

令和元年6月8日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08728

研究課題名(和文) 核内受容体HNF4 とPPARによるNASH発症機序の解明と治療応用への基礎研究

研究課題名(英文) Basic research of the developmental mechanism and the therapeutic application of NASH by HNF4a and PPAR

研究代表者

井上 裕介 (Inoue, Yusuke)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：90304302

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)：肝臓特異的HNF4欠損マウス(KOマウス)でのNASH発症におけるPPARの活性化機構の解明を目的とした。KOマウスでは脂肪酸取り込みに関与するFATP1の発現が顕著に上昇しており、FATP1の転写活性化はPPAR α 依存的に強く誘導された。また、KOマウスで発現低下するmiRNAを同定し、その標的遺伝子として線維化に関与する遺伝子を同定した。さらに、KOマウス肝臓では数種類の脂肪酸の割合が変動していた。加えて、脂肪酸伸長と不飽和化に関与する複数の遺伝子の発現変動が認められた。以上より、KOマウスでは脂肪酸の質的变化によりPPAR α が活性化されてNASHを発症する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PPAR α 活性化はNASHを抑制すると考えられており、PPAR α のアゴニストがNASHの治療薬の候補になると考えられている。本研究から、反対にPPAR α の活性化がNASH発症に重要であることが分かったため、一部のNASHの治療にはPPAR α 阻害剤が有効であることが推測される。NASHの原因は不明な点が多く、確立された治療法もないため、より多種類の治療薬の開発が切望されていることから、本研究は従来と異なる機構による新規のNASH治療薬や診断法の開発に有意義である。

研究成果の概要(英文)：We aimed to investigate the mechanism of PPAR α activation in the development of NASH in HNF4 α -null mice (KO mice). Expression of FATP1 was increased in KO mice, and the transactivation of FATP1 was strongly induced by PPAR α . Furthermore, Decreased expression of miRNAs was identified in KO mice, and the gene involved in hepatic fibrosis was also identified as the target gene of the miRNAs. In addition, hepatic fatty acid composition was altered in KO mice with altered expression of fatty acid elongases and desaturases. These results suggests that PPAR α activation by qualitative change of fatty acids might induce the development of NASH in KO mice.

研究分野：分子生物学、病態生化学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性疾患（NAFLD）は良性の単純性脂肪肝であるが、1～2割は脂肪肝から悪性の非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）に移行し、肝硬変や肝癌にまで進展する（国内の患者数は約200万人）。NASH発症には脂肪肝形成後、酸化ストレスによる炎症が誘導される2段階説と様々な因子が絡む複数因子並列説が提唱されているが、NASHの原因は不明な点が多く、確立された治療法もない。

HNF4 α は肝臓で多くの遺伝子を発現制御する核内受容体である。我々は肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウス（Hnf4a^{AH}マウス）を用いて多くの表現型と HNF4 α 標的遺伝子を同定してきた。Hnf4a^{AH}マウスは脂肪肝に加え、酸化ストレスや線維化が亢進するため、新規 NASH モデル動物である。しかし、NASH 発症機序の全容解明には至っていない。

一方、Hnf4a^{AH}マウスでは核内受容体 PPAR α の顕著な活性化が認められた。そこで、Hnf4a^{AH}マウスと PPAR α 欠損マウスからダブル欠損マウスを作成した結果、脂肪肝が改善され、1年以上延命した。従って、Hnf4a^{AH}マウスは PPAR α の活性化により NASH を発症することが示唆された。

2. 研究の目的

新規 NASH モデルマウスである Hnf4a^{AH}マウスの NASH 発症機序を解明し、NASH 治療薬開発の基盤とすることを目的とする。

3. 研究の方法

脂肪酸の取り込みに関与する FATP1 の発現が Hnf4a^{AH}マウスで増加する理由を解析するために、ルシフェラーゼレポーターベクターを用いたコトランスフェクションを行なった。また、PPAR の FATP1 中の PPAR 結合配列への DNA 結合活性は、クロマチン免疫沈降（ChIP）により解析した。FATP1 発現誘導株は HepG2 細胞に Tet-ON 3G ベクターを用いて樹立し、Oil O Red を用いて脂肪染色を行なった。また、マイクロアレイにより、網羅的な miRNA の発現解析を行い、変動があった miRNA については qRT-PCR により、発現解析を行なった。さらに、HepG2 細胞において HNF4 α の発現を siRNA を用いて発現抑制し、HNF4 α により発現制御されている miRNA を同定した。加えて、同定した miRNA の標的遺伝子候補をデータベース解析により抽出し、3'-UTR 解析により標的遺伝子であるのかを検証した。

