Nrf2*-KO:

activity  $0.8 \pm 0.1$  vs  $1.3 \pm 0.2$ , fibrosis  $0.9 \pm 0.3$  vs  $3.2 \pm 0.3$ ) (図 3).

また, 肝組織における qPCR 解析では *Nrf2*-筋レスキューマウスで炎症性サイトカイン, 線維化関連因子の遺伝子発現が低下していた (図 4).

血液生化学解析では, 肝障害を反映する AST, ALT が *Nrf2*-筋レスキューマウスで低値

を示した. 一方, グルコース負荷試験, インスリン負荷試験では両群に差を認めなかった.

(3) 筋 *Nrf2* は, 肥満の病態下で抗酸化因子の発現を誘導し, 骨格筋の炎症・酸化ストレス障害を減弱させ, 遅筋線維の萎縮を抑制することが明らかになった. さらに, *Nrf2* を介した骨格筋の維持は, Muscle-Liver axis を介して NASH の抑制に寄与することが明らかになった. これらの結果は, 筋 *Nrf2* が肥満者における骨格筋量と機能の維持において, 重要な標的分子となる可能性を示すとともに, 未だ根本的治療が存在しない NASH に対して筋-肝関連の視点からの新たな治療法の構築につながる可能性がある.

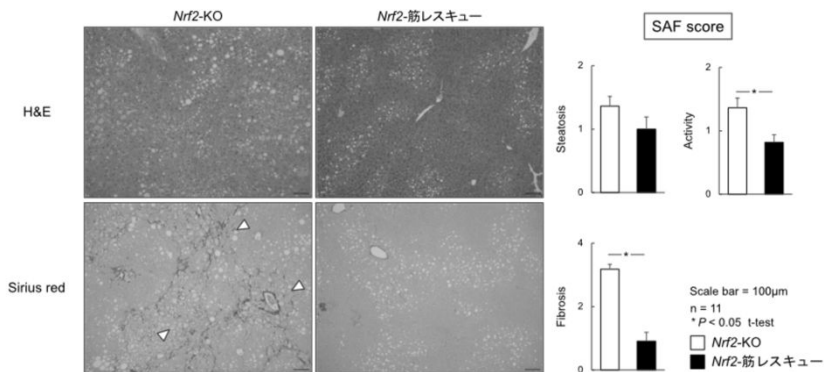


図 3: 肝病理の変化

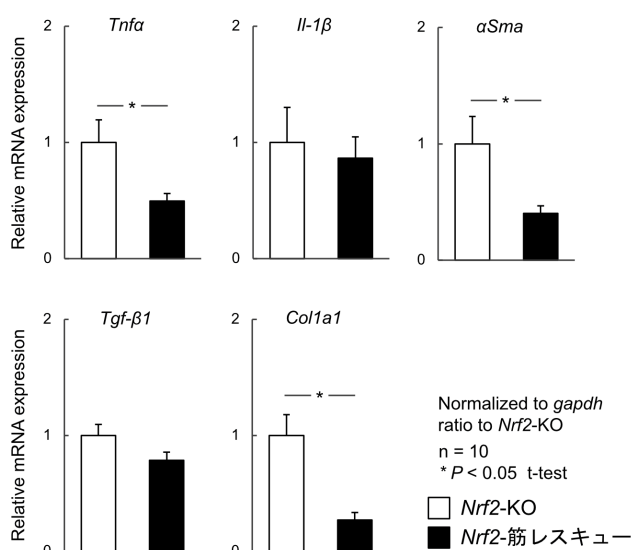


図 4: 肝組織における qPCR 解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Yamanashi Y, Tanaka Y, Ogata Y, Toyoda Y, Oshida N, Okada K, Shoda J, Suzuki H	4. 巻 156
2. 論文標題 Hepatic Niemann-Pick C1-Like 1 exacerbates non-alcoholic fatty liver disease by re-absorbing specific biliary oxysterols	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 113877
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2022.113877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miura I, Okada K, Ishii A, Warabi E, Watahiki T, To K, Shimano H, Ariizumi S, Shoda J	4. 巻 13
2. 論文標題 p62/Sqstm1 rescue in muscle retards the progression of steatohepatitis in p62/Sqstm1-null mice fed a high-fat diet	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 993995
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2022.993995	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Watahiki T, Okada K, Miura I, To K, Tanaka S, Warabi E, Kanno N, Yamagata K, Gotoh N, Suzuki H, Ariizumi S, Tsuchiya K, Nagasaki Y, Shoda J	4. 巻 11
2. 論文標題 Antioxidative Self-Assembling Nanoparticles Attenuate the Development of Steatohepatitis and Inhibit Hepatocarcinogenesis in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1939
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox11101939	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Komine S, Miura I, Shoda J, Tokinoya K, Oh S, Miyashita N, Omori H	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of a sulforaphane supplement on muscle soreness and damage induced by eccentric exercise in young adults: A pilot study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiol Reps	6. 最初と最後の頁 15130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.15130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yabe Y, Kim T, Oh S, Oshida N, Hasegawa N, Kamimaki T, Someya N, Shoda J	4. 巻 18
2. 論文標題 Association of dietary habits and physical activity levels with non-alcoholic fatty liver disease with advanced liver fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Environ Res & Public Health	6. 最初と最後の頁 8918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph18178918	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okada K, Watahiki T, Horie M, Takayama T, Aida Y, To K, Shida T, Ishige K, Suzuki H, Nishiyama H, Shoda J	4. 巻 100
