

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：33915

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05280

研究課題名(和文) 刺激応答タンパクGADD34と代謝性高齢者疾患の解明

研究課題名(英文) Stress responsive GADD34 and metabolic syndrome

研究代表者

磯部 健一(isobe, ken-ichi)

名古屋女子大学・家政学部・教授

研究者番号：20151441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病が日本でも増加している。私たちは長年GADD34分子に着目して研究を行ってきた。GADD34遺伝子欠損マウスは老化に伴い、2型糖尿病、脂肪肝から肝硬変、肝癌を高率に発症する。そのメカニズムの解明から脂肪肝の発症や抑制に食事内容が重要であることがわかった。マウスにエネルギー源として砂糖、グルコース、果糖のみを投与すると、2週間で脂肪肝を発症する。また、脂肪エネルギーが60%でコリンを欠損する食事でも2週間という短さで脂肪肝を発症する。これらのマウスに糖質が極端に低く、糖質をほとんど持たず、脂質60%である鶏卵のみ長期投与しても脂肪肝にならないばかりか、強力な脂肪肝抑制効果があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年日本では生活習慣病が大きな問題になっている。それは、肥満からくる糖尿病、脂肪肝、動脈硬化さらにそれが進行して、腎不全、肝硬変、肝がん、心筋梗塞、脳梗塞といった中年以降の多くの疾患に関係する。この原因として、食事の内容が問題になっている。本研究はマウスモデルで生活習慣病、特に脂肪肝の発症メカニズムを解析した。GADD34はインスリンシグナル伝達系を抑制することで、糖尿病や脂肪肝の発症を抑制していることを見出した。さらに、砂糖、果糖単独投与マウスは1週間で、コリン欠乏食は2週間で脂肪肝を発症させること、鶏卵のみ投与マウスは半年以上脂肪肝を発症しないことを見出した。

研究成果の概要(英文)：metabolic syndrome represent serious in Japan. We found that aged GADD34-deficient mice showed fatty liver. We examined the effects of GADD34 on natural life span by using GADD34-deficient mice. We observed that with age GADD34-deficient mice become obese, developing fatty liver followed by liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma and insulin resistance. During these studies, we found that nutrients in the foods were important to induce fatty liver. Feeding of sugar, glucose or fructose only diet induced strong nonalcoholic fatty liver disease only in 2 weeks. High fats (60% fat) without choline diet also induced fatty liver in 2 weeks. For more than one year feeding of adult C57BL/6 female mice egg-only diet did not induce fatty liver. Adding boiled eggs or raw egg yolk to sugar, glucose or fructose or only diet or colline deficient diet strongly suppressed fatty liver.

研究分野：免疫、老化、代謝

キーワード：脂肪肝 生活習慣病 鶏卵 GADD34

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) 肥満特に内臓脂肪の増加によるメタボリックシンドロームは世界的な問題となっている。日本の高齢化社会というより世界的に、肥満、特に内臓脂肪増加に伴う肥満の増加により、2型糖尿病、高血圧、動脈硬化、高脂血症が増加している。糖尿病からは腎症に移行し、透析の原因の第一位である。高脂血症、脂肪肝から、肝硬変へと進行する。動脈硬化は脳梗塞、心筋梗塞、高血圧から心不全といったように多くの高齢者の疾患が内臓脂肪の蓄積から発生している。この問題に対して、内臓脂肪増加のメカニズムと各疾患の発症機序の解明が必要であり、疾患の進行をいかにして予防するかが急がれている。

