

令和元年6月13日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19351

研究課題名(和文)3種類のPNPLA3遺伝子改変マウスを用いたNASH発症病態の解明

研究課題名(英文)The study for the pathogenesis of NASH using three kinds of PNPLA3 gene-modified mice

研究代表者

越智 経浩(OCHI, Tsunehiro)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教

研究者番号：30617840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：PNPLA3遺伝子およびERストレスを介したNAFLD/NASHの発症病態について、3種類のPNPLA3遺伝子改変マウス(PNPLA3遺伝子欠損、ヒトPNPLA3正常遺伝子導入、ヒトPNPLA3 I148M遺伝子導入)を作成して検討を行った。PNPLA3遺伝子は、ERストレス下にXBP-1遺伝子の制御を介して、肝臓の脂肪酸やトリグリセリド代謝に関与していることが示された。また、ヒトPNPLA3 I148M導入マウスにおいて、高脂肪食負荷により脂肪化が起きやすい傾向が見られた。以上の結果から、PNPLA3遺伝子およびERストレスは、NAFLD/NASHの発症病態に重要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、メタボリックシンドロームとされる肥満、糖尿病、高血圧、脂質異常症は増加の一途であり、わが国でも社会問題となっている。それと並行して、メタボリックシンドロームを原因とした脂肪肝とそれに伴う慢性肝疾患(NAFLD/NASH)も増加してきている。

PNPLA3遺伝子多型およびERストレスが関与しているNAFLD/NASH発症メカニズムを解明することは、今まで推奨されてきた食事療法・運動療法などの治療に加えて、患者の病態に合わせたオーダーメイド治療や新たな創薬へ繋がることを期待され、学術的・社会的意義は高いものと思われる。

研究成果の概要(英文)：A sequence variation (I148M) in the patatin-like phospholipase domain-containing protein 3/adiponutrin(PNPLA3) gene and Endoplasmic reticulum (ER) stress have been reported to be important pathological characteristics in NAFLD/NASH. To clarify, therefore, the pathogenesis of NAFLD/NASH, we established three kinds of PNPLA3 gene-modified mice and investigated the phenotypes and involved factors under ER stress and other conditions. Our observations would indicate that PNPLA3 has an important role in hepatic fatty acid and triglyceride metabolism through XBP1 under ER stress. Moreover, human PNPLA3I148M knockin mice had a tendency to develop hepatic steatosis with high fat diet. Taken together, PNPLA3 and ER stress are important for the pathogenesis of NAFLD/NASH.

研究分野：非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)、糖代謝

キーワード：NASH PNPLA3 PNPLA3 mutation XBP-1

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

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) および進行性病変である非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の発症要因としての肥満や糖尿病が重要とされてきたが、2008年 Romeo らは 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/NASH 発症における一番重要な感受性遺伝子であることを報告した (Nat Genet 2008; 40: 1461)。さらに我が国でも川口らは、PNPLA3 遺伝子多型が日本人において NASH 発症に重要であることを報告している (PLoS One 2012; 7: e38322)。PNPLA3 は patatin domain を有する蛋白の一つで、肝細胞内の脂肪滴膜に局在する。PNPLA ファミリー蛋白は Phospholipase 活性、TG hydrolase、retinylester hydrolase、acyl-CoA-依存・非依存トランスアシラーゼなどの活性を有することが知られている (J.Lipid Res.2006; 47: 1940、J.Lipid Res.2009; Suppl. 5: S63)。このため、PNPLA3 遺伝子に対応する蛋白欠損マウスに関する解析が行われたが、様々な食事や糖負荷を行っても NAFLD・NASH に関与する所見は得られなかった (Hepatology 2010; 52:1134)。このように、動物実験では PNPLA3 遺伝子と NAFLD・NASH との関連については依然明らかではないが、両者の関連を示す臨床研究はその後多数報告されている。さらに、PNPLA3 変異遺伝子 (I148M) 導入マウス (J Clin Invest 2012; 122: 4130、Hepatology. 2015; 61:108) を用いた NASH 発症に関する実験結果が発表された。それによると、PNPLA3 変異遺伝子導入マウスでは高スクロース負荷で肝の脂肪沈着や炎症が増悪し、PNPLA3 変異遺伝子が NASH 発症重要な役割を果たしていることが示された。一方、ER ストレスは NASH 発症および進展に関与しているとされ、patatin domain を有する PNPLA ファミリーの一つで相同性の強い PNPLA2 遺伝子において、その欠損マウスに ER ストレスを負荷すると肝臓の脂肪沈着が増加し ER ストレスを軽減することが報告された (Hepatology 2012; 56: 270)。これまで我々も、NASH 発症において PNPLA3 遺伝子および ER ストレスが重要な役割を果たすことを報告して来た。

2. 研究の目的

PNPLA3 変異遺伝子による NASH 発症における肝の脂肪化形成、ER ストレス、炎症、線維化進展などの各段階における詳細な病態メカニズムについては未だ明らかではない。このため、当教室で作成した作成した 3 種類の PNPLA3 遺伝子改変マウス (PNPLA3 遺伝子欠損、ヒト PNPLA3 正常遺伝子導入、variant 遺伝子導入) を用いてそれらの発症病態の解明を行うことを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

PNPLA3 遺伝子欠損マウスおよびヒト PNPLA3 正常遺伝子および変異遺伝子 (I148M) を導入しアルブミンプロモーターにて肝臓特異的に過剰発現させた計 3 種類の PNPLA3 遺伝子改変マウスを用いて、高脂肪食、高スクロース食負荷およびツニカマイシン投与による ER ストレス負荷を行い、C57BL/6 マウス (WT mice) との相違点について検討し、PNPLA3 遺伝子の ER ストレス、脂質代謝への関与を介した NASH 発症病態への役割について解明を行った。

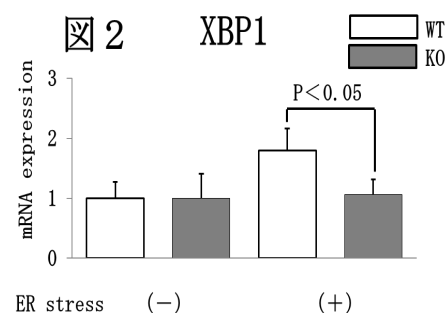
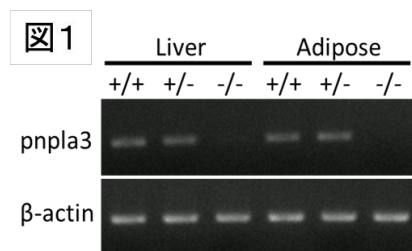
4. 研究成果

(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

我々が作成した PNPLA3 遺伝子欠損マウス (図 1: KO mice) を用いて ER stress 負荷による肝組織の変化と、正常マウスと比べた ER stress 応答の相違点について検討した。ツニカマイシン (TM) の腹腔内投与にて ER stress を惹起すると、ER stress 応答の中心的な制御因子である XBP-1 遺伝子の発現 (un-splicing form: 非活性型および splicing form: 活性型) が、KO mice では ER stress 負荷にて抑制されていることが明らかになった (図 2)。KO mice における ER stress では、IRE1 の発現やリン酸化に変化がなかったことから、PNPLA3 遺伝子による XBP-1 遺伝子発現や mRNA の安定化が ER stress 応答に重要であることが示唆された。

(2) PNPLA3 遺伝子の脂肪酸合成系への役割についての解析

ER stress により肝臓は脂肪化を来し TG 含量も増加するが、同時に肝内の脂肪酸量も増加することが知られている。コントロールマウスに比べ KO mice では、肝の脂肪化 (microvesicular steatosis) が明らかに抑制され、肝内中性脂肪 (TG) 含量も KO mice

