

令和元年6月14日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K16219

研究課題名(和文) 転写因子SREBP-1のNASHに対する病態生理的意義解明と新規食事治療法開発

研究課題名(英文) Development of novel diet therapy and analysis of pathophysiological significance involved in transcription factor SREBP-1 for NASH

研究代表者

煙山 紀子 (KEMURIYAMA, Noriko)

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：50747350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：SREBP-1とNASH発症・進展との関係性と、SREBP-1を介したNASH病態に対する食事療法を検討した。野生型ならびにSREBP-1KOマウスに対して、動脈硬化誘発高脂肪食にてNASH病態を惹起させたところ、SREBP-1KOマウスでは、特に炎症に関わる遺伝子群の低下が認められ、SREBP-1の新規標的遺伝子が示唆された遺伝子Xを抽出した。また、SREBP-1を強力に抑制するEPAとDHAは共にNASH病態を改善したが、EPAは肝および血清の脂質低下作用が強く、DHAは肝における抗炎症作用が強かった。よって、EPAとDHAは、それぞれの有用性を生かした使い分けができることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SREBP-1は、食事による影響を直接的に大きく受けるため、肝臓に対するSREBP-1の病態生理的役割を明らかにし、エネルギー代謝及び炎症調節の分子メカニズムの解明とそれを制御する新規因子・遺伝子を解明することは、生活習慣病の病態理解を深めるだけでなく、食事パターンや食事の種類といった栄養学的な介入に大きなインパクトを与える可能性を秘め、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We examined the relationship between SREBP-1 and NASH onset / progress, and diet therapy for NASH pathogenesis via SREBP-1. Atherogenic high fat diet was fed to WT and SREBP-1 KO mice to induce NASH. mRNA expression involved in inflammation decreased in SREBP-1 KO mice compared to WT mice. We identified gene X as novel target gene of SREBP-1. In addition, both EPA and DHA which inhibited activation of SREBP-1 ameliorated NASH symptom. Intriguingly, EPA had a greater hepatic triacylglycerol (TG)-reducing effect than DHA. In contrast, DHA had a greater suppressive effect than EPA on hepatic inflammation. These results revealed that both EPA and DHA are effective to treat AHF-induced NASH in mice, but they exert different effects, which indicate that EPA and DHA may be differentially used in the NASH treatment, depending upon the disease's stage.

研究分野：栄養学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎 脂質代謝 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の発症と悪化は世界的な問題となっており、その予防や治療が各国で重要課題として位置づけられている。病態の分子メカニズム解明による治療薬の開発が進められ、近年では治療の選択肢が広がってきている。一方で、食生活は生活習慣病において最も影響力が大きい生活習慣の一つであるが、現在の食事療法の主体はカロリーの制限であり、病態の分子メカニズムに即した更なる選択肢の充実が求められる。

メタボリックシンドロームに高頻度に合併する非アルコール性脂肪性肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis: NASH) は、多飲酒歴が無いにもかかわらず、脂質が肝臓に過剰に蓄積して慢性的な炎症が引き起こされ、肝細胞変性、壊死、線維化と進み、最終的にはがんの進展をもきたすものであり、社会的に大きく問題視されている生活習慣病の一つである。

肝臓や脂肪組織を中心とした栄養臓器に脂質を蓄積するメカニズムについては、取り込み・合成・異化を制御する転写因子が支配的な役割を果たしていることが種々の研究から明らかにされつつある。転写因子 Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1 は、食事摂取、特に絶食後再摂食で著明に活性化し、脂質合成を司るエネルギー代謝転写因子である。SREBP-1 の活性化は、肝臓において脂肪酸合成を介して脂肪肝の形成を促進させ、肥満・インスリン抵抗性などメタボリックシンドロームに関与している。

一方で近年では、エネルギー代謝転写因子と炎症のシグナルクロストークが報告され (Nature, 2008, 454: 470-477.) エネルギー代謝転写因子が、代謝面の作用にとどまらず炎症系への干渉作用を持つ可能性が示されるようになってきた。SREBP-1 の NASH への関与は、NASH の肝臓で SREBP-1 が上昇するとの報告がみられるが、脂肪肝の形成に関与する以外の詳細は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

