

平成30年6月18日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03093

研究課題名(和文)生活習慣病予防における脂肪酸組成制御の有用性の解明と健康科学への応用

研究課題名(英文)Elucidation of the usefulness of the control of fatty acid composition for the prevention of lifestyle-related disease and application to health science

研究代表者

松坂 賢 (Matsuzaka, Takashi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70400679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓特異的Elovl6欠損マウスは高ショ糖食の給餌や肥満モデルob/obマウスとの交配により、対照マウスに比べてインスリン感受性が亢進した。肝臓のトランスクリプトーム解析およびリポミクス解析により、Elovl6欠損およびインスリン感受性と相関する遺伝子Xおよび脂質Yを見出し、これらが肝臓のインスリン感受性を制御することを明らかにした。また、Elovl6欠損マウスを2型糖尿病モデルdb/dbマウスと交配すると、膵細胞量とインスリン分泌量が増加することにより2型糖尿病の発症・進展が抑制されることを明らかにした。また、マクロファージのElovl6が脂肪細胞のベージュ化を制御する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Liver-specific Elovl6 KO mice showed enhanced hepatic insulin signaling when they were fed a high-sucrose diet or were crossed with ob/ob mice. Through transcriptome and lipidomics analysis, we identified and characterized gene X and lipid Y as hepatic insulin signaling regulators. To define the role of Elovl6 in type 2 diabetes development, we assessed the effects of Elovl6 deletion in leptin receptor-deficient C57BL/KsJ db/db mice. The db/db-Elovl6 KO mice had a markedly increased β -cell mass with increased proliferation and decreased apoptosis, an adaptive increase in insulin, and improved glycemic control. Elovl6 is a fundamental factor linking dysregulated lipid metabolism to β -cell dysfunction, islet inflammation, and β -cell apoptosis in diabetes. Moreover, we analyzed the role of Elovl6 in macrophage and found the possibility that macrophage Elovl6 regulate the formation of beige fat.

研究分野：代謝内分泌学

キーワード：脂肪酸伸長酵素 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国において、肥満は増加の一途を辿っており、これを基盤とする心疾患、脳血管疾患は、日本人の死因においてそれぞれ第2位、第3位を占めており、第1位の癌と肥満の関連性も指摘されている。肥満は脂肪組織や全身各組織への脂肪蓄積過多の表現型であり、それが引き金となり2型糖尿病が発症し、血管壁への脂質沈着が動脈硬化の直接原因であるという事実は、生活習慣病における脂質代謝制御恒常性の重要性を物語っている。これら生活習慣病の予防の観点から肥満の防止が重要であることは明らかであるが、継続的な食生活の改善や運動は必ずしも簡単ではない。したがって、生活習慣病の予防や治療に、これまでの考え方のみから脱却したパラダイムシフト、新しい方法が求められている。そのためには、生活習慣病の基本となる脂質代謝機構の解明に新しい視点から取り組み、その制御法を開発することが重要である。

生体には様々な脂質分子が存在するが、その基本成分・前駆体として中心的な役割を果たすのが脂肪酸である。脂肪酸は鎖長や不飽和度の違いによる多様性に富み、エネルギー源、生体膜の構成成分、脂質メディエーターの前駆体として多彩な機能を持ち、あらゆる生命現象に関与する。細胞内に最も多く見られる脂肪酸は炭素数(C)16あるいはC18の長鎖脂肪酸である。研究代表者らは、エネルギーバランスの破綻や過栄養が生活習慣病をもたらす病態の解明を目標に、栄養シグナルが脂肪酸合成を誘導する分子機序を、生理・病態の両面から解析してきた。特に、転写因子 Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c を中心に、脂肪酸合成制御機構ならびにそれによる生活習慣病発症機序を分子レベルで解明してきた。トランスクリプトーム解析による新規 SREBP 標的遺伝子の探索過程において、申請者は新規脂肪酸伸長酵素 Elongation of very long chain fatty acids member 6 (Elovl6) をクローニングし、Elovl6 が C12-16 の飽和・一価不飽和脂肪酸を基質とし、C18 以上の長鎖脂肪酸の合成に重要なリポジェニック酵素であることを明らかにした (*J Lipid Res.* 43:911, 2002)。さらに、本酵素の生体内での酵素作用と生理的役割を解明するために、Elovl6 欠損マウスの作製および解析を行い、それまで全く予想されていなかった脂肪酸の質と病態との関連を明らかにしてきた。Elovl6 欠損マウスの各組織では、炭素数 18 以上の脂肪酸の減少、炭素数 16 以下の脂肪酸の増加、不飽和/飽和脂肪酸比の増加など、様々な脂肪酸組成の変化を認めた。Elovl6 欠損マウスに高脂肪高シヨ糖食負荷や肥満モデル ob/ob マウスとの交配により肥満を誘導すると、野生型マウスと同様に肥満と脂肪肝を呈するが、野生型マウスに比べて良好な耐糖能およびインスリン感受性を示すことを明らかに

した (*Nat Med.* 13:1193, 2007.)。また、Elovl6 欠損マウスでは生活習慣病の肝の表現型である非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の発症が抑制されること (*Hepatology.* 56:2119, 2012.)。Elovl6 欠損マウスでは高脂肪高シヨ糖食により惹起されるグルコース応答性インスリン分泌不全が改善すること (*BBRC.* 450:318, 2014.) を明らかにした。これらの結果は、従来着目されていた肥満にともない臓器に蓄積する脂質の「量」のみならず、脂肪酸の鎖長や不飽和度、その存在比率 (脂肪酸組成) といった脂質の「質」を制御することで、肥満が持続した状態においてもインスリン抵抗性、糖尿病、心血管リスクを改善できる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

このように、Elovl6 は生活習慣病の予防・治療のターゲットとなりうるが、健康増進への応用のためには、以下のような未解明の課題が残されている。

臓器・細胞レベルでの Elovl6 の機能の解明

Elovl6 によりその構成脂肪酸分子種や量が変化し、細胞機能を変化させる脂質の特定

Elovl6 による脂肪酸組成の変化がエネルギー代謝、インスリン感受性、炎症におよぼす影響とその分子メカニズムの解明

そこで、本研究では、細胞・臓器特異的 Elovl6 欠損マウスを用いて肝臓、膵細胞、マクロファージにおける Elovl6 および脂肪酸組成の生理的・病態生理的意義と、脂肪酸の質の違いが生理・病態におよぼす分子メカニズムを解明し、生活習慣病の新規予防法・治療法の開発に資する知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

Cre-lox P システムを用いて、Elovl6 flox マウスと細胞・臓器特異的に Cre を発現するマウスとの交配によって、細胞・臓器特異的な Elovl6 欠損マウスを作製し、その表現型を解析する。具体的には、肝臓 (肝細胞)、膵細胞、マクロファージについて細胞・臓器特異的な Elovl6 欠損マウスを解析することで、代謝性疾患発症への機序を把握する。各細胞・臓器に対する Cre recombinase 発現マウスは以下のとおりである。

- ・肝臓 (肝細胞): Albumin-Cre マウス
- ・膵細胞: INS2-Cre マウス
- ・マクロファージ: LyzM-Cre マウス

(1) 肝臓特異的 Elovl6 欠損マウスの解析

肝臓特異的 Elovl6 欠損マウスを普通食、高脂肪高シヨ糖食、高シヨ糖食で飼育し、体重、臓器重量、肝臓および血中脂質含量、血糖値、インスリン値、耐糖能、インスリン感受性を解析した。コントロールマウスと比較して肝臓特異的 Elovl6 欠損マウスの表現型に違いが認められた場合には、肝臓のトランスクリプトーム解析およびリピドミクス解析を実

施する。

(2) 膵 細胞における Elovl6 の役割

2型糖尿病モデル db/db マウスと Elovl6 欠損マウスの交配動物を作製し、Elovl6 の欠損が2型糖尿病の発症・進展にどのような影響をおよぼすか解析する。また、膵 細胞特異的 Elovl6 欠損マウスを作製して、高脂肪高シヨ糖食負荷および db/db マウスとの交配を行い、個体の糖代謝パラメーター(血糖値、インスリン値、HbA1c 値、糖負荷試験)、膵臓ランゲルハンス氏島の組織像、および単離ランゲルハンス氏島におけるインスリン分泌能等を解析する。

(3) マクロファージにおける Elovl6 の役割
コントロールマウスおよび Elovl6 欠損マウスから腹腔マクロファージを採取し、炎症を活性化させる LPS、TNF- α 、ATP、パルミチン酸などで刺激し、その炎症関連遺伝子発現および炎症性サイトカインの分泌を解析する。また、マクロファージ特異的 Elovl6 欠損マウスおよびコントロールマウスに普通食または高脂肪高シヨ糖食を与え、個体の肥満、インスリン抵抗性、耐糖能異常および主要代謝臓器(肝臓、脂肪組織、膵 細胞、骨格筋)における病理組織像とエネルギー代謝関連遺伝子発現を解析する。

4. 研究成果

(1) Elovl6 欠損マウスとは異なり、肝臓特異的 Elovl6 欠損マウスでは高脂肪高シヨ糖食によるインスリン抵抗性は抑制されなかった。したがって、高脂肪食誘導性のインスリン抵抗性の改善には、他の臓器の Elovl6 の阻害あるいは肝臓の非実質細胞(Kupffer 細胞、星細胞、類洞内皮細胞)における Elovl6 の阻害が必要であると考えられる。

一方、高シヨ糖食の給餌により、コントロールマウスに比べて肝臓特異的 Elovl6 欠損マウスでは血糖値の低下およびインスリン感受性の亢進が認められた。このインスリン感受性の亢進は肝臓で認められ、インスリン刺激による肝臓のAktのリン酸化はコントロールに比べて肝臓特異的 Elovl6 欠損マウスで有意に上昇した。マイクロアレイ解析により、高シヨ糖食で発現が著明に増加し、かつコントロールに比べて肝臓特異的 Elovl6 欠損マウスで発現が低下する遺伝子Xを見出した。アデノウイルスを用いて遺伝子Xを肝臓特異的 Elovl6 欠損マウスの肝臓にコントロールと同レベルに発現させると、高シヨ糖食による肝臓特異的 Elovl6 欠損マウスのインスリン感受性の亢進がキャンセルされた。肝臓の脂質メタボローム解析により、Elovl6 の欠損および遺伝子Xの補充により変化し、インスリン感受性と相関する脂質Yを見出した。さらに、脂質Yをヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞にふりかけると、インスリン感受性が低下した。

以上の結果から、Elovl6 は肝臓において脂肪酸 *de novo* 合成系を介した脂肪酸組成制御

によりインスリン感受性を制御する可能性が示唆された。本研究により見出したこれら脂質によるインスリン感受性の制御メカニズムの解明が、インスリン抵抗性の分子機構の解明や糖尿病の新規治療法の開発につながることを期待される。

(2) Elovl6 欠損マウスと肥満・2型糖尿病モデル db/db マウスを交配して Elovl6 欠損 db/db マウスを作製し、2型糖尿病の発症・進展における Elovl6 の意義を解析した。Elovl6 欠損 db/db マウスでは膵 細胞の増殖の亢進とアポトーシスの減少により膵 細胞量が著明に増加し、インスリン分泌量が増大するために、血糖値が低下した。db/db マウスに比べて、Elovl6 欠損 db/db マウスの膵臓ランゲルハンス島では、オレイン酸(C18:1n-9)とトリグリセリドの蓄積が減少し、膵 細胞の減少を引き起こす炎症と小胞体ストレスが抑制された。さらに、野生型マウスと Elovl6 欠損マウスから単離した膵臓ランゲルハンス島に脂肪酸をふりかけた解析により、オレイン酸が膵 細胞のインスリン含量やグルコースに応答したインスリン分泌能を減少させること、またパルミチン酸により引き起こされる膵 細胞の炎症、小胞体ストレス、アポトーシスが Elovl6 の欠損により抑制されることを明らかにした。したがって、Elovl6 の阻害は、インスリン分泌を抑制するオレイン酸の過剰蓄積を抑制することと、パルミチン酸による脂肪毒性を軽減することにより、肥満にともなう代償性インスリン分泌を維持し、糖尿病を予防・改善すると考えられる (*Diabetes*. 66:1833, 2017)。

