

令和元年5月15日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19328

研究課題名(和文) ケトン体が非アルコール性脂肪性肝疾患の進行に与える影響の解析

研究課題名(英文) Influence of ketone body on the progression of nonalcoholic fatty liver disease

研究代表者

川野 佑輝 (Kawano, Yuki)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：80448175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒドロキシ酪酸(BHB)はケトン体の一種で肝細胞において脂肪酸から合成されるが、肝細胞の脂質糖代謝に与える影響は明らかでない。糖脂質代謝異常は小胞体ストレスと相関があることから、本研究ではBHBが小胞体ストレスに与える影響を解析した。培養肝細胞とマウス個体レベルにおいてBHBは小胞体ストレスを抑制するが、これらの作用は小胞体ストレスと相関のあるサーチュイン1遺伝子と無関係であることがわかった。また、細胞内のBHB産生を薬理的および遺伝子学的に操作することで、小胞体ストレスを制御することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞内のヒドロキシ酪酸(BHB)産生を操作することにより小胞体ストレスを制御できることを、我々は本研究により初めて報告した。小胞体ストレスは糖脂質代謝異常や非アルコール性脂肪性肝疾患の誘因となることから、BHB産生をコントロールすることでこれらの疾患を制御できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：-hydroxybutyrate (BHB), a ketone body in mammals, is produced from fatty acids in hepatocytes. To elucidate the role of BHB in the hepatic endoplasmic reticulum (ER), we examined the effects of BHB on ER stress. In Hepa1c1c7 cells, BHB suppressed the protein expression of ER stress responsive genes without causing alterations in the protein expression of sirtuin 1 (SIRT1). The intraperitoneal administration of BHB reduced the protein expression of ER stress responsive genes in mouse livers. In HepG2 cells, the protein expression levels of ER stress responsive genes were increased by the partial inhibition of BHB production with siRNA targeting endogenous 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase, whereas they were decreased by promoting BHB production with fenofibrate. These findings revealed that BHB helps to suppress hepatic ER stress via a SIRT1-independent pathway, and it might be possible to manipulate ER stress by regulating BHB production genetically or pharmacologically.

研究分野：肝臓病学

キーワード：小胞体ストレス ケトン体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

現在、脂肪肝は健診受診者の約3人中1人の割合で認められている。アルコールを過度に摂取していなくても肥満や糖尿病、脂質異常症、高血圧症を背景として脂肪肝を発症することがあり、これは非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）と呼ばれている。NAFLDの内、約10%の人が非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）を発症し、未治療の場合には肝がんや肝不全で死亡することがあるが、未だにその進展機序の全貌は明らかでなく、また特効薬も無い。主要なケトン体であるβヒドロキシ酪酸（BHB）は、肝細胞において脂肪酸の酸化により生合成され、飢餓時においてグルコースに替わるエネルギー源になるだけでなく、生体内の情報伝達物質としての役割も担っている。BHBの免疫細胞における抗炎症作用、心筋細胞や腎細胞における酸化ストレス抑制効果、脂肪組織における脂肪分解抑制効果などがこれまで報告されているが、BHBが肝細胞の糖脂質代謝に与える影響の解明は十分でない。

### 2. 研究の目的

主要なケトン体であるβヒドロキシ酪酸（BHB）がNAFLDの病態の進行にどのように関与しているかを明らかにし、NAFLDにおける新規治療ターゲットを発見することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

(1) 小胞体ストレスは肝臓における糖脂質代謝異常の誘因となるため、細胞外のBHBが肝細胞の小胞体ストレスに与える影響を解析した。

(2) BHBによる小胞体ストレス制御機構を明らかにするため、BHBが肝細胞の核内に局在するサーチュイン1（SIRT1）遺伝子に与える影響を解析した。

(3) 薬理学的および遺伝子学的に細胞内のBHB産生を制御することで、肝細胞の小胞体ストレスレベルを変化させることができるかどうかを解析した。

### 4. 研究成果

BHBが肝細胞の小胞体ストレスに与える影響を明らかにするため、マウス肝がん由来細胞株Hepalclc7細胞とヒト肝がん由来細胞株HepG2細胞を小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン（5 μg/mL）で処理し、BHB（10 mM）処理群と非処理群における小胞体ストレス応答遺伝子の発現量を解析した。mRNA発現量に関してはリアルタイムRT-PCR法を、タンパク質発現量に関してはウェスタンブロット法を用いて測定した。その結果、Hepalclc7細胞

