

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月16日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590354

研究課題名（和文） 脂肪肝改善に関する核内受容体の研究：新規病態モデルの確立と治療  
応用への展開

研究課題名（英文） Study of the nuclear receptors involved in fatty livers; establishment  
of a new pathological model and development of therapeutic application.

### 研究代表者

井上 裕介（INOUE YUSUKE）

群馬大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：90304302

研究成果の概要（和文）：肝臓 HNF4 $\alpha$ 欠損マウス(KO マウス)に PPAR $\alpha$ を欠損させると脂肪肝が改善する。脂肪肝発症機構の解明のために、PPAR $\alpha$ の DNA 結合能を解析した結果、KO マウスでの DNA 結合活性が低下していた。KO マウスで PPAR $\gamma$ 1 と PGC1 $\alpha$ の発現増加と PPAR $\alpha$ 標的遺伝子の転写活性化が確認された。従って、KO マウスでは PPAR $\gamma$ や PGC1 $\alpha$ 、PPAR $\alpha$ / $\gamma$ 1 の内在性リガンドにより PPAR $\alpha$ 標的遺伝子が転写活性化され、脂肪肝が誘導されると推測された。

研究成果の概要（英文）：Deletion of hepatic PPAR $\alpha$  in liver-specific HNF4 $\alpha$ -null mice (KO mice) improved fatty livers. To investigate the pathogenic mechanism of fatty livers, DNA binding activity of hepatic PPAR $\alpha$  was analysed. As a result, DNA binding activity of hepatic PPAR $\alpha$  was decreased in KO mice. Expression of hepatic PPAR $\gamma$ 1 and PGC1 $\alpha$  was also increased and transactivation of hepatic PPAR $\alpha$  target genes was observed in KO mice. These results indicate that hepatic PPAR $\gamma$ 1, PGC1 $\alpha$ , and unidentified ligands for PPAR $\alpha$ / $\gamma$ 1 could transactivate the PPAR $\alpha$  target genes and induce fatty livers in KO mice.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：病態生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：脂肪肝、核内受容体、HNF4 $\alpha$ 、PPAR $\alpha$

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓の遺伝子発現ネットワークの破綻は代謝疾患を引き起こす。このネットワークは上流の転写因子群を起点として、下流の標的遺伝子の発現を誘導する。HNF4 $\alpha$ は、このネットワーク上流で機能する核内受容体であり、多くの肝臓特異的遺伝子の発現を制御する。HNF4 $\alpha$ の機能解明のために肝臓特異的HNF4 $\alpha$ 欠損マウス (H4-KO マウス) を解析したところ、様々な表現型を示し、特に顕著な脂肪肝を示すことが分かった。

脂肪肝発症機構を解明するために、H4-KO マウス肝臓で発現減少する核内受容体 PPAR $\alpha$ に着目した。PPAR $\alpha$ は脂肪酸をリガンドとして活性化され、脂肪酸酸化に関与する遺伝子の発現を活性化する。しかし、H4-KO マウスでは多くの PPAR $\alpha$ 標的遺伝子の発現が上昇していた。このため、H4-KO マウスと PPAR $\alpha$ 欠損マウスを交配してダブル欠損マウスを作製したところ、脂肪肝の顕著な改善が認められた。この結果は、PPAR $\alpha$ の活性化が H4-KO マウスにおける脂肪肝発症の一因であることを示唆している。H4-KO マウスは血糖値が低いため、グルコースから十分なエネルギー産生ができない。そこで、グルコースに代わり脂肪酸からエネルギーを産生していると予想した。このため H4-KO 肝臓では脂肪酸酸化遺伝子の発現亢進のために PPAR $\alpha$ の常時活性化が起きる。さらに、肝臓の脂肪酸蓄積により PPAR $\alpha$ の活性化が増幅され、最終的に様々な代謝異常を示すのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、将来的な脂肪肝治療への展開を目標に、以下の課題達成を目指した。

- (1) HP/D-KOマウスの表現型を解析し、H4-KO マウスとの共通点と相違点を明らかにする。
- (2) HNF4 $\alpha$ とPPAR $\alpha$ による脂肪酸酸化遺伝子群の発現制御機構を明らかにする。
- (3) PPAR $\alpha$ タンパク質を発現・精製し、PPAR $\alpha$ の機能を阻害する核酸アプタマーを取得する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ダブル欠損マウスの機能解析