2) 私たち(磯部、長谷川、大橋)は、長年 GADD34 (Ppp1r15a) とそれに結合するタンパク質に関する研究を行ってきた(磯部研; FASEB J. 2003, Nature Genetics 2003, Scientific Reports 2014, 2015 等)。GADD34 はストレス刺激で上昇し、protein phosphatase 1 (PP1) に結合することで、酵素を脱リン酸化することで様々な機能を持つ。特に ER ストレスで上昇し、eIF2 α を脱リン酸化することを我々(磯部研; FASEB J. 2003) や Ron 等が見いだしてよく知られている。最近、我々は遺伝子欠損マウス(GADD34KO)が老化に従って、肥満を発症することを見いだした(磯部研; Scientific Reports 2015)。肥満発症に伴って、耐糖能異常、脂肪肝から肝がん発生まで、多くの肥満関連疾患を発症してくることを見いだした。一方、Ron らは ER ストレス応答を介して GADD34 遺伝子移入が糖尿病発症を抑えるという結果を報告している(Cell Metabolism 2008)。我々の結果では自然老化或は高脂肪食で肥満から糖尿病や肝疾患を発症するものであり、Ron らは老化の過程を見ていない。当初、我々も ER ストレスが関与すると過程して解析を始めた(磯部; 2013-15 年基盤 B)。しかし、我々が見つけたことは GADD34 がインスリン刺激ですぐに上昇し、若年 GADD34KO マウスではインスリンシグナルがむしろ亢進しているとする予想外の結果であった。GADD34 の脂肪肝発症防御は ER ストレスに関与するものであるか、我々が見出したようにインスリンシグナルを抑える作用によるものであるか明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

生活習慣病が日本人に広く広まってきた。これまで、西洋食、すなわち、高タンパク、高脂質食が肥満を招き、2型糖尿病(それに伴う腎障害)、脂肪肝から肝硬変、肝臓癌の発生頻度を上げているといった栄養学的な教育が行われている。一方で、糖質摂取こそが、肥満、脂肪肝、2型糖尿病の元凶であるとした考え方が広まってきている。本研究の究極の目的は生活習慣病を防ぐにはどのような食生活が理想的かといったことにある。我々がこれまで研究してきた GADD34KO マウスが老化に伴い、肥満、脂肪肝、2型糖尿病を発症してきたため、このマウスの解析を足がかりとして、生活習慣病の予防のためにはどのような食事が理想的かを明らかにすることを目的とした。一方、GADD34 はストレス応答蛋白、特に ER ストレス応答蛋白ということが定着している。すなわち ER ストレスが細胞にかかった時に細胞は細胞死を防ぐために eIF2 α をリン酸化することで一旦蛋白合成をストップさせる。GADD34 は ER ストレスで発現が上昇し、PP1 を介して、eIF2 α を脱リン酸化することで蛋白合成を再開させる。ところが、我々は GADD34 はストレス以外にも、G-CSF といった増殖シグナルで発現が上昇すること等、多くの刺激や増殖因子で発現が上昇することを報告してきた。今回、インスリンシグナルで発現が上昇することから、この生物学的意味を調べる。このことから、GADD34 は細胞にかかるストレス、増殖刺激により、発現が上昇し、様々なシグナル伝達系に PP1 を介して脱リン酸化酵素として働くことで、細胞の生体防御たんぱく質として重要であることを確立したい。

3. 研究の方法

GADD34 とインスリンシグナル伝達系

高齢者に多く発症するメタボリックシンドロームの解明のため、我々が長年研究してきた GADD34KO マウスを若い発症前の解析からはじめ、インスリンシグナル亢進が老化に伴って進行し、肥満、脂肪肝、2型糖尿病を発症し、インスリンシグナル伝達系が逆転することに至る過程を組織標本作成、生化学的解析(インスリンシグナル伝達系、AST、ALT、糖代謝、脂質代謝)の解析を行った。GADD34 のインスリンシグナル伝達系への関与はインスリンシグナル伝達に関与するインスリン受容体、AKT、mTOR とその下流のシグナル伝達系酵素のリン酸化で解析した。代謝解析は解糖系、糖新生、脂肪酸合成系、脂肪酸 β 酸化に関与する酵素の発現解析、転写因子の発現を Western blot を中心に解析した。

