

平成30年6月14日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16208

研究課題名(和文)小胞体ストレスを介した食事性脂肪肝の発症メカニズム：新規脂肪酸センサー分子の同定

研究課題名(英文)The role of ER stress in fatty liver: Identification of novel fatty acid sensing molecule

研究代表者

安倍 知紀 (ABE, TOMOKI)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：00736605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脂肪肝の予防・改善法の開発のため、ユビキチンリガーゼCbl-bの働きに着目して脂肪肝の発症メカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とした。マウスにおいてCbl-b遺伝子を欠損させると、高脂肪食のような栄養過多の条件下で脂肪肝を発症しやすくなることが明らかとなった。食事由来の飽和脂肪酸は、肝臓において脂肪合成に関わる遺伝子の発現量を増大させるが、Cbl-b遺伝子欠損により、さらに脂肪合成が促進されることを明らかにした。Cbl-bは、肝臓において高脂肪食による小胞体ストレスの緩和に関わる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Fatty liver is associated with cirrhosis and hepatic carcinoma, although molecular mechanisms for fatty liver remain unclear. The aim of this study was to elucidate the pathophysiological role of Cbl-b, one of ubiquitin ligases in the fatty liver induced by nutritional excess in mice. I found that depletion of Cbl-b exacerbate fatty liver in mice fed high-fat diet for 8 weeks. In livers of Cbl-b deficient mice, ER stress and expressions of lipogenesis-associated genes were upregulated. Cbl-b might be a potent target to prevent and improve for fatty liver.

研究分野：分子栄養学

キーワード：脂肪肝 ユビキチンリガーゼ 小胞体ストレス 脂肪合成

### 1. 研究開始当初の背景

近年、わが国では健康診断などで肝機能障害の存在を指摘されるケースが増加しつつある。肝臓は、糖・脂質代謝において重要な役割を果たしており、肝機能の障害はメタリックシンドロームをはじめとする代謝性疾患の引き金となる。以前は、主にアルコールの過剰摂取により肝機能の障害が引き起こされると考えられてきた。しかしながら、近年では明らかな飲酒歴がないにもかかわらず、肝機能の障害を指摘される人が増えている。その肝機能障害の原因として、肝臓への過剰な脂肪蓄積を代表的な所見とする脂肪肝があることが分かってきた。アルコールに依存しない単純性脂肪肝は、非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) の1つであると考えられており、進展すると脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) の発症を介して肝臓がんや肝硬変といった重篤な疾患を引き起こすことで生命を脅かす。このように、脂肪肝は重大な疾患のリスクファクターであるにもかかわらず、その発症メカニズムが不明なために有効な予防・治療法は未だにない。

研究代表者のこれまでの研究により、ユビキチンリガーゼ Cbl-b (casitas B-cell lymphoma-b) は、肥満によるインスリン抵抗性 (インスリンが作用しにくくなった病態) の発症を抑制することを報告してきた。肥満により増大した血中の飽和脂肪酸は、免疫担当細胞の1つであるマクロファージを活性化し、炎症性サイトカイン分泌を介してインスリン抵抗性を発症させる。Cbl-b は、飽和脂肪酸によるマクロファージの活性化を抑制することを明らかにした。その研究の中で、Cbl-b 遺伝子欠損マウスは、高脂肪食による食事性脂肪肝を発症しやすいことに偶然気づいた。これらのことは、Cbl-b が新規脂肪酸センサーとして働き、飽和脂肪酸による情報伝達の遮断を介して、食事性脂肪肝の発症を抑制することを示唆した。

### 2. 研究の目的

脂肪肝の新規予防・治療法の開発には、発症メカニズムの解明が不可欠である。そこで本研究では、食べ過ぎや高脂肪食といった食事の乱れに起因する脂肪肝 (食事性脂肪肝) の発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。とくに、食事性脂肪肝発症におけるユビキチンリガーゼ Cbl-b の生理的意義の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 高脂肪食による食餌性脂肪肝モデル