また、Hnf4a^{AH}マウスとコントロールマウスの肝臓の総脂肪酸を抽出し、GC/MS により、脂肪酸組成を比較した。さらに、Hnf4a^{AH}マウスで発現変動する脂肪酸伸長および不飽和化酵素をコードする mRNA の発現を qRT-PCR により網羅的に解析した。加えて、PPAR α 欠損マウスと PPAR α の特異的リガンドを用いて、PPAR α の標的となる脂肪酸伸長および不飽和化酵素を同定した。

4. 研究成果

Hnf4a^{AH}マウス肝臓では、脂肪酸の取り込みに関与する FATP1 の発現が顕著に上昇していたため、FATP1 の発現が PPAR α 依存的に転写活性化されるのかどうかをプロモーターアッセイにより解析した。その結果、マウス FATP1 のプロモーター活性は PPAR 応答配列依存的に転写活性化され、転写活性化は PPAR α により特に強く誘導された。さらには、PPAR α の存在下ではコアクチベーターの PGC1 α や特異的リガンドにより、さらなる転写活性化が認められた。一方、PPAR β や PPAR γ によっても特異的リガンドの存在下で転写活性化が認められたが、転写活性化能は PPAR α よりも弱いことが分かった。また、ChIP アッセイにより、Hnf4a^{AH}マウス肝臓

では PPAR α が特異的に FATP1 のプロモーター領域に結合していることが分かったが、PPAR β や PPAR γ の結合は認められなかった。このため、*Hnf4a*^{AH} マウスによる FATP1 の発現誘導は PPAR α の活性化によるものであることが明らかになった。また、*Hnf4a*^{AH} マウス肝臓では PPAR α の発現は低下しているが、FATP1 により取り込まれた脂肪酸が PPAR α のリガンドとなり、PPAR α が活性化されていると推測される。

次に、PPAR α の活性化によって誘導される FATP1 を発現誘導可能なヒト肝がん細胞株を作製した。その結果、FATP1 の発現誘導により脂肪が蓄積することが分かった。従って、予想どおり *Hnf4a*^{AH} マウスでは PPAR α の活性化による FATP1 や CideA の発現増加により、脂肪肝が促進されていることが予想される。また、*Hnf4a*^{AH} マウスで発現低下する miRNA として miR-130a-5p、miR-194-5p、miR-193a を同定したが、*Hnf4a*^{AH} マウスで発現低下する miRNA として miR-455-3p を新たに同定した。ヒト肝癌細胞で HNF4 α を siRNA を用いて発現抑制することにより、miR-455-3p の発現が低下したため、miR-455-3p は HNF4 α の新規標的遺伝子であることが示唆された。さらに、miR-455-3p の標的遺伝子として肝臓の線維化に関与する遺伝子をレポーターアッセイにより同定し、*Hnf4a*^{AH} マウスでの発現増加も確認できた。このため、HNF4 α は miR-455-3p を介して肝臓の線維化を抑制していることが示唆される。

また、PPAR α の活性化機能は十分に解析されていないため、*Hnf4a*^{AH} マウス肝臓における PPAR α の活性化機構について解析した。PPAR α は内在性脂肪酸をリガンドとして活性化するため、*Hnf4a*^{AH} マウス肝臓内の総脂肪酸解析を行った。この結果、数種類の脂肪酸の割合が *Hnf4a*^{AH} マウスで増減していることが分かった。さらに、脂肪酸伸長および不飽和化酵素をコードする mRNA の発現を網羅的に解析した結果、*Hnf4a*^{AH} マウスでの *Elovl3* の顕著な発現低下、*Elovl7* の顕著な発現増加、*Fads3* の発現増加が認められた。このうち、PPAR α 欠損マウスと PPAR α の特異的リガンドを用いた解析から、*Elovl7* は PPAR α により活性化されることが示唆された。従って、*Hnf4a*^{AH} マウスでは、脂肪酸伸長および不飽和化酵素の発現変動による脂肪酸組成の質的变化により、PPAR α が活性化されることが推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 14 件）

1. Sumardika IW, Chen Y, Tomonobu N, Kinoshita R, Ruma IMW, Sato H, Kondo E, **Inoue Y**, Yamauchi A, Murata H, Yamamoto KI, Tomida S, Shien K, Yamamoto H, Soh J, Futami J, Putranto EW, Hibino T, Nishibori M, Toyooka S, **Sakaguchi M**. Neuroplastin- β mediates S100A8/A9-induced lung cancer disseminative progression. *Mol Carcinogen*. 58, 980-995 (2019) (査読有)
2. Sasaki S, Hara A, **Sakaguchi M**, Nangaku M, **Inoue Y**. Hepatocyte nuclear factor 4 α regulates megalin expression in proximal tubular cells. *Biochem Biophys Res*. 17, 87-92 (2019) (査読有)
3. Kinoshita R, Sato H, Yamauchi A, Takahashi Y, **Inoue Y**, Sumardika IW, Chen Y, Tomonobu N, Araki K, Shien K, Tomida S, Torigoe H, Namba K, Kurihara E, Ogoshi Y, Murata H, Yamamoto KI, Futamai J, Putranto EW, Ruma IMW, Yamamoto H, Soh J, Hibino T, Nishibori M, Kondo E, Toyooka S, **Sakaguchi M**. Newly developed anti-S100A8/A9 monoclonal antibody efficiently prevents lung tropic cancer metastasis. *Int J Cancer*. 145, 569-575 (2019) (査読有)
4. Kinoshita R, Sato H, Yamauchi A, Takahashi Y, **Inoue Y**, Sumardika IW, Chen Y, Tomonobu N, Araki K, Shien K, Tomida S, Torigoe H, Namba K, Kurihara E, Ogoshi Y, Murata H, Yamamoto KI, Futamai J, Putranto EW, Ruma IMW, Yamamoto H, Soh J, Hibino T, Nishibori M, Kondo E, Toyooka S, **Sakaguchi M**. exexSSSRs (extracellular S100 soil sensor receptors)-Fc fusion proteins work as prominent decoys to S100A8/A9-induced lung tropic cancer metastasis. *Int J Cancer*. 144, 3138-3145 (2019) (査読有)
5. Sasaki S, Urabe M, Maeda T, Suzui J, Irie R, Suzuki M, Tomaru Y, **Sakaguchi M**, Gonzalez FJ, **Inoue Y**. Induction of hepatic metabolic functions by a novel variant of hepatocyte nuclear factor 4 γ . *Mol Cell Biol*. 38, e00213-18 (2018) (査読有)

6. Ruma IM, Kinoshita R, Tomonobu N, **Inoue Y**, Kondo E, Yamauchi A, Sato H, Sumardika IW, Youyi C, Yamamoto K, Murata H, Toyooka S, Nishibori M, **Sakaguchi M**. Embigin promotes prostate cancer progression by S100A4-dependent and -independent mechanisms. *Cancers (Basel)* 10, E239 (2018) (査読有)
7. Fujita H, **Inoue Y**, Kuwahara M. Selective incorporation of foreign functionality into fibrin gels through a chemically modified DNA aptamer. *Bioorg Med Chem Lett.* 28, 35-39 (2018) (査読有)
8. Sumardika IW, Youyi C, Kondo E, **Inoue Y**, Ruma IMW, Murata H, Kinoshita R, Yamamoto KI, Tomida S, Shien K, Satoh H, Yamauchi A, Futami J, Putranto EW, Hibino T, Toyooka S, Nishibori M, **Sakaguchi M**. β -1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase 3 increases MCAM stability, which enhances S100A8/A9-mediated cancer motility. *Oncol Res.* 26, 431-444 (2018) (査読有)
9. Enomoto R, Kurosawa A, Nikaido Y, Mashiko M, Saheki T, Nakajima N, Kuroiwa S, Otobe M, Ohsaki M, Tooyama K, **Inoue Y**, Kuwabara N, Kikuchi O, Kitamura T, Kojima I, Nakagawa Y, Saito T, Osada H, Futahashi M, Sezutsu H, Takeda S. A novel partial agonist of GPBA reduces blood glucose level in a murine glucose tolerance test. *Eur J Pharmacol.* 814, 130-137 (2017) (査読有)
10. Morimoto A, Kannari M, Tsuchida Y, Sasaki S, Saito C, Matsuta T, Maeda T, Akiyama M, Nakamura T, **Sakaguchi M**, Nameki N, Gonzalez FJ, **Inoue Y**. An HNF4 α -microRNA-194/192 signaling axis maintains hepatic cell function. *J Biol Chem.* 292, 10574–10585 (2017) (査読有)
11. Putranto EW, Kinoshita R, Watanabe M, Sadahira T, Murata H, Yamamoto KI, Futami J, Kataoka K, **Inoue Y**, Ruma IMW, Sumardika IW, Youyi C, Kubo M, Sakaguchi Y, Saito K, Nasu Y, Kumon H, Huh NH, **Sakaguchi M**. Expression of tumor suppressor REIC/Dkk-3 by a newly improved adenovirus vector with insertion of an hTERT promoter at the 3'-side of the transgene. *Oncol Lett.* 14, 1041-1048 (2017) (査読有)
12. **Sakaguchi M**, Yamamoto M, Miyai M, Maeda T, Hiruma J, Murata H, Ruma IM, Putranto EW, **Inoue Y**, Huh NH, Tsuboi R, Hibino T. Identification of an S100A8 receptor neuropilin- β and its heterodimer formation with EMMPRIN. *J Invest Dermatol.* 136, 2240-2250 (2016) (査読有)
13. Saho S, Satoh H, Kondo E, **Inoue Y**, Yamauchi A, Murata H, Kinoshita R, Yamamoto KI, Futami J, Putranto EW, Ruma IM, Sumardika IW, Youyi C, Suzawa K, Yamamoto H, Soh J, Tomida S, Sakaguchi Y, Saito K, Iioka H, Huh NH, Toyooka S, **Sakaguchi M**. Active secretion of dimerized S100A11 induced by the peroxisome in mesothelioma cells. *Cancer Microenviron.* 9, 93-105 (2016) (査読有)
14. Ruma IM, Putranto,EW, Kondo E, Murata H, Watanabe M, Huang P, Kinoshita R, Futami J, **Inoue Y**, Yamauchi A, Sumardika IW, Youyi C, Yamamoto K, Nasu Y, Nishibori M, Hibino T, **Sakaguchi M**. MCAM, as a novel receptor for S100A8/A9, mediates progression of malignant melanoma through prominent activation of NF- κ B and ROS formation upon ligand binding. *Clin Exp Metastasis.* 33, 609-627 (2016) (査読有)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 佐々木翔太、浦部瑞穂、前田つかさ、鈴木淳子、入江亮太、阪口政清、Frank J. Gonzalez、井上裕介「新規 HNF4 γ バリエントによる肝機能の誘導」第 41 回日本分子生物学会、2018 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜
2. 笠野一郎、瀧澤将行、齊藤千夏、Frank J. Gonzalez、井上裕介「PPAR α カスケードの活性化による新規 NASH 発症機構の解明」第 41 回日本分子生物学会、2018 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜
3. 生井美帆、井上 裕介「肝臓 HNF4 α の標的タンパク質の同定」第 41 回日本分子生物学会、2018 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜
4. 安藤翔太郎、井上裕介「肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスで発現上昇する転写因子の機能解析」第 41 回日本分子生物学会、2018 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜
5. 吉田稜、松田強志、神成真名、Frank J. Gonzalez、井上裕介「肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスの血糖値低下機構の解析」第 39 回日本分子生物学会、2016 年 11 月 29 日、パシフィコ横浜
6. 濱田真輝、井上裕介「HNF4 α による肺がん形成、進行への影響」第 39 回日本分子生物学会、2016 年 11 月 29 日、パシフィコ横浜
7. 瀧澤将行、有賀長透、齊藤千夏、行木信一、Frank J. Gonzalez、井上裕介「PPAR α カスケードの活性化による脂肪肝の発症」第 39 回日本分子生物学会、2016 年 11 月 29 日、パシ