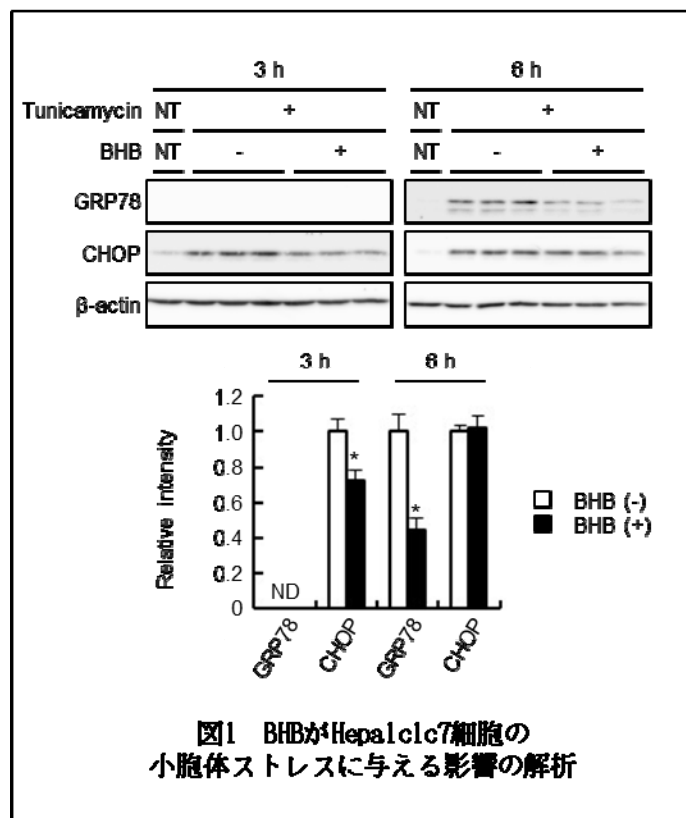


図1 BHBがHepalclc7細胞の小胞体ストレスに与える影響の解析

胞において、BHB 処理群ではツニカマイシン刺激 3 時間後の C/EBP homologous protein (CHOP) タンパク質発現量が、6 時間後の glucose-regulated protein 78 (GRP78) タンパク質発現量が減少していた (図 1)。同様に、HepG2 細胞においても、BHB 処理群ではツニカマイシン刺激 6 時間後の GRP78、spliced X-box binding protein-1 (XBP-1) および transcriptional CHOP-inducer activating transcription factor 4 (ATF4) の mRNA 発現量が減少、GRP78 と CHOP のタンパク質発現量も減少していた。次に、in vivo において BHB が肝臓の小胞体ストレスに与える影響について解析するため、C57BL/6 マウス (8 週齢・雄) に BHB を腹腔内投

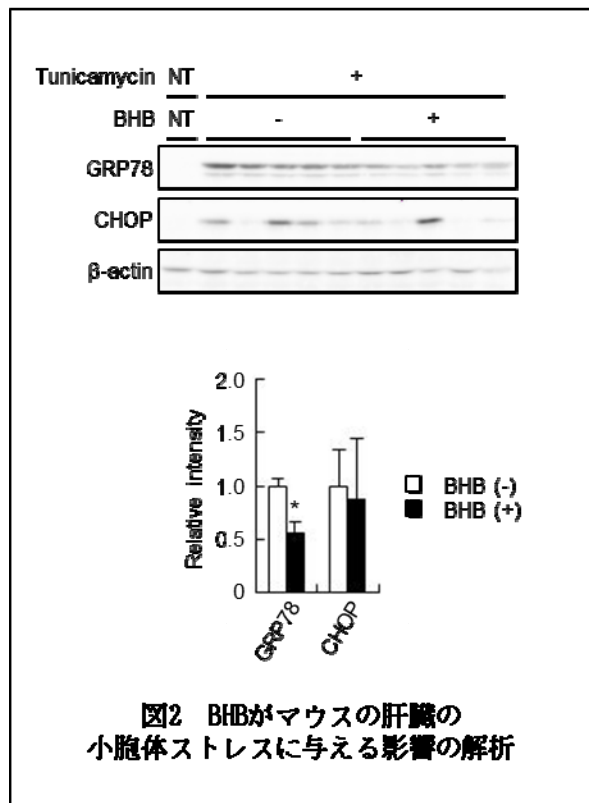


図2 BHBがマウスの肝臓の小胞体ストレスに与える影響の解析

与しておき、2 時間後にツニカマイシン (0.5 g/kg・体重) を腹腔内投与することで肝臓における小胞体ストレスを誘導した。BHB 投与群と非投与群における小胞体ストレス応答遺伝子のタンパク質発現量を解析したところ、ツニカマイシン投与 24 時間後の GRP78 タンパク質発現量は BHB 投与群で有意に減少していたが、CHOP タンパク質発現量に関しては両群間で有意な差は見られなかった (図 2)。BHB を腹腔内に投与すると 6 時間以内に同物質の血中濃度は最高値となり、その後は速やかに低下するため、BHB による小胞体ストレスの抑制効果が不完全であった可能性がある。以上より、BHB は肝細胞における小胞体ストレスを抑制することが明らかとなった。

続いて、BHB が小胞体ストレス誘導性細胞障害に与える影響を解析するため、Hepal1c7 細胞をツニカマイシンで 24 時間処理し、Cell Counting Kit-8 を用いて BHB 処理群と非処理群における細胞生存率を評価した。BHB 非処理群ではツニカマイシン処理により細胞生存率が有意に低下したが、BHB 処理群では細胞生存率の低下を認めなかった。また、BHB 処理群ではアポトーシスにより誘導される切断型 PARP1 と活性型 Caspase 3 遺伝子のタンパク質発現量が減少していた。以上より、BHB はアポトーシスを抑制することで小胞体ストレス誘導性細胞障害から肝細胞を保護していることが示唆された。

BHB による小胞体ストレス抑制機構を明らかにするため、小胞体ストレス抑制作用を有する SIRT1/AMP-activated protein kinase (AMPK) 経路に BHB が与える影響について解析した。Hepal1c7 細胞をツニカマイシンで処理し、BHB 処理群と非処理群における SIRT1 タンパク質発現量と AMPK α のリン酸化タンパク質発現量を測定したが、両群間で有意差を認めなかった。また、SIRT1 活性測定キットを用いて BHB が SIRT1 酵素活性に与える影響を評価したが、BHB は SIRT1 酵素活性に影響を与えなかった。以上より、Hepal1c7 細胞において BHB は SIRT1 非依存性に小胞体ストレスを抑制していると考えられた。

最後に、肝細胞内における BHB 産生をコントロールすることで小胞体ストレスを制御できるかどうかについて解析を行った。まず、BHB の産生を阻害するためにケトン体合成に必要な酵素である HMG-CoAlyase (HMGCL) に対する siRNA を HepG2 細胞に導入した後、ツニカマイシンで 6 時間処理し小胞体ストレス応答遺伝子の mRNA とタンパク質発現量を解析した。対照群と比較すると、siHMGCL 導入群では GRP78 の mRNA とタンパク質発現量が有意に増加していた。次に、BHB の産生を促進するために PPAR $\alpha$  作用薬であるフェノフィブラートで HepG2 細胞を処理し、ツニカマイシンで小胞体ストレスを誘導した。対照群と比較すると、フェノフィブラート処理群で GRP78 のタンパク質発現量が有意に減少していた。しかし、siHMGCL で BHB 産生を阻害している

