

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19327

研究課題名（和文）非アルコール性脂肪性肝疾患の治療に資するホスホリパーゼCの解明

研究課題名（英文）Identification of phospholipase C for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease

研究代表者

河野 望（Kono, Nozomu）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・准教授

研究者番号：50451852

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：Huh-7細胞におけるPIの分解過程をd8グリセロール標識により検討した結果、PIの分解には分子種特異性があり、非アラキドン酸含有PIの半減期が短いことが明らかとなった。LPLAT11欠損細胞におけるPI分解亢進に関わる因子を探索した結果、PI-PLC活性が報告されているPLCファミリー、PLCXDファミリーおよびSMSrの発現抑制ではPIの分解は抑制されなかった。一方、PI分解を抑制する化合物をスクリーニングする中で、脂質ホスファターゼの阻害剤がPI分解を阻害することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果から得られた分子種特異的なPI分解ならびにPI-PLCの候補をさらに検討することで、非アルコール性脂肪性肝疾患の病態形成に関わるPI代謝およびその実行分子が明らかとなり、非アルコール性脂肪性肝疾患の新たな診断・治療戦略を提供することができる。

研究成果の概要（英文）：The degradation process of PI in Huh-7 cells was examined by d8 glycerol labeling, which revealed that PI degradation is species-specific and that the half-life of non-arachidonic acid-containing PI is shorter. PI degradation was not inhibited by the knockdown of PLC family members, PLCXD family members, and SMSr, which have been reported to have PI-PLC activity. On the other hand, in screening compounds that inhibit PI degradation, we found that an inhibitor of lipid phosphatases inhibits PI degradation.

研究分野：脂質生物学

キーワード：ホスホリパーゼC ホスファチジルイノシトール 非アルコール性脂肪性肝疾患

1. 研究開始当初の背景

近年、飲酒の習慣がないにも関わらず肝臓に中性脂質が蓄積する非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) の患者が急増している。NAFLD の一部は重症化し、非アルコール性脂肪性肝炎を経て、肝硬変や肝がんへと進行する。そのため脂肪肝の重症化を抑制することが大きな課題となっているが、脂肪肝の発症機構や重症化のメカニズムは不明な点が多く残されており、治療法も確立されていない。一方、ゲノムワイド関連解析により、遺伝的要因と NAFLD との関連が明らかになってきている。その中でも、LPLAT11 (lysophospholipid acyltransferase 11) の機能減弱型一塩基多型は、ヨーロッパの肥満患者の実に 6 割が有すると報告されており、世界的な注目を浴びている (*Gastroenterol* 2016,150:1219-30.e6.)

LPLAT11 は、申請者のグループが膜リン脂質の 1 つであるホスファチジルイノシトール (PI) にアラキドン酸を導入する酵素として同定した分子である (*Mol Biol Cell* 2008, 19:1174-84)。細胞内に存在する PI のほとんどはアラキドン酸を有するが、本酵素を欠損させると、アラキドン酸含有 PI が激減し、オレイン酸など二重結合が少ない脂肪酸が結合した PI に置き替わる。最近、肝臓特異的 LPLAT11 欠損マウスを作成したところ、通常飼育条件下で脂肪肝を自然発症すること、高脂肪食下では炎症や線維化が亢進していることを見出した。さらに肝培養細胞で脂肪肝発症のメカニズムを解析したところ、LPLAT11 を欠損した肝細胞では PI の合成と分解が亢進しており、PI の分解によって生じたジアシルグリセロールがトリグリセリドへと変換され、脂肪肝を引き起こしていることが示唆された (*Gut* 2020, 70:180)。PI の分解には極性頭部を加水分解するホスホリパーゼ C (PLC) 活性が作用していることが示唆されたが、一般的な PLC 分子の中に本活性に関わるものはなく、未同定の PLC が関与すると考えられた。この PLC の実体が明らかになれば、NAFLD の有効な治療標的になることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が独自に開発した細胞レベルでの PI 分解アッセイを駆使し、NAFLD に関与する新規 PLC 分子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

