

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08512

研究課題名(和文) 脂肪酸組成バランスの不均衡と肝臓 肺連関による肺気腫進展の機序解明と新規治療戦略

研究課題名(英文) Elucidation of dynamics in fatty acid composition and serpin A1 expression in the liver associated with deficiency of Elovl6.

研究代表者

横山 知行 (Yokoyama, Tomoyuki)

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：70312890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Elongation of long chain fatty acid member 6 (Elovl6)の欠損に伴う脂肪酸組成の変化が、肝臓でのserpinA1遺伝子、1-アンチトリプシンタンパクの動態にどのように影響するかを目的として検討を行った。その結果、肝細胞へのElovl6のノックダウンおよび脂肪酸組成の変化が1-アンチトリプシンの遺伝子発現および細胞外分泌に影響し、これにより全身および肝臓特異的Elovl6欠損マウスにおける血中濃度の低下を引き起こす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Elovl6の欠損に伴う脂肪酸組成の変化が、肝臓でのserpinA1遺伝子、1-アンチトリプシンタンパクの動態にどのように影響するかを検討した。その結果、肝細胞へのElovl6のノックダウンおよび脂肪酸組成の変化が1-アンチトリプシンの遺伝子発現および細胞外分泌に影響し、これにより全身および肝臓特異的Elovl6欠損マウスにおける血中濃度の低下を引き起こす可能性が示唆された。したがって、肝臓での脂肪酸バランス変化が血中の1-アンチトリプシン活性を制御することで肺疾患の発症・進展に起因することが示唆され、肺気腫の新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether changes in fatty acid composition associated with deletion of Elongation of long chain fatty acid member 6 (Elovl6) affect the protein dynamics of 1-antitrypsin and the serpinA1 gene expression in the liver. Consequently, knockdown of Elovl6 into hepatocytes and changes in fatty acid composition affect gene expression and extracellular secretion of 1-antitrypsin, leading to reduced blood levels in systemic and liver-specific Elovl6-deficient mice. was suggested.

研究分野：臨床生理学

キーワード：遊離脂肪酸 1-アンチトリプシン 肝臓

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Elovl6 欠損マウスでは肺線維症だけではなく、肺胞の破壊による気腫性変化も伴い、喫煙曝露による肺気腫モデルマウスを作製したところ、肺気腫病変の増加と脂肪酸組成の変化を認められた。したがって、Elovl6 が細胞内の脂肪酸組成のバランスを変化させることで、肺気腫の発症、進展にも強く影響していることが示された。

そこで、Elovl6 欠損マウスの肺組織を用いて、RNA シークエンスによる遺伝子発現の網羅的スクリーニングを行った結果、 α 1-アンチトリプシンの産生に関わる遺伝子である SerpinA1 に着目した。申請者らは Elovl6 欠損マウスの肝臓において SerpinA1 のタンパク発現が著明に低下し、血中の α 1-アンチトリプシンの濃度も著明に低下することを見出した。以上の結果から、Elovl6 欠損マウスでは α 1-アンチトリプシンの血中濃度低下に伴って先天性の肺気腫様病変を呈し、さらに、喫煙曝露によって、 α 1-アンチトリプシンの活性が低下して肺気腫病変が増悪した可能性がある。したがって、肝臓での脂肪酸バランス変化が血中の α 1-アンチトリプシン活性を制御することで肺疾患の発症・進展に起因することが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、脂肪酸組成とその組成を調節する Elovl6 が、 α 1-アンチトリプシンの発現や活性などに及ぼす影響を検討し、肺気腫の病態メカニズムの解明と新規の予防・治療戦略を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) siRNA を用いたノックダウン実験

AML12 細胞の内因性 Elovl6 を、Small interfering RNA (siRNA) を用いてノックダウンした。コントロールには siRNA green fluorescent protein (siGFP) を用いた。

(2) 培養細胞への脂肪酸刺激

脂肪酸を用いて AML12 細胞に刺激を行った。コントロールには 10%BSA(SIGMA、日本)を用いた。脂肪酸刺激は、まず、AML12 細胞を抗生剤と 10%BSA を含み、血清を含まない培地に置換し、37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。その後、調製した脂肪酸溶液を AML12 細胞に添加し、24 時間培養後に RNA およびメディアムを回収して実験に使用した。