H4-KO マウス ((HNF4 $\alpha$ <sup>flox/flox</sup>, Cre+) とコ

ントロールマウス (HNF4 $\alpha$ <sup>flox/flox</sup>, Cre-), ダブル欠損マウスと PPAR $\alpha$ 欠損マウスの4種類のマウス血清を用いて中性脂肪、コレステロールなどの生化学検査を行った。また、ダブル欠損マウスの肝臓から RNA を用いてノーザンブロット、加えて RNA を逆転写後、リアルタイム PCR により PPAR $\alpha$ 標的遺伝子の発現を定量した。

#### (2) H4-KO マウスの PPAR $\alpha$ 活性化機構の解析

##### ① PPAR $\alpha$ タンパク質の発現

KO マウス肝臓における PPAR $\alpha$ タンパク質の発現をウエスタンブロットで検証した。

##### ② PPAR $\alpha$ による DNA 結合能の解析

プロモーター中に PPAR $\alpha$ 結合配列 (PPRE) をもつ遺伝子 {ペルオキシソーム $\beta$ 酸化酵素 (BIEN)、ミトコンドリア HMG-CoA 合成酵素 (HMGCS2)、小胞体 $\omega$ 酸化酵素 (CYP4A14)} それぞれのビオチン標識した PPRE をプローブとして、H4-KO マウスおよびコントロールマウス肝臓の核タンパク質を使用してゲルシフトアッセイを行った。また、H4-KO マウス肝臓におけるクロマチンレベルでの PPAR $\alpha$ の PPRE 結合能を調べるために、H4-KO マウスおよびコントロールマウス肝臓を用いてクロマチン免疫沈降を行った。

##### ③ PPAR $\alpha$ による転写活性化能の解析

BIEN, HMGCS2, CYP4A14 の PPRE が PPAR $\alpha$ による転写活性化に関与しているかどうかを解析するために、それぞれの遺伝子の PPRE を含むプロモーター領域をクローニングし、HEK293 細胞に導入後、ルシフェラーゼアッセイを行った。

##### ④ PPAR $\alpha$ 以外の活性化因子の探索

PPAR $\alpha$ 以外以外に PPRE に結合し、活性化する因子として PPAR $\beta$ , PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2, PGC1 $\alpha$

があるため、H4-KO マウスとコントロールマウス肝臓から RNA を抽出・逆転写後、リアルタイム PCR でこれらの遺伝子の発現定量を行った。

### (3) ヒト PPAR $\alpha$ タンパク質の発現・精製

HepG2 細胞から抽出した RNA を用いて RT-PCR により全長のヒト PPAR $\alpha$  cDNA を増幅し、His タグをコードする pET ベクターにクローニングした。大腸菌に形質転換後、融合タンパク質を発現させ、His タグタンパク質精製用レジンにより融合タンパク質を精製した。

## 4. 研究成果

### (1) ダブル欠損マウスの機能解析

H4-KO マウスの血中コレステロール値、トリグリセリド値、遊離脂肪酸、リン脂質はコントロールマウスと比較してそれぞれ約 33%、29%、54%、40%に低下した。ダブル欠損マウスは PPAR $\alpha$ 欠損マウスと比較してそれぞれ約 32%、38%、43%、39%に低下した。この結果から、H4-KO マウスとダブル欠損マウス間での脂質値低下の割合は同様であることが分かった。しかし、PPAR $\alpha$ 欠損マウスはコントロールマウスと比較してこれらの脂質値が約 1.3~1.5 倍高かったため、ダブル KO マウスでの血中脂質値は H4-KO と比較して増加していることが分かった。

また、ノーザンブロットにより、H4-KO マウス肝臓において、脂肪酸酸化に関与する遺伝子群 (ACOX, BIEN, thiolase, SCAD, MCAD, CYP4A14) の発現上昇が認められ、ダブル KO マウスにおいてはそれらの発現の抑制が認められた。また、H4-KO マウス肝臓におけるこれらの遺伝子の発現をリアルタイム PCR により解析した結果、PPAR $\alpha$ は約 60%の低下、MCAD と HMGCS2 は約 3 倍、BIEN は約 8 倍、CYP4A14 は約 15 倍発現上昇することが確認された。