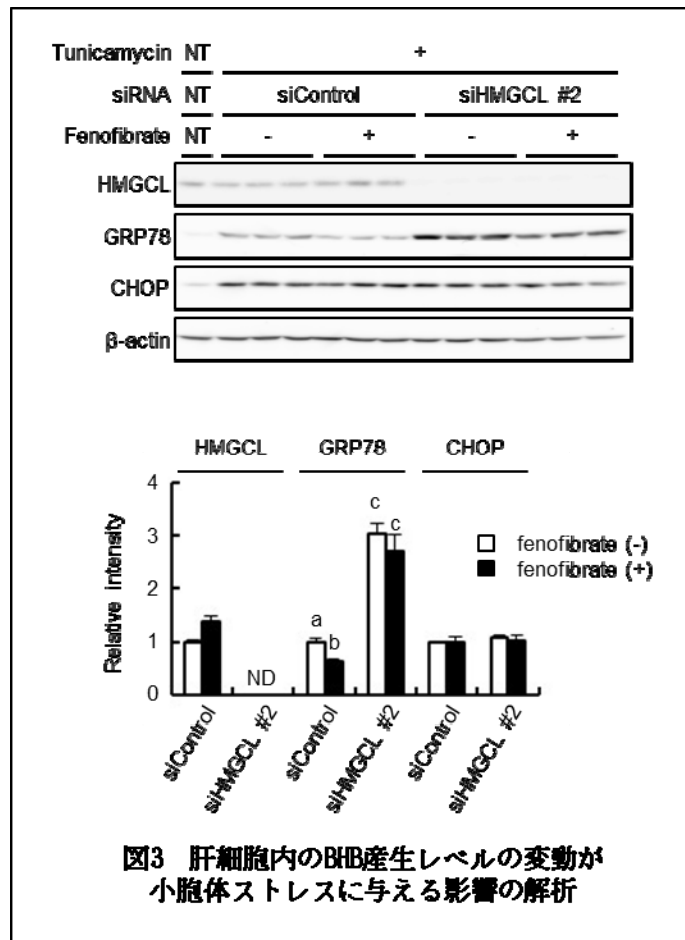
と、フェノフィブラートで処理しても GRP78 のタンパク質発現を抑制できなかった(図 3)。以上より、フェノフィブラートは肝細胞内の BHB 産生を促進することで小胞体ストレス応答を抑制している可能性が示唆された。

本研究により、BHB は SIRT1 非依存性に肝細胞における小胞体ストレスを抑制することを明らかにした。また、細胞内の BHB 産生をコントロールすることで小胞体ストレス応答を制御できることを示した。BHB 産生にかかわる因子を標的とした小胞体ストレス関連肝疾患に対する治療法開発の一助となる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Tagawa R, Kawano Y, Minami A, Nishiumi S, Yano Y, Yoshida M, Kodama Y.  $\beta$ -hydroxybutyrate protects hepatocytes against endoplasmic reticulum stress in a sirtuin 1-independent manner. Arch Biochem Biophys 663: 220-227, 2019.  
DOI: 10.1016/j.abb.2019.01.020  
査読有
2. Hatazawa Y, Yano Y, Okada R, Tanahashi T, Hayashi H, Hirano H, Minami A, Kawano Y, Tanaka M, Fukumoto T, Murakami Y, Yoshida M, Hayashi Y. Quasispecies variant of pre-S/S gene in HBV-related hepatocellular carcinoma with HBs antigen positive and occult infection. Infect Agent Cancer 2:13:7, 2018.  
DOI: 10.1186/s13027-018-0179-4  
査読有
3. Yano Y, Seo Y, Hayashi H, Hatazawa Y, Hirano H, Minami A, Kawano Y, Saito M, Ninomiya T, Sugano M, Yamada H, Kitajima N, Yoon S, Hayashi Y. Factors associated with the decrease in hepatitis B surface antigen titers following interferon therapy in patients with chronic hepatitis B: Is interferon and adefovir combination therapy effective? Biomed Rep 7(3): 257-262, 2017.  
DOI: 10.3892/br.2017.944  
査読有



4. Horas H Nababan S, Nishiumi S, Kawano Y, Kobayashi T, Yoshida M, Azuma T. Adrenic acid as an inflammation enhancer in non-alcoholic fatty liver disease. Arch Biochem Biophys 623-624: 64-75, 2017.  
DOI: 10.1016/j.abb.2017.04.009  
査読有
5. Kawano Y, Nishiumi S, Saito M, Yano Y, Azuma T, Yoshida M. Identification of Lipid Species Linked to the Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Curr Drug Targets 16(12): 1293-300, 2015.  
DOI: 10.2174/1389450116666150408103318  
査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. 西海信、サウト・ホラス・ハトグアン・ナババン、川野佑輝、小林隆、吉田優. 脂質分析による非アルコール性脂肪性肝炎病態関連因子の同定. 第 42 回日本医用マスペクトル学会年会. 2017/09/14-09/15, 東京都 (日本) .
2. Saut Nababan, Yuki Kawano, Shin Nishiumi, Yoshihiko Yano, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. Ether Phospholipid Profile in Mice with Non-Alcoholic Steatohepatitis. APASL2016. 2016/02/21-02/24, 東京都 (日本) .

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：炎症性関連病態を伴う非アルコール性脂肪性肝疾患のバイオマーカー  
発明者：東健、吉田優、川野佑輝、西海信、サウトホラスハトグアンナババン  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2017-066355  
出願年：2017/03/29  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：田川 亮真

ローマ字氏名：TAGAWA, Ryoma

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。