2. 論文標題 The prevalence and clinical implications of pancreatic fat accumulation identified during a medical check-up	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e27487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000027487	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miura I, Komine S, Okada K, Wada S, Warabi E, Uchida F, Oh S, Suzuki H, Mizokami Y, Shoda J	4. 巻 9
2. 論文標題 Prevention of non-alcoholic steatohepatitis by long-term exercise via the induction of phenotypic changes in Kupffer cells of hyperphagic obese mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiol Reps	6. 最初と最後の頁 e14859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14859	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Oh S, Tsujimoto T, Kim B, Uchida F, Iizumi S, Isobe T, Sakae T, Tanaka K, Shoda J	4. 巻 3
2. 論文標題 Weight loss-independent benefits of exercise on liver steatosis and stiffness in Japanese men with NAFLD	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JHEP Reports	6. 最初と最後の頁 100253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhepr.2021.100253	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uchida F, Oh S, Shida T, Suzuki H, Yamagata K, Mizokami Y, Bukawa H, Shoda J	4. 巻 18
2. 論文標題 Exercise Practice Induces Beneficial Effects on Periodontal Disease Conditions-Oral Microbiota and Saliva Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Environ Res & Public Health	6. 最初と最後の頁 3470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph18073470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsuishi Y, Shimojo N, Hoshino H, Enomoto Y, Mathis BJ, Oh S, Kawano S, Myoenzono K, Maeda S, Shoda J, Inoue S, Inoue Y	4. 巻 9
2. 論文標題 Establishment of a murine, lipopolysaccharide-induced sepsis model for testing anaerobic exercise thresholds and early mobilization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicine in Drug Delivery	6. 最初と最後の頁 100074
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.medidd.2020.100074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shida T, Oshida N, Suzuki H, Okada K, Watahiki T, Oh S, Kim T, Isobe T, Okamoto Y, Ariizumi S, Yamamoto M, Shoda J	4. 巻 50
2. 論文標題 Clinical and anthropometric characteristics of non-obese NAFLD subjects in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Res	6. 最初と最後の頁 1032-1046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13543	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watahiki T, Okada K, Warabi E, Nagaoka A, Suzuki H, Ishige K, Mizokami Y, Tokushige K, Ariizumi S, Yamamoto M, Shoda J	4. 巻 69