### (2) H4-KO マウスの PPAR $\alpha$ 活性化機構の解析

#### ① PPAR $\alpha$ タンパク質の発現

ウエスタンブロットにより、PPAR $\alpha$ タンパク質の発現をコントロールマウスと比較したところ、H4-KO マウスでは mRNA レベルと同様に発現の低下が認められた。

#### ② PPAR $\alpha$ による DNA 結合能の解析

ゲルシフトアッセイにより、BIEN、HMGCS2、CYP4A14 の PPPE への PPAR $\alpha$ の DNA 結合能を解析したところ、H4-KO マウス肝臓の PPAR $\alpha$ は DNA 結合能が大きく低下していた。さらにクロマチンレベルでの PPAR $\alpha$ の DNA 結合能の解析のためにクロマチン免疫沈降を行った結果、H4-KO マウス肝臓の PPAR $\alpha$ の DNA 結合能は変化がない、もしくは低下していることが分かった。

#### ③ PPAR $\alpha$ による転写活性化能の解析

上記の遺伝子の PPPE が転写活性化に必要な領域かどうかを検証するために、HMGCS2 と BIEN のプロモーターをクローニングし、HEK293 細胞に導入後、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、これらの遺伝子は PPPE および PPAR $\alpha$ 依存的に転写活性化されることが分かったため、DNA 結合能の解析に用いた PPPE は機能的な転写活性化領域であることが確認された。

#### ④ PPAR $\alpha$ 以外の活性化因子の探索

上記の実験から、KO マウス肝臓において PPAR $\alpha$ 以外の因子による PPAR $\alpha$ 標的遺伝子の転写活性化が考えられたため、PPAR $\beta$ 、PPAR $\gamma$ 1、PPAR $\gamma$ 2、PGC1 $\alpha$ の発現をリアルタイム PCR により比較した。その結果、PPAR $\beta$ の発現は変化がなく、PPAR $\gamma$ 2 の発現は減少した。一方、KO マウス肝臓において PPAR $\gamma$ 1 の発現は約 3 倍、PGC1 $\alpha$ の発現は約 4 倍発現上昇していることが分かった。さらに、PPAR $\gamma$ 1 と PGC1 $\alpha$ は PPPE 配列依存的に HMGCS2 と BIEN の転写を活性化すること、リガンド存在下で転写活

性化がさらに誘導されることが明らかになった。

### (3) ヒト PPAR $\alpha$ タンパク質の発現・精製

ヒト PPAR $\alpha$  cDNA を増幅後、pET26b ベクターにクローニングした。その後、大腸菌で His-PPAR $\alpha$  融合タンパクを発現させ、His-アフィニティークロマトグラフィーにより、PPAR $\alpha$ タンパク質を粗精製することができた。現在は、PPAR $\alpha$ に対するアダプターを取得中である。

以上の結果より、H4-KO マウス肝臓における PPAR $\alpha$  の DNA 結合能の低下が明らかになった。このため、PPAR $\alpha$  標的遺伝子群の転写活性化には PPAR $\alpha$  の直接的な関与の可能性は低いと予想されるが、PPAR $\alpha$  の内在性リガンドの増加による PPAR $\alpha$  標的遺伝子の転写活性化の可能性は排除できない。また、PPAR $\gamma$  や PGC1 $\alpha$  の発現上昇による PPAR $\alpha$  標的遺伝子群の転写活性化の可能性も示唆された。今後は、KO マウス肝臓で増加するリガンド (脂肪酸) を探索し、PPAR ファミリーや PGC1 $\alpha$  などのコアクティベーターなどによる PPAR $\alpha$  標的遺伝子群の発現経路を解析することにより、脂肪肝発症機構の解明を目指す。また、PPAR $\alpha$  タンパク質に対する核酸アダプターを取得し、脂肪肝の治療薬開発も目指していく。

## 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 6 件)

① Yamamoto K, Murata H, Putranto EW, Kataoka K, Motoyama A, Hibino T, Inoue Y, Sakaguchi M, and Huh NH. DOCK7 is a critical regulator of the RAGE-Cdc42 signaling axis that induces formation of dendritic pseudopodia in human cancer cells. *Oncol Rep.* 29, 1073-1079, 2013. DOI:10.3892/or.2012.2191. 査読有

