

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790351

研究課題名（和文） 転写因子 Nrf1 欠失による脂肪肝炎発症の分子機序の解明

研究課題名（英文） Molecular Mechanism of fatty liver in Nrf1 knockout mice

研究代表者

勝岡 史城 (KATSUOKA FUMIKI)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・准教授

研究者番号：30447255

研究成果の概要（和文）：本研究は、Nrf1 肝臓特異的欠失マウスの表現形の解析を通して、Nrf1 の肝臓における機能解明を試みた。マイクロアレイによる遺伝子発現解析、クロマチン免疫沈降解析、CE-TOFMS システムを用いたメタボロームによる質量分析の結果、Nrf1 は、アミノ酸、脂質の異化反応に関わる遺伝子群を直接、あるいは間接的に制御しており、その破綻が Nrf1 欠失マウスの脂肪肝炎の発症に寄与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Through the analyses of Nrf1 liver-specific knockout mice, we examined the function of Nrf1 in the livers. Gene expression analysis using microarray, chromatin immunoprecipitation analysis, and metabolome analysis using CE-TOFMS revealed that Nrf1 directly and indirectly regulates the genes related to amino acid and lipid catabolism, suggesting that the dysregulation of these metabolic genes is associated with liver phenotypes of Nrf1 knockout mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：転写因子、脂質代謝、脂肪肝炎、Nrf1

## 1. 研究開始当初の背景

脂肪肝は、成人の3割以上が罹患する肝臓疾患である。中でも、飲酒歴がないにもかかわらず、糖尿病などの生活習慣病を背景に脂肪肝を発症し肝炎に至る非アルコール性脂肪肝炎（NASH）が増加している。我が国においても早急な対策が必要であるが、根本的な治療法は確立されておらず、NASH に対する治療薬の開発が急がれている。新規治療薬の開発では、対象となる疾患モデル動物の存在が必須である。しかし、これまで報告されてい

る NASH モデル動物については、実際の NASH の病態と解離が指摘されており、新たなモデル動物の確立が期待されている。本研究の申請者は、遺伝子の発現制御不全に基づく疾患モデルの研究に取り組んでおり、これまで、転写因子 Nrf1 の肝臓特異的な欠失マウスが、ヒト NASH に近い病態を示すことを明らかにしてきた。本マウスは、生後6週齢程度で脂肪肝を発症し、その後、繊維化を伴う肝炎を示す。しかし、病状進行の詳細な過程、病態発症の分子機序が不明であるため、本マウスの NASH 疾患モデルとしての確立

には更なる解析が必須である。肝臓における Nrf1 の標的遺伝子は、相同分子である Nrf2 と同様に抗酸化酵素・異物代謝酵素群であるとする報告がある。しかし、申請者は、Nrf1 は Nrf2 とは一部異なる標的遺伝子群を制御していると考えており、本マウスの NASH の発症の理解には、Nrf1 の肝臓における独自の標的遺伝子の同定が必須であると考えた。

## 2. 研究の目的

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の患者は、肥満などの生活習慣病を背景に増加している。しかし、根本的な治療法は確立されておらず、ヒトの疾患を反映した疾患モデルマウスも十分に確立されていない。生体防御関連遺伝子群の発現に寄与する Nrf1 の肝臓特異的欠失マウスは重篤な脂肪肝炎を示すが、その詳細は解析されていない。本申請研究は、Nrf1 の肝臓における標的遺伝子群を明らかにし、Nrf1 欠失マウスによる NASH の発症・進行の分子機序の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) Nrf1 肝臓特異的欠失マウスの病態進行の経時変化

Nrf1 肝臓特異的欠失マウスより、経時的に、血清、肝臓組織を採取した。生化学的解析として、血清中の逸脱肝酵素量 (ALT, AST) の経時的な測定により、肝機能の傷害を評価した。また肝臓中のトリグリセリド量、総コレステロール量を測定し、脂質パラメーターの推移を観察した。組織学的解析として、脂肪沈積をオイル染色で、繊維化をマッソントリクローム染色、免疫組織科学染色で解析した。遺伝子発現解析として、Nrf1 欠失により影響を受ける遺伝子の発現を網羅的に定量する目的で、各ステージより抽出した RNA を用いたマイクロアレイ解析を実施した。また、代謝産物の量的変化を網羅的に解析するため、キャピラリー電気泳動 — 飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) を用いたメタボローム解析を実施した。

(2) ChIP シークエンス解析による肝臓における Nrf1 の標的遺伝子の同定  
肝臓における Nrf1 の標的遺伝子を同定する

ため、Nrf1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) シークエンス解析を実施した。使用したマウス肝臓細胞由来の Hepa1 細胞は、Nrf1 に対する siRNA によるノックダウン解析で Nrf1 が十分に機能的であるか予め検証した。また、Nrf1 と同じファミリーに属する Nrf2、ならびに Nrf1 の機能に必須のパートナーである小 Maf 群因子に対する ChIP シークエンス解析も実施した。これらの結果を比較検討することで、肝臓細胞のゲノム上の Nrf1 特異的な結合部位の解明を試みた。

## 4. 研究成果

(1) Nrf1 肝臓特異的欠失マウスの病態進行を、分子生物学的、組織学的に解析した。その結果、Nrf1 肝臓特異的欠失マウスでは、遺伝子の欠損が始まる 4 週齢前後から ALT 等の肝酵素の逸脱、脂質染色による脂質の蓄積が観察された。従って、Nrf1 遺伝子の欠損後、速やかに脂肪蓄積等の病態が進行することが明らかとなった (図 1)。

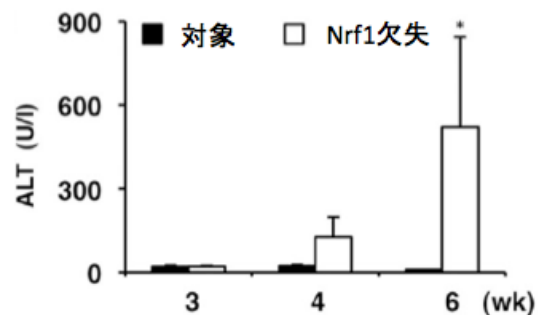


図1 血清中ALTの経時変化

標的遺伝子の解析では、5 週齢のマウス肝臓由来の RNA を用いたマイクロアレイ解析を実施し、パスウェイ解析を実施した。これまでに Nrf1 の標的遺伝子として報告されているタンパク質分解酵素複合体であるプロテ

p-value	Name of Event
1.52E-18	Metabolism of amino acids and derivatives (アミノ酸代謝)
1.50E-07	Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins. (Oxidative phosphorylation)
2.57E-06	Metabolism of lipids and lipoproteins (脂質代謝)
2.69E-06	Proteasome cleavage of substrate (タンパク質分解酵素複合体)
2.61E-02	Pyruvate metabolism and TCA cycle

図2 Nrf1欠失によって減少する遺伝子群 (Reactomeパスウェイ解析の結果)

アソームサブユニット遺伝子の発現減少の他、脂質代謝、アミノ酸代謝関連遺伝子の減少、ミトコンドリア呼吸鎖遺伝子の発現減少、細胞増殖関連遺伝子の増加を認めた (図 2)。一部の代謝関連遺伝子遺伝子 (Acox1, Hadh, Akr1d1, Hmgcs2, Fads1: 遺伝子の略称については Mouse Genome Informatics: MGI を参照) の発現変化については、定量的 RT-PCR によっても確認した。興味深いことに、このような遺伝子発現の変化は、Nrf2 欠失マウスや Nrf2 が恒常的に活性化されている Keap1 遺伝子発現低下マウスの肝臓においては観察されなかったことから、Nrf1 が Nrf2 とは異なる遺伝子群を制御していることが強く示唆された。

また、このような代謝異常と関連する代謝物の変化を CE-TOFMS システムで解析し、本マウスの病態が、異化代謝系の異常と密接に関連するか検討を行った。その結果、アミノ酸の量の変化、ならびに、TCA サイクルの代謝産物 (フマル酸、イソクエン酸等) の変化を捉えることができた (図 3)。これら代謝物の変化は、マイクロアレイ解析で捉えた遺伝子群の発現変化と矛盾しないものであり、Nrf1 が異化反応の促進に寄与していることが示唆された。

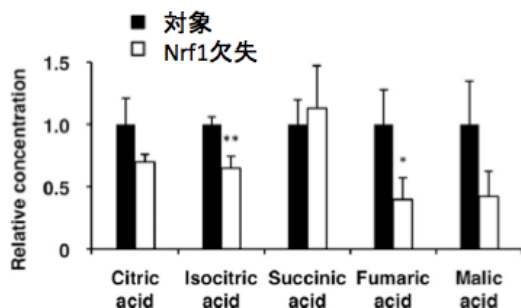


図3 Nrf1欠失マウス肝臓における TCA サイクル代謝産物の変化

転写共役因子として機能することが知られている Lipin1 と PGC-1b については、遺伝子制御領域に Nrf1-Maf 二量体の結合配列を見いだした。レポーター遺伝子解析、ゲルシフト解析、ChIP-qPCR 解析の結果は、Nrf1-Maf がこれら制御領域に結合し、これら遺伝子の転写活性化に寄与することを示し、Nrf1 の直接の標的遺伝子であること強く示唆した。これら遺伝子が Nrf2 によっても制御されている可能性について検証を行ったが、これら遺伝子制御領域への Nrf2 の有意な結合は、ChIP-qPCR 解析では観察されなかった。従っ

て、Nrf1 は Nrf2 とは異なる代謝関連遺伝子を制御することで、肝臓において独自の機能を発揮していることが強く示唆された。

(2) Nrf1 と小 Maf 群因子の ChIP シークエンス解析を実施し、標的遺伝子のさらなる探索を実施したが、Nrf1 に対する抗体の特異性が低く、精度の高いデータは得られなかった。一方、Nrf1 と同じ CNC ファミリーに属する Nrf2 と小 Maf 群因子の結合部位については、精度の高い結果が得られた。その結果、これまで解析では、CNC-小 Maf 因子の結合配列 (GACnnnGC) の nnn の配列については多様性を許すと認識されていたが、今回の結果から、nnn の部分は多くの場合 TCA とであり、CNC-小 Maf 因子が強い親和性で結合する配列であることが明らかとなった (図 4)。また、これらの配列の近傍に存在する遺伝子の解析から、Nrf2-Maf の幅広代謝関連遺伝子に対する貢献を示すことができた。



図4 ChIPシークエンス解析が示す Nrf2-小Maf因子の結合配列の多様性

以上の結果から、Nrf1 は肝臓において、脂質代謝やアミノ酸代謝等の異化反応の促進に寄与していることが示された。Nrf1 と Nrf2 は、機能的に重複していると報告されているが、これら異化反応促進に対する寄与は Nrf1 独自の機能であると強く示唆された。また、Nrf1 と Nrf2 は、ともに共通の祖先より進化した分子であるが、分子進化の過程で、このような独自の機能を獲得していったと考えられる。また、この異化反応の促進という機能の破綻が、肝臓における病態発症に大きく寄与していると考えられる。異化反応の促進は、飢餓応答等において重要な反応であるが、Nrf1 がこれら応答反応において、重要な制御因子として重要な役割を果たしていると考えられた。Nrf1 の活性を調節するシグナルの解明、化合物を同定することは、将来的には、脂肪肝の治療等につながる可能性があると考えている。

## 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 3 件)

- (1) Hirotsu Y, Katsuoka F, Funayama R, Nagashima T, Nishida Y, Nakayama K, Engel JD, Yamamoto M. Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic Acids Research*. 査読有 40, 10228-10239 (2012) doi:10.1093/nar/gks827
- (2) Hirotsu Y, Hataya N, Katsuoka F, Yamamoto M. NF-E2-Related Factor 1 (Nrf1) Serves as a Novel Regulator of Hepatic Lipid Metabolism through Regulation of the Lipin1 and PGC-1 $\beta$  Genes. *Molecular and Cellular Biology* 査読有 40, 2760-2770 (2012) doi:10.1128/ MCB.06706-11
- (3) Yamazaki H, Katsuoka F, Motohashi H, Engel JD, Yamamoto M. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking all three small Maf proteins. *Molecular and Cellular Biology*. 査読有 32, 808-816 (2012) doi:10.1128/ MCB.06543-11

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 弘津陽介, 勝岡史城, 舟山 亮, 長嶋 剛史, 西田有一郎, 中山 啓子, James Douglas Engel, 山本雅之. Nrf2-小 Maf 転写因子のゲノムワイド解析による遺伝子発現制御システムの解明. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11-12 日 (福岡)
- (2) Hirotsu Y, Katsuoka F, Funayama R, Nagashima T, Nishida Y, Nakayama K, Engel JD, Yamamoto M. Genome-wide analysis of antioxidant response element dependent gene regulation mediated by the Nrf2-MafG heterodimer. The 4th EMBO Meeting. 2012 年 9 月 22-25

日 (ニース・フランス)

- (3) 弘津 陽介, 勝岡 史城, 長嶋 剛史, 西田 有一郎, 舟山 亮, 中山 啓子, 山本 雅之. Nrf2-sMaf 2 量体の DNA 結合配列指向性と転写制御機構のゲノムワイド解析. 新学術領域研究「転写代謝システム」と転写研究会共催 若手ワークショップ. 2012 年 2 月 9 日 (湯河原)
- (4) 弘津陽介, 勝岡史城, 西田有一郎, 舟山亮, 中山啓子, 山本雅之. 生体防御システムを支える転写因子 Nrf2-MafG のゲノムワイド解析. 東北大学大学院医学系研究科 第 5 回リトリート 2012 年 1 月 21 日 (仙台)
- (5) 勝岡史城, 山岸博未, 山本雅之. CNC 因子と小 Maf 因子のヘテロ二量体による生体防御遺伝子の発現制御の意義. 第 84 回日本生化学会大会. 2011 年 9 月 21 日 (京都)

[その他] (計 1 件)

マイクロアレイ解析のデータは、NCBI Gene Expression Omnibus ( GEO : [www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) ) に、Accession No. GSE35124、GSE38350 で登録公開している。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

勝岡 史城 (KATSUOKA FUMIKI)  
東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・准教授  
研究者番号 : 30447255