(3) SerpinA1 発現ベクター作成法

まず、マウスの肝臓の RNA を用いて、逆転写(RT)-PCR 法によりマウス cDNA を得た。次に NCBI より検索したマウス SerpinA1a(Accession No. NM_009243.4) のコード配列から、PCR に用いるプライマーの設計を行った。5'末端の開始コドンの前に EcoR I サイト、3'末端の停止コドンの後に BamH I サイトを設定し、プライマーを設定した。得られた cDNA を用いて、PCR 酵素として PrimeSTAR Max DNA Polymerase (TaKaRa) を使用して PCR 反応を行った。次に、QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) を用いて PCR 産物を精製した。この PCR 産物と、pcDNA3.1/flag ベクターを Nhe I、BamH I (Roche) で切断し、Quick Ligation Kit (NEW ENGLAND BioLabs, Inc.) を用いてライゲーションすることで、pcDNA3.1/flag ベクターにマウス SerpinA1 をコードする配列を組み込んだ。作成した pcDNA3.1-flag mouse SCD1 ベクターを用いて、293T 細胞にリン酸カルシウム法で遺伝子導入し、タンパク発現を確認した。

(4) siRNA と発現ベクターのダブルトランスフェクション

AML12 細胞に Elovl6 の siRNA と pcDNA-flag serpinA1 を同時にトランスフェクションし

た。コントロールには siGFP、pcDNA-GFP を用いた。

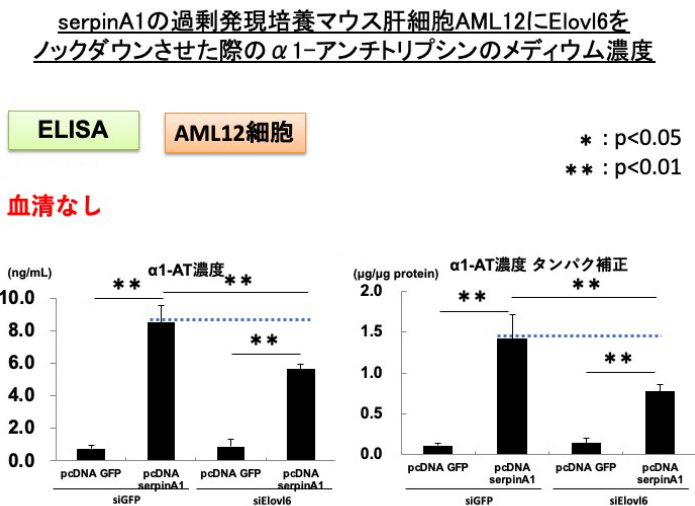
4. 研究成果

培養マウス肝細胞に siRNA を用いて Elov16 をノックダウンさせたところ、 α 1-アンチトリプシンのタンパクをコードする *serpinA1a-c*, *serpinA1e* の遺伝子発現が著明に低下した。Elov16 の発現が低下することで細胞内の脂肪酸組成が変化することから、培養マウス肝細胞に主要な脂肪酸を添加したところ、不飽和脂肪酸であるオレイン酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸により *serpinA1a-e* の遺伝子発現の有意な低下を認めた。以上より、肝細胞への Elov16 の発現低下および不飽和脂肪酸の添加により、 α 1-アンチトリプシンの発現が低下することを確認した。

次に、培養マウス肝細胞での Elov16 のノックダウン、脂肪酸刺激により、*serpinA1* の遺伝子発現が低下することから、タンパクレベルにおける発現動態について検討したが、AML12 細胞におけるベースのタンパク発現量が低いこと、 α 1-アンチトリプシン抗体の問題で検出が困難などの影響があり、検討ができなかった。

さらに、肝細胞における Elov16 の発現低下が、 α 1-アンチトリプシンタンパクの細胞外への分泌に影響するかどうかを検討するため、Elov16 の siRNA をトランスフェクションし、 α 1-アンチトリプシンのメディウム中の濃度を検討したが、*serpinA1* を過剰発現していない siGFP をトランスフェクションした AML12 細胞では、 α 1-アンチトリプシンのメディウム中の濃度は極めて低く、siElov16 をトランスフェクションしても明らかな変化は認められなかった。そこで、 α 1-アンチトリプシンの細胞内におけるタンパク動態を確認するため、外因性に α 1-アンチトリプシンタンパクを産生させるための *SerpinA1* の発現ベクターを作成して、 α 1-アンチトリプシンのメディウム中の濃度を検討した。その結果、Elov16 のノックダウンにより、 α 1-アンチトリプシンのメディウム中の濃度が約 1/2 程度に低下することを確認した (図 1)。