② Kogure H, Hikawa Y, Hagihara M, Tochio N, Koshiba S, Inoue Y, Güntert P, Kigawa T, Yokoyama S, and Nameki N. Solution

structure and siRNA-mediated knockdown analysis of the mitochondrial disease-related protein C12orf65. *Proteins.* 80, 2629-2642, 2012. DOI: 10.1002/prot.24152. 査読有

③ Safdar H, Cheung KL, Vos HL, Gonzalez FJ, Reitsma PH, Inoue Y, and van Vlijmen BJ. Modulation of mouse coagulation gene transcription following acute in vivo delivery of synthetic small interfering RNAs targeting HNF4 $\alpha$  and C/EBP $\alpha$ . *PLoS One*, 7, e38104, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0038104. 査読有

④ Masud MM, Masuda T, Inoue Y, Kawahara M, Sawai H, and Ozaki H. Synthesis of modified siRNA bearing C-5 polyamine-substituted pyrimidine nucleoside in their 3'-overhang regions and its RNAi activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 715-717, 2011. DOI:10.1016/j.bmcl.2010.11.125. 査読有

⑤ Safdar H, Inoue Y, van Puijvelde GH, Reitsma PH, and van Vlijmen BJ. The role of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  in regulating mouse hepatic anticoagulation and fibrinolysis gene transcript levels. *J. Thromb. Haemost.* 8, 2839-2841, 2010. DOI:10.1111/j.1538-7836.2010.04080.x. 査読有

⑥ Handa Y, Hikawa Y, Tochio N, Kogure H, Inoue M, Koshiba M, Güntert P, Inoue Y, Kigawa T, Yokoyama S, and Nameki N. Solution structure of the catalytic domain of the mitochondrial protein ICT1 that is essential for cell vitality. *J. Mol. Biol.* 404, 260-273, 2010. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.09.033. 査読有

[学会発表] (計 20 件)

① Saito C, Gonzalez FJ, Inoue Y. Activation of hepatic PPAR $\alpha$  cascade in liver-specific HNF4 $\alpha$ -deficient mice. 第 35 回日本分子生物学会、2012.12.12、マリンメッセ福岡 (福岡県)

② Matsuo S, Fujimura T, Mizui Y, Gonzalez FJ, Inoue Y. Transcriptional regulation of hepatic transferrin receptor 2. 第 35 回日本分子生物学会、2012.12.12、マリンメッセ福岡 (福岡県)

③ Yokota S, Sakamoto N, Gonzalez FJ, Inoue Y. Regulation of transcriptional control of

complement C8 $\alpha$  gene by HNF4 $\alpha$ . 第 35 回日本分子生物学会、2012. 12. 12、マリンメッセ福岡 (福岡県)

④ Kannari M, Tsuchida Y, Saito C, Gonzalez FJ, Inoue Y. Analysis of transcriptional regulation of microRNA-194/192 by HNF4 $\alpha$ . 第 35 回日本分子生物学会、2012. 12. 12、マリンメッセ福岡 (福岡県)

⑤ Matsuta T, Kannari M, Gonzalez FJ, Inoue Y. Low blood glucose levels in liver-specific HNF4 $\alpha$ -null mice by decreased expression of hepatic glucagon receptor. 第 35 回日本分子生物学会、2012. 12. 12、マリンメッセ福岡 (福岡県)

⑥ 松尾峻介、藤村岳史、水井由美子、Frank J. Gonzalez、井上裕介、2 型トランスフェリン受容体遺伝子の転写活性化機構の解析、日本生化学会関東支部例会、2012. 6. 23、群馬大学昭和キャンパス (群馬県)

⑦ 松田強志、神成真名、Frank J. Gonzalez、井上裕介、肝臓特異的 HNF4 $\alpha$  欠損マウスの血糖値低下とグルカゴン受容体のプロモーター解析、平成 24 年度日本生化学会関東支部例会、2012. 6. 23、群馬大学昭和キャンパス (群馬県)

⑧ 横田聡美、坂本憲明、Frank J. Gonzalez、井上裕介、HNF4 $\alpha$  による補体遺伝子 C8 $\gamma$  の転写活性化機構の解析、平成 24 年度日本生化学会関東支部例会、2012. 6. 23、群馬大学昭和キャンパス (群馬県)

