

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15764

研究課題名(和文) 酸化ステロール蓄積に起因する肥満性炎症誘発の分子機構解明と食品成分による予防

研究課題名(英文) Molecular mechanism of oxysterol 7-alpha hydroxylase on NASH progression

研究代表者

渡邊 雄一 (Watanabe, Yuichi)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：70792729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では酸化ステロール代謝に焦点をあて、肥満に起因する疾患のうち非アルコール性脂肪肝の発症・進行メカニズム解明を試みた。最近の研究から、酸化ステロールは炎症反応に関与することが示唆されている。そのことに着目し、NCBIに登録されているマイクロアレイデータを再解析した結果、酸化ステロール代謝酵素の一つの発現が発症時に低下していることを見出した。本研究では、その低下を回復させることで病態が緩和されることに加え、発症時の発現低下メカニズムを明らかにした。本研究成果はNASH進行における新規因子をターゲットとした予防・軽減化する機能性食品の創製を可能にするものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食習慣の欧米化による肥満に起因する糖尿病や循環器疾患、非アルコール性脂肪肝(NAFLD)などの生活習慣病の罹患率増加は医療費増大に直結し、我が国においても大きな問題となっている。なかでも、NAFLDを罹患する人口は年々増加しており、非アルコール性脂肪肝(NASH)へと進展した潜在患者は100-200万人いるとされている。

本研究では、NASHの炎症や線維化に関わるとされる因子を同定し、その発現回復がNASH進行を緩和させることを見出した。加えて、NASH進行時の当該因子の発現低下メカニズムを明らかにした。これらの成果はNASH進行を予防する機能性食品の創製に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common chronic liver disease worldwide affecting more than 25% of adult population. Whereas NAFLD encompasses from benign simple steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), detail of its transition mechanisms underlying the pathogenesis of that are still unknown. In this study, we focused on the hepatic Cyp7b1 gene, whose expression was downregulated in the liver of ob/ob mice and MCD diet-fed mice based on previous microarray data. We investigated the effect of CYP7B1 recovery on the phenotype of NASH under conditions of NASH development and its association with general NASH features such as oxidative and lipid stress. We found that CYP7B1 recovery suppressed hepatitis and fibrosis. We also found that the induction of lipid stress and oxidative stress seen early in the development of NASH suppresses Cyp7b1 transcription in hepatocytes.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：NASH 酸化ステロール代謝 胆汁酸合成経路 CYP7B1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食習慣の欧米化による肥満に起因する糖尿病や動脈硬化などの循環器疾患、非アルコール性脂肪肝(NAFLD)などの生活習慣病の罹患率増加は医療費増大に直結し、我が国においても大きな問題となっている。最近の研究から、酸化ステロールは炎症反応に関与することが示唆されている。

2. 研究の目的

研究代表者は NCBI に登録されているレプチン欠損 (*ob/ob*) マウスおよびメチオニン・コリン欠乏高脂肪食飼育により NAFLD あるいは非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を発症した肝臓のマイクロアレイデータを用いて、酸化ステロールの代謝・合成経路に焦点をあて再解析を行い、酸化ステロール代謝酵素の一つである CYP7B1 の発現が発症マウスで低下していることを見出した。そこで本研究では、肥満に起因する疾患のうち、NAFLD および NASH に焦点をあて、CYP7B1 と NASH の発症および病態の進行との関連について解析を試みた。

3. 研究の方法

1) NASH 発症時の CYP7B1 の発現解析

8 週もしくは 1 週間のメチオニン・コリン欠乏食飼育したマウス肝臓における CYP7B1 の発現変動に関して、mRNA レベル及びタンパク質レベルで解析する。また、メチオニン・コリン食飼育期間を短縮し NASH の発症と CYP7B1 発現レベルの変化について解析する。

2) CYP7B1 発現が NASH 進行に及ぼす影響の解析

アデノ随伴ウイルスベクターを用いてマウス肝臓に CYP7B1 を強制発現させ、8 週間のメチオニン・コリン食飼育により NASH を誘発した際の肝臓での炎症系マーカーおよび線維化マーカーの発現を解析する。

3) CYP7B1 低下メカニズムの解析

1)の短期間メチオニン・コリン食飼育マウス肝臓では、肝臓での脂肪蓄積や酸化ストレスマーカー等の一部の炎症系マーカーのみの応答が見られた。そこで、これらが CYP7B1 の発現低下に関与するか明らかにするために、マウス肝由来細胞 Hepa1-6 にオレイン酸やパルミチン酸、 H_2O_2 を処理し CYP7B1 発現を解析した。

4. 研究成果

1) NASH 発症時の CYP7B1 の発現解析

8 週間のメチオニン・コリン食飼育により、血清中の ALT 及び AST の値が上昇し、肝臓での *Tnf- α* や *I-1 β* 、*Tlr4* といった炎症系マーカーの遺伝子発現の上昇に加え、 *α -Sma* や *Colla1* といった線維化マーカーの遺伝子発現も上昇していた。さらに肝臓での α -Sma タンパク質発現も上昇していた。この NASH 発症肝臓において CYP7B1 の発現を測定したところ、遺伝子発現に加えタンパク質レベルでも発現が低下していた (図 1)。