膵 細胞特異的 Elovl6 欠損マウスを普通食で飼育した場合、血糖値や耐糖能にコントロールマウスとの違いは認められなかった。膵 細胞特異的 Elovl6 欠損マウスを2型糖尿病モデル db/db マウスと交配すると、インスリン分泌量の増加傾向と糖尿病の改善傾向が認められた。しかし、本研究で使用した INS2-Cre マウスのコンストラクトに含まれる human Growth Hormone の影響による実験系の問題点から db/db マウスにおける解析が困難となる局面があった。そこで、マウス Ins1 遺伝子を含む大腸菌人工染色体(BAC)による Cre 発現マウスを利用して新規に膵 細胞特異的 Elovl6 欠損マウスを作出した。本マウスは優れた膵 細胞組織特異的な遺伝子改変を示した。現在、この新規膵 細胞特異的 Elovl6 欠損マウスを用いて解析を開始している。高脂肪食負荷や STZ 処置が膵 β 細胞特異的 Elovl6 欠損マウスにおよぼす影響を含めて今後さらなる検討を行う。

(3) コントロールおよびマクロファージ特異的 Elovl6 欠損マウスの腹腔マクロファージでは TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカインの発現が低下していたが、LPS やパルミチン酸で刺激した際のこれら炎症性サイトカインの発現誘導は、コントロールおよびマクロファージ特異的 Elovl6 欠損マ

ウスの腹腔マクロファージで同様であった。また、マクロファージ特異的 Elovl6 欠損マウスに高脂肪食負荷や遺伝性肥満モデルマウスとの交配を行うことで、慢性炎症におけるマクロファージの Elovl6 の役割を脂肪組織や肝臓に着目して検討したが、コントロールマウスと比較して慢性炎症に明確な違いは認められなかった。一方、脂肪組織のマクロファージはベージュ化にも関与することが報告されていることから、マクロファージ特異的 Elovl6 欠損マウスに 3 受容体アゴニストを投与して脂肪組織の変化を解析したところ、マクロファージ特異的 Elovl6 欠損マウスの皮下脂肪や内臓脂肪はコントロールマウスのそれとは異なる組織像を示し、またマクロファージの Elovl6 が白色脂肪組織におけるベージュ化に関与する可能性を示唆するデータが得られた。今後、マクロファージの Elovl6 が脂肪細胞のベージュ化におよぼす影響に着目して研究を行う。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

Zhao H, Matsuzaka T, Nakano Y, Motomura K, Tang N, Yokoo T, Okajima Y, Han SI, Takeuchi Y, Aita Y, Iwasaki H, Yatoh S, Suzuki H, Sekiya M, Yahagi N, Nakagawa Y, Sone H, Yamada N, Shimano H. Elovl6 Deficiency Improves Glycemic Control in Diabetic db/db Mice by Expanding β -Cell Mass and Increasing Insulin Secretory Capacity. *Diabetes*. 66(7):1833-1846, 2017. doi: 10.2337/db16-1277.

Muranaka H, Hayashi A, Minami K, Kitajima S, Kohno S, Nishimoto Y, Nagatani N, Suzuki M, Kulathunga LAN, Sasaki N, Okada N, Matsuzaka T, Shimano H, Tada H, Takahashi C. A distinct function of the retinoblastoma protein in the control of lipid composition identified by lipidomic profiling. *Oncogenesis*. 6(6):e350, 2017. doi: 10.1038/oncsis.2017.51.

