

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19035

研究課題名(和文)脂質転移タンパク質の臓器間ネットワークを介した抗炎症効果についての検討

研究課題名(英文)Anti-inflammatory properties of lipid transfer protein in nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者

伊藤 雅方(ITO, Masanori)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：20459811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脂質転移タンパク質であるSTARD10はPPAR $\alpha$ の下流遺伝子の発現を正に調節することにより抗炎症効果を示すという仮説を検証したところ、予想に反しSTARD10の欠損は脂肪滴の発達を抑制し、NASHの進行も抑制した。検討の結果、STARD10はリン脂質産生酵素との相互作用を介して脂肪滴の surface-to-volume ratio に影響し、STARD10の欠損は surface-to-volume ratio を大きくすることで脂肪滴を小さくし、脂肪肝およびNASHへの進行を抑制することが示された。この結果はNAFLD/NASH発症機構の解明に貢献するものであり、診断や治療法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：NASH is characterized by lipid accumulation with inflammation and fibrosis in the liver. STARD10, steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer domain containing 10, is a member of the START domain-containing lipid transfer protein family. To elucidate the role of STARD10 in lipid accumulation associated with NASH, NASH model mice were produced. The liver of Stard10 knockout(Stard10 $^{-/-}$ ) mice was smaller in size and the area of lipid droplet(LD) in hepatocytes was significantly smaller compared to those of WT mice. Gene expression levels of proinflammatory cytokines and fibrosis marker genes were lower in the liver of Stard10 $^{-/-}$  mice. LD surface membrane consists of a single monolayer of phospholipids such as phosphatidylcholine(PC). Importantly, we found that STARD10 promotes the formation of large LDs through the interaction with lysophosphatidylcholine acyltransferase(LPCAT1). These results indicate that STARD10 and LPCAT1 play crucial roles in promoting LD formation.

研究分野：統合生理学、応用遺伝学、分子生物学

キーワード：炎症 肝臓 脂質転移タンパク質 脂肪蓄積 脂肪滴 ホスファチジルコリン リン脂質 NASH

## 1. 研究開始当初の背景

現代の生活習慣の変化に伴い、過食や過度の飲酒、運動不足による肥満人口の増加が問題になっている。肥満は肝臓中に過度のトリグリセリド(TG)やコレステロール等の脂質が蓄積する非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) の原因となる。NAFLD は非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) へと進行し、さらに線維化から肝硬変、肝臓の発症へといたるものもある。NAFLD/NASH においては脂肪滴 (lipid droplet) が発達している。Lipid droplet はホスファチジルコリン(PC)を主として含む脂質単分子層と多くの lipid droplet 結合タンパク質で構成される細胞内小器官であり、TG の貯蔵器官としての役割だけでなく、VLDL の形成や脂質代謝に重要な役割を果たすと見直され、学術的な注目を集めている。その形成機構を明らかにすることは NAFLD/NASH の発症機構の解明につながり社会的な要請も高い。

STARD10 (Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)- related lipid transfer (START) domain containing 10) は哺乳動物では 15 種類が存在する START domain を有するタンパク質の 1 つで、PCTP-L (Phosphatidylcholine transfer protein like protein) としても知られている。これまでに別々のグループで精子形成 (TISP-81; Transcript increased in spermiogenesis-81) や大腸癌 (Sdccag28; Serologically defined colon cancer antigen 28) で発現が認められるものとして独立に同定された。試験管内の実験において、PC などのリン脂質のリポソーム間での転移活性を有することが示されているが、その生理機能については不明であった。研究代表者らの研究により STARD10 は特に肝臓に強い発現が認められ、*Stard10* 遺伝子の欠損マウス (*Stard10*<sup>-/-</sup>) は高脂肪食負荷による肝臓の肥大が野生型マウスと比べて有意に抑制され、コレステロール及び TG 含有量の増加も抑制されることが示された。その原因として、*Stard10*<sup>-/-</sup> マウスにおける胆汁酸の肝臓から胆汁中への分泌の亢進、腸管での再吸収の低下と糞中への排出の増加が、肝臓のメタボローム解析、肝臓及び胆汁の胆汁酸構成の解析、胆管からの胆汁回収、及び糞中胆汁酸含量の測定の結果から明らかになっている。その背景には *Stard10*<sup>-/-</sup> マウスの肝臓においてコル酸産生に関与する *Cyp8b1* や胆汁酸の脱抱合に関わる *Acot* 等の発現の低下が考えられた。さらに、*Cyp8b1* や *Acot* の遺伝子発現は PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor) によって制御されることから、ルシフェラーゼアッセイによる解析を行い、STARD10 が、PPAR により制御される遺伝子の発現を正に調節することが示された (Ito et al., 2013)。

