

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08536

研究課題名(和文) PDLIM2欠損マウスを用いた非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の病因病態の解明

研究課題名(英文) Clarification of pathogenesis of NASH(non-alcoholic steatohepatitis) using PDLIM2-deficient mice

研究代表者

田中 貴志 (TANAKA, TAKASHI)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：00415225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は、脂肪肝に炎症や線維化を伴った病態であるが、最近高率に肝硬変や肝臓に進行することが明らかになり、臨床で大きな問題となっている。LIM蛋白ファミリーに属する核内ユビキチンリガーゼであるPDLIM2を欠損させたマウスは、タコニック社のマウスの腸内細菌を定着させて高脂肪食で飼育すると、高率にNASH様病変を発症することが明らかになった。本研究により、特定の腸内細菌叢および高脂肪食により腸管のバリアが傷害され、これに伴って腸内細菌の代謝物や菌体成分が門脈を経由して肝臓へと流入して肝臓の脂質代謝や炎症反応を亢進させることが、NASHの発症の原因となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：NASH is a chronic hepatic inflammation associated with immune cell infiltration and fibrosis. We recently found that mice deficient in PDLIM2, a nuclear ubiquitin E3 ligase containing PDZ and LIM domains, spontaneously develop NASH-like pathology. Notably, PDLIM2-deficient mice develop NASH in the animal facility of Harvard University, but not in RIKEN facility. Since systemic inflammation can be modified by gut microbiota, we colonized gut microbiota of mice from Taconic Farms into germ-free PDLIM2-deficient mice, and found that PDLIM2-deficient mice with Taconic microbiota environment could develop NASH when we fed a normal chow or higher fat diet (9-15% fat). Microarray analysis of Kupffer cells in PDLIM2-deficient liver showed the upregulation of inflammation and metabolism-related genes, which contribute to the NASH phenotype. These data suggest that Taconic microbiota or microbiota-derived metabolites are essential for the development of NASH in combination with PDLIM2-deficiency.

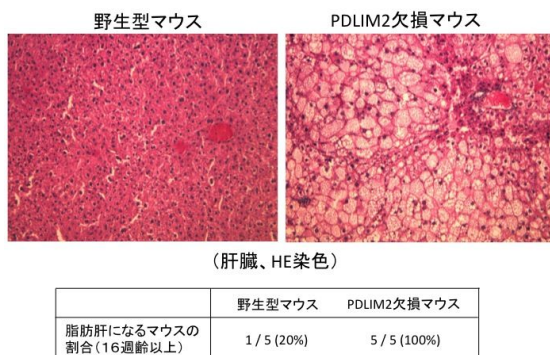
研究分野：免疫学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎(NASH) PDLIM2 ユビキチンリガーゼ 腸内細菌 脂質代謝

## 1. 研究開始当初の背景

PDLIM2 (PDZ and LIM domain protein-2) は、申請者らによって単離された LIM 蛋白ファミリーに属する核内コピキチンリガーゼである (Tanaka T et al, Immunity, 22, 729, 2005)。申請者は、PDLIM2 が、樹状細胞においては、炎症反応に必須の転写因子 NF- $\kappa$ B をコピキチン化・分解することにより、またヘルパー T 細胞においては、Th1 および Th17 細胞分化に必須の転写因子 STAT4 および STAT3 をコピキチン化・分解・不活性化することにより炎症反応を負に制御していることを明らかにした (Tanaka T et al, Nat. Immunol., 8, 584, 2007; Tanaka T et al, Sci. Signal., 4(202), ra85, 2011)。その後の研究で、申請者は、PDLIM2 欠損マウスは 16 週齢以上になると、炎症細胞浸潤をとともう脂肪肝、すなわちヒトの NASH 様の病態を高率に自然発症することを見出した。しかしながら、その発症率はマウスを飼育する環境要因に大きく依存することも明らかになった。PDLIM2 欠損マウスは、申請者がハーバード大学に留学していたときに作製したものであり、ハーバード大学の動物施設で飼育した場合には、PDLIM2 欠損マウスは全例 NASH を発症する。これに対し、理化学研究所の動物施設で飼育した場合には、PDLIM2 欠損マウスは全く NASH を発症しない。また、PDLIM2 欠損マウスを高脂肪食で飼育すると、野生型マウスとくらべて体脂肪量が増加することから、PDLIM2 欠損マウスには何らかの脂質代謝異常が存在することが示唆されたものの、NASH 様病変には至らなかった。最近の研究により、NASH は脂質代謝異常を基礎として、ここに過剰な炎症が加わることにより発症すると考えられている。しかしながら、PDLIM2 欠損マウスにおいてはこの両者が存在しているにもかかわらず、飼育環境が変わると PDLIM2 欠損マウスは NASH を発症しない。このことは、NASH の発症にはさらに別の環境因子の関与が重要であることを示唆している。