本研究にかかる動物実験は、動物実験委員会の承認を得てから実施した。6週齢の雄性 C57BL/6J 系統の野生型マウス (日本エスエルシー) および Cbl-b 遺伝子欠損マウス (National Institute of Health, US) に対して、高脂肪食 (オリエンタル酵母工業、カロリー

比換算で脂質が60%となるように配合) を摂取させ、食餌性脂肪肝を誘導した。

#### (2) 組織学的解析

マウスより肝臓を摘出し、中性緩衝10%ホルマリン溶液にて1晩固定したのちにパラフィンにて包埋した。肝臓切片は、厚さ6 $\mu$ mで作製し、ヘマトキシリン・エオシン (H.E.) 染色を行った。

#### (3) ウェスタンブロットティング

マウス肝臓を液体窒素にて凍結後、乳鉢と乳棒を用いて破碎した。破碎した肝臓サンプルは、Lysis buffer (Triton-Xを含む) に入れ、超音波装置にて溶解させた。タンパク質濃度測定後、SDS 化し各サンプル30 $\mu$ gのタンパク質を SDS-PAGE に用いた。使用した抗体は、anti-Fatty acid synthase、anti-SCD1、anti-PPAR $\gamma$ 、anti-Cbl-b (Cell Signaling Technology)、anti-GAPDH (Santa Cruz) 抗体であった。HRP 活性にて検出したバンドは、Image J ソフトウェアを使用して数値化した。

#### (4) リアルタイム RT-PCR

マウス組織を凍結後、乳鉢と乳棒を用いて破碎し ISOGEN (ニッポンジーン) に回収した。ホモジナイザーを用いて懸濁し、RNA を抽出した。抽出した RNA 濃度を測定し、各サンプル1 $\mu$ gの RNA を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。リアルタイム RT-PCR は、SYBR Green (Applied Biosystems) を用いて StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) にて検出した。

### 4. 研究成果

(1) Cbl-b 遺伝子欠損は食事性脂肪肝を増悪した。

まず、Cbl-b 遺伝子欠損マウスにおいて食事性脂肪肝を引き起こす高脂肪食摂取の期間について検討した。2週間の高脂肪食摂取では、野生型マウスおよび Cbl-b 遺伝子欠損マウスの肝臓において脂肪蓄積はほとんど認められなかった。5週間の高脂肪食摂取を行うと、Cbl-b 遺伝子欠損マウスのうち一部の個体において脂肪蓄積の増加が認められた (データは示さず)。8週間にわたって高脂肪食を摂取させると、有意に Cbl-b 遺伝子欠損マウスの肝臓において脂肪蓄積が増加することを確認した (図1)。

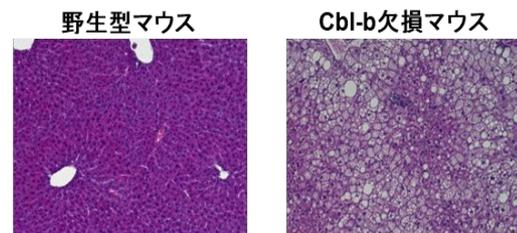


図1. 高脂肪食を8週間与えたマウスの肝臓 (H.E. 染色)

次に、Cbl-b 遺伝子欠損による肝臓への脂肪蓄積促進のメカニズムについて検討した。肝臓は、グルコースや脂肪酸から中性脂肪を合成する能力を有する臓器である。また、肥

