

食塩過剰摂取による内臓脂肪蓄積と異所性脂肪沈着の制御機構の解明

高木 博史

名古屋市立大学大学院医学研究科消化器・代謝内科学

概要 肥満や糖尿病などの代謝疾患の病態形成における食塩過剰摂取の直接的な影響は未だ明らかになっていない。我々は、食事誘導性肥満マウスモデルを用いて、脂質過剰摂取に食塩過剰摂取が伴うと、体重増加が抑制されるにも関わらず、内臓脂肪重量増加、肝重量低下、インスリン分泌能低下を呈することを報告した。

本研究においては、食塩過剰摂取が内臓脂肪蓄積や異所性脂肪沈着にどのような影響を与えメタボリック症候群の病態形成に関与するかを明らかにすることを目的に解析を行った。

C57BL6 雄マウスに高脂肪食(カロリー比率脂肪 60%, 食塩濃度 0.38%)または高脂肪高塩分食(カロリー比率脂肪 60%, 食塩濃度 2.0 または 4.0%)を負荷し、負荷後 21 週において精巣周囲脂肪組織・肝を摘出し解析した。

高脂肪高塩分食(HFHS)群は、高脂肪食(HF)群と比較して、精巣周囲脂肪組織における Cd11c, TNF- α , MCP-1 の遺伝子発現が有意に低下していた。脂肪細胞のサイズ, F4/80 陽性細胞によって形成される王冠様構造の数や形状は、両群間で差を認めなかった。

肝においては炎症性サイトカインの遺伝子発現に両群間で有意差を認めなかったが、HFHS 群は HF 群と比較して、脂肪の沈着が減弱していた。また、HFHS 群は、普通食群と比較して尿中カテコラミンの高値を認めた。

HFHS 群と HF 群の遺伝子発現の差異から、HFHS 群においては、炎症を惹起・増悪させる機能を担う M1 マクロファージの遊走や炎症性サイトカイン発現、線維化進行へ向かう経路が減弱していることが示唆された。脂質摂取に食塩過剰摂取を伴う場合には、内臓脂肪量が増加することによって lipid spillover が生じにくくなる可能性が想定された。また、脂質摂取に食塩過剰摂取が伴うと交感神経活性化を生じることが確認されたため、交感神経活性化が病態形成に影響している可能性が示唆された。

日本人を含むアジア人の 2 型糖尿病は、内臓脂肪蓄積によって生じる軽度のインスリン抵抗性をインスリン分泌によって代償しきれないために発症するという特徴がある。この機構に食塩過剰摂取がどのように関与しているかについてさらに検討を進めたい。

1. 研究目的

食塩過剰摂取は、高血圧症、心血管障害、脳卒中、慢性腎臓病の発症・増悪因子であることが確立しているが、肥満や糖尿病などの代謝疾患に対する直接的な影響の有無は明らかになっていない。本研究においては、食塩摂取が内臓脂肪蓄積と異所性脂肪沈着などの脂肪分布に対して影響し、メタボリック症候群の病態形成に影響するかを明らかにするために解析を行った。

研究代表者は、食事誘導性肥満マウスモデルを用いて、脂質過剰摂取に食塩過剰摂取が伴うと、体重増加が抑制されるにも関わらず、内臓脂肪重量が増加、肝重量が低下することを報告した (Fig. 1, 2)⁽¹⁾。さらに高脂肪高塩分食群ではインスリン感受性は有意に改善しているものの、ブドウ糖負荷に対するインスリン分泌が低下して耐糖能障害を呈した。一方で、普通食または高塩分食を負荷した場合には、両群の体重、精巣周囲脂肪組織重量に差を認

めず、上記の変化は脂質の過剰摂取に食塩過剰摂取が組み合わさると生じることが確認された。組織学的解析の結果、高脂肪食摂取によって肝への脂肪沈着が認められるが、高脂肪高塩分食群では脂肪沈着が有意に軽減していた (Fig. 3)。以上の結果から、脂質と食塩の過剰摂取によって、脂質のみの過剰摂取と比較すると内臓脂肪量が増加し、肝における異所性脂肪沈着が軽減してインスリン抵抗性は低下することが示唆された。本研究においては、脂質と食塩の過剰摂取によって内臓脂肪が蓄積する一方で異所性脂肪沈着が軽減する機序や病態形成における役割を明らかにする目的で検討を行った。

