

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460388

研究課題名(和文)新規NF- $\kappa$ B制御分子ヌクリングの脂肪性肝障害発症への作用機序の解明研究課題名(英文) Study of a novel NF- $\kappa$ B-regulating protein, Nucling, in the development of non-alcoholic fatty liver diseases

研究代表者

坂井 隆志 (SAKAI, TAKASHI)

徳島文理大学・その他の研究科・教授

研究者番号：80284321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、新規NF- $\kappa$ B制御分子ヌクリング(Nucling)のヒト生体内における生理機能と病態における意義の解明を目標として、ヌクリングKOマウスにおける非アルコール性脂肪性肝障害(NAFLD)を中心とした代謝異常症の発症病態を詳細に検討した。その結果、我々は高インスリン血症を来す一因となり得るインスリンの発現制御異常が、NAFLDの発症要因となることを見出した。これはインスリン発現制御異常とNAFLDがフィードバックループにより病態の増悪をもたらすことを示唆する。ヌクリングは無刺激状態におけるインスリン発現制御に重要であり、その制御不全が代謝異常を引き起こすと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD, is a cause of a fatty liver not due to excess alcohol use, which is related to insulin resistance and metabolic abnormalities. Here, we found that Nucling-KO mice develop hallmark features of NAFLD. We hypothesized that these metabolic changes might correlate with the accumulation of oxidative stress in liver, and malfunction of insulin regulation in pancreas. Nucling deficiency promoted the accumulation of reactive oxygen species in liver of mice. High fat diet revealed dysregulation of insulin expression in the Nucling-KO mice. We also found that glucose-induced insulin up-regulation requires NF- $\kappa$ B activation, which is dysregulated in Nucling-KO mice. These results suggest that defect of the Nucling-NF- $\kappa$ B system promoted the malfunction of insulin transcription resulted in development of metabolic disorders including NAFLD. In conclusion, we propose that NF- $\kappa$ B signal is important for the homeostatic regulation of insulin transcription.

研究分野：病態生理学

キーワード：NAFLD Nucling NF- $\kappa$ B metabolic syndrome insulin resistance

## 1. 研究開始当初の背景

マウスヌクリング遺伝子は全長 1411 アミノ酸をコードし、またその配列中にはアンキリンリピート、ロイシンジッパーモチーフ及び二つの t-SNARE コイルドコイルドメインといったタンパク質間相互作用に重要と思われる複数のモチーフが同時に存在する構造を有する。これまでの研究成果より、我々は本遺伝子のコードする蛋白分子が細胞障害性ストレス時に誘導される複数の細胞死 (アポトーシス) 誘導情報伝達経路を制御していることを示す知見を得ている。ヌクリングは種々の細胞外ストレスにより細胞内に発現が誘導され、アポトーシス誘導分子 Apaf-1 と分子間相互作用して、そのアポトーシス誘導時の核移行及び細胞内発現を制御することにより、Apaf-1/カスパーゼ 9 経路 (アポトゾーム経路) の活性化に関与している。さらに、Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)とも相互作用し、その核移行を制御することにより、NF- $\kappa$ B の標的である種々のアポトーシス関連遺伝子 (ガレクチン 3 等) の転写活性を制御している。また、抗アポトーシス分子ガレクチン 3 との相互作用により、アポトーシス抑制経路の制御にも関与が強く示唆されている。一方、ヌクリング自身がその標的である NF- $\kappa$ B の転写活性によって発現誘導され、アポトーシス誘導因子として働いた後にプロテアソーム及びカスパーゼ系により分解されることを我々は明らかにした。このことより、細胞は傷害性ストレスにさらされると最初は NF- $\kappa$ B の活性化により抵抗性を示すが、持続的ストレス下ではヌクリングの発現が誘導され、アポトーシスの方へ傾くというモデルが考えられた。実際にヌクリングの欠損は細胞障害性ストレスに対してアポトーシス障害を引き起こすことが個体レベルで種々、確認されている。例えば最近、リポ多糖内毒素 (LPS) 刺激によって通常引き起こされる敗血症性ショック反応がヌクリングノックアウト (KO) マウスで起こりにくくなっていることを見出した。LPS は主に細胞膜上の Toll 様受容体 (TLR4) に結合し、下流の NF- $\kappa$ B の活性化を誘導し、結果としてその下流の TNF $\alpha$ 、IL1 $\beta$ 、IL-6 などの急激な発現上昇、いわゆるサイトカインストームによるショックを引き起こすと考えられている。そしてその主な標的組織の一つとして肝臓が挙げられる。ヌクリング KO マウスではこのサイトカインストーム機構のどこかに破綻が生じることにより LPS 刺激に対する抵抗性を獲得していると考えられた。同 KO マウスでは LPS 刺激後の上記サイトカインのレベルは野生型と比較して有意差が見られなかった。一方、同マウスより調整した肝細胞は LPS や TNF $\alpha$  による細胞死誘導に対し抵抗性を示した。その他、分子レベルでの詳細な検討により、「**ヌクリングは細胞障害性ストレス後のアポトーシス誘導現象に重要な働きを担っており、それは NF- $\kappa$ B の活性化を制御する**

**ことによりもたらされる」と結論付けた。**ヌクリングの関与が示唆される NF- $\kappa$ B 経路は、近年発がん機構への関与が注目されてきている。特に肝炎に伴う肝がんの発症機構においては、肝実質細胞及びクッパー細胞における NF- $\kappa$ B の活性化及びそれに伴うアポトーシス抑制が極めて重要な役割を担っていることが明らかとなってきている。ヌクリング KO マウスでは初代培養胚性線維芽細胞において NF- $\kappa$ B の持続的活性化が観察されていたが、生体肝組織においても多くのヌクリング KO マウス個体において NF- $\kappa$ B の持続的活性化を最近確認している。また、同 KO マウスでは肝炎・肝がんの自然発症率が生後一年を経過した集団で著増することが観察されている。最近我々はこれらヌクリング KO マウスに於ける炎症性肝疾患発症の下地として、NF- $\kappa$ B 活性化異常に起因すると考えられる代謝障害が存在していることを見いだした。

## 2. 研究の目的

**ヌクリング KO マウスにおける肝炎炎症性疾患の発症機構の解明**を最終目標として、その下地となっていると考えられる糖・脂質代謝系の異常の検討とその分子レベルでの解析を行う。我々は既に、同 KO マウスでは野生型マウスと比較して高脂血症、肝機能障害、肝脂肪変性が好発することを確認しており、肝炎・肝がん発症の前段階としての非アルコール性脂肪性肝障害 (NAFLD) の存在が疑われる。ヌクリング—NF- $\kappa$ B 経路、カスパーゼ経路あるいはガレクチン 3 経路を中心とした情報伝達経路を検討し、その発症機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 糖・脂質代謝異常及び非アルコール性脂肪性肝障害 (NAFLD) の有無の検討

通常食及び高タンパク食、高脂肪食投与による体重の変化 (離乳直後より老齢期まで) をヌクリング KO マウスとその同腹ヘテロもしくは野生型マウスで比較する。

体重に有意差が認められたステージに於いて、体脂肪、内臓脂肪、肝脂肪率を調べる (小動物用 CT スキャン装置使用: 徳島大学総研)。精巣上体脂肪体の大きさも調べる。

上記結果と、血清コレステロール値及び肝機能との相関を調べることにより、脂質代謝異常と肝障害度との関連性を明らかにする。

インスリン耐糖能検査を行う (インスリン耐糖能異常は NAFLD の特徴の一つであるため)。場合によっては高タンパク食、高脂肪食投与マウスを用いる。

その他一般的な糖代謝検査(糖負荷テストなど)を行う。

インスリンレベルを調べる(ELISA, qRT-PCR etc): インスリンレベル低下はNAFLDあるいは糖尿病後期の所見、インスリンレベル上昇は糖尿病前・中期の一般的所見

マウス膵 細胞株(MIN6 細胞)にヌクリングノックダウン(KD)システムを導入し(ヌクリング KD 用 siRNA はサンタクルズ等から購入可能) 培養細胞レベルでのインスリン分泌機構におけるヌクリングの重要性を調べる。また以降の分子レベルでの解析系として確立させる。

肝臓におけるインスリンの発現を調べる(ウェスタンブロット、免疫組織染色など): 高糖負荷によるマウス組織の異所性(肝含む)インスリン発現が報告されている(1)。また最近解糖系におけるNF- $\kappa$ Bシグナルの重要性が報告されている(2)。肝臓での解糖系の異常によるインスリン抵抗性の獲得にインスリンの異所性発現やNF- $\kappa$ Bシグナルが深く関わっている可能性が疑われ、もしこれが証明されれば、肝臓における新たな制御機構の発見に繋がることが期待される。

(2) アポトーシス経路あるいはNF- $\kappa$ B経路の障害の有無を分子レベルで検討

ヌクリング KO マウス由来の細胞組織と同様の所見が MIN6 細胞のヌクリング KD で認められるかどうかを検討する。

・ヌクリング KD により低グルコース培地による通常の培養条件でNF- $\kappa$ Bの活性化が誘導されるか: EMSA, 細胞免疫染色  
・高グルコース負荷によるNF- $\kappa$ B活性化の検討及びヌクリング KD 細胞でのNF- $\kappa$ B活性化異常の検証

・ヌクリング KD によるインスリン分泌異常が前年度の研究実施により確認された場合、その異常がNF- $\kappa$ B経路を介したものであるかどうかをMIN6の培養系にNF- $\kappa$ B阻害剤(NAI)を投与するなどの実験により確認する。

上記と同様の実験をヌクリング KO マウス及びその同腹野生型対照マウス由来の肝細胞を用いて行う。

#### 4. 研究成果

(1) ヌクリング KO マウスにおける非アルコール性脂肪性肝障害(NAFLD)を中心とした代謝異常症の発症病態を詳細に検討した。NAFLDは肝臓におけるアルコール非依存の脂肪蓄積異常として特徴付けられ、インスリン

抵抗性や高インスリン血症といったメタボリック症候群に係る兆候を示す。NAFLDと高インスリン血症がどのように結びついているのかはあまりよく分かっていないが、NAFLDは肝臓だけでなく、膵臓、脂肪組織、筋肉などの機能にも影響を及ぼし、それら臓器の炎症反応へ至ることが分かっているため、恐らくは高インスリン血症もNAFLDの結果であろうと一般に考えられている。我々は高インスリン血症を来す一因となり得るインスリンの発現制御異常が、NAFLDの発症要因となることを見出した。これはインスリン発現制御異常とNAFLDがフィードバックループにより病態の増悪をもたらすことを示唆する。インスリンの遺伝子発現は膵内分泌腺の細胞に於いて緻密に制御されている。この制御の破綻は容易に糖尿病などの異常を引き起こす。栄養素やホルモン刺激によるインスリン発現誘導機構は精力的に研究されてきたが、そのような刺激が無い状態におけるインスリンの発現制御機構に関する研究はほとんど報告が無い。我々はヌクリングの発現不全が、無刺激状態におけるインスリン及びその上流分子であるPdx-1の発現異常を来すことを、膵臓組織及び膵培養細胞系で確認した。またヌクリングノックアウトマウスでは糖代謝異常と共にNAFLD様所見が確認された。以上より、ヌクリングは無刺激状態におけるインスリン発現制御に重要であり、その制御不全が代謝異常を引き起こすと考えられた。

(2) ヌクリング KO マウスにおける炎症性疾患の自然発症率上昇における細胞性免疫の寄与を検討するために、細胞性免疫が障害されているヌードマウスを遺伝的背景に持つヌクリング KO マウス(ヌクリング KO ヌードマウス, Nucl<sup>-/-</sup>nu)を作成し、炎症性疾患発症率を調べた。その結果、ヌクリング KO ヌードマウスでは、C57black6/J背景のヌクリング KO マウスでは認められなかった乳がんの発症例が散見されるようになった。また出産後の乳腺退縮減少の遅延が確認された。去年度報告の研究の続きとして、出産後マウスの離乳後乳腺退縮現象におけるヌクリングの関与について検討を進めた。まずヌクリングは乳腺の発達時に発現誘導され、さらに退縮時にはより強く発現が惹起されることを確認した。またヌクリングノックアウト(KO)マウスの乳腺ではアポトーシス異常がみられ、退縮現象が遅延していた。分子レベルの解析では野生型でみられるNF- $\kappa$ B及びstat3の活性化が同KOマウスの乳腺では抑えられていることを見出した。これらのシグナルは乳腺退縮に重要な役割を担っていることが知られている。以上より「ヌクリングは乳腺退縮(mammary gland involution)時のアポトーシス誘導現象に重要な働きを担っており、それはNF- $\kappa$ B及びstat3の活性化を制御することによりもたらされる」ことが強く示唆された。

(3) ヌクリング K0 マウスにおける非アルコール性脂肪性肝障害 (NAFLD) を中心とした代謝異常症の発症病態を詳細に検討した。NAFLD は肝臓におけるアルコール非依存の脂肪蓄積異常として特徴付けられ、インスリン抵抗性や高インスリン血症といったメタボリック症候群に関係する兆候を示す。NAFLD と高インスリン血症がどのようにして結びついているのかはあまりよく分かっていないが、NAFLD は肝臓だけでなく、膵臓、脂肪組織、筋肉などの機能にも影響を及ぼし、それら臓器の炎症反応へ至ることが分かっているため、恐らくは高インスリン血症も NAFLD の結果であろうと一般に考えられている。我々は高インスリン血症を来す一因となり得るインスリンの発現制御異常が、NAFLD の発症要因となることを見出した。これはインスリン発現制御異常と NAFLD がフィードバックループにより病態の増悪をもたらすことを示唆する。インスリンの遺伝子発現は膵内分泌腺の細胞に於いて緻密に制御されている。この制御の破綻は容易に糖尿病などの異常を引き起こす。栄養素やホルモン刺激によるインスリン発現誘導機構は精力的に研究されてきたが、そのような刺激が無い状態におけるインスリンの発現制御機構に関する研究はほとんど報告が無い。我々はヌクリングの発現不全が、無刺激状態におけるインスリン及びその上流分子である Pdx-1 の発現異常を来すことを、膵臓組織及び膵培養細胞系で確認した。またヌクリングノックアウトマウスでは糖代謝異常と共に NAFLD 様所見が確認された。以上より、ヌクリングは無刺激状態におけるインスリン発現制御に重要であり、その制御不全が代謝異常を引き起こすと考えられた。

#### 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5件)

Dang HV, Sakai T, Pham TA, Tran DH, Yorita K, Shishido Y, Fukui K. Nucling, a novel apoptosis-associated protein, controls mammary gland involution by regulating NF- B and STAT3. J Biol Chem., 査読有、290 巻 40 号、2015、24626-24635  
DOI:10.1074/jbc.M115.673848

Tran DH, Shishido Y, Chung SP, Trinh HT, Yorita K, Sakai T, Fukui K. Identification of DNA-binding proteins that interact with the 5'-flanking region of the human d-amino acid oxidase gene by pull-down assay coupled with two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal., 査読有、116 巻、2015、94-100

DOI:10.1016/j.jpba.2015.02.031.

Tran DH, Shishido Y, Chung SP, Trinh HT, Yorita K, Sakai T, Fukui K. Identification of two promoters for human D-amino acid oxidase gene: implication for the differential promoter regulation mediated by PAX5/PAX2. J Biochem., 査読有、157 巻 5 号、2015、377-387  
DOI:10.1093/jb/mvu084

福井 清、宍戸 裕二、頼田 和子、坂井 隆志、D-アミノ酸代謝の病態システム酵素学: 統合失調症疾患感受性と D-アミノ酸酸化酵素、月刊バイオインダストリー、査読無、31 巻、2014、11-16

Kim SM, Sakai T, Dang HV, Tran NH, Ono K, Ishimura K, Fukui K. Nucling, a novel protein associated with NF- B, regulates endotoxin-induced apoptosis in vivo. J Biochem., 査読有、153 巻 1 号、2013、93-101.

##### [学会発表](計9件)

Van Huy Dang, T. Sakai, Anh Tuan Pham, Hong Diem Tran, K. Yorita, Y. Shishido, K. Fukui. Nucling, a novel apoptosis-associated protein, controls Mammary Gland involution by regulation NF- B and STAT3. 1st International Symposium on Molecular Medicine in Tokushima University (徳島市) 12月16日、2015.

Anh Tuan Pham, T. Sakai, Van Huy Dang, Y. Shishido, K. Yorita, K. Fukui. Poly(I:C) stimulation-induced microglial activation is regulated by Nucling signal. 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 (神戸ポートアイランド、兵庫) 12月3日、2015.

Van Huy Dang, T. Sakai, Anh Tuan Pham, Hong Diem Tran, K. Yorita, Y. Shishido, K. Fukui. Nucling, a novel apoptosis-associated protein, controls postlactational involution of mammary gland through regulation of NF- B and STAT3. The Second Gene and Immunotherapy Conference in Vietnam: 招待講演 (ベトナム・ホーチミン市) 9月25日 2015.

Van Huy Dang, T. Sakai, Anh Tuan Pham, Hong Diem Tran, K. Yorita, Y. Shishido, K. Fukui. Nucling, an apoptosis-associated novel protein, controls mammary gland involution

through regulation of NF- B and STAT3. The 10th International Symposium of the Institute Network (札幌市) 7月24日, 2015.

Huy Van Dang, Takashi Sakai, Tuan Anh Pham, Diem Hong Tran, Kazuko Yorita, Yuji Shishido and Kiyoshi Fukui<sup>\*</sup>, Nucling, an apoptosis-associated novel protein, controls mammary gland involution through regulation of NF-κB and STAT3. (the most excellent presentation Award) The meeting of Stress & Nutrition Cluster on January 20<sup>th</sup>, 2015 (at the University of Tokushima)

Huy Van Dang, Takashi Sakai, Tuan Anh Pham, Diem Hong Tran, Kazuko Yorita, Yuji Shishido and Kiyoshi Fukui<sup>\*</sup>, Nucling, an apoptosis-associated novel protein, controls the postlactational involution of mammary gland through regulation of NF- B and STAT3. The 87<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (October 15<sup>th</sup> to 18<sup>th</sup>, 2014) in Kyoto

Huy Van Dang, Takashi Sakai, Tuan Anh Pham, Diem Hong Tran, Kazuko Yorita, Yuji Shishido and Kiyoshi Fukui<sup>\*</sup>, Nucling, an apoptosis-associated novel protein, controls the postlactational involution of mammary gland through regulation of NF- B and STAT3. (the prize of Young Research Award.) Tokushima Bioscience Retreat (September 18<sup>th</sup> to 20<sup>th</sup>, 2014 ”) in Shodoshima

Tran DH, Shishido Y, Huong TTH, Yorita K, Sakai T, Fukui K. Induction and regulation of gene expression of D-amino acid oxidase in glial and kidney cells. 日本ビタミン学会第66回大会(姫路市)2014年6月14日

Huy Van Dang, Takashi Sakai, Tuan Anh Pham, Diem Hong Tran, Kazuko Yorita, Yuji Shishido and Kiyoshi Fukui<sup>\*</sup>, Loss of Nucling promotes delayed mammary gland involution through suppression of NF- B and STAT3. The symposium of Japanese biochemical society, Tyougoku-Shikoku branch at The University of Ehime (From 2014-06-06 to 2014-06-07).

[図書](計0件)

〔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

坂井 隆志 (SAKAI, Takashi)  
徳島文理大学・健康科学研究所・教授  
研究者番号：80284321

### (2) 研究分担者

福井 清 (FUKUI, Kiyoshi)  
徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授  
研究者番号：00175564

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

Dang, Huy Van  
Pham, Tuan Anh  
Tran, Diem Hong  
Kim, Sun Mi