

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09009

研究課題名(和文) PNPLA3遺伝子改変マウスを用いたERストレスを介するNASH発症・病因の解明

研究課題名(英文) Analysis for the pathogenesis of development of NASH via ER stress by PNPLA3 gene mutant mice

研究代表者

小笠原 光成 (Ogasawara, Mitsunari)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：10605215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：XBP-1遺伝子はATF6と高血糖により発現が制御されているが、ATF6の発現上昇はWild, KO miceともに有意差を認めないことから、XBP-1遺伝子発現にPNPLA3遺伝子が関わっている可能性が示唆された。脂質合成因子遺伝子発現を検討したが、WildとKO miceで違いを認めず、KO miceでの飽和脂肪酸/不飽和脂肪酸の比率がER stress負荷前から高値であることから、PNPLA3遺伝子による脂肪酸組成変化に対する作用が考えられた。また、PNPLA3 KO miceに対しPNPLA3変異遺伝子(I148M)を肝特異的に発現する(アルブミンプロモータ)マウス作成が完了した。

研究成果の概要(英文)：Because XBP-1 was regulated by ATF6 and hyperglycemia, and expression of ATF6 was not different between wild type and Knockout mice, it was considered that regulation of XBP-1 gene was involved by PNPLA3 gene. In gene expression of lipid synthesis, expression of SREBP1c, ACC2, FASN, CPT1, DGAT1, 2 were not different in between wild type and knockout mice, and saturated fatty acids/unsaturated fatty acids ratios were high both before and after ER stress. Therefore, we concluded that PNPLA3 may have roles for the changes of fatty acids composition. In addition, we have created PNPLA3 mutant transgenic mice (Tg: PNPLA3 KO mice with mutant PNPLA3 gene (I148M) which is liver specific regulated by albumin promoter.

研究分野：NASH

キーワード：NASH PNPLA3 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

NAFLD (非アルコール性脂肪性肝疾患) およびその進行性のタイプである NASH (非アルコール性脂肪肝炎) の発症要因として肥満や糖尿病などが重要であるが、人種差や遺伝子多型などのいわゆる遺伝的要因の違いも重要な役割を果たしていることが明らかで、これまで我々は発症・病因に関連する遺伝子多型として 3-Adrenergic receptor、Microsomal triglyceride transfer protein、IL-1、resistin、MnSOD などの因子の重要性について報告してきた。しかし、2008 年 Romeo らはそれらの遺伝子多型を凌駕するほどの NAFLD 発症感受性遺伝子の多型について、22 番染色体近傍の patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) の variant (I148M) が NAFLD 発症感受性遺伝子であることを報告した。我が国からも川口らが同様の遺伝子多型の報告をしており、さらに少なくとも日本人においては NASH 発症に関わる重要な遺伝子多型であることも示された。PNPLA3 は肝細胞内の脂肪滴膜に局在し、リパーゼ活性を促進させ脂質代謝に関与することから、この部位 (I148M) の遺伝子多型は脂質代謝異常に重要な影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、直ちにこの遺伝子に対応する蛋白質を欠損するマウスが作製され、肝臓における病変の有無について検索がなされたが、NAFLD・NASH との明確な関連を示す所見は得られなかった。PNPLA3 遺伝子多型と NAFLD・NASH の関連については依然明らかではないものの、その後もその両者の関連を示す臨床研究が数多く報告されている。

2. 研究の目的

PNPLA3 遺伝子多型が NASH 発症に重要であることが報告されているものの、その発症メカニズムは明らかでない。このため PNPLA3 欠損マウスおよび変異遺伝子 (I148M) トランスジェニックマウスを用いて、1) PNPLA3 欠損マウスにおける ER stress を介した NASH 発症への関与の解析、2) PNPLA3 遺伝子の脂肪酸合成系への役割についての解析、3) PNPLA3 変異遺伝子 I148M トランスジェニックマウスを用いた NASH 発症の病態解明の実験を実施することで NAFLD の発症病因における PNPLA3 遺伝子多型の役割について解明を行うことを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

1) PNPLA3 欠損マウスにおける ER stress を介した NASH 発症への関与の解析: PNPLA3 遺伝子による XBP-1 の発現調整機序およびその下流の SCD-1 を介した脂質合成系への役割についての解析を検討した。

2) PNPLA3 遺伝子の脂肪酸合成系への役割についての解析: PNPLA3 遺伝子による脂肪酸組成の変化および TG 合成への役割について

解析し、NASH 発症への役割を検討した。

3) PNPLA3 変異遺伝子 I148M トランスジェニックマウスを用いた NASH 発症の病態解明: 2 種類の遺伝子改変マウスに対し ER stress および高スクロース食負荷を行い、PNPLA3 変異遺伝子の XBP-1 遺伝子発現と脂質合成系制御を介した NASH 発症メカニズムの解析を行った。