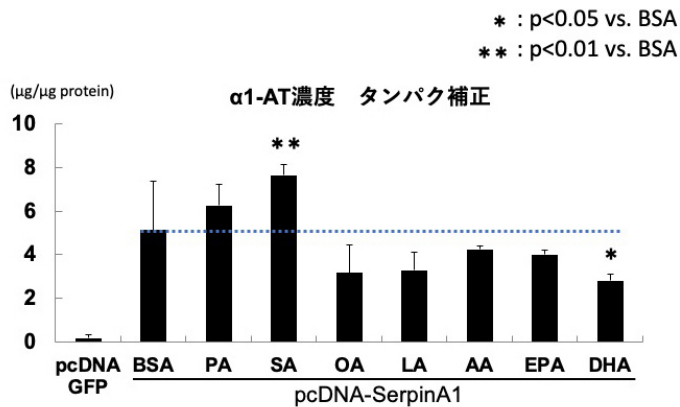
図 1



さらに、肝細胞に主要な脂肪酸を添加して同様の検討を行ったところ、ドコサヘキサエン酸の添加により α 1-アンチトリプシンのメディウム中の濃度が有意に低下することを確認した (図 2)。

最後に、肝細胞における α 1-アンチトリプシンタンパクの動態を免疫蛍光染色で観察したところ、コントロールでは細胞にびまん性にタンパクが染まるのに対し、Elov16 のノックダウンにより、細胞膜の周囲に強く染まる傾向を認めた。

serpinA1の過剰発現培養マウス肝細胞AML12に脂肪酸刺激を行った際のα1-アンチトリプシンのメディウム濃度



今回、α1-アンチトリプシンを過剰発現した培養肝細胞に血清ありと血清なしの条件で Elov16 をノックダウンさせたところ、血清ありの条件ではα1-アンチトリプシンの細胞外分泌に変化を認めず、血清なしの条件で細胞外分泌が低下するという結果が得られた。つまり、血清ありと血清なしの培養条件で、Elov16 のノックダウンによる細胞内の脂質組成に違いが出たと考えられ、この脂質がα1-アンチトリプシンの細胞外分泌に影響していると考えられる。今後は脂質組成とα1-アンチトリプシンとの関連性について、慎重に解析を重ね、肝臓での脂肪酸バランス変化が血中のα1-アンチトリプシン活性を制御して肺疾患の発症・進展に関わる機序を明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Umbarawan, Y. Enoura, A. Ogura, H. Sato, T. Horikawa, M. Ishii, T. Sunaga, H. Matsui, H. Yokoyama, T. Kawakami, R. Maeno, T. Setou, M. Kurabayashi, M. Iso, T.	4. 巻 62
2. 論文標題 FABP5 Is a Sensitive Marker for Lipid-Rich Macrophages in the Luminal Side of Atherosclerotic Lesions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int Heart J	6. 最初と最後の頁 666-676
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1536/ihj.20-676	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Furukawa, N. Koitabashi, N. Matsui, H. Sunaga, H. Umbarawan, Y. Syamsunarno, Mraa Yamaguchi, A. Obokata, M. Hanaoka, H. Yokoyama, T. Kurabayashi, M.	4. 巻 36
2. 論文標題 DPP-4 inhibitor induces FGF21 expression via sirtuin 1 signaling and improves myocardial energy metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heart Vessels	6. 最初と最後の頁 136-146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00380-020-01711-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawakami, R. Sunaga, H. Iso, T. Kaneko, R. Koitabashi, N. Obokata, M. Harada, T. Matsui, H. Yokoyama, T. Kurabayashi, M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Ketone body and FGF21 coordinately regulate fasting-induced oxidative stress response in the heart	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 7338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10993-4	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 -
1. 著者名 Nagasaka, T. Koitabashi, N. Ishibashi, Y. Aihara, K. Takama, N. Ohyama, Y. Yokoyama, T. Kaneko, Y.	4. 巻 25
2. 論文標題 Acute Myocarditis Associated with COVID-19 Vaccination: a Case Report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Cardiol Cases	6. 最初と最後の頁 285-288
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jccase.2021.11.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 松井 弘樹、須永 浩章、忠木 沙耶香、古川 希、磯 達也、松坂 賢、島野 仁、倉林 正彦、横山 知行
2. 発表標題 心臓のミトコンドリアの品質維持を制御する脂肪酸の探索と病態意義の解析
3. 学会等名 第28回日本未病学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須永 浩章、松井 弘樹、小保方 優、小坂橋 紀通、磯 達也、横山 知行、倉林 正彦
2. 発表標題 ケトン体による心筋エネルギー代謝の調節機構の検討
3. 学会等名 第28回日本未病学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rina Tanabe, Hiroki Matsui, Ryo Kawakami, Tomoyuki Yokoyama, Masahiko Kurabayashi, Hideki Ishii, Tatsuya Iso
2. 発表標題 Comparison between urinary fatty acid binding protein 1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in acetaminophen-induced acute kidney injury in mice
3. 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Satoh, Hiroki Matsui, Hiroaki Sunaga, Ryo Kawakami, Tatsuya Iso, Hiedeki Ishi, Tomoyuki Yokoyama, Masahiko Kurabayashi
2. 発表標題 Deletion of fatty acid synthase in vascular smooth muscle cells attenuates neointima formation after vascular injury in mice
3. 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1 . 発表者名 Reika Nagata, Masaru Obokata, Hiroki Matsui, Hiroaki Sunaga, Ryo Kawakami, Tomonari Harada, Tatsuya Iso, Tomoyuki Yokoyama, Hideki Ishii
2 . 発表標題 Inflammatory cytokine production by visceral fat in heart failure with preserved ejection fraction
3 . 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会 (国際学会)
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 Hiroaki Sunaga, Hiroki Matsui, Sayaka Tadaki, Yogi Umbarawan, Nozomi Furukawa, Ryo Kawakami, Tatsuya Iso, Norimichi Koitabashi, Takashi Matsuzaka, Hitoshi Shimano, Tomoyuki Yokoyama, Hideki Ishii, Masahiko Kurabayashi
2 . 発表標題 Genetic deletion of Elovl6 in cardiac fibroblast attenuates fibrotic response during pressure overload in mice.
3 . 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会 (国際学会)
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 Rina Tanabe, Hiroki Matsui, Ryo Kawakami, Tomoyuki Yokoyama, Masahiko Kurabayashi, Hideki Ishii, Tatsuya Iso.
2 . 発表標題 Comparison between urinary fatty acid binding protein 1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in acetaminophen-induced acute kidney injury in mice.
3 . 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会 (国際学会)
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 Yuki Satoh, Hiroki Matsui, Hiroaki Sunaga, Ryo Kawakami, Tatsuya Iso, Hiedeki Ishi, Tomoyuki Yokoyama, Masahiko Kurabayashi.
2 . 発表標題 Deletion of fatty acid synthase in vascular smooth muscle cells attenuates neointima formation after vascular injury in mice.
3 . 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会 (国際学会)
4 . 発表年 2023年