図1 PDLIM2欠損マウスの高度な脂肪肝を伴うNASH様病変



## 2. 研究の目的

マウスを飼育する施設が異なると個体レ

ベルでの炎症性疾患モデル実験における発症率や重症度が異なることは以前からよく知られていた。多くの研究者が、何らかの環境因子がこれに影響を及ぼしていると感じてはいたが、その実態はこれまでのところ不明であった。PDLIM2 欠損マウスは 16 週齢以上になると、通常の飼料で飼育している状態でも、高度の脂肪肝を伴う NASH 様の病態を高率に自然発症する。しかも、この病態が飼育環境を変えると全く起こらなくなることから、環境の違いで病態が変化する非常にいいモデルであると考えられる。また、PDLIM2 欠損マウスを高脂肪食で飼育しても同様の NASH 様病変を再現できないことから、単に飼料などによる代謝系だけの問題ではないと考えられた。

最近の研究で、特定の腸内細菌が全身の炎症性疾患の病態の増悪に關与するということが相次いで報告された。また、NASH に関しても、腸内細菌叢の変化および自然免疫系の過剰な活性化が NASH の発症および増悪に關与しているということが報告された。よって、PDLIM2 欠損マウスの NASH 様病変の場合にも、腸内細菌叢の変化がその発症に深く関係している可能性が考えられた。

そこで、本申請研究においては、PDLIM2 欠損マウスを用いて、NASH の病因病態を明らかにするとともに、NASH の発症において腸内細菌がどのように關与するのかを解明することを目指す。具体的には次の 3 つのことを研究期間内に明らかにする。各研究の詳細は次の研究計画の項で説明している。

- (1) PDLIM2 欠損マウスの NASH 様病変を再現性よく誘導できる腸内細菌の同定
- (2) PDLIM2 欠損マウスを用いた NASH 発症の分子機構の解明
- (3) PDLIM2 が脂質代謝を制御するメカニズムの解明

## 3. 研究の方法

まずは PDLIM2 欠損マウスを無菌化したあと、さまざまな腸内細菌群を投与・定着させることにより、NASH 様の病変を再現性よく誘導できる腸内細菌を同定する。腸内細菌叢を変化させるだけで高度の脂肪肝と NASH を発症させることができれば、腸内細菌と全身の炎症反応の関係を直接証明できることになり非常に画期的であると考えられる。また、關与している腸内細菌を同定することができれば、マウスの炎症モデルの実験をうまくコントロールできると考えられる。

さらに、PDLIM2 欠損マウスの NASH の病態を解析することにより NASH の病因を明らかにする。また、NASH を発症した PDLIM2 欠損マウスの組織を用いてマイクロアレイ解析を行い、NASH の発症や病気の進展、さらには

肝硬変や肝臓へ移行に関与する因子を同定することにより病気の進展のメカニズムの解明を試みる。

PDLIM2 欠損マウスには何らかの脂質代謝異常が存在することから、PDLIM2 は脂質代謝も負に制御すると考えられる。脂質代謝に関与するシグナル伝達を負に制御する分子はこれまでのところ同定されていない。PDLIM2 の作用を解析することにより、脂質代謝および脂肪細胞分化を負に制御する分子機構も明らかにできると考えられる。

以上の研究は、将来的には、NASH やその他のヒトの炎症性疾患、および、メタボリックシンドロームなどの脂質代謝異常の新しい治療法の開発につながることを期待できる。

#### 4 . 研究成果

PDLIM2欠損マウスは、ハーバード大学の動物施設で飼育した場合には、全例NASH様の病変を発症するが、理化学研究所の動物施設で飼育した場合には全くNASHを発症しない。特定の腸内細菌が全身の炎症性疾患の病態の増悪に関与することが示唆されているが、ハーバード大学の動物施設は主にタコニック社からマウスを購入していた。そこで、米国タコニック社からマウスを購入し、このマウスの糞便を無菌化したPDLIM2欠損マウスに投与することで腸内細菌群を移植・定着させて、NASHを発症するかどうかを検討した。その結果、タコニック社のマウスの腸内細菌叢を有するPDLIM2欠損マウスの雄はオリエンタル酵母社のCMF(脂肪含量9%)という高カロリー食で飼育すると、8ヶ月でNASH様病変を高率に発症した。一方雌マウスは、CMFで飼育してもNASH様病変を発症しないが、日本クレア社のQuick Fat Diet(脂肪含量15%)という高脂肪食で飼育すると7ヶ月で全例NASH様病変を発症した。以上の結果は、PDLIM2欠損マウスにおけるNASH様病変の発症には、タコニック社マウスの腸内細菌の環境が必須であることを示している。

さらに、腸内細菌のメタゲノム解析を行ったところ、理研の野生型マウス、タコニック社の腸内細菌をもつ野生型マウス、およびタコニック社のマウスの腸内細菌を有するPDLIM2欠損マウスは、それぞれ腸内細菌の構成が異なること明らかになった。また、このPDLIM2欠損マウスにおいては、ACC1やFASなどの肝臓の脂肪合成に関与する酵素、およびクッパー細胞のCCL2というケモカインの発現が野生型マウスと比べて亢進していた。以上より、PDLIM2欠損マウスでは、タコニック社のマウスの腸内細菌叢および高脂肪食により腸内細菌叢が変化し、これに伴って産生された腸内細菌の代謝物や菌体成分が門脈を経由で肝臓へと流入して肝臓の脂質代謝や炎症反応

を亢進させることでNASH様病変が発症するのではないかと考えられた。

#### 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2件)

- 1, Shin, C., Ito Y., Ichikawa S., Tokunaga M., Sakata-Sogawa, K., Tanaka, T. MKRN2 is a novel ubiquitin E3 ligase for the p65 subunit of NF- $\kappa$ B and negatively regulates inflammatory responses. *Sci Rep* 7, 46097 (2017), doi: 10.1038/srep46097 査読有
- 2, Ono, R., Kaisho, T., Tanaka, T. PDLIM1 inhibits NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory signaling by sequestering the p65 subunit of NF- $\kappa$ B in the cytoplasm. *Sci Rep* 5, 18327 (2015) , doi: 10.1038/srep18327 査読有

[学会発表](計10件)

- 1, Tanaka, T. “Microbiota-dependent development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in PDLIM2-deficient mice..” 第46回日本免疫学会学術集会、(仙台) 2017年12月14日。
- 2, Tanaka T. “Microbiota-dependent development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in PDLIM2-deficient mice” Luxembourg FNR-RIKEN Joint Symposium, Understanding Inflammatory Diseases beyond Complexity (Yokohama) October 4, 2017
- 3, 田中貴志 「ナールスゲンによる皮膚機能調整の分子生物学的研究」 第5回ナールス研究懇話会、(大阪) 2017年10月20日。
- 4, Tanaka T. “Negative regulation of inflammatory responses by LIM proteins” The 1<sup>st</sup> RIKEN-McGill Symposium, Excellence in Immunology & Genetics (Montreal, Canada) May 8-9, 2017
- 5, Tanaka, T. “The roles of LIM protein family in the regulation of inflammatory responses” S10: Dynamic control of inflammatory signaling by organelle in DC/macrophages、第45回日本免疫学会学術集会、(那覇) 2016年12月7日。
- 6, Shin, C., Tanaka, T. “MKRN2 is a novel

- ubiquitin E3 ligase for p65 subunit of NF- $\kappa$ B, negatively regulating NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory responses.” 第 45 回日本免疫学会学術集会、(那覇) 2016年12月7日。
- 7, Tanaka, T. “Negative regulation for inflammatory responses and its association with autoimmune diseases” The 2<sup>nd</sup> RIKEN-IITU Joint Symposium (Yokohama) December 2, 2016
- 8, Tanaka, T., Shibazaki, A., Ono, R., Kaisho, T. “Fbxo21, a component of ubiquitin E3 ligase complex, associates with PDLIM2 and specifically regulates NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory signaling.” 第 44 回日本免疫学会学術集会、(札幌) 2015年11月18日。
- 9, Ono, R., Tanaka, T. “PDLIM1 negatively regulates NF- $\kappa$ B signaling by sequestering p65 subunit of NF- $\kappa$ B in the cytoplasm in an I $\kappa$ B $\alpha$ -independent manner.” 第44回日本免疫学会学術集会、(札幌) 2015年11月19日。
- 10, Shibazaki, A., Tanaka, T. “PDLIM7 promoted ubiquitin/proteasome-dependent degradation for p65 subunit of NF- $\kappa$ B through PDLIM2 protein stabilization.” 第 44 回日本免疫学会学術集会、(札幌) 2015年11月19日。

〔図書〕(計1件)

Tanaka, T. Clarification of the molecular mechanisms that negatively regulate inflammatory responses. **Chronic Inflammation, Mechanisms and Regulation**, 109-118 (2016)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：創傷修復促進剤

発明者：吉岡龍藏、田中陽子、矢口学、

田中貴志

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2017-081239

出願年月日：平成29年4月17日

国内外の別：国内

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  
[http://www.riken.jp/research/labs/ims/inflamm\\_reg/](http://www.riken.jp/research/labs/ims/inflamm_reg/)  
<http://www.ims.riken.jp/labo/36/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 貴志 (TANAKA TAKASHI)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：00415225

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし