

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790643  
 研究課題名（和文） 肝栄養代謝における小胞体ストレス応答の分子機構解明  
 研究課題名（英文） Regulation of hepatic glucose and lipid metabolism by ER stress response  
 研究代表者  
 太田 嗣人（OTA TSUGUHITO）  
 金沢大学・フロンティアサイエンス機構・特任助教  
 研究者番号：60397213

## 研究成果の概要（和文）：

生活習慣病の病態基盤と考える肝臓の脂肪化にストレス応答が関与するという現象のメカニズムを以下のごとく明らかにした。培養肝細胞に palmitic acid (PA), oleic acid (OA), docosahexanoic acid (DHA) を処理し、肝臓からの VLDL-apoB 分泌に対する影響を検討した。PA はセラミド合成経路を一部に介し小胞体ストレスを亢進させ apoB の分泌を阻害する。一方、DHA は小胞体ストレスよりはむしろ酸化ストレスの亢進を介し apoB 分泌を阻害する。脂肪酸は種類によって、共通あるいは固有の小胞体ストレスあるいは酸化ストレス経路を介して apoB の分泌を阻害し、脂肪肝や脂質異常症を発症させると考え更に解析を進めている。

研究成果の概要（英文）： Increased secretion of apolipoprotein B (apoB)-containing lipoproteins, particularly VLDL, and hepatic steatosis are characteristic concomitants of insulin resistance, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes. Endoplasmic reticulum (ER) stress plays a central role in the development of hepatic insulin resistance and steatosis. Each fattyacid (FA), when administered for prolonged periods of time, can, at certain doses, inhibit apoB secretion. The effects of OA and PA parallel their ability to induce ER stress; PA is more potent and acts, in part, via ceramide. DHA is the most potent inhibitor but this is independent of ER stress.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：内分泌代謝

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：脂質代謝異常，脂肪肝，小胞体ストレス，インスリン抵抗性，炎症

## 1. 研究開始当初の背景

過栄養という現代の環境負荷に起因する生活習慣病の基盤病態にインスリン抵抗性 (IR)がある。過去およそ 10 年の研究から、過栄養・肥満が要因となる疾患 [メタリックシンドローム (MetS), 2 型糖尿病, 高脂血症, 動脈硬化症] を引き起こす主役は脂肪組織, とりわけ内臓脂肪と考えられている。最近になって, 我々を含む多くの臨床研究により MetS の 70-80% は非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) を合併すること (Gastroenterology 123:1705, 2002), 脂肪肝患者のほとんどは IR を示すこと (N Engl J Med 346:1221, 2002), 脂肪肝は心血管疾患の独立した危険因子であること (Atherosclerosis 191:235, 2007), IR が改善すると NAFLD が改善すること (Ota T Gastroenterology 2007) などから肝臓の脂肪化が生活習慣病の本質的病態のひとつである可能性が指摘されている。

なかでも, 過栄養がもたらす生活習慣病の発生と維持において肝臓が重要な役割を果たしている現象のひとつに, 脂肪肝と高中性脂肪 (TG) 血症が IR 状態において高頻度に合併し共存していることがあげられる。すなわち過栄養にさらされた肝臓は VLDL として脂質の放出を増加させるにもかかわらず脂質を過剰に蓄積し脂肪肝に至り, これは IR と関連している。申請者は, 1) 過栄養状態において高 TG 血症と脂肪肝という一見相反する病態が共存するその意義, 2) 肝脂質代謝の破綻が IR や MetS を発症させる新しい機序を探求するため, 細胞内の小胞体 (ER) に生じるストレスに注目し検討を行ってきた。最近, 肥満や高脂肪食負荷によって肝臓に ER ストレスが誘導され IR が惹起されることが報告され (Science 306:425, 2004), ER ストレスは IR の上流病態であるという視点から, 代謝疾患におけるその役割が注目される。

過栄養にさらされた個体では, 脂質の過剰摂取による食餌由来の脂肪酸または IR による脂肪組織での TG 分解亢進から生じた脂肪酸が肝臓へ大量に流入する。申請者はこれまで, 高脂肪食が酸化ストレスを引き起こし脂肪肝を発症することに加え (Hepatology 2007), 肝へ過剰に流入した脂肪酸が ER ストレスを誘導し, 肝からのアポリポ蛋白 B (apoB) の分泌を減少させ脂肪肝が促進するという現象を明らかにした (JCI 2008, Keystone Symposia 優秀演題)。

## 2. 研究の目的

過栄養・肥満に起因する生活習慣病の病態基盤と考える肝臓の脂肪化とそれに続く炎症にストレス応答およびインスリン抵抗性の両者が深く関与するという現象の意義とメカニズムを検討することを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

1. 肝脂質代謝機能の破綻が炎症を誘導する機序: 食餌性 NASH モデルの栄養主成分を 1) 飽和脂肪酸・蔗糖 に変換し IR を増大, 2) ジアシルグリセロール・n-3 多価不飽和脂肪酸に変換し IR を減弱させる。IR の増減がどの脂肪酸代謝経路を正または負に制御し炎症を誘導するかを, インスリン感受性, 脂肪酸代謝カイネティクス, 肝病理組織像・炎症マーカー (JNK, NF- $\kappa$ B) を測定し評価する。

2. 小胞体ストレスレベルの変化と脂肪酸代謝の恒常性維持: 脂肪酸ホメオスターシスにおける小胞体ストレス応答の役割を明らかにするため, i) 過栄養負荷マウス (脂肪酸灌流, 高脂肪) や脂肪肝モデル, ii) 小胞体ストレス抵抗性マウス, 分子標的 (GRP78, CHOP 等) を RNAi 法でノックダウンした肝細胞を用い, ストレスレベルをダイナミックに増減さ

せ生じる脂肪酸代謝動態変化を脂肪酸代謝カイネティクス, 主要代謝分子の遺伝子発現, 蛋白発現・リン酸化等の方法により測定する.

#### 4. 研究成果

我々は先に, どのような種類の脂質の過剰摂取と肝への蓄積が NASH の進展や肝にインスリン抵抗性を誘導させるかを (1) 高脂肪食, (2) 高コレステロール食, また (3) 高脂肪・高コレステロール食を正常マウス (C57Bl/6J マウス) に投与し, 肝に蓄積する脂質組成に着目し検討した. その結果, TG よりもコレステロールの蓄積が肝に強い酸化ストレスを惹起し, 脂肪化から炎症を誘導すること, さらに palmitic acid (PA) を中心とする飽和脂肪酸摂取の増加が 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) 過酸化脂質修飾蛋白の蓄積から酸化ストレスをさらに増大させ, IRS-2 蛋白の減少とピルビン酸由来の肝糖新生亢進から肝インスリン抵抗性を増大させることを見出した (Hepatology 2007). 今回, PA が肝臓のインスリン抵抗性を惹起する機序を in vitro にて詳細に検討した. 培養肝細胞 H4IIEC3 細胞において飽和脂肪酸の PA は, ミトコンドリア由来の活性酸素種を過剰に産生し, ストレスキナーゼである JNK をリン酸化し, IRS-2 リン酸化の阻害を介してインスリンシグナルを低下させることを明らかにした. 高脂肪食摂取マウスでは, 肥満と全身のインスリン抵抗性の増大に先行して, 肝臓と脂肪組織において酸化ストレス遺伝子の発現が協調的に増加し, 肝臓では脂肪酸 $\beta$ 酸化関連遺伝子の発現亢進と相関があることを見出した.

さらに, 肝臓へ流入する脂肪酸がその種類によって, 1) どのような代謝経路を介してストレス応答を誘導するのか, 2) 肝臓から VLDL-apoB の分泌に与える影響の差異を検討

した. 培養肝細胞において PA, oleic acid (OA), docosahexanoic acid (DHA) を 16 時間各々培養すると, PA および DHA は OA に比し apoB の分泌を強く阻害した. PA は OA に比し, eIF2 $\alpha$  のリン酸化を亢進させ, セラミド合成阻害剤により apoB 分泌は有意な回復を認めたことから, PA はセラミド合成経路を一部に介して小胞体ストレスを亢進させ apoB の分泌を阻害する. 一方, DHA による apoB 分泌阻害は vitamin E の処理により改善したことから, DHA は ER ストレスよりはむしろ酸化ストレスの亢進を介し apoB 分泌を阻害することが示唆された. 脂肪酸はその種類によって, 共通あるいは固有の小胞体ストレス経路あるいは酸化ストレス経路を介して apoB の分泌を阻害し, 脂肪肝や脂質異常症を増悪または改善させると考えられ, さらに解析を行う予定である.