Huh-7 細胞もしくは、LPLAT11 欠損 Huh-7 細胞に対して、 $[^{14}\text{C}]$ グリセロールもしくはグリセロール $d8$ を添加し、12 時間培養後、標識グリセロール不含培地に変え、経時的にサンプリングをおこなった。標識 PI の検出は、細胞から総脂質を抽出後、薄層クロマトグラフィー/オートラジオグラフィーもしくは LC-MS によりおこなった。PLC 候補遺伝子のノックダウンは候補遺伝子に対する siRNA を細胞にトランスフェクションすることによりおこなった。ノックダウンの確認は定量 PCR によりおこなった。

4. 研究成果

LPLAT11 を欠損した Huh-7 細胞は、LPLAT11 欠損マウス肝臓と同様にアラキドン酸含有 PI の減少とオレイン酸含有 PI の増加、中性脂質の蓄積がみられる。この細胞に $[^{14}\text{C}]$ グリセロールを添加し、 $[^{14}\text{C}]$ ラベルされた PI の分解を経時的に調べると、LPLAT11 欠損細胞では野生型に比べて PI の分解が顕著に亢進する。このことから、①LPLAT11 欠損細胞では PI の分子種特異性のない PI-PLC の発現が誘導されている、もしくは②PI 分子種特異性のある PI-PLC が LPLAT11 の欠損に関わらず発現している可能性が考えられた。そこで、分解される PI に分子種特異性があるか調べるために、重水素グリセロールラベルにより PI を標識し、LC-MS で検出することにより、各 PI 分子種の分解を調べた。 $d8$ グリセロールの添加条件、LC 条件、MRM 条件を検討した結果、48 時間の $d8$ グリセロールラベルで 10-15% の PI がラベルされ、逆相カラムを用いた LC-MS/MS により個々の重水素標識 PI を検出・定量することに成功した。この分析系を用いて、PI

の分解を分子種レベルで調べた結果、18:0/20:4 PI などアラキドン酸を含む PI 分子種は半減期が 16 時間程度であったのに対し、16:0/18:1 PI などのアラキドン酸を含まない PI 分子種は半減期が 1 時間程度と短かった。このことから、PI の分解には分子種特異性があることがわかった。