4. 研究成果

1) PNPLA3 欠損マウスにおける ER stress を介した NASH 発症への関与の解析: ER ストレス応答を介した NASH 発症要因を明らかにする目的で、これまでに我々が作成した PNPLA3 欠損マウス (KO mice) を用いてツニカマイシンの腹腔内投与により ER ストレス応答および肝臓の組織学的検討を行った。ER ストレス応答のうち、中心的な制御因子である XBP-1 遺伝子の発現 (XBP-1u および XBP-1s) が、KO mice における ER stress 負荷にて抑制されており、IRE1 のリン酸化や 2 量体形成が KO mice においても変化がないにも関わらず XBP-1 の発現が抑制されていた。XBP-1 遺伝子は ATF6 と高血糖により発現が制御されているが、ATF6 の発現上昇は WT、KO mice とともに有意差を認めないことから、XBP-1 遺伝子発現に PNPLA3 遺伝子が関わっている可能性が示唆される。

2) PNPLA3 遺伝子の脂肪酸合成系への役割についての解析: コントロールに比べ KO mice では、ER stress 負荷により肝の脂肪化が明らかに抑制され、肝内 TG 含量も増加は見られなかった。XBP-1 下流の SCD-1 発現の低下による脂肪酸合成系への影響が重要と考えられる。それと同時に、KO mice では飽和脂肪酸/不飽和脂肪酸の比率は ER stress 負荷前から高値であり、PNPLA3 遺伝子による脂肪酸組成変化に対する作用が考えられる。脂質合成因子の発現については、SREBP1c、ACC2、FASN、CPT1、DGAT1、2 などを検討したが、WT と KO mice で違いを認めなかった。

3) PNPLA3 変異遺伝子 I148M トランスジェニックマウスを用いた NASH 発症の病態解明: PNPLA3 KO mice に対し PNPLA3 変異遺伝子 (I148M) を肝特異的に発現する (アルブミンプロモータ) マウス (Tg mice) の確立が完了した。その Tg mice に対し通常食およびスクロース食や高脂肪食飼育による phenotype を確認したが、そのみでは phenotype は発現が見られなかった。このため、ツニカマイシン負荷による ER stress 負荷実験を実施して、PNPLA3 KO mice と Tg mice を比較検討することで、PNPLA3 変異遺伝子 (I148M) による ER stress に対する作用を開始している。

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 12 件)

Oeda S, Ono M, Saibara T, Eguchi Y (他 16 名); Japan Study Group for NAFLD (JSG-NAFLD): Prevalence of pruritus in patients with chronic liver disease: a multicenter study. *Hepato Res.* E252-E262, 2018,48.
doi: 10.1111/hepr.12978.

Ono M: A re donors or recipients a more important predictive factor for the development of non-alcoholic fatty liver disease after liver transplantation? *Hepato Res.* 48: E6-E8, 2018,48.
doi: 10.1111/hepr.12975.

Amano A, Ono M, Saibara T, Obayashi H, Ishigami A (他 12 名): Abnormal lipid/lipoprotein metabolism and high plasma testosterone levels in male but not female aromatase-knockout mice. *Arch Biochem Biophys.* 622: 47-58, 2017 査読あり
doi: 10.1016/j.abb.2017.03.007.

Honda Y, Ono M, Nakajima A (他 20 名): Efficacy of glutathione for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: an open-label, single-arm, multicenter, pilot study. *BMC Gastroenterol.* 2017 Aug 8;17(1):96, 2017
doi: 10.1186/s12876-017-0652-3.

Kamada Y, Ono M, Saibara T, Miyoshi E, Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG NAFLD) (他 14 名): Use of Mac-2 binding protein as a biomarker for nonalcoholic fatty liver disease diagnosis. *Hepato Commun* 780-791. 2017,1.
doi: 10.1002/hep4.1080.

Ochi T, Ono M, Torimura T, Saibara T (他 15 名): Differences in characteristics of glucose intolerance between patients with NAFLD and chronic hepatitis C as determined by CGMS. *Sci Rep.* 7: 10146. 2017.
doi: 10.1038/s41598-017-09256-4.

Ohmi S, Ono M, Saibara T, Fujimoto S (他 7 名): Analysis of factors influencing glucose tolerance in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetol Metab Syndr.* 9: 65, 2017
doi: 10.1186/s13098-017-0264-7.

Masuda K, Ono M, Saibara T (他 5 名): High fasting insulin concentrations may be a pivotal predictor for the severity of hepatic fibrosis beyond the glycemic status in non-alcoholic fatty liver disease patients before development of diabetes mellitus. *Hepato Res.* 47: 983-990, 2017
doi: 10.1111/hepr.12832.

