

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K12901

研究課題名(和文) ユビキチンリガーゼによるNASH発症抑制機構の解明

研究課題名(英文) Suppression of non-alcoholic steatohepatitis by ubiquitin ligases in mice

研究代表者

安倍 知紀 (Abe, Tomoki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：00736605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、NASHに対する新たな予防法や治療法の開発のため、ユビキチンリガーゼに着目してNASHの発症メカニズムの解明を目指したものである。本研究により、高脂肪食を摂餌したマウスにおいてユビキチンリガーゼCbl-bは、脂肪肝におけるクッパー細胞と肝臓浸潤マクロファージの活性化を抑制することを見出した。新たな脂肪肝モデルである、食事時刻を乱すことにより肥満や肝脂質の蓄積を誘導したマウスにおいて、肝炎発症に関わると予想されるユビキチンリガーゼの発現変動を見出した。今後、さらに発現変動したユビキチンリガーゼの肝炎発症における生理的意義について研究を継続する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASHは肝硬変や肝がんの発症を介して生命を脅かす重篤な疾患にもかかわらず、有効な治療薬はいまだにない。それは、NASHの発症メカニズムには不明な点が多く残っているためである。本研究ではユビキチンリガーゼという酵素に着目し、NASHの発症メカニズムの解明を目指した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate molecular mechanisms for non-alcoholic steatohepatitis by using mouse models. We found that knockout of Cbl-b promoted lipid accumulation and inflammation in livers of mice fed high-fat diet. In wild-type mice, high-fat diet increased hepatic protein expression levels of Cbl-b. We also used mice fed high-fat high-sucrose diet during sleep phase as novel model of fatty liver. Feeding during sleep phase induced obesity and hepatic lipid accumulation in mice, compared with ad libitum feeding. We found that feeding during sleep phase influenced on expression of several ubiquitin ligases, which may be associated with non-alcoholic steatohepatitis in livers of mice. Further research is needed to elucidate the roles of these ubiquitin ligases in diet-induced fatty liver and non-alcoholic steatohepatitis.

研究分野：分子栄養学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 ユビキチンリガーゼ Cbl-b マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

肥満を基盤病態とするメタボリックシンドロームは、さまざまな疾患の発症の引き金となる。なかでも非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease : NAFLD) は、アルコールとは非依存的に発症する疾患であり、成人健康診断受診者の約 30% に認められる。NAFLD は、予後良好な単純性脂肪肝と進行性の非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis : NASH) に分類される。NASH は、肝臓の線維化を介して肝硬変や肝癌を発症させるため、脂肪肝から NASH への進展予防・治療法の開発が急務である。重大な疾患にもかかわらず、NASH の発症メカニズムには不明な点が多く、有効な治療薬は未だに無かった。

免疫担当細胞であるマクロファージやクッパー細胞の活性化は、NASH 発症において中心的な役割を果たす。脂肪肝から NASH への進展において、マクロファージやクッパー細胞の異常な活性化がいかんして誘発されるかは明らかでなかった。我々はこれまでの研究により、ユビキチンリガーゼ Cbl-b (Casitas B-lineage lymphoma-b) が飽和脂肪酸によるマクロファージの活性化を抑制することを報告した (Abe T. et al. *Diabetes*, 2013.)。マクロファージやクッパー細胞は、飽和脂肪酸や細胞死によって生じた自己由来の核酸を感知することで活性化し、炎症反応を引き起こす。ゆえに、マクロファージやクッパー細胞の活性化の抑制が、NASH の治療標的になると考えられている。しかしながら、NASH 発症に関わるマクロファージ活性化シグナルの調節メカニズムは明らかにされていなかった。

日本人においては、欧米の人たちと比べて体重がそれほど重くないにもかかわらず、脂肪肝を呈する人が多いことが知られている。この 1 つの原因として、日本人においては皮下脂肪の繊維化が起こりやすく、皮下脂肪に蓄積できる脂肪が少ないために肝臓や筋肉などの臓器に異所性に蓄積されてしまうのではないかと考えられている。我々は、脂肪組織の性質だけでなく、生活習慣も脂肪肝や肝炎発症に関わるのではないかと考えている。社会の 24 時間化により、シフトワークに従事する人が多く存在しており、夜間勤務はメタボリックシンドローム発症リスクを高めることは広く知られている。しかし、生活習慣の乱れと脂肪肝や NASH 発症との関連は明らかでなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は、NASH に対する治療や予防法の確立のため、NASH の発症メカニズムをユビキチンリガーゼに着目して解明することを目的とした。単なる食事性脂肪肝だけでなく、生活習慣の乱れたモデルマウスを用いて、肝臓への脂肪蓄積メカニズムの解明にも取り組んだ。