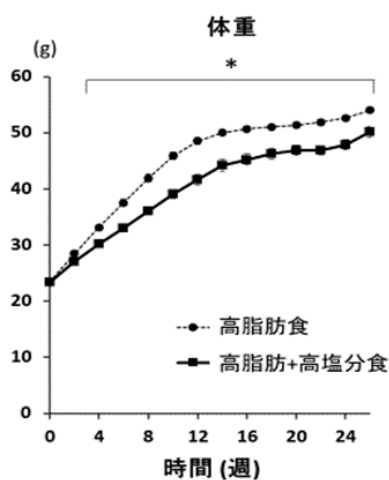


Fig. 1 高脂肪食群, 高脂肪+高塩分食群の体重変化

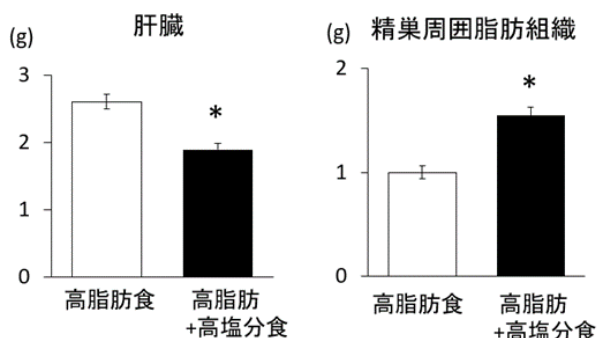


Fig. 2 高脂肪食群, 高脂肪+高塩分食群の臓器重量

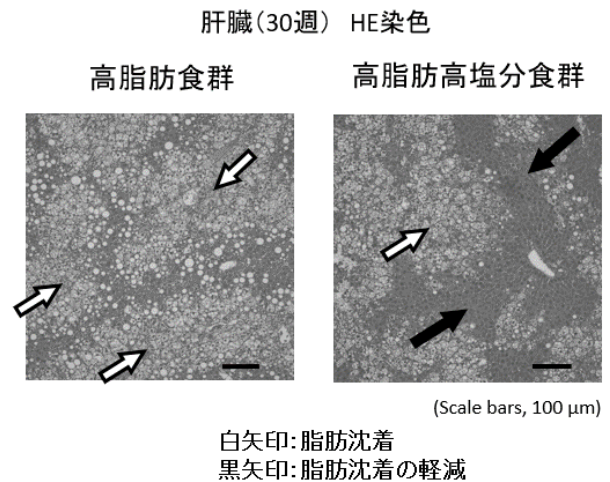


Fig. 3 高脂肪食群, 高脂肪+高塩分食群の肝の組織学的所見

2. 研究方法

2.1 方法① 脂質と食塩の過剰摂取による臓器における遺伝子発現の変化

C57BL6 雄マウスに高脂肪食(カロリー比率脂肪 60%, 食塩濃度 0.38%)または高脂肪高塩分食(カロリー比率脂肪 60%, 食塩濃度 2.0 または 4.0%)を負荷し、負荷後1週及び 21 週において精巣周囲脂肪組織、肝を摘出し、遺伝子発現をリアルタイム定量 PCR 法で検討した。

2.2 方法② 脂質と食塩の過剰摂取による組織学的所見の変化

C57BL6 雄マウスに高脂肪食または高脂肪高塩分食を負荷し、21 週において精巣周囲脂肪組織、肝を摘出し、脂肪細胞のサイズ、F4/80 陽性細胞によって形成される王冠様構造の数や形状を免疫組織化学で検討した。

2.3 方法③ 脂質と食塩の過剰摂取における交感神経活性化の関与の検討

C57BL6 雄マウスに普通食、高脂肪食または高脂肪高塩分食を負荷し、代謝ケージ内で飼育して酸性蓄尿を行い、尿中カテコラミンを測定した。また、高脂肪食または高脂肪高塩分食を負荷後1週間における褐色脂肪組織の遺伝子発現をリアルタイム定量 PCR 法で検討した。

2.4 方法④ 病態改善に関わる薬剤の検討

C57BL6 雄マウスに高脂肪高塩分食を 6 週間負荷し、その後、ナトリウム依存性グルコース共輸送体-2(SGLT2) 阻害剤 Dapagliflozin 10 mg/kg/日を 2 週間投与して、腹腔