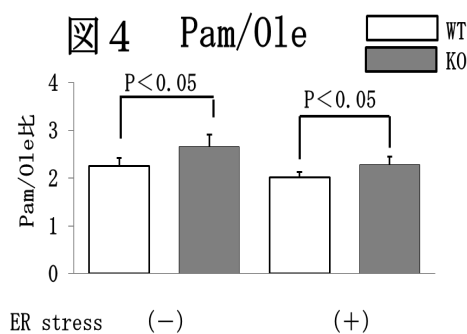
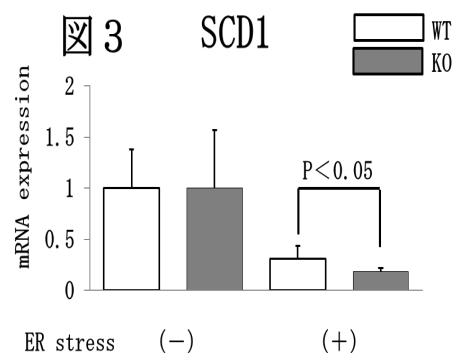


では増加が見られなかった。このことから、PNPLA3 遺伝子は ER stress による肝脂肪化に関連する作用を有していることが示唆された。XBP-1 遺伝子は肝内の脂質代謝に重要な役割を果たしており、XBP-1 欠損マウスでは肝臓の脂質合成が抑制されることが報告されている (Science. 2008; 320: 1492)。また、上述のように XBP-1 遺伝子の発現調整に PNPLA3 遺伝子が関わっており、XBP-1 遺伝子の下流で作用する脂肪酸や脂質合成に関与する SCD-1 の発現を制御していると想定され、KO mice でも ER stress 下で SCD-1 の発現が抑制されるなどの実験結果 (図 3) を得た。また、コントロールマウスと KO mice では、ER stress の有無に関わらず、不飽和脂肪酸であるオレイン酸と飽和脂肪酸であるパルミチン酸の比が異なっていた (図 4)。

(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

我々が作成した 1) KO mice (図 1) に加えて、KO mice に 2) PNPLA3 ヒト正常遺伝子および、3) variant (I148M) をアルブミンプロモーターにて肝臓特異的に過剰発現させた 2 種類の PNPLA3 遺伝子改変マウスをさらに追加作成した。3 種類の PNPLA3 遺伝子改変マウスを用いて、通常食だけでなく、高脂肪食、高スクロース食およびツニカマイシン投与による ER ストレス負荷を行い、phenotype や関連する因子について検討を行った。variant (I148M) 導入マウスにおいて、高脂肪食負荷により脂肪化が起きやすい傾向が見られた。

以上の結果から、PNPLA3 遺伝子は、ER ストレス下において XBP-1 遺伝子の制御を介し、肝臓の脂肪酸やトリグリセリド代謝に関与することで NASH 発症に関わっていることが示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

(1) Oki Y, Ono M, Hyogo H, Ochi T, Munekage K, Nozaki Y, Hirose A, Masuda K, Mizuta H, Okamoto N, Saibara T. Evaluation of postprandial hypoglycemia in patients with nonalcoholic fatty liver disease by oral glucose tolerance testing and continuous glucose monitoring. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2018 Jul;30(7):797-805. doi: 10.1097/MEG.0000000000001118. 査読有

(2) Masuda K, Noguchi S, Ono M, Ochi T, Munekage K, Okamoto N, Suganuma N, Saibara T. 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. *Hepatol Res*. 2017 Sep;47(10):983-990 doi: 10.1111/hepr.12832. 査読有

(3) Ochi T, Kawaguchi T, Nakahara T, Ono M, Noguchi S, Koshiyama Y, Munekage K, Murakami E, Hiramatsu A, Ogasawara M, Hirose A, Mizuta H, Masuda K, Okamoto N, Suganuma N, Chayama K, Yamaguchi M, Torimura T, Saibara T. Differences in characteristics of glucose intolerance between patients with NAFLD and chronic hepatitis C as determined by CGMS. *Sci Rep*. 2017 Aug 31;7(1):10146 doi: 10.1038/s41598-017-09256-4. 査読有