## 3. 研究の方法

実験 1 : Cbl-b 欠損による脂肪肝や NASH への影響

雄性の C57BL/6J バックグラウンドの野生型マウスと Cbl-b 遺伝子欠損マウスを用いて高脂肪食負荷実験を行った。6 週齢になった時点で普通食から高脂肪食へと切り替えた。高脂肪食は HFD-60 (オリエンタル酵母工業) を用いた。高脂肪食を 16 週間摂餌させて後にサンプリングを行い、肝臓における q-PCR 法による遺伝子発現解析とパラフィン切片を用いた免疫組織化学染色 (Cbl-b、F4/80、CD11c) を行った。なお、Cbl-b 欠損マウスを用いた実験は、研究代表者の研究計画申請時の所属先である徳島大学で行った。

実験 2 : 食餌時刻を乱れがマウス肝臓と骨格筋に与える影響

8 週齢の雄性 C57BL/6J 野生型マウスに対して、1 日 8 時間のみ摂餌可能な時間制限給餌を行うことで、マウスの食餌時刻を乱した。1 日のうち明期と暗期が 12 時間ずつの明暗条件下でマウスの飼育を行った。照明が点灯する時間を ZT (Zeitgeber time) 0 とする。マウスは夜行性であるため、活動期の 8 時間 (ZT14~22) のみ摂餌可能な活動期摂餌群と非活動期の 8 時間 (ZT2~10) のみ摂餌可能な非活動期摂餌群との 2 群間で比較を行った。時間制限給餌期間中は高脂肪高ショ糖食 (F2HFHSD、オリエンタル酵母工業) をマウスに給餌し、1 週間または 9 週間の時間制限給餌を行った。時間制限給餌後、血液、肝臓、骨格筋のサンプリングを行った。血液は 1 晩 4 で静置後、遠心することで血清を得て IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) の濃度を Quantikine ELISA キット (R&D システムス) を用いて測定した。肝臓は q-PCR 法を用いて遺伝子発現解析とウェスタンブロッティングにてタンパク質発現量を解析した。骨格筋は凍結切片を作成してヘマトキシリン・エオシン染色後に筋繊維の太さを計測した。

## 4. 研究成果

実験 1 : Cbl-b 欠損による食餌性脂肪肝の増悪と炎症性サイトカイン発現の増大

高脂肪食負荷による肝臓への脂肪蓄積は、Cbl-b 欠損により顕著に増大した。炎症性サイトカインの発現を見てみると、*Il-1β* と *Ccl2* の発現量が野生型マウスに比べて Cbl-b 欠損マウスの肝臓において増大していた (図 1)。

これまでの研究により、脂肪肝になると肝臓における Cbl-b の発現量が約 1.2 倍増大することを見出していた。本研究では、どの細胞において Cbl-b のタンパク質量が増大するのか

免疫組織化学染色を用いて検討した。Cbl-b は肝細胞を含めてさまざまな細胞において発現が認められたが、マクrophージやクッパー細胞のマーカである F4/80 や CD11c の陽性細胞で特に高い発現が認められた。このことは、これまでの研究成果と一致して、Cbl-b は主にマクrophージやクッパー細胞に発現し、脂肪肝から NASH へと進展する過程で起こる炎症反応において重要な役割を果たしていると考えられた。今後、さらに Cbl-b の標的分子の解析を進め、NASH 発症における炎症反応に対する Cbl-b の抑制メカニズムを明らかにしていきたい。