⑨ 齊藤千夏、Frank J. Gonzalez、井上裕介、肝臓特異的 HNF4 $\alpha$  欠損マウスにおける PPAR $\alpha$  の発現・機能解析、平成 24 年度日本生化学会関東支部例会、2012. 6. 23、群馬大学昭和キャンパス (群馬県)

⑩ 神成真名、土田雄一、齊藤千夏、Frank J. Gonzalez、井上裕介、肝臓 HNF4 $\alpha$  による miR-194/192 の発現制御機構の解析、平成 24 年度日本生化学会関東支部例会、2012. 6. 23、群馬大学昭和キャンパス (群馬県)

⑪ 小暮裕幸、樋川雄介、萩原護、井上裕介、行木信一、ミトコンドリアにおける ICT1 による翻訳停滞解消機構の解明、平成 24 年度日本生化学会関東支部例会、2012. 6. 23、群馬大学昭和キャンパス (群馬県)

⑫ 樋川雄介、小暮裕幸、井上裕介、行木信一、Transcriptional analysis of the gene

encoding the mitochondrial protein C12orf6. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011. 12. 15、パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑬ Kogure H, Handa Y, Hikawa Y, Inoue Y and Nameki N. Transcriptional Analysis of the Gene Encoding the Mitochondrial Protein ICT1、The 16th Annual Meeting of the RNA Society and The 13th Annual Meeting of the RNA Society of Japan、2011. 6. 16、京都国際会館 (京都府)

⑭ Tsuchida Y, Suzuki J, Nakamura H, Nakamura T, Gonzalez FJ, Inoue Y. Hepatic HNF4 $\alpha$  is required for microRNA expression. 第 33 回日本分子生物学会、2010. 12. 12、パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑮ 横田聡美、坂本憲明、Frank J. Gonzalez、井上裕介、HNF4 $\alpha$  を介した補体成分 C8 $\alpha$  の発現制御機構の解析、群馬大学ファイブバイオプロセス研究会、2010. 11. 24、桐生地域地場産業振興センター (群馬県)

⑯ 宮岡広樹、Frank J. Gonzalez、井上裕介、肝臓グルカゴン受容体のエピジェネティック制御、群馬大学ファイブバイオプロセス研究会、2010. 11. 24、桐生地域地場産業振興センター (群馬県)

⑰ 松尾峻介、藤村岳史、水井由美子、Frank J. Gonzalez、井上裕介、トランスフェリン受容体 2 の発現制御機構の解析、群馬大学ファイブバイオプロセス研究会、2010. 11. 24、桐生地域地場産業振興センター (群馬県)

⑱ 中村遥、Frank J. Gonzalez、井上裕介、肝臓特異的 HNF4 $\alpha$  欠損マウスにおけるプロテオーム解析、群馬大学ファイブバイオプロセス研究会、2010. 11. 24、桐生地域地場産業振興センター (群馬県)

⑲ 土田雄一、中村遥、中村宜広、Frank J. Gonzalez、井上裕介、肝臓 HNF4 $\alpha$  による miRNA の発現制御、群馬大学ファイブバイオプロセス研究会、2010. 11. 24、桐生地域地場産業振興センター (群馬県)

⑳ 鈴木淳子、入江亮太、Frank J. Gonzalez、井上裕介、肝臓特異的 HNF4 $\alpha$  欠損マウスにおける HNF4 $\alpha$  の発現解析、群馬大学ファイブバイオプロセス研究会、2010. 11. 24、桐生地域地場産業振興センター (群馬県)

〔図書〕(計1件)

井上裕介. 朝倉書店、ヒトにおける食物の消化・吸収・代謝と異物の代謝. 石原勝敏, 末光隆志 (総編集)、生物の事典、2010、pp.169-174

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

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

○取得状況 (計0件)

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

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井上 裕介 (INOUE YUSUKE)

群馬大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：90304302

### (2) 研究分担者

桑原 正靖 (KUWAHARA MASAYASU)

群馬大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：40334130

行木 信一 (NAMEKI NOBUKAZU)

群馬大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：80302959

### (3) 連携研究者