また、メチオニン・コリン食による飼育を 1 週間に短縮し同様の解析を行った結果、1 週間のメチオニン・コリン食飼育でも CYP7B1 の発現は低下していた。一方で、線維化マーカー発現に変化は見られず、炎症系マーカーの発現変化も一部にしか見られなかった。

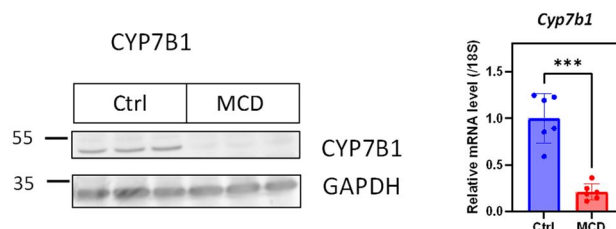


図1. メチオニン・コリン食飼育したマウス肝臓でのCYP7B1発現

2) CYP7B1 発現が NASH 進行に及ぼす影響の解析

1)での解析の結果、NASH 進行時に CYP7B1 の発現が低下すること、さらには NASH 進行の初期段階で発現低下が始まっていることが示唆された。これらの結果から、NASH の進行に CYP7B1 の発現が関与していることが予想されたため、CYP7B1 のレスキュー実験を行った。

本実験では、中長期的かつ組織特異的な目的遺伝子を発現させるアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いた。AAV により肝臓特異的に CYP7B1 を発現させたマウスを 8 週間メチオニン・コリン食飼育した際の各種応答について解析した。その結果、CYP7B1 の発現により血清中 AST・ALT 値の上昇が緩和され、肝臓での炎症系マーカー及び線維化マーカー濃

伝子の発現上昇も緩和された。これらの結果から、CYP7B1 の発現低下は NASH 進行に関与していることが示唆された。

3) CYP7B1 低下メカニズムの解析

1)及び2)での解析の結果、脂肪蓄積肝においてCYP7B1の発現低下はNASHの進行に関与することが示唆された。また、1)での短期間(1週間)のメチオニン・コリン食飼育では、一部の炎症系マーカーの上昇とCYP7B1の発現低下のみが観察された。これらの結果から、応答が見られた炎症もしくは脂肪蓄積がCYP7B1の発現低下を引き起こしていることが予想された。そこで、マウス肝細胞由来のHepa1-6を用いてこれらの応答とCYP7B1の発現との関連について解析した。Hepa1-6にオンレイン酸を処理してもCYP7B1の発現に変化はなかったものの、パルミチン酸の処理によりCYP7B1の発現が低下した。また、短期間のメチオニン・コリン食飼育で酸化ストレスマーカー遺伝子の上昇がみられていたため、Hepa1-6にH₂O₂を処理した結果、CYP7B1の発現がパルミチン酸処理と同様低下した。パルミチン酸処理により、メチオニン・コリン食飼育及びH₂O₂処理で変化が見られた酸化ストレスマーカー遺伝子の発現上昇がみられた。これらの結果から、CYP7B1の発現低下は酸化ストレスを誘発する脂肪蓄積により引き起こされることが示唆された(図2)。

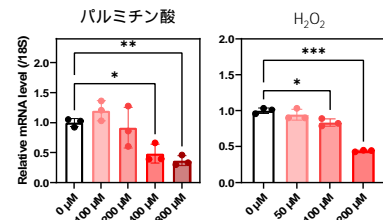


図2. CYP7B1の発現低下要因の検討

本研究により、NASH 進行時に CYP7B1 の発現が低下し、その発現低下が NASH の進行に関与していること、そしてその発現低下は酸化ストレスを誘発する脂肪蓄積により引き起こされていることが明らかとなった。これらの研究成果により、CYP7B1 をターゲットとすることで NASH 進行を予防・軽減化する機能性食品の創製が可能になるものと考えられる。現在、以上の内容をまとめて国際誌に投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Yuichi, Sasaki Takashi, Miyoshi Shoko, Shimizu Makoto, Yamauchi Yoshio, Sato Ryuichiro	4. 巻 297
2. 論文標題 Insulin-induced genes INSIG1 and INSIG2 mediate oxysterol-dependent activation of the PERK-eIF2-ATF4 axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100989 ~ 100989
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.100989	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊 雄一、佐々木 崇、三吉 翔子、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎
2. 発表標題 酸化ステロールはINSIGを介してPERK/ATF4経路活性化とそれに伴う細胞死を誘導する
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Napatsorn DUMRONGKULCHART, Yuichi WATANABE, Makoto SHIMIZU, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO
2. 発表標題 CYP7B1 and its function on the progression of non-alcoholic steatohepatitis
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊 雄一、三吉 翔子、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎
2. 発表標題 脂質代謝制御因子Insig-酸化ステロール結合の新規応答
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊 雄一、三吉 翔子、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎
2. 発表標題 INSIGを介した酸化ステロールによる細胞死誘導機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 雄一、三吉 翔子、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎
2. 発表標題 脂質代謝制御因子Insigを介した酸化ステロールによる新規応答
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊 雄一、三吉 翔子、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎
2. 発表標題 The novel signaling of Insig-oxysterol interaction
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------