食事による脂肪肝の誘導とその防御

一般のマウス実験による高脂肪食は多くはエネルギー量(E)として 60%で適量の糖質、たんぱく質を含んでいる。ところが、この高脂肪食では肥満、脂肪肝発症まで数ヶ月かかる。同じ 60%の脂質を含むが極端に糖質の低い(5%E)鶏卵のみを長期間(1年以上)摂取させることで、生活習慣病とりわけ、脂肪肝が誘導されるかを調べた。さらに、報告されているように 30%の糖質摂取のみのマウスは脂肪肝を誘導する。また、メチオニン、コリン欠乏食(MCT)は脂肪肝を誘導する。その発展として 60%脂質を含むコリン欠損食 choline deficient (MCD) diet containing 60% energy from fat (CDAHFD)食は短期間で脂肪肝を誘導する。これらのマウスに同時にあるいは脂肪肝誘導後に鶏卵のみを摂取させ、脂肪肝がもとに復帰するか否かを調べた。肝臓を中心に組織解析、ALT、AST、ケトン体、脂肪酸、中性脂肪といった生化学的解析を行った。解糖系、糖新生、脂肪酸合成系、脂肪酸 β 酸化に関与する酵素の発現解析、転写因子の発現を Western blot を中心に解析した。

4. 研究成果

GADD34 とインスリンシグナル伝達系

GADD34 はストレス刺激で上昇し、protein phosphatase I (PP1)に結合することで、酵素を脱リン酸化することで様々な機能を持つ。これまで、GADD34 は小胞体に存在し、蛋白合成のシャットオフからの回避に主として働くことを我々のグループを含め多くの研究者が報告してきた。このことから GADD34 は GADD153 等と同様に ER ストレス応答蛋白であることが定着している。我々は雄の GADD34 GADD34KO が老化に伴い肥満、2型糖尿病、脂肪肝、肝硬変から肝臓癌を発症する実験結果から生活習慣病と GADD34 の関連を解析した。GADD34 に対する抗体で細胞内局在を調べてみると、GADD34 はインスリン刺激で発現が上昇し細胞膜、小胞体、核へと移動することが判明した。若年 GADD34KO マウスではインスリンシグナル伝達系が上昇していた。このことは、GADD34 はインスリンシグナルが入ると、発現が上昇し、PP1 と結合して、インスリンシグナル伝達系を抑制することで生体の恒常性を保っていると考えられる。さらに、インスリンシグナル伝達系のどこで GADD34 が働いているかを調べるために、GADD34WT マウスと GADD34KO マウスにおけるインスリンシグナル伝達系を検索したところインスリン受容体それ自身のリン酸化が上昇することがわかった。そのことから、下流のシグナルである AKT 以下のリン酸化が上昇していた。以前、我々は GADD34 が BFCOL-1 (ZFP148)と結合し、BFCOL-1 は PTRF(Cavin-1)と結合することを報告している Cavin-1 は細胞膜のカベオラに PTRF は核内に存在していることが従来報告されてきた。すなわち、インスリンシグナルが入ると、GADD34 は ZFP148/Cavin-1 を介して、インスリン受容体に結合しインスリンシグナルを調節していることが予想される。Cavin-1 は遺伝子欠損マウスの報告から、脂質の細胞内への取り込みに関与することが報告されていること

から、GADD34 は Cavin-1 を介して、脂質の取り込みを抑制していると考えられる。

食事と生活習慣病との関連

当初、GADD34 が肥満から 2 型糖尿病、脂肪肝へと進展することから肥満という生活習慣病が脂肪肝、NASH、肝硬変、肝臓癌の引き金になると考えていた。しかし、メスの GADD34KO マウスの解析では肥満にならずに老化に伴い脂肪肝が発症し、NASH、肝硬変、肝臓癌へと進展することが明らかになった。すなわち、肥満よりも、食事内容が脂肪肝発症のメカニズム解析に重要であり、そこに明らかに GADD34 が関与していることが示唆された。インスリンシグナル伝達系亢進は解糖系を動かし、肝臓ではグリコーゲン、中性脂肪の蓄積に関与する。そこで、マウスに与える食事内容を極端なエネルギー原を持つものにして実験を行った。

1) 低糖質、高脂質、高たんぱく質の鶏卵投与は脂肪肝を誘導するか？

低糖質(5%エネルギー量)で高脂肪食(60%エネルギー量)と同じ高脂質含量を持つ鶏卵のみで 5 週齢の C57BL/6 メスマウスを長期間飼育したところ、1 年半以上元気に生育すること、脂肪肝は発症しないこと(組織、生化学)を見出した。

2) 単糖であるグルコース、フルクトース、二糖である砂糖を 30%になるようにビタミン、ミネラル、アミノ酸の入った水溶液に溶かして投与したところ、2 週間で高度な脂肪肝を発症した。その後、2 週間鶏卵を投与したところ、脂肪肝はなくなり、ほぼ正常に回復した。