内ブドウ糖負荷試験, インスリン負荷試験, 組織重量の解析を行った。

3. 研究結果

3.1 結果① 脂質と食塩の過剰摂取による臓器に

おける遺伝子発現の変化

C57BL6 雄マウスに高脂肪食または高脂肪高塩分食を負荷開始後 21 週において, 高脂肪高塩分食群の精巣周囲脂肪組織において, 高脂肪食群と比較して, F4/80 の遺伝子発現に有意差は認めなかったが, Cd11c, TNF- α , MCP-1, Trem2, TGF- β の遺伝子発現が有意に低下した (Fig. 4)。

同時期に採取した肝において, TNF- α , F4/80, TGF- β の遺伝子発現に両群間の有意差を認めなかった。

3.2 結果② 脂質と食塩の過剰摂取による組織学的所見の変化

高脂肪食群, 高脂肪高塩分食群においては, 普通食群と比較して精巣周囲脂肪組織の脂肪細胞の肥大化, F4/80 陽性細胞が形成する王冠様構造の増加を認めた (Fig. 5)。高脂肪食群と高脂肪高塩分食群の比較においては, 脂肪細胞や王冠様構造の数, サイズには有意な差を認めなかった。

精巣周囲脂肪組織における遺伝子発現

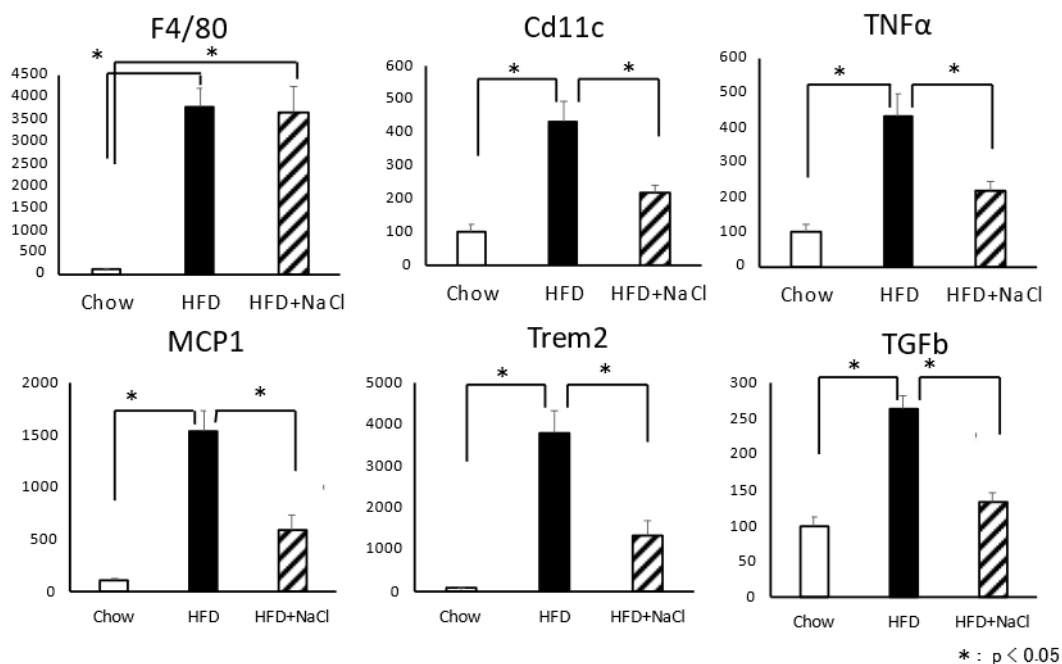


Fig. 4 精巣周囲脂肪組織における遺伝子発現

Chow: 普通食群, HFD + NaCl: 高脂肪高塩分食群, HFD: 高脂肪食

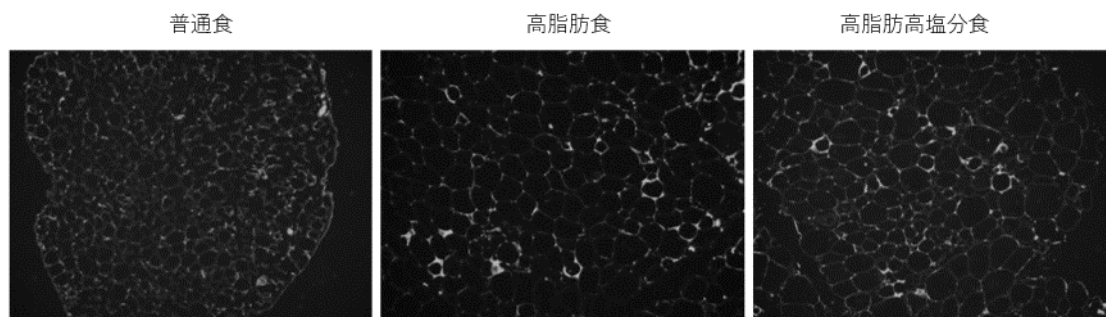


Fig. 5 精巣周囲脂肪組織における F4/80 免疫組織化学

3. 3 結果③ 脂質と食塩の過剰摂取における交感神経活性化の関与の検討

普通食群と比較して、高脂肪高塩分食群では尿中アドレナリン・ノルアドレナリンの有意な増加を認めた (Fig. 6)。高脂肪高塩分食群においては、高脂肪食群と比較して、食事負荷 1 週間後における褐色脂肪組織の IL-6 遺伝子発現が有意に高かった。

3. 4 結果④ 病態改善に関わる薬剤の検討

Dapagliflozin 投与群は、非投与群と比較して、尿中アドレナリン・ノルアドレナリンが有意に低下した (Fig. 7)。また Dapagliflozin 投与群においては腹腔内ブドウ糖負荷試験において、耐糖能が有意に改善し、空腹時血中インスリン濃度が有意に低かった (Fig. 8)。インスリン負荷試験における血糖値には両群に差を認めなかった。薬剤投与期間 2 週間において、Dapagliflozin 投与群は褐色脂肪組織重量が有意に低下したが、肝と精巣周囲脂肪組織重量には両群間の有意差を認めなかった (Fig. 9)。

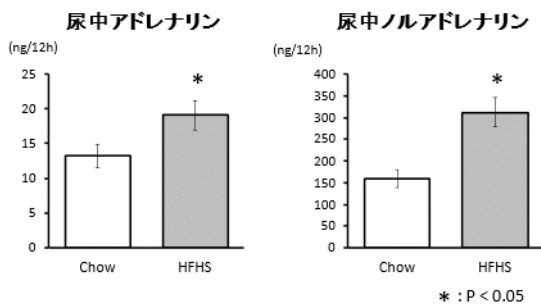


Fig. 6 尿中カテコラミン
Chow: 普通食群, HFHS: 高脂肪高塩分食群

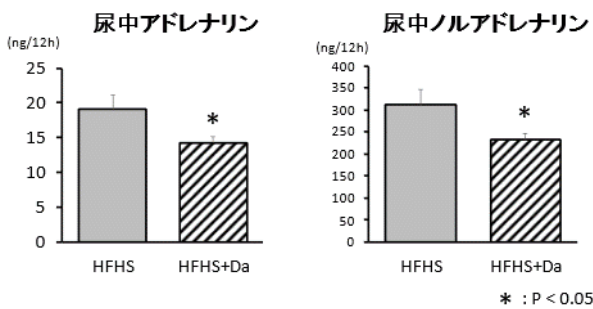


Fig. 7 尿中カテコラミン
HFHS: 高脂肪高塩分食群, +Da: Dapagliflozin 投与群

腹腔内ブドウ糖負荷試験

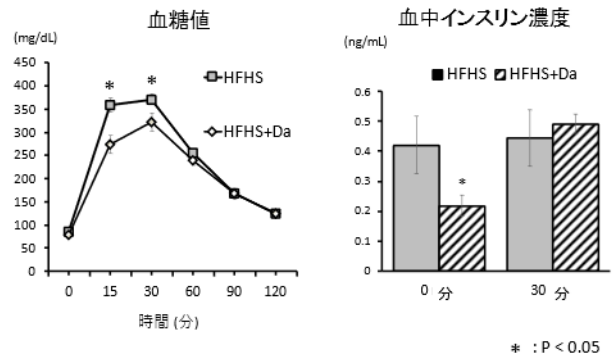


Fig. 8 ブドウ糖負荷試験結果
HFHS: 高脂肪高塩分食群, +Da: Dapagliflozin 投与群

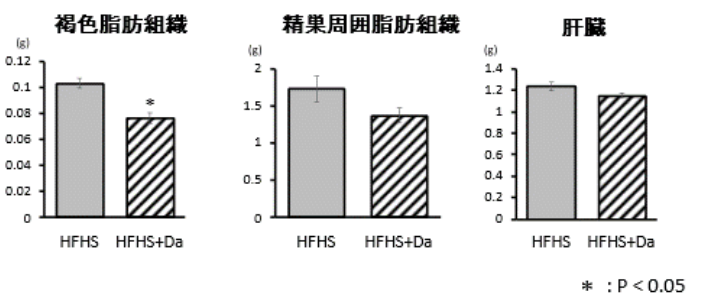


Fig. 9 組織重量
HFHS: 高脂肪高塩分食群, +Da: Dapagliflozin 投与群

4. 考察

本研究においては、脂質過剰摂取に食塩過剰摂取が伴った場合の内臓脂肪蓄積と異所性脂肪沈着の制御機構を明らかにすることを目的に検討を行った。特に組織における遺伝子、タンパク発現、組織学的所見の違いから病態解明の手がかりとなる因子を見出すことを目指した。