PPAR $\alpha$  は NF- $\kappa$ B を抑制しており、Kupffer 細胞は PPAR $\alpha$  が抑制されることで NF- $\kappa$ B の経路が活性化し IL-1 $\beta$  等のサイトカインを放出する。IL-1 $\beta$  は肝細胞の PPAR $\alpha$  の活性を抑制し、NF- $\kappa$ B の経路を活性化することで肝臓の炎症を進行させることから、STARD10 は PPAR $\alpha$  を介して抗炎症効果を有するという仮説を立てた。

## <引用文献>

(1) Ito M, Yamanashi Y, Toyoda Y, Izumi-Nakaseko H, Oda S, Sugiyama A, Kuroda M, Suzuki H, Takada T, Adachi-Akahane S : Disruption of *Stard10* gene alters the PPAR $\alpha$ -mediated bile acid homeostasis. *Biochim Biophys Acta*. 1831: 459-468. (2013)  
doi: 10.1016/j.bbali.2012.11.008.

## 2. 研究の目的

脂質転移タンパク質である STARD10 は研究代表者らのこれまでの実験結果から、肝臓・胆嚢・小腸に高発現し、PPAR $\alpha$  の下流遺伝子の発現を正に調節することにより、胆汁酸代謝に影響することが明らかになってきた。PPAR $\alpha$  は NF- $\kappa$ B の経路を抑制しており、その活性化は炎症反応を抑制する。そのため、STARD10 はその発現により抗炎症効果を示すと考えられるが NAFLD/NASH 発症過程における STARD10 の関与の有無については不明である。本研究では STARD10 が PPAR を介し、肝臓、腸管、脂肪組織等の臓器間ネットワークに影響を与えることで抗炎症効果を示し得るとする仮説の検証を目的とした。

## 3. 研究の方法

研究代表者らが作製した *Stard10*<sup>-/-</sup> マウスを用い、その表現型を解析した。コリン欠乏メチオニン減量高脂肪飼料(CDAA)を用い、野生型マウスと *Stard10*<sup>-/-</sup> マウスに NASH を誘導し、肝臓組織中の lipid droplet 形成の解析、炎症や線維化関連遺伝子発現の解析等を行った。またマウス肝臓由来細胞株 Hepa1-6 を用いて STARD10 の lipid droplet 形成への影響について解析した。

## 4. 研究成果

- (1) CDAA を用いて野生型マウス及び *Stard10*<sup>-/-</sup> マウスに NASH を誘導したところ、脂肪蓄積による肝臓の肥大の程度が *Stard10*<sup>-/-</sup> マウスでは野生型マウスと比較して有意に低いことが明らかになった。
- (2) 肝臓における炎症関連遺伝子の発現を解析した結果、STARD10 が抗炎症効果を

有するという仮説に反して、NASH 誘導による *Tnfa* や *Il-1b*, *Mdr1b*, *Lcn2* 等の発現上昇が *Stard10*<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスと比較して有意に低いことが明らかになった。

- (3) 肝臓における線維化関連遺伝子の発現についても解析した結果、(2)の結果と同様に NASH 誘導による *Col1a1* や *Tgfb1* 等の発現上昇が *Stard10*<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスと比較して有意に低いことが明らかになった。
- (4) 肝臓の組織切片を作製し、lipid droplet の面積を解析した結果、NASH 誘導により *Stard10*<sup>-/-</sup>マウス、野生型マウスともに lipid droplet は発達したが、*Stard10*<sup>-/-</sup>マウスの lipid droplet の面積は野生型マウスと比較して有意に小さかった。
- (5) リゾ PC にアシル基を転移させ、PC を産生する酵素である LPCAT1 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 1)の発現は NASH 誘導により上昇し、lipid droplet を超遠心により分画すると、LPCAT1 は lipid droplet 画分に存在することが明らかになった。
- (6) マウス肝癌由来細胞株 Hepa1-6 に STARD10 及び LPCAT1 を過剰発現させ、Pull-down assay を行った結果、STARD10 と LPCAT1 が相互作用することが示された。
- (7) STARD10 及び LPCAT1 を Hepa1-6 に過剰発現させると、lipid droplet の蓄積量が増加することが明らかになった。
- (8) (7)において、さらに lipid droplet のサイズを測定したところ、LPCAT1 単独の発現では比較的小さいサイズの lipid droplet の割合が増加し、STARD10 と LPCAT1 の共発現では大きい lipid droplet の割合が増加していた。