(4) Ochi T, Munekage K, Ono M, Higuchi T, Tsuda M, Hayashi Y, Okamoto N, Toda K, Sakamoto S, Oben JA, Saibara T. Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 is involved in hepatic fatty acid and triglyceride metabolism through X-box binding protein 1 and modulation of endoplasmic reticulum stress in mice. *Hepatol Res*. 2016 May;46(6):584-92 doi: 10.1111/hepr.12587. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

【国際学会】

(1) Yamamoto S, Ono M, Masuda K, Nagano S, Yano Y, Kitagawa T, Hashiba M, Ochi T, Munekage K, Hirose A, Mizuta H, Saibara T. EVALUATION OF IMPAIRED FATTY ACID OXIDATION CAPACITY BY DYNAMIC LIVER SCINTIGRAPHY WITH 1231-BMIPP IS IMPORTANT IN THE DEVELOPMENT OF NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE IN NON-OBESE PATIENTS. DDW2018

(2) 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

(3) Nagano S , Ono M , Ochi T , Munekage K , Yano Y , Mizuta H , Ogasawara M , Hirose A , Nozaki Y , Okamoto N , Iwasaki S , Jude A , Oben T , Saibara T . Involvement of PNPLA3 function for hepatic lipids metabolism through XBP1 and modulation of endoplasmic reticulum stress in mice . APDW 2017

(4) Munekage K , Ono M , Ochi T , Ogasawara M , Hirose A , Fujimura Y , Iwasaki S , Saibara T . INVOLVEMENT OF AGE-RAGE SYSTEM FOR THE DEVELOPMENT OF HEPATIC FIBROSIS IN NASH . uegweek2016 (24th United European Gastroenterology Week) 2016 年 10 月 15 日 ~ 2016 年 10 月 19 日 Austria Vienna (Austria Center Vienna)

(5) Ono M , Ochi T , Munekage K , Ogasawara M , Hirose A , Nozaki-Fujimura Y , Okamoto N , Iwasaki S , Oben J , Saibara T . 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) 2016 年 04 月 13 日 ~ 2016 年 04 月 17 日 Spain Barcelona (Fira Barcelona Gran Via)

【国内学会】

(6) 越智経浩、川口巧、中原隆司、小野正文、宗景玄祐、村上英介、平松憲、小笠原光成、廣瀬享、茶山一彰、島村拓司、西原利治 慢性肝疾患の成因により耐糖能異常の特徴は異なっている 第 5 回肝臓と糖尿病・代謝研究会 . 一般演題 (ポスター) 「NASH/NAFLD、肝線維化」 2018.7.21 鳥取 (米子コンベンションセンター)

(7) 越智経浩、小野正文、西原利治 選択的 SGLT2 阻害薬による肝機能への有効性と治療効果因子についての検討 第 54 回日本肝臓学会総会 . シンポジウム 2 「NASH の諸問題 ~ 診断法と治療の再検証 ~ 」 2018.6.14 大阪 (大阪国際会議場)

(8) 越智経浩、小野正文、西原利治 脂肪肝発症に対する肥満度と飲酒量の影響は男女で異なっている 第 104 回日本消化器病学会総会 . 一般演題 (ポスター) 2018.4.19-21 東京 (京王プラザホテル)

(9) 越智経浩、小野正文、西原利治 NAFLD と C 型慢性肝炎患者の耐糖能異常の特徴についての比較検討 第 42 回日本肝臓学会西部会 シンポジウム 2017 年 11 月 30 日 ~ 12 月 1 日 福岡

〔図書〕 (計 2 件)

(1) 越智経浩 他、南江堂 消化器疾患最新の治療 2017-2018 2017 504 (343 ~ 346)

(2) 越智経浩 他、メジカルレビュー社 Mebio 2016 108 (4 ~ 9)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kochi1nai.jp/home/>

http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_phs11/

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

研究代表者氏名 : 越智 経浩

ローマ字氏名：OCHI, Tsunehiro

所属研究機関名：高知大学

部局名：教育研究部 医療学系 基礎医学部門

職名：助教

研究者番号：30617840