そこで本研究は、SREBP-1 と NASH 発症・進展との関係性について解析し、食事によって大きく制御される SREBP-1 の制御を介した NASH 病態に対する新たな食事療法を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

SREBP-1 欠損マウスの解析を通じて、SREBP-1 が NASH の病態と炎症の制御にどのような役割を果たすか検討する。食餌誘発性による脂肪肝・炎症を、個体の表現型と、トランスクリプトーム解析を行って各解析結果を統合することにより、SREBP-1 欠損が、脂質をはじめとしたどのような変化を介して病態生理に影響するか、またその変化はどのような因子によるのかを明らかにする。さらに培養細胞実験などと併せ、どのような分子メカニズムで NASH 病態に影響を及ぼすか解析を行う。最終的には、食事の種類や食品因子による、SREBP-1 の活性化制御を基盤とした NASH に対する食事療法の開発に資する知見を得る。以下に具体的な方法について示す。

(1) SREBP-1KO マウスを用いた NASH モデル表現型解析

SREBP-1 の有無による NASH 病態の評価をするため、高ショ糖・高脂肪・高コレステロールを含んだ食餌 (動脈硬化誘発高脂肪食 Atherogenic high fat: AHF) を餌で供与し NASH モデル動物を作製する。野生型と SREBP-1 欠損マウスの表現型を、エネルギー代謝の観点より、体重、組織重量、体脂肪量、血糖値、血中ホルモン・生理活性物質濃度、血中脂質、臓器脂質含量などエネルギー代謝の従来解析法により明らかにする。また、これらのマウスに対し、肝臓における組織障害を、血中 ALT 値測定、形態学的観察 (マクロ、HE 染色、特殊染色、免疫染色)、遺伝子発現、タンパク定量を行うことで評価する。

(2) マウス肝臓、培養肝細胞をサンプルとした網羅的遺伝子発現解析

上記作製動物の肝臓より RNA を抽出し、DNA チップを用いてエネルギー変動系、病態系で遺伝子発現パターンの網羅的プロファイリング、発現が増加あるいは減少している遺伝子のクラスタリングを行い、SREBP-1 欠損による変動が最も強く反映されているパスウェイを特定する。

マウスで見られたフェノタイプの分子メカニズムを解明するため、必要に応じて培養肝細胞を用い、SREBP-1 の有無による遺伝子発現プロファイルを詳細に解析し、どの遺伝子・パスウェイが関わっているのかを検討する。

(3) SREBP-1 の活性制御を目的とした食事療法の検討

遺伝子改変マウスを用いた検討では、代償的に様々な因子が変動している可能性があるため、上述の研究内容で検討した SREBP-1 遺伝子改変マウスの表現型を参考に、SREBP-1 を特異的に変動させるモデルを食事負荷により再構築をはかり、予測されるエネルギー代謝、炎症の変動、治療効果について仮説の検証を行う。

4. 研究成果

(1) 結果として、野生型と比較して、SREBP-1 欠損マウスは、肝中 TG 蓄積は部分的に低下し、一方肝中コレステロールは野生型と同程度に蓄積が認められた。血中 ALT レベルは野生型と同程度であったが、HE 組織学的所見とマクロファージ免疫染色の結果より、SREBP-1 欠損マウスは肝臓の炎症性細胞の浸潤が抑制されていることが確認された。遺伝子発現解析においても、炎症に関わる遺伝子群の低下が認められた。肝中 TG と血中 ALT レベルあるいは炎症に関わる遺

伝子群と相関性は見られなかったため、SREBP-1 欠損マウスでみられた NASH 病態の軽減は、脂質蓄積以外への関与がある可能性が示唆された。

(2) 遺伝子発現プロファイルの網羅的解析：上記作製動物の肝臓より RNA を抽出し、DNA チップを用いてエネルギー変動系、病態系で遺伝子発現パターンの網羅的プロファイリング、発現が増加あるいは減少している遺伝子のクラスタリングを行った。野生型と比較して、SREBP-1 欠損では、炎症関連の遺伝子発現が最も変動が認められた。