よって、当初の予想とは反対に STARD10 の抑制が抗炎症効果をもたらすと考えられた。さらに、PC 転移タンパク質である STARD10 と PC 産生酵素である LPCAT1 と相互作用が lipid droplet の surface-to-volume ratio に影響し、lipid droplet サイズを調節し得ることが明らかになった。そのため、STARD10 の欠損は surface-to-volume ratio を大きくすることで、lipid droplet を小さくし、脂肪肝および NASH への進行を抑制すると考えられる。この結果は NAFLD/NASH 発症の分子機構の解明に貢献するものであり、診断や治療法の開発につながるものである。

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)

[学会発表](計 14 件)

伊藤雅方, 富田太郎, 三上義礼, 村上慎吾, 小田哲子, 黒田優, 赤羽悟美: Mechanism of regulation of the lipid droplet formation through the transfer and synthesis of phospholipids. 第95回日本生理学会大会、サンポートホール高松(香川県高松市). 2018.3.28

村上慎吾, 富田太郎, 三上義礼, 伊藤雅方, 赤羽悟美: リン脂質転移タンパク質 STARD の分子動力的シミュレーション. 平成29年度生体界面研究会(第8回)、東京理科大学(千葉県野田市). 2018.2.21

伊藤雅方, 小田哲子: NASH 発症過程における脂質転移タンパク質による脂肪滴形成促進機構. 第151回東邦医学会例会、東邦大学医療センター大森病院(東京都大田区). 2018.2.15

伊藤雅方, 富田太郎, 三上義礼, 高橋佳一, 進藤英雄, 清水孝雄, 赤羽悟美: Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer domain containing 10 (STARD10) promotes lipid accumulation and lipid droplet formation in mouse model of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). 第40回日本分子生物学会年会(ConBio2017)、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市). 2017.12.7

Ito M, Tomida T, Mikami Y, Murakami S, Oda S, Kuroda M, Adachi-Akahane S: Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer domain containing 10 promotes lipid accumulation and lipid droplet formation in the liver of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) model mouse. 10th Joint Seminar on Biomedical Sciences、大田区産業プラザ(東京都大田区). 2017.11.16

伊藤雅方, 富田太郎, 三上義礼, 村上慎吾, 小田哲子, 黒田優, 赤羽悟美: 脂質転移タンパク質 STARD10 は脂肪蓄積及び脂肪滴形成を促進する. 第94回日本生理学会大会、アクトシティ浜松(静岡県浜松市). 2017.3.28

伊藤雅方, 富田太一郎, 三上義礼, 村上慎吾, 小田哲子, 黒田優, 赤羽悟美: 脂質転移タンパク質 STARD10 は NASH における脂肪蓄積及び脂肪滴形成を促進する. 第 90 回日本薬理学会年会、長崎新聞文化ホール (長崎県長崎市). 2017.3.17

赤羽悟美, 伊藤雅方, 三上義礼, 村上慎吾, 富田太一郎: リン脂質転移蛋白 Stard10 を介した肝細胞における脂肪滴サイズの調節機構. 平成 28 年度生体界面研究会(第 6 回)、金沢大学(石川県金沢市). 2017.2.9

伊藤雅方, 富田太一郎, 高橋佳一, 進藤英雄, 三上義礼, 村上慎吾, 清水孝雄, 赤羽悟美: 肝細胞の脂肪滴形成における脂質転移タンパク質 STARD10 の役割について. 第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市). 2016.12.1

伊藤雅方, 富田太一郎, 三上義礼, 村上慎吾, 赤羽悟美: 脂質転移タンパク質 STARD10 の脂肪滴形成への作用について. 第 1 回黒潮カンファレンス、サンライズ九十九里(千葉県山武郡九十九里町). 2016.10.22

伊藤雅方, 富田太一郎, 関由成, 杉本結衣, 小田哲子, 黒田優, 赤羽悟美: Role of Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer domain containing 10 (STARD10) in lipid droplet formation. 第 93 回日本生理学会大会、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市). 2016.3.23

伊藤雅方, 杉本結衣, 関由成, 富田太一郎, 赤羽悟美: Altered expression of Ca<sup>2+</sup>-signaling proteins in atria and pulmonary vein of DM model mice. 第 89 回日本薬理学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市). 2016.3.9

伊藤雅方, 小田哲子: 脂質転移タンパク質の臓器間ネットワークを介した炎症に対する影響の解明. 第 147 回東邦医学会例会、東邦大学医療センター大森病院(東京都大田区). 2016.2.19

伊藤雅方, 杉本結衣, 関由成, 富田太一郎, 赤羽悟美: コリン欠乏食負荷時の肝臓脂肪蓄積における脂質転移タンパク質 STARD10 の役割. 第 10 回トランスポーター研究会年会、慶應義塾大学薬学部(東京都港区). 2015.6.21

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 雅方 (ITO Masanori)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号: 20459811