満すると肝臓における脂肪合成が促進されるために、肝臓へ脂肪が蓄積することも知られている。したがって、Cbl-b 遺伝子欠損により、肝臓における脂肪合成が促進されるのではないかと考えた。Cbl-b 遺伝子欠損マウスの肝臓において、新規の脂肪酸合成に関わる酵素である fatty acid synthase (FAS)、stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) および、これらの酵素の転写を正に調節する転写因子 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  のタンパク質をウェスタンブロットング法にて検出した。普通食を摂取した Cbl-b 遺伝子欠損マウスの肝臓において、野生型マウスと比べて FAS、SCD1、PPAR  $\gamma$  のタンパク質量に有意な差は認められなかった(データは示さず)。8 週間の高脂肪摂取により、野生型マウスの肝臓に比べて Cbl-b 遺伝子欠損マウスの肝臓において FAS、SCD1、PPAR  $\gamma$  のタンパク質量が有意に増加していた(図 2)。このことから、高脂肪食摂取のような栄養過多の状況下において、Cbl-b 遺伝子欠損により肝臓における脂肪合成が促進することにより、脂肪蓄積が亢進することで食事性脂肪肝を発症することが明らかとなった。

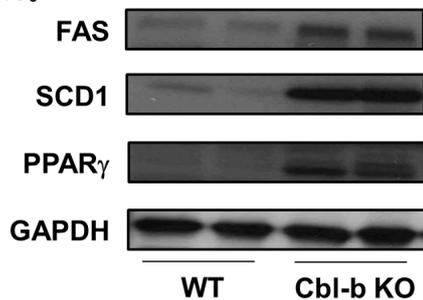


図2. 肝臓における脂肪合成に関連するタンパク質量 (WT; 野生型、Cbl-b KO; Cbl-b 遺伝子欠損マウス)

脂肪の蓄積は合成のみならず、消費する経路である脂肪酸酸化に関わる遺伝子やタンパク質の発現量によっても大きく影響を受けることが知られている。そこで、高脂肪食を摂取した Cbl-b 遺伝子欠損マウスの肝臓および骨格筋(骨格筋は脂肪酸酸化に重要な臓器である)における Carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT1) と PPAR $\alpha$  の遺伝子発現量について検討を行った。データには示さなかったが、脂肪酸酸化に関わる遺伝子に対して、Cbl-b 遺伝子欠損は影響を与えなかったことも確認している。

次に、Cbl-b がどのようにして脂肪合成に関わる遺伝子の発現量を調節しているのかを明らかにすることを試みた。近年、小胞体ストレスが脂肪肝発症において重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。そこで、高脂肪食を摂取した Cbl-b 遺伝子欠損マウスの肝臓において小胞体ストレスマーカーのうち Chop および Xbp-1s (spliced Xbp-1) mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法にて

検討した。すると、野生型マウスの肝臓に比べて、Cbl-b 遺伝子欠損マウスの肝臓において Chop および Xbp-1s mRNA とともに発現量が增大していた(図 3)。この結果から、Cbl-b

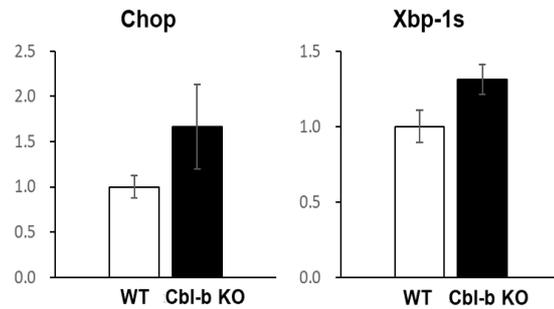


図3. 肝臓における小胞体ストレスに関わる遺伝子の発現量 (WT; 野生型、Cbl-b KO; Cbl-b 遺伝子欠損マウス)

は小胞体ストレス制御に関わることが考えられた。そこで、Cbl-b はミトコンドリア小胞体連関に関わるのではないかと仮説を立てた。小胞体とミトコンドリアの結合には、Mitofusin (MFN) と呼ばれるタンパク質が必要であることが知られており、MFN2 はチロシン残基のリン酸化を受けることも知られていた。Cbl-b はチロシン残基がリン酸化されたタンパク質に結合し、ユビキチン化する酵素である。ユビキチン化されたタンパク質は、分解またはタンパク質機能に変化が生じる。Cbl-b は MFN2 を標的とし、そのタンパク質量を制御するのではないかと考えた。しかし、マウス肝臓や培養肝細胞を用いて検討したが、Cbl-b は小胞体 ミトコンドリア連関に影響を与えないことが分かった。Cbl-b による小胞体ストレス調節のメカニズムについては、今後も検討していきたいと考えている。