Sawada Y, Izumida Y, Takeuchi Y, Aita Y, Wada N, Li E, Murayama Y, Piao X, Shikama A, Masuda Y, Nishi-Tatsumi M, Kubota M, Sekiya M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Sugano Y, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Suzuki H, Yagyu H, Kawakami Y, Kadowaki T, Shimano H, Yahagi N. Effect of sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibition on weight loss is partly mediated by liver-brain-adipose neurocircuitry. *Biochem Biophys Res Commun*.

493(1):40-45, 2017. doi:10.1016/j.bbrc.2017.09.081.

Nishi-Tatsumi M, Yahagi N, Takeuchi Y, Toya N, Takarada A, Murayama Y, Aita Y, Sawada Y, Piao X, Oya Y, Shikama A, Masuda Y, Kubota M, Izumida Y, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Sekiya M, Iizuka Y, Kawakami Y, Kadowaki T, Yamada N, Shimano H. A key role of nuclear factor Y in the refeeding response of fatty acid synthase in adipocytes. *FEBS Lett*. 591(7):965-978, 2017. doi: 10.1002/1873-3468.12620.

Takei K, Han SI, Murayama Y, Satoh A, Oikawa F, Ohno H, Osaki Y, Matsuzaka T, Sekiya M, Iwasaki H, Yatoh S, Yahagi N, Suzuki H, Yamada N, Nakagawa Y, Shimano H. Selective peroxisome proliferator-activated receptor-modulator K-877 efficiently activates the peroxisome proliferator-activated receptor-pathway and improves lipid metabolism in mice. *J Diabetes Investig*. 8(4):446-452, 2017. doi: 10.1111/jdi.12621.

Oishi Y, Spann NJ, Link VM, Muse ED, Strid T, Edillor C, Kolar MJ, Matsuzaka T, Hayakawa S, Tao J, Kaikkonen MU, Carlin AF, Lam MT, Manabe I, Shimano H, Saghatelian A, Glass CK. SREBP1 Contributes to Resolution of Pro-inflammatory TLR4 Signaling by Reprogramming Fatty Acid Metabolism. *Cell Metab*. 25(2):412-427, 2017. doi: 10.1016/j.cmet.2016.11.009.

Sunaga H, Matsui H, Anjo S, Syamsunarno MR, Koitabashi N, Iso T, Matsuzaka T, Shimano H, Yokoyama T, Kurabayashi M. Elongation of Long-Chain Fatty Acid Family Member 6 (Elovl6)-Driven Fatty Acid Metabolism Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype Through AMP-Activated Protein Kinase/Krüppel-Like Factor 4 (AMPK/KLF4) Signaling. *J Am Heart Assoc*. 23;5(12), 2016. pii: e004014. doi: 10.1161/JAHA.116.004014.

Kikuchi T, Orihara K, Oikawa F, Han SI, Kuba M, Okuda K, Satoh A, Osaki Y, Takeuchi Y, Aita Y, Matsuzaka T, Iwasaki H, Yatoh S, Sekiya M, Yahagi N, Suzuki H, Sone H, Nakagawa Y, Yamada N, Shimano H. Intestinal CREBH overexpression prevents high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia by reducing Npc1l1 expression. *Mol Metab*. 5(11):1092-1102, 2016.