3) 鶏卵と同じ高脂肪を持つが、コリンを欠損する choline deficient (MCD) diet containing 60% energy from fat (CDAHFD)食を雄マウスに投与したところ、2 週間で脂肪肝を発症した。その後、2 週間鶏卵を投与したところ、脂肪肝はなくなり、ほぼ正常に回復した。

このことから明らかになったのは、脂肪肝発症には、中性脂肪の多い食事よりも、糖質の多い食事の方が重要であるということ、中性脂肪が多くても、低糖質でコリンを含んでいる鶏卵は脂肪肝を発症しないばかりか、脂肪肝抑制効果を持つことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nishio N, Hasegawa T, Tatsuno I, Isaka M, Isobe KI.	4. 巻 17
2. 論文標題 Female GADD34 mice develop age-related inflammation and hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Geriatr Gerontol Int.	6. 最初と最後の頁 2593-2601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ggi.13080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Isobe KI, Nishio N, Hasegawa T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Immunological aspects of age-related diseases.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 World J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 129-137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4331/wjbc.v8.i2.129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Oh-Hashi K, Sugiura N, Amaya F, Isobe KI, Hirata Y.	4. 巻 440
2. 論文標題 Functional validation of ATF4 and GADD34 in Neuro2a cells by CRISPR/Cas9-mediated genome editing.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Cell Biochem.	6. 最初と最後の頁 65-75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11010-017-3156-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 磯部健一、西尾尚美	4. 巻 49
2. 論文標題 腸内細菌と老化	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 17-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okada A, Nangaku M, Jao TM, Maekawa H, Ishimono Y, Kawakami T, Inagi R.	4. 巻 7
2. 論文標題 D-serine, a novel uremic toxin, induces senescence in human renal tubular cells via GCN2 activation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 11168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-11049-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Y, Ito S, Isobe K.	4. 巻 6
2. 論文標題 Vancomycin-sensitive bacteria trigger development of colitis-associated colon cancer by attracting neutrophils.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 23920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep23920	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito S, Tanaka Y, Oshino R, Okado S, Hori M, Isobe KI.	4. 巻 7
2. 論文標題 GADD34 suppresses lipopolysaccharide-induced sepsis and tissue injury through the regulation of macrophage activation.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cell Death Dis.	6. 最初と最後の頁 e2219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/cddis.2016.116.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Du Q, Tsuboi N, Shi Y, Ito S, Sugiyama Y, Furuhashi K, Endo N, Kim H, Katsuno T, Akiyama S, Matsuo S, Isobe KI, Maruyama S.	4. 巻 186
2. 論文標題 Transfusion of CD206+ M2 Macrophages Ameliorates Antibody-Mediated Glomerulonephritis in Mice.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 3176-3188.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Naomi Nishio, Tadao Hasegawa, Ken-ich Isobe.
2. 発表標題 Female GADD34 mice develop inflammation and hepatocellular carcinoma by aging.
3. 学会等名 第40回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西尾尚美、長谷川忠男、磯部健一
2. 発表標題 GADD34 works to suppress obesity-induced Metabolic Diseases including type 2 diabetes and NASH2.
3. 学会等名 第86回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 磯部 健一	4. 発行年 2017年
2. 出版社 三恵社	5. 総ページ数 91
3. 書名 管理栄養士のための臨床医科学 2	

1. 著者名 磯部 健一	4. 発行年 2017年
2. 出版社 三恵社	5. 総ページ数 84
3. 書名 管理栄養士のための臨床医科学3	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長谷川 忠男 (Hasegawa Tadao) (10314014)	名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授 (23903)	
研究分担者	稲城 玲子 (Inagi Reiko) (50232509)	東京大学・医学部附属病院・特任准教授 (12601)	
研究分担者	大橋 憲太郎 (Oh-hasi Kentarou) (50332953)	岐阜大学・工学部・准教授 (13701)	
研究分担者	西尾 尚美 (Nisio Naomi) (80513457)	埼玉大学・教育学部・准教授 (12401)	
研究分担者	藤本 豊土 (Fujimoto Toyosi) (50115929)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	