マウスにおいて炎症関連の遺伝子発現に最も変動が認められたため、肝癌由来細胞株である HepG2 を用いて siRNA により SREBP-1 の発現をノックダウンする系を構築した。その培養細胞を用い、次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq を行い、遺伝子発現パターンの網羅的プロファイリング、発現が増加あるいは減少している遺伝子のクラスタリングを行った。その結果、SREBP-1 のノックダウン群では、脂質代謝系だけではなく、免疫系に関わる遺伝子発現の低下が認められ、再現性の検討から遺伝子 X に絞り込んだ。以上の結果は、SREBP-1 は脂質代謝以外の、免疫系に関わる遺伝子発現制御を介して NASH 病態形成に関与している可能性を示唆しており、今後これについて詳細に解析を行う予定である。

(3) SREBP-1 の制御を介した NASH 食事療法を検討するため、本研究ではまず、SREBP-1 の活性化抑制を持つ eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5) と docosahexaenoic acid (DHA, C22:6) をそれぞれ 5% で 4 週間 AHF に混餌投与し、脂質代謝および NASH 病態の諸指標について解析した。その結果、EPA と DHA は、共に血清の総コレステロール値と ALT 値の増加と肝の線維化を抑制した。EPA と DHA はともに SREBP-1 の活性化を強力に抑制していたが、EPA は DHA と比較して肝トリグリセリド蓄積に対する抑制作用が強く、DHA は EPA と比較して肝の炎症および酸化ストレスに対する抑制効果が強かった。以上の結果は、SREBP-1 を強力に抑制する EPA と DHA は共に AHF による NASH 病態および脂質異常に対して抑制的に作用することが明らかとなった。さらに、EPA は肝および血清の脂質低下作用が強く DHA は肝における抗炎症作用が強かった。したがって、この 2 種類 n-3 系多価不飽和脂肪酸は、NASH の病態により、それぞれの有用性を生かした使い分けができることが示唆された (PLoS One. 2016 Jun 22;11(6):e0157580.)。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

以下の論文はすべて査読有

[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. 2016 Jun 22;11\(6\):e0157580. doi: 10.1371/journal.pone.0157580.](#)

[Suzuki-Kemuriyama N, Nakano-Tateno T, Tani Y, Hirata Y, Shichiri M. Salusin- as a powerful endogenous antidipsogenic neuropeptide. Sci Rep. 2016 Feb 12;6:20988. doi: 10.1038/srep20988.](#)

〔学会発表〕(計 6 件)

高臨風、[煙山紀子](#)、齋藤奈津美、渡邊聖栄子、龍完次郎、宇野絹子、張舜恵、小川秀治、渡邊厚、美谷島克宏、中江大。「脂質代謝関連転写因子 SREBP-1 が小胞体ストレスと慢性炎症に及ぼす影響」、第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2019 年。

[煙山紀子](#)、池端香織、山下卓也、内野里美、佐藤峻太、船水遥、宇野絹子、張舜恵、小川秀治、渡邊厚、美谷島克宏、中江大。「Development of an animal model of non-obese (Asiatic) nonalcoholic steatohepatitis -related hepatocellular carcinoma」、第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年。

[煙山紀子](#)、池端香織、山下卓也、内野里美、佐藤峻太、船水遥、宇野絹子、張舜恵、小川秀治、渡邊厚、美谷島克宏、中江大。「マウスにおける改変コリン欠乏メチオニン低減アミノ酸食による非肥満型 NASH の病態解析」、第 45 回日本毒性学会学術年会、2018 年。

[煙山紀子](#)、松坂賢、美谷島克宏、島野仁、中江大。「マウス非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)病態に Eicosapentaenoic acid (EPA) と Docosahexaenoic acid (DHA) が及ぼす異なる影響」、日本食品化学学会第 23 回総会・学術大会、2017 年。

[煙山紀子](#)、松坂賢、中江大、島野仁。「食欲調節機構を標的とする生活習慣病制御の可能性」、

第19回日本病態栄養学会年次学術集会（招待講演）2016年.

Noriko Suzuki-kemuriyama, Takashi Matsuzaka, Yoshinori Takeuchi, Yoshimi Nakagawa, Naoya Yahagi, Nobuhiro Yamada, Hitoshi Shimano. 「Comparison of the effects of EPA and DHA on the development of NASH」, 12th Asian Congress of Nutrition (国際学会), 2016年.

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.nodai.ac.jp/academics/app/safety/lab/902/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。