doi:10.1016/j.molmet.2016.09.004.
Takeuchi Y, Yahagi N, Aita Y, Murayama Y, Sawada Y, Piao X, Toya N, Oya Y, Shikama A, Takarada A, Masuda Y, Nishi M, Kubota M, Izumida Y, Yamamoto T, Sekiya M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Urayama O, Kawakami Y, Iizuka Y, Gotoda T, Itaka K, Kataoka K, Nagai R, Kadowaki T, Yamada N, Lu Y, Jain MK, Shimano H. KLF15 Enables Rapid Switching between Lipogenesis and Gluconeogenesis during Fasting. *Cell Rep.* 16(9):2373-86, 2016. doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.069.
Suzuki-Kemuriyama N, Matsuzaka T, Kuba M, Ohno H, Han SI, Takeuchi Y, Isaka M, Kobayashi K, Iwasaki H, Yatoh S, Suzuki H, Miyajima K, Nakae D, Yahagi N, Nakagawa Y, Sone H, Yamada N, Shimano H. Different Effects of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids on Atherogenic High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *PLoS One.* 11(6):e0157580, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0157580.
Nakagawa Y, Satoh A, Tezuka H, Han SI, Takei K, Iwasaki H, Yatoh S, Yahagi N, Suzuki H, Iwasaki Y, Sone H, Matsuzaka T, Yamada N, Shimano H. CREB3L3 controls fatty acid oxidation and ketogenesis in synergy with PPAR. *Sci Rep.* 6:39182, 2016. doi: 10.1038/srep39182.
Nakagawa Y, Oikawa F, Mizuno S, Ohno H, Yagishita Y, Satoh A, Osaki Y, Takei K, Kikuchi T, Han SI, Matsuzaka T, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Yahagi N, Isaka M, Suzuki H, Sone H, Takahashi S, Yamada N, Shimano H. Hyperlipidemia and hepatitis in liver-specific CREB3L3 knockout mice generated using a one-step CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep.* 6:27857, 2016. doi: 10.1038/srep27857.
Kuba M, Matsuzaka T, Matsumori R, Saito R, Kaga N, Taka H, Ikehata K, Okada N, Kikuchi T, Ohno H, Han SI, Takeuchi Y, Kobayashi K, Iwasaki H, Yatoh S, Suzuki H, Sone H, Yahagi N, Arakawa Y, Fujimura T, Nakagawa Y, Yamada N, Shimano H. Absence of Elovl6 attenuates steatohepatitis but promotes gallstone formation in a lithogenic diet-fed Ldlr(-/-) mouse model. *Sci Rep.* 5:17604, 2015. doi:10.1038/srep17604.
Osaki Y, Nakagawa Y, Miyahara S, Iwasaki H, Ishii A, Matsuzaka T, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A,

Yahagi N, Suzuki H, Sone H, Ohashi K, Ishibashi S, Yamada N, Shimano H. Skeletal muscle-specific HMG-CoA reductase knockout mice exhibit rhabdomyolysis: A model for statin-induced myopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 466(3):536-40, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.065.

〔学会発表〕(計5件)

松坂賢、島野仁「脂肪酸伸長酵素 Elovl6 による脂肪酸の質の制御と異所性脂肪」第38回日本肥満学会(招待講演)、2017年。

松坂賢、島野仁。「生活習慣病における脂肪酸組成制御の重要性と脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の役割」日本内分泌学会第35回内分泌代謝学サマーセミナー、2017年。

松坂賢、島野仁。「Elovl6 欠損マウスはシヨ糖嗜好性が亢進する」公募シンポジウム17:食嗜好の分子神経基盤、第94回日本生理学会大会、2017年。

松坂賢、島野仁。「生活習慣病における脂肪酸組成制御の重要性と脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の役割」シンポジウム14:疾患に有用な栄養素 脂肪酸、第20回日本病態栄養学会年次学術集会、2017年。

松坂賢、島野仁「脂肪酸伸長酵素 Elovl6 による脂肪酸組成制御と生活習慣病」第97回日本栄養・食糧学会 関東支部大会シンポジウム、2016年3月12日、東京大学農学部弥生キャンパス(東京)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.u-tsubu-endocrinology.jp/>

<http://matsuzakalab-tsubu.org/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松坂 賢 (MATSUZAKA, Takashi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号: 70400679

(2)研究分担者

島野 仁 (SHIMANO, Hitoshi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号: 20251241