結果①において、高脂肪高塩分食群では F4/80 の遺伝子発現に有意差は認めなかったことから、マクロファージの総量には差がないことが示唆されるが、Cd11c, TNF- α , MCP-1, Trem2, TGF- β の遺伝子発現が有意に低下したことから、炎症を惹起・増悪させる機能を担う M1 マクロファージの遊走や炎症性サイトカイン発現、脂肪細胞増殖、線維化進行へ向かう経路が減弱していることが示唆された。また、肝における炎症や線維化促進に関連する遺伝子発現の変化は顕著ではないことが示唆された。高脂肪食摂取によって内臓脂肪が増加し、その許容量を超えた際に lipid spillover によって肝や筋に異所性脂肪が沈着することが想定されるが、食塩摂取を伴う場合には、内臓

脂肪量が増加することによって lipid spillover が生じにくくなる可能性が示唆された。

結果①によってマクロファージの総数には差がないことが示唆されたため、組織学的解析を行った。結果②においては Fig. 3 に代表的な画像所見を示したが、高脂肪食、高脂肪高塩分食において、精巣周囲脂肪組織の組織学的所見に有意な差異は見出せなかった。解析前は、高脂肪高塩分食において炎症・線維化は軽減していることが示唆されたため、こうした病態形成の起点となる王冠様構造の数に差が見出されることを想定していた。遺伝子発現には差があることから、さらに詳細な解析によって両群の差異を見出せる可能性はあると考えている。脂肪細胞のサイズについてはヒストグラムを用いた解析なども検討の余地があると考え。また、高脂肪高塩分食群における精巣周囲脂肪組織の重量増加は、個々の細胞の肥大ではなく増殖が関与することも考えられる。今後は、脂肪細胞の増殖という観点からの検討も課題としたい。

結果③において、脂質と食塩の過剰摂取によって交感神経系が活性化することが示され、これが食塩過剰摂取によって生じる病態形成に関与することが示唆された。褐色脂肪細胞における IL-6 遺伝子発現は UCP-1 発現制御とは異なったメカニズムによる交感神経活性化が介すると報告されており⁽²⁾、本検討においても遺伝子発現によって交感神経活性化を評価できる手法として用いた。食塩過剰摂取と交感神経活性化をつなぐ中枢神経系の制御機構についてさらに検討を進めたい。

結果④において、高脂肪高塩分食による耐糖能障害に対して SGLT2 阻害薬が有用であることが示された。SGLT2 阻害薬の多面的な作用機序の背景として、交感神経活性化抑制作用、ナトリウム排泄作用が報告されており、食塩と脂質の過剰摂取が形成する病態に有効であると想定して効果を検討した。本検討において、高脂肪高塩分食においては交感神経活性化が生じているが、SGLT2 阻害薬はその活性化を抑制する作用があることが確かめられた。また、空腹時インスリン濃度が低いことからインスリン感受性を改善していることが示唆された。興味深いことに SGLT2 阻害薬投与早期において褐色脂肪組織の重量変化が生じた。この機序の詳細は不明であるが、体重や体脂肪量が減少する際に、内臓脂肪量や肝重量の変化に先んじて褐色脂肪組織の変化が生じることが示唆される。