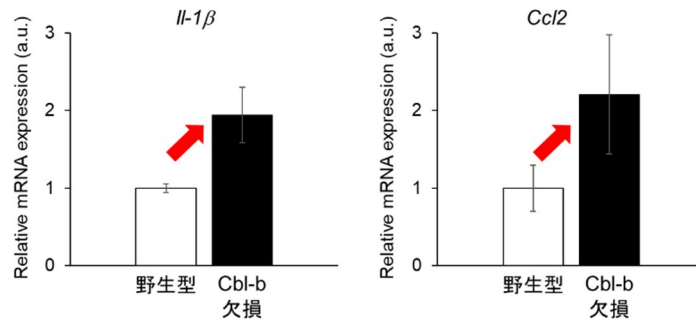


図1.高脂肪食を16週間摂餌したマウスの肝臓における遺伝子発現量各群n = 4。平均値±SEM。

## 実験 2：食餌時刻の乱れによる肝臓の遺伝子発現変動と骨格筋萎縮

時間制限給餌を 1 週間行うと、マウスの肝臓に蓄積した中性脂肪は活動期摂餌群に比べて非活動期摂餌群では約 3 倍増加する (Yasumoto Y. et al. *Metabolism*, 2016)。本研究では、さらに時間制限給餌を 9 週間まで行い、肝臓について解析を行った。9 週間にわたって時間制限給餌を行っても、肝臓への脂質蓄積量や脂質合成関連酵素 (Fatty acid synthase) のタンパク質レベルは 1 週間の時間制限給餌と比べて変化が認められなかった。興味深いことに、活動期摂餌群に比べて、非活動期摂餌群の肝臓においては Cbl-b とは異なるユビキチンリガーゼの mRNA 発現が変動することを見出した。このユビキチンリガーゼは、これまで脂肪肝や NASH 発症に関わるという報告はなく、肝臓における生理的意義については今後さらに検討を続けていく予定である。

研究計画当初は想定していなかったが、脂肪肝や NASH 発症に密接に関わる骨格筋に対する食餌時刻の乱れが与える影響についても検討を行った。活動期摂餌群に比べて、非活動期摂餌群では四肢の握力と腓腹筋重量が約 10% 低下することを見出した。腓腹筋における筋繊維の太さも非活動期摂餌群では細くなっていたことから、食餌時刻の乱れは筋萎縮を引き起こすことが分かった (図 2)。食餌時刻の乱れによる筋萎縮は、血中 IGF-1 濃度の低下が原因であることも明らかにした (Abe T. et al. *Arch Biochem Biophys*, 2019.)

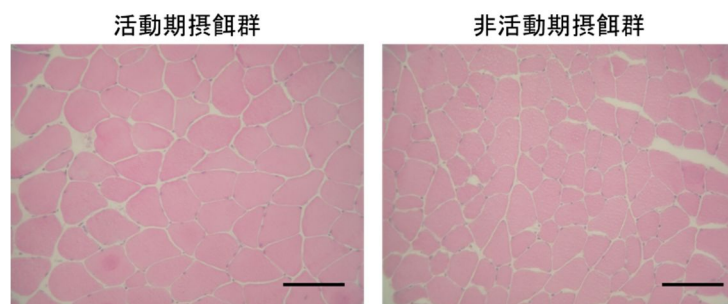


図2.時間制限給餌1週間後のマウス腓腹筋の断面図  
スケールバー = 100 μm

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tomoki Abe, Saori Yamamoto, Tatsuya Konishi, Yoshinori Takahashi, Katsutaka Oishi	4. 巻 82
2. 論文標題 Maternal fish oil supplementation ameliorates maternal high-fructose diet-induced dyslipidemia in neonatal mice with suppression of lipogenic gene expression in livers of postpartum mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrition Research	6. 最初と最後の頁 34-43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nutres.2020.07.003.	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 Abe Tomoki, Kazama Rei, Okauchi Hiroki, Oishi Katsutaka	4. 巻 677
2. 論文標題 Food deprivation during active phase induces skeletal muscle atrophy via IGF-1 reduction in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108160 ~ 108160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2019.108160	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安倍知紀、大石勝隆
2. 発表標題 摂食のタイミングの乱れはIGF-1の減少を介して骨格筋を萎縮させる
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安倍知紀
2. 発表標題 食餌時刻の乱れがマウス骨格筋に与える影響
3. 学会等名 第67回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoki Abe, Katsutaka Oishi
2. 発表標題 Food deprivation during active phase induces skeletal muscle atrophy in mice
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安倍知紀、風間玲、大石勝隆
2. 発表標題 摂食タイミングの乱れは骨格筋を萎縮させる
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安倍知紀、風間玲、大石勝隆
2. 発表標題 非活動期の時間制限給餌による脂肪組織の肥大化メカニズム
3. 学会等名 第5回時間栄養科学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安倍知紀、風間玲、大石勝隆
2. 発表標題 活動リズムに同期したインスリンの分泌リズムが骨格筋量の維持に重要である
3. 学会等名 第25回時間生物学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安倍知紀、風間玲、大石勝隆
2. 発表標題 非活動期の時間制限給餌による脂肪組織の肥大化メカニズム
3. 学会等名 第13回環境生理学プレコンgres
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関