1. 発表者名 Reika Nagata, Masaru Obokata, Hiroki Matsui, Hiroaki Sunaga, Ryo Kawakami, Tomonari Harada, Tatsuya Iso, Tomoyuki Yokoyama, Hideki Ishii
2. 発表標題 Inflammatory cytokine production by visceral fat in heart failure with preserved ejection fraction.
3. 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroaki Sunaga, Hiroki Matsui, Sayaka Tadaki, Yogi Umbarawan, Nozomi Furukawa, Ryo Kawakami, Tatsuya Iso, Norimichi Koitabashi, Takashi Matsuzaka, Hitoshi Shimano, Tomoyuki Yokoyama, Hideki Ishii, Masahiko Kurabayashi.
2. 発表標題 Genetic deletion of Elovl6 in cardiac fibroblast attenuates fibrotic response during pressure overload in mice.
3. 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松井 弘樹, 桑原 夏海, 前野 敏孝, 須永 浩章, 倉林 正彦, 横山 知行.
2. 発表標題 慢性閉塞性肺疾患および特発性肺線維症患者における血中脂肪酸組成の解析.
3. 学会等名 第27回日本未病学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須永 浩章, 松井 弘樹, 横山 知行, 倉林 正彦
2. 発表標題 急性心臓イベントにおける線維芽細胞増殖因子21 (FGF21) の有用性に関する検討
3. 学会等名 第69回日本医学検査学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 忠木 沙耶香, 松井 弘樹, 須永 浩章, 古川 希, 川上 亮, 磯 達也, 小板橋 紀通, 松坂 賢, 島野 仁, 横山 知行, 倉林 正彦
2. 発表標題 Deranged fatty acid composition by Elovl6-knockout induces cardioprotective mechanism during pressure overload: a Potential New Therapeutic Target for Heart Failure.
3. 学会等名 第84回日本循環器学会総会・学術集会（国際学会）
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
研究分担者	前野 敏孝 (Maeno Toshitaka) (00436297)	群馬大学・大学院医学系研究科・准教授 (12301)	
研究分担者	須永 浩章 (Sunaga Hiroaki) (10760077)	足利大学・工学部・講師 (32201)	
研究分担者	松井 弘樹 (Matsui Hiroki) (20431710)	群馬大学・大学院保健学研究科・准教授 (12301)	

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
---------	---------