2. 論文標題 Gender difference in development of steatohepatitis in p62:Nrf2 double-knockout mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Exp Anim	6. 最初と最後の頁 395-406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.20-0028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦征, 岡田浩介, 石井亜紀子, 正田純一
2. 発表標題 骨格筋のp62は筋-肝連関を介して脂肪性肝炎の炎症・線維化を抑制する
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦征, 岡田浩介, 正田純一
2. 発表標題 骨格筋のNrf2は筋-肝連関を介してマウスNASHの肝炎症・線維化を抑制する
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦征, 岡田浩介, 石井亜紀子, 綿引隆久, 陶経緯, 正田純一
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎に対する筋Nrf2の防御的役割
3. 学会等名 日本筋学会第8回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 呉 世昶, 森 祐太郎, 磯部 智範, 榮 武二, 田中 喜代次, 正田 純一
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) における運動療法の重要性
3. 学会等名 第11回肥満と消化器疾患研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦 征, 岡田 浩介, 藤 英治, 正田 純一
2. 発表標題 運動実践はKupffer細胞機能の改善と関連してNASHモデルp62遺伝子欠失マウスにおける脂肪性肝炎を改善する
3. 学会等名 第11回肥満と消化器疾患研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田 浩介, 綿引 隆久, 正田 純一
2. 発表標題 p62およびNrf2遺伝子二重欠失マウスは, 腸内細菌叢の変化に関連したlipopolysaccharide増加により脂肪性肝炎を自然発症する
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陶 経緯, 綿引 隆久, 岡田 浩介, 石毛 和紀, 鈴木 英雄, 有泉 俊一, 山本 雅一, 正田 純一
2. 発表標題 NASH進行とNASH肝癌におけるautophagy調節因子p62の役割
3. 学会等名 第25回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦 征, 岡田 浩介, 石井 亜紀子, 正田 純一
2. 発表標題 骨格筋のp62は骨格筋機能を改善させ脂肪性肝炎の炎症・線維化を減弱する
3. 学会等名 第7回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 三浦征, 石井亜紀子, 綿引隆久, 岡田浩介, 和田聖大, 正田純一
2. 発表標題 継続的走運動は筋-肝連関を介して脂肪性肝炎の炎症・線維化を改善する
3. 学会等名 第43回日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田浩介, 綿引隆久, 正田純一
2. 発表標題 脂肪酸代謝制御因子p62はマウス脂肪性肝炎を防御する - 組織細胞特異的p62遺伝子レスキューマウスの解析より
3. 学会等名 JDDW2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 綿引隆久, 岡田浩介, 正田純一
2. 発表標題 レドックスナノ粒子 (RNP) はp62:Nrf2遺伝子二重欠失マウス脂肪性肝炎における線維化を抑制する
3. 学会等名 JDDW2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田浩介, 綿引隆久, 正田純一
2. 発表標題 p62は肝臓-脂肪組織の連関による脂肪酸代謝の制御を介してマウス脂肪性肝炎を防御する
3. 学会等名 第56回肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 押田夏美, 岡田浩介, 鈴木英雄, 正田純一
2. 発表標題 NAFLDにおける筋損傷マーカーTitin-N fragmentの尿中測定とその臨床的意義
3. 学会等名 第56回肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦 征, 石井 亜紀子, 小峰 昇一, 岡田 浩介, 藤 英治, 正田 純一
2. 発表標題 p62遺伝子欠失マウスにおける脂肪性肝炎の発症にはサルコペニア形成が随伴する
3. 学会等名 第6回日本筋学会 学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	鈴木 英雄  (Suzuki Hideo)  (00400672)	筑波大学・医学医療系・准教授   (12102)	
研究 分担者	柳川 徹  (Yanagawa Toru)  (10312852)	筑波大学・医学医療系・教授   (12102)	
研究 分担者	石井 亜紀子  (Ishii Akiko)  (10400681)	筑波大学・医学医療系・講師   (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岡田 浩介  (Okada Kosuke)  (80757526)	筑波大学・附属病院・病院講師    (12102)	
研究分担者	呉 世昶  (Oh Sechang)  (10789639)	筑波大学・医学医療系・研究員    (12102)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	三浦 征  (Miura Ikuru)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関