Higuchi T, Ono M, Sakamoto S (他 11 名). Suppression of MicroRNA-7 (miR-7) Biogenesis by Nuclear Factor 90-Nuclear Factor 45 Complex (NF90-NF45) Controls Cell Proliferation in Hepatocellular Carcinoma. *J Biol Chem.* 291: 21074-21084, 2016

Ono M, Saibara T. Are genetic variations the most important risk factors for development of hepatocellular carcinoma? *J Gastroenterol.* 51: 404-405, 2016,
doi: 10.1007/s00535-015-1130-8.

Toda K, Hayashi Y, Ono M, Saibara T. Characterization of Ovarian Responses to Equine Chorionic Gonadotropin of Aromatase-Deficient Mice With or Without 17 β -Estradiol Supplementation. *Endocrinology.* 157: 2093-2103, 2016
doi: 10.1210/en.2015-1701.

Imajo K, Ono M, Nakajima A (他 15 名): Magnetic Resonance Imaging More Accurately Classifies Steatosis and Fibrosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Than Transient Elastography. *Gastroenterology* 150: 626-637, 2016
doi: 10.1053/j.gastro.2015.11.048.

[学会発表](計 9 件)

Nagano S, Ono M, Ochi T, Munekage K, Yano Y, Mizuta H, Ogasawara M, Hirose A, Nozaki Y, Okamoto N, Iwasaki S, Oben JA, Saibara T: Involvement of PNPLA3 function for hepatic lipids metabolism through XBP1 and modulation of endoplasmic reticulum stress in mice. APDW 2017. Poster, Hong Kong, (Hong Kong Convention and Exhibition Center), 2017.9.23-26.

Ono M: Characteristics of Japanese NAFLD/NASH. The 103rd General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology The 6th International Forum. Japan Tokyo(Keio Plaza Hotel), 2017.4.20-22.

Ono M, Munekage K, Ochi T, Hirose A, Ogasawara M, Okamoto N, Saibara T:

Functional roles of AGE-RAGE system for the development of hepatic fibrosis of NASH . AASLD THE LIVER MEETING 2017 . Poster , Washinton,DC . (Washinton、 DC Convention Center) , 2017.10.20-24.

Yano Y , Mizuta H , Ono M , Saibara T . (他 8 名) : Vonoprazan-based third-line triple therapy in Helicobacter pylori eradication and study of the diversity of antimicrobial susceptibilities. APDW 2017. Poster , Hong Kong, (Hong Kong Convention and Exhibition Center) , 2017.9.23-26.

Yano Y , Mizuta H , Ono M , Saibara T . (他 6 名) : POTASSIUM-COMPETITIVE ACID BLOCKER-BASED THIRD-LINE TRIPLE THERAPY IN HELICOBACTER PY-LORI ERADICATION AND STUDY OF THE DIVERSITY OF ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITIES . uegweek2016(24th United European Gastroenterology Week) . Poster , Vienna(Austria) , 2016.10.15-19.

Munekage K , Ono M , Ochi T , Saibara T . (他 4 名) : INVOLVEMENT OF AGE-RAGE SYSTEM FOR THE DEVELOPMENT OF HEPATIC FIBROSIS IN NASH . uegweek2016(24th United European Gastroenterology Week) . Poster , Vienna(Austria) , 2016.10.15-19.

Kohsaki T , Oe K , Kigi A , Saibara T , Munekage M , Hanazaki K : A case of osteoclast-like giant cell tumor of the pancreas without epithelial differentiation . The Joint Conference of the 47th annual meeting of the Japan Pancreas Society(JPS) , the 20th meeting of the International Association of Pancreatology(IAP)and the 6th meeting of the Asian Oceanic Pancreatic Association(AOPA) .Poster ,Miyagi (Japan) , 2016.8.4-7.

Kessoku T , Ono M , Eguchi Y , Nakajima A . (他 13 名) : EFFICACY OF GLUTATHIONE FOR THE TREATMENT OF NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE:AN OPEN-LABEL, MULTICENTER, PROSPECTIVE STUDY . EASL(51th Annual Meeting of The European Association For The Study of The Liver) . Poster , Barcelona(Spain) , 2016.4.13-17.

Ono M , Ochi T , Oben J , Saibara T . (他 6 名) : PNPLA3 IS INVOLVED IN HEPATIC LIPIDS METABOLISM THROUGH XBP1 AND MODULATION OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN MICE . EASL(51th Annual Meeting of The European Association For The Study of The Liver) . Poster , Barcelona(Spain) , 2016.4.13-17.

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.kochi1nai.jp/home/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者
小笠原 光成 (OGASAWARA Mitsunari)
高知大学・教育研究部医療学系
臨床医学部門・助教
研究者番号 : 10605215

(2) 研究分担者
小野 正文 (ONO Masafumi)
高知大学・教育研究部医療学系
臨床医学部門・准教授
研究者番号 : 70304681

西原 利治 (SAIBARA Toshiji)
高知大学・教育研究部医療学系
臨床医学部門・教授
研究者番号 : 60145125