フィコ横浜

8. M. Akiyama, A. Morimoto, M. Kannari, Y. Tsuchida, T. Matsuta, C. Saito, S. Sasaki, S. Kakizaki, F.J. Gonzalez, Y. Inoue. Positive regulation of Hepatic miRNA by HNF4 α , 3rd International Symposium of GUMI&MADE 2016、2016年12月9日、桐生市民会館
9. 浦部瑞穂、佐々木翔太、前田つかさ、鈴木淳子、入江亮太、阪口政清、Gonzalez J. Frank、井上裕介「核内受容体 HNF4 γ による肝がん細胞の再分化誘導」第40回日本分子生物学会、2017年12月9日、神戸国際会議場
10. S. Sasaki, M. Urabe, T. Maeda, J. Suzuki, R. Irie, M. Sakaguchi, F.J. Gonzalez, and Y. Inoue Application of hepatocyte nuclear factor 4 γ for establishment of differentiated hepatocytes 4th International Conference on Pharmaceutical and Biomedical Engineering, 2017年10月17日、大阪
11. S. Sasaki, M. Urabe, T. Maeda, J. Suzuki, R. Irie, S. Kakizaki, F.J. Gonzalez, and Y. Inoue Induction of hepatocyte-specific gene expression by a novel nuclear receptor 4th International Symposium of Gunma University Medical Innovation and Advanced Micro-Device Engineering 2017年11月6日、前橋商工会議所
12. 秋山萌、守本葵、神成真名、土田雄一、松田強志、齊藤千夏、佐々木翔太、前田つかさ、阪口政清、Frank Gonzalez、井上裕介「肝臓における miRNA を介した新規 HNF4 α ネットワークの解明」第40回日本分子生物学会、2017年12月9日、神戸国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ : <https://sites.google.com/a/gunma-u.ac.jp/wakamatsu-lab/home>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 阪口 政清

ローマ字氏名 : Masakiyo Sakaguchi

所属研究機関名 : 岡山大学

部局名 : 大学院医歯薬総合研究科

職名 : 教授

研究者番号 (8桁) : 70379840

研究分担者氏名 : 柿崎 暁

ローマ字氏名 : Satoru Kakizaki

所属研究機関名 : 群馬大学

部局名 : 大学院医学系研究科

職名 : 講師

研究者番号 (8桁) : 80344935

(2) 研究協力者

該当者なし

※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。