(2) 食事性脂肪肝により Cbl-b タンパク質量は増大した。

Cbl-b 遺伝子欠損マウスを用いた解析より、Cbl-b は食事性脂肪肝の発症において抑制的に働くことを見出した。このことから、脂肪肝を発症すると、Cbl-b タンパク質量が減少し、さらに脂肪肝が進展するのではないかと考えた。脂肪肝における Cbl-b タンパク質量を調べるために、野生型マウスに高脂肪食を 14 週間与え、脂肪肝を誘導した。普通食を 14 週間摂取したマウスの正常な肝臓に比べて、脂肪肝においては予想に反して Cbl-b タ

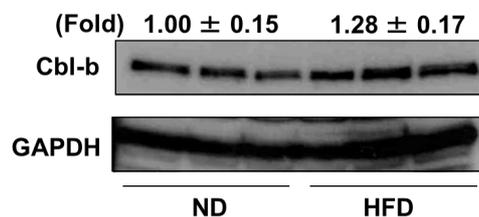


図4. 肝臓におけるCbl-bタンパク質量 (ND; 普通食、HFD; 高脂肪食)

ンパク質量が約 1.2 倍増加していた(図 4)。

Cbl-b タンパク質量の増加は、Cbl-b mRNA の増加を伴っていたため、転写レベルの制御が関与すると考えられた。これまでに検討した結果より、転写因子 Egr ファミリーが関与していると予想している。

脂肪肝において、Cbl-b タンパク質量は増大していたが、その機能に変化が生じるのではないかと考えた。Cbl-b はリン酸化を受けることで、ユビキチンリガーゼとしての酵素活性が増大することが知られている。また、ユビキチン化を受けることも分かっていた。したがって、正常な肝臓と脂肪肝における Cbl-b の翻訳後修飾について検討したが、リン酸化やユビキチン化の程度に差は認められなかった。今後、脂肪肝による Cbl-b の酵素活性への影響について明らかにし、Cbl-b が脂肪肝に対する予防・治療法の標的となるかどうか検討していきたい。

本研究成果により、マウスにおいて Cbl-b 遺伝子が欠損すると、高脂肪食のような栄養過多の条件下では脂肪合成が促進され、脂肪肝を発症しやすくなることが明らかとなった。さらなる研究により、Cbl-b の酵素活性を高めることで脂肪肝の発症を抑制できるかどうか検討する必要がある。また、ヒトの肝臓においても同様に Cbl-b が脂肪肝発症を抑制できるかどうか、培養細胞を用いて検討しなければならないと考えている。

#### 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 2 件)

1. Abe T, Hirasaka K, Nikawa T. Involvement of Cbl-b-mediated macrophage inactivation in insulin resistance. *World J Diabetes*. 8(3):97-103, 2017. doi: 10.4239/wjd.v8.i3.97. 査読有
2. Abe T, Hirasaka K, Kohno S, Tomida C, Haruna M, Uchida T, Ohno A, Oarada M, Teshima-Kondo S, Okumura Y, Choi I, Aoyama T, Terao J, Nikawa T. Capric acid up-regulates UCP3 expression without PDK4 induction in mouse C2C12 myotubes. *J Nutr Sci Vitaminol*, 62(1):32-39, 2016. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 安倍知紀、風間玲、大石勝隆、非活動期の時間制限給餌による脂肪組織の肥大化メカニズム、第 24 回日本時間生物学会学術大会、2017 年 10 月 28-29 日、京都大学吉田キャンパス(京都府京都市)
2. 安倍知紀、風間玲、大石勝隆、摂食時間の乱れは脂肪細胞を肥大化させることなく肥満を誘導する、第 22 回アディポサイエンス・シンポジウム、2017 年 8 月 19 日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/bmd/biomed-bcl/index.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

安倍 知紀 (ABE, Tomoki)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号：00736605