5. 今後の課題

日本人を含むアジア人の 2 型糖尿病は、内臓脂肪蓄積によって生じる軽度のインスリン抵抗性をインスリン分泌によって代償しきれないために発症するという特徴がある。一方で、脂肪細胞の蓄積があっても健康障害を生じていない、健康的な肥満「healthy adipose expansion」という概念も提唱されており、肥満・代謝疾患の病態形成における脂肪組織の量と性質の制御機構の解明が求められている。日本人男性の検討において、内臓脂肪蓄積があっても脂肪肝がなければインスリン抵抗性を認めなかったと報告⁽³⁾や、アジア人において、食塩摂取量を反映する 24 時間尿中ナトリウム排泄量が多いと、内臓脂肪優位型の肥満を呈することが報告されており⁽⁴⁾、今回のマウスモデルがヒトの病態形成を反映することが支持される。本検討において、脂質と食塩の過剰摂取における内臓脂肪の変化が確かめられ、その病態形成機序、治療法の確立に向けた解析を進めることができた。さらなる解析によって、病態形成の鍵因子を同定し、将来的には適切な食塩摂取量の提唱、個人の疾患感受性に基づいた個別化医療への応用展開を目指したい。

6. 文献

1. Taki K, Takagi H, Hirose T, Sun R, Yaginuma H, Mizoguchi A, Kobayashi T, Sugiyama M, Tsunekawa T, Onoue T, Hagiwara D, Ito Y, Iwama S, Suga H, Banno R, Sakano D, Kume S, Arima H. Dietary sodium chloride attenuates increased β -cell mass to cause glucose intolerance in mice under a high-fat diet. *PLOS One*. 2021;16(3):e0248065.
2. Qing H, Desrouleaux R, Israni-Winger K, Fogelman N, Zhang C, Rashad S, Palm NW, Sinha R, Marina R, Picciotto M, Perry RJ, Wang A. Origin and function of stress-induced IL6 in murine models. *Cell*. 2020; 182: 372-387.
3. Kadowaki S, Tamura Y, Someya Y, Takeno K, Kaga H, Sugimoto D, Kakehi S, Funayama T, Furukawa Y, Suzuki R, Nishitani-Yokoyama M, Shimada K, Daida H, Aoki S, Kanazawa A, Kawamori R, Watada H. Fatty Liver Has Stronger Association With Insulin Resistance Than Visceral Fat Accumulation in Nonobese Japanese Men. *Journal of the Endocrine Society*. 2019; 3:1409–1416.

4. Nam GE, Kim SM, Choi MK, Heo YR, Hyun TS, Lyu ES, Oh SY, Park HR, Ro HK, Han K, Lee YK. Association between 24-h urinary sodium excretion and obesity in Korean adults: A multicenter study. *Nutrition*. 2017;41:113-119.

Clarification of Regulatory Mechanisms of Visceral Fat Accumulation and Ectopic Fat Deposition Induced by Excessive Salt Intake

Hiroshi Takagi

Nagoya City University

Summary

The direct effects of excessive salt intake on the pathogenesis of metabolic diseases remain unknown. Using a mouse model of diet-induced obesity, we have reported that excessive salt intake in combination with excessive fat intake causes visceral fat gain, decreased liver weight, and decreased insulin secretion, despite suppression of body weight gain. In this study, we aimed to clarify how excessive salt intake affects visceral fat accumulation and ectopic fat deposition and contributes to the pathogenesis of metabolic diseases.

Male C57BL6 mice were fed a high-fat diet (60% fat calorie ratio, 0.38% salt concentration) or a high-fat, high-salt diet (60% fat calorie ratio, 2.0 or 4.0% salt concentration), and epididymal white adipose tissue and liver were removed and analyzed at 21 weeks after loading. Gene expression of Cd11c, TNF- α , and MCP-1 in epididymal white adipose tissue was significantly decreased in the high-fat, high-salt diet (HFHS) group compared with the high-fat diet (HF) group. The size and the number of adipocytes and shape of crown-like structures formed by F4/80-positive cells was not different between the two groups. In the liver, there was no significant difference in gene expression of inflammatory cytokines between the two groups, but fat deposition was reduced in the HFHS group compared to the HF group. The HFHS group had higher levels of urinary catecholamines than the HF group.

The differences in gene expression between the HFHS and HF groups suggest that the pathways for M1 macrophage migration, inflammatory cytokine expression, and fibrosis progression, which induces and exacerbates inflammation, were attenuated in the HFHS group. We hypothesized that lipid spillover may be less likely to occur when fat intake is accompanied by excessive salt intake. In addition, the results showed that excessive salt intake accompanied by fat intake causes sympathetic activation, suggesting that sympathetic activation may have a role in the pathogenesis.

Type 2 diabetes mellitus in Asians, including Japanese, is characterized by impaired insulin secretion that does not fully compensate mild insulin resistance caused by visceral fat accumulation. We further investigate the role of excessive salt intake in the pathogenesis of Type 2 diabetes or metabolic diseases.