次に、LPLAT11 欠損 Huh-7 細胞における ^{14}C ラベル PI の分解亢進の系を利用して、RNAi スクリーニングをおこなった。RNAi する対象分子として、Huh-7 で発現が確認された PLC ファミリー (PLCb1,PLCb2, PLCb3, PLCb4, PLCd1, PLCd3, PLCd4, PLCg1, PLCg2, PLCe1, PLCh1, PLCh2, PLCz) PI-PLC 活性が報告されている PLCXD ファミリー (PLCXD1~3) および SMSr、および PI サイクルに関わる Nir2, Nir3 を選定した。その結果、どの遺伝子の発現抑制によっても LPLAT11 欠損細胞での ^{14}C PI の分解が抑制されなかった。そこで、各種阻害剤を添加し、PI 分解を抑制する化合物をスクリーニングした。その結果、PLC の一般的な阻害剤である U73122 やリソソームの酸性化を抑制するクロロキンでは、LPLAT11 欠損細胞における PI 分解の亢進を抑制できなかった。一方で、脂質のホスファターゼを抑制する阻害剤の 1 つが LPLAT11 KO 細胞における PI 分解の亢進を抑制することを見出した。さらに、阻害剤が標的とする脂質ホスファターゼのノックダウンで、PI の分解が抑制される結果を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shibata Takeaki, Kawana Hiroki, Nishino Yuri, Ito Yoshiko, Sato Hiroyasu, Onishi Hirofumi, Kano Kuniyuki, Inoue Asuka, Taketomi Yoshitaka, Murakami Makoto, Kofuji Satoshi, Nishina Hiroshi, Miyazawa Atsuo, Kono Nozomu, Aoki Junken	4. 巻 12
2. 論文標題 Abnormal male reproduction and embryonic development induced by downregulation of a phospholipid fatty acid-introducing enzyme Lpgat1 in zebrafish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-11002-4	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 Shimanaka Yuta, Matsumoto Keiko, Tanaka Yuki, Ishino Yuki, Ni Shenwei, Guan Jun-Lin, Arai Hiroyuki, Kono Nozomu	4. 巻 5
2. 論文標題 Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry enables simultaneous measurement of all phosphoinositide regioisomers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42004-022-00676-6	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 Moriyama Hidenori, Endo Jin, Kataoka Masaharu, Shimanaka Yuta, Kono Nozomu, 他13人, Arai Hiroyuki, Sano Motoaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Omega-3 fatty acid epoxides produced by PAF-AH2 in mast cells regulate pulmonary vascular remodeling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-30621-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 Thomas Ffion B, Omnis Deike J, Bader Jakob M, Chung Gary HC, Kono Nozomu, Stefan Christopher J	4. 巻 5
2. 論文標題 Tricalbin proteins regulate plasma membrane phospholipid homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202201430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.202201430	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 Zhang Zhikuan, Nomura Norimichi, Muramoto Yukiko, Ekimoto Toru, Uemura Tomoko, Liu Kehong, Yui Moeko, Kono Nozomu, Aoki Junken, Ikeguchi Mitsunori, Noda Takeshi, Iwata So, Ohto Umeharu, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-32019-3	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 Kawana Hiroki, Ozawa Masaya, Shibata Takeaki, Onishi Hirofumi, Sato Yukitaka, Kano Kuniyuki, Shindou Hideo, Shimizu Takao, Kono Nozomu, Aoki Junken	4. 巻 63
2. 論文標題 Identification and characterization of LPLAT7 as an sn-1-specific lysophospholipid acyltransferase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 100271 ~ 100271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jlr.2022.100271	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 Petkevicius Kasparas, Palmgren Henrik, 他19人, Kono Nozomu, Aoki Junken, Hess Sonja, Sienski Grzegorz, Pilon Marc, Bohooly-Y Mohammad, Maresca Marcello, Peng Xiao-Rong	4. 巻 13
2. 論文標題 TLCD1 and TLCD2 regulate cellular phosphatidylethanolamine composition and promote the progression of non-alcoholic steatohepatitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-33735-6	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 該当する
1. 著者名 Miyazaki Takuro, Taketomi Yoshitaka, Higashi Takayoshi, Ohtaki Hirokazu, Takaki Takashi, Ohnishi Koji, Hosonuma Masahiro, Kono Nozomu, Akasu Risako, Haraguchi Shogo, Kim-Kaneyama Joo-Ri, Otsu Kinya, Arai Hiroyuki, Murakami Makoto, Miyazaki Akira	4. 巻 43
2. 論文標題 Hypercholesterolemic Dysregulation of Calpain in Lymphatic Endothelial Cells Interferes With Regulatory T-Cell Stability and Trafficking	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 e66-e82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.122.317781	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 河野 望	4. 巻 59
2. 論文標題 酸化リン脂質から産生されるエポキシ化 3脂肪酸の生理機能	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 24 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.59.1_24	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 Valentine William J., Yanagida Keisuke, Kawana Hiroki, Kono Nozomu, Noda Nobuo N., Aoki Junken, Shindou Hideo	4. 巻 298
2. 論文標題 Update and nomenclature proposal for mammalian lysophospholipid acyltransferases, which create membrane phospholipid diversity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101470 ~ 101470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101470	査読の有無 無
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 Arai Hiroyuki, Kono Nozomu	4. 巻 176
2. 論文標題 -Tocopherol transfer protein (-TTP)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 162 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2021.09.021	査読の有無 無
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24件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 岩田 紘、山岸 洸太、張 琇ウェン、新井 洋由、河野 望、青木 淳賢
2. 発表標題 膜脂質異常によるIre1活性化におけるVps34の機能解明
3. 学会等名 第21回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフィォラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩田 紘歩、木村 公鴻、嶋中 雄太、河野 望、青木 淳賢
2. 発表標題 マスト細胞の活性化に関するエポキシ化 3脂肪酸の作用標的の探索
3. 学会等名 第21回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフィォラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八木優太郎、川名裕己、可野邦行、河野望、田辺弘明、岩部-岡田美紀、 岩部真人、山内敏正、門脇孝、横山茂之、青木淳賢
2. 発表標題 アディポネクチン受容体はホスホリパーゼA2活性により リン脂質の不飽和化に寄与する
3. 学会等名 第21回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフィォラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石野雄己、河野望、桑山尚大、川口大地、岸雄介、後藤由季子、新井洋由、青木淳賢
2. 発表標題 胎児期大脳皮質形成過程におけるアラキドン酸含有ホスファチジルイノシトールの機能の解明
3. 学会等名 第64日本脂質生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩間大河、可野邦行、川名裕己、河野望、長田克之、橋立智美、進藤英雄、青木淳賢
2. 発表標題 MSイメージングを用いた組織切片上での脂肪酸リモデリング活性の可視化
3. 学会等名 第64日本脂質生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河野 望
2. 発表標題 酸化リン脂質を介する生理活性脂肪酸の産生機構とその意義
3. 学会等名 第64日本脂質生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川名裕己、小澤雅也、河野望、青木淳賢
2. 発表標題 LPLAT7/LPGAT1によるER形態制御機構の解析
3. 学会等名 第64日本脂質生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河野 望
2. 発表標題 生体膜脂質によるIRE 1 活性化機構
3. 学会等名 第15回小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倪申ウェイ、葛西峻輔、赤木聡介、青木淳賢、新井洋由、河野望
2. 発表標題 飽和脂肪酸によって小胞体ストレス応答が起きる分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第15回小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩田 紬、石野 雄己、倪申 ウェイ、河野 望、青木 淳賢
2. 発表標題 超臨界流体クロマトグラフィー質量分析を用いた重水素標識ホスホイノシチドの分析
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河野 望
2. 発表標題 飽和型カルジオリピンの精子形成における機能
3. 学会等名 第95回日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河野 望
2. 発表標題 非ミトコンドリア型カルジオリピンの精子形成における機能
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩田 紬、山岸 洸太、張 琇ウェン、八代田英樹、村田茂穂、新井 洋由、河野 望、青木 淳賢
2. 発表標題 イノシトール欠乏によるIre1活性化におけるVps34の機能解明
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 望月大、小川 笑満里、赤木 聡介、新井 洋由、河野 望、青木淳賢
2. 発表標題 精巢非ミトコンドリア型カルジオリピンの合成に関わる分子の探索
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 望月大、赤木 聡介、嶋中 雄太、新井 洋由、河野 望、青木淳賢
2. 発表標題 非ミトコンドリア型カルジオリピンの精子形成における役割
3. 学会等名 フォーラム2022 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩間 大河、可野 邦行、川名 裕己、河野 望、長田 克之、橋立 智美、進藤 英雄、青木 淳賢
2. 発表標題 MSイメージングを用いたリン脂質生合成活性の可視化
3. 学会等名 第47回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩間 大河、可野 邦行、川名 裕己、河野 望、長田 克之、橋立 智美、進藤 英雄、青木 淳賢
2. 発表標題 組織切片上でのde novo リン脂質生合成活性の可視化
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川名裕己、大西浩文、八木優太郎、可野邦行、河野望、田辺弘明、岩部-岡田美紀、岩部真人、山内敏正、門脇孝、横山茂之、青木淳賢
2. 発表標題 PAQRファミリー分子は新規リン脂質代謝酵素群である
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倪 申ウェイ、葛西峻輔、赤木 聡介、新井洋由、河野 望、青木淳賢
2. 発表標題 オートファジー関連タンパク質による飽和脂肪酸誘導性のIRE1活性化機構の解明
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倪 申ウェイ、葛西峻輔、赤木 聡介、新井洋由、河野 望、青木淳賢
2. 発表標題 オートファジー関連タンパク質による飽和脂肪酸誘導性のIRE1活性化機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石野雄己、河野望、桑山尚大、川口大地、岸雄介、後藤由季子、新井洋由、青木淳賢
2. 発表標題 胎児期大脳皮質形成過程におけるアラキドン酸含有ホスファチジルイノシトールの機能の解明
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河野 望
2. 発表標題 ホスファチジルイノシトール脂肪酸鎖異常による脂肪肝発症機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nozomu Kono
2. 発表標題 The role of phosphatidylinositol acyl chains in nonalcoholic fatty liver disease
3. 学会等名 The19th International Symposium on Atherosclerosis（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石野 雄己、河野 望、桑山 尚大、川口 大地、岸 雄介、後藤 由季子、新井 洋由、青木 淳賢
2. 発表標題 胎児期大脳皮質形成過程におけるアラキドン酸含有ホスファチジルイノシトールの役割
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021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
---------	---------