#### 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 7 件)

1. Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, Nabemoto S, Kurita S, Ota T, Ando H, Miyamoto K, Kaneko S: Palmitate Induces Insulin Resistance in H4IIEC3 Hepatocytes through Reactive Oxygen Species Produced by Mitochondria. *J Biol Chem* 284:14809-14818, 2009, 査読有

2. Uno M, Kurita S, Misu H, Ando H, Ota T, Matsuzawa-Nagata N, Kita Y, Nabemoto S, Akahori H, Zen Y, Nakanuma Y, Kaneko S, Takamura T: Tranilast, an antifibrogenic agent, ameliorates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 48:109-118, 2008, 査読有

3. Takamura T, Misu H, Matsuzawa-Nagata N, Sakurai M, Ota T, Shimizu A, Kurita S, Takeshita Y, Ando H, Honda M, Kaneko S: Obesity upregulates genes involved in oxidative phosphorylation in livers of diabetic patients. *Obesity (Silver Spring)* 16:2601-2609, 2008, 査読有
4. Kurita S, Takamura T, Ota T, Matsuzawa-Nagata N, Kita Y, Uno M, Nabemoto S, Ishikura K, Misu H, Ando H, Zen Y, Nakanuma Y, Kaneko S: Olmesartan ameliorates a dietary rat model of non-alcoholic steatohepatitis through its pleiotropic effects. *Eur J Pharmacol* 588:316-324, 2008, 査読有
5. Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, Ota T, Yokoyama M, Honda M, Miyamoto K, Kaneko S: Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism* 57:1071-1077, 2008, 査読有
6. 太田嗣人, 篁 俊成: 脂肪肝とリポトキシシティ; リポトキシシティを見直す The Lipid 19:20-26, 2008, 査読無
7. 太田嗣人: 高脂血症・脂肪肝形成における ER ストレスの意義 メタボリックシンドロームから消化器疾患に迫る 分子消化器病 6:37-40, 2009, 査読無

[学会発表] (計 5 件)

1. Takamura T, Misu H, Nagata N, Ishikura K, Ota T, Kaneko S: Identification of a redox-associated hepatokine that contributes to systemic insulin

resistance

*Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Type 2 Diabetes and Insulin Resistance* J3 352, January 21, 2009 (USA)

2. Ota T, Gayet C, Ginsberg HN: Different fatty acids inhibit apoB100 secretion by both common and unique molecular pathways *Diabetologia* 51 (suppl. 1) S299, September 9, 2008. *Presented at the 2008 Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD)* (Italy)

3. 太田嗣人, Ginsberg HN

脂肪酸誘導性肝小胞体ストレスは apoB100 分泌を選択的に阻害し肝脂肪化を促進する 第 51 日本糖尿病学会年次学術集会, 2008 年 5 月 23 日, 東京フォーラム (東京)

4. Ota T, Gayet C, Ginsberg HN:

Inhibition Of Apolipoprotein B100 Secretion By Lipid-induced Hepatic Endoplasmic Stress 第 41 回動脈硬化学会, 2009 年 7 月 17 日, 海峡メッセ (山口)

5. 太田嗣人, 篁 俊成, 金子周一, Henry Ginsberg インスリン抵抗性で生じる小胞体ストレスは apoB 分泌を選択的に阻害し脂肪肝を促進する, 第 23 回日本糖尿病合併症学会, 2008 年 10 月 3 日, 日本都市センター (東京)

[その他]

ホームページ等

<http://ota.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

太田 嗣人 (OTA TSUGUHITO)

金沢大学・フロンティアサイエンス機構・

特任助教

研究者番号：60397213

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし