

令和元年6月21日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16153

研究課題名(和文)小胞体ストレスと脂肪肝発症を仲介する小胞体膜タンパク質ILDR2の分子機構の解明

研究課題名(英文)The role of ILDR2 in ER stress and hepatic steatosis.

研究代表者

渡邊 和寿(Watanabe, Kazuhisa)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：60724416

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)：脂肪肝は肝硬変や肝がんへ進行するため、その予防・治療法の開発が急務である。2型糖尿病感受性遺伝子Ildr2は小胞体に局在する膜タンパク質をコードしているが、生理的役割や機能は不明である。我々はILDR2結合タンパク質、MBOAT7を同定しており、MBOAT7はホスファチジルイノシトール(PI)の脂肪酸転移酵素として知られている。そこで、ILDR2が脂肪肝におけるPIの質的变化に関与するか否かを肝臓特異的ILDR2欠損マウス(LKO-ILDR2)にメチオニン・コリン欠乏食を与えた脂肪肝モデルマウスを作製し、肝臓中PIを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はILDR2の機能に関して、局在や結合タンパク質の同定、さらにノックアウトマウスを解析することによりその個体レベルでの意義を明らかにした。この研究過程で、ILDR2が肝臓中リン脂質の質的变化に関与し、脂肪肝発症に関与することが示唆された。脂肪肝の直接の治療法はないため、ILDR2の機能解明は脂肪肝の治療法開発の分子基盤になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with obesity and type 2 diabetes and increases the risk for liver cirrhosis and cancer. A diabetes susceptibility gene, Ildr2, encodes a transmembrane protein localized to the ER membrane whose physiological functions are unknown. We previously identified ILDR2 interaction protein, MBOAT7, which mediates acyl-chain remodeling of phosphatidylinositols (PIs). We hypothesized that ILDR2 may influence hepatic PI composition in NAFLD. In LKO-ILDR2 mice fed on the MCD diet compared to AAV-GFP injected Ildr2 floxed (GFP-flox) mice fed on the MCD diet, liver triglyceride content was significantly increased by 1.6-fold in LKO-ILDR2 mice compared to GFP-flox mice, hepatic PI was significantly increased. Manipulation of hepatic ILDR2 expression is associated with changes in PI molecular species in the liver.

研究分野：代謝学

キーワード：脂肪肝 ILDR2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、脂肪肝は糖尿病など、メタボリックシンドロームの病態と深く関与していることが注目されている。脂肪肝は2型糖尿病のリスク因子だけでなく、肝硬変や肝がんへ進行するため、その予防・治療法の開発が急務である。以前、我々はQTL解析により新規糖尿病感受性遺伝子 *Ildr2* を同定し、マウス肝臓における ILDR2 ノックダウンが脂肪肝を誘導することを見出した¹。さらに、ILDR2 機能解明のため、免疫沈降法及びMALDI-TOF-MSを用いてILDR2結合タンパク質、MOBAT7を同定した²。MBOAT7はホスファチジルイノシトール(PI)のアシル転移酵素であり、MBOAT7 rs641738 Tアリルは脂肪肝のリスクを増大させ、肝臓中PIの変容に関連することが報告されている³。しかし、ILDR2がMOBAT7とどのように相互作用し脂肪肝発症に関与するのかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、脂肪肝発症におけるILDR2の役割・意義を分子レベルで解明するために、ILDR2と結合するタンパク質MBOAT7に着目し、ILDR2が肝臓中PI組成の変化に影響を及ぼすか否かを検討し、ILDR2-MOAT7の相互作用の機能解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肝臓特異的ILDR2欠損マウス及びILDR2過剰発現マウスの作製

我々はすでにILDR2-floxマウスを作製しており、今回の研究では、ILDR2-floxマウスにAAV-Creを投与した肝臓特異的ILDR2ノックアウトマウス(LKO-ILDR2)を用いる。肝臓における *Ildr2* 発現量は、LKO-ILDR2マウス肝臓を採取し、リアルタイムPCRによってmRNA量を確認した。本研究では、AAV投与後メチオニン・コリン欠乏(MCD)食を与えて脂肪肝を誘導したLKO-ILDR2マウスを実験に用いて測定・解析する。

(2) 肝臓脂質含量の測定

12時間絶食させたMCD食LKO-ILDR2マウスの肝臓を採取し、Bligh-Dyer抽出法を用いて肝臓中の脂質を抽出し、中性脂肪とコレステロール量を測定する。肝臓切片を作成しOil-Red-O染色により脂肪滴の程度を観察する。

(3) VLDL分泌の測定

肝臓におけるILDR2欠損及び過剰発現によるVLDL分泌の影響を検討するため、マウスを16時間絶食後、リポタンパクリパーゼ阻害剤であるTyloxapol(500mg/kg)を静脈注射し、その後1時間おきに4時間まで採血し、血漿中性脂肪を測定する。

(4) 肝臓中のリン脂質測定

肝臓におけるILDR2欠損及び過剰発現による肝臓中リン脂質の影響を測定するため、LC-MS/MSを用いてリン脂質分析する。

4. 研究成果

(1) MCD食LKO-ILDR2マウスの作製

LKO-ILDR2の肝臓 *Ildr2* mRNAはコントロールであるAAV-GFP投与ILDR2-floxマウス(GFP-flox)に比べ90%以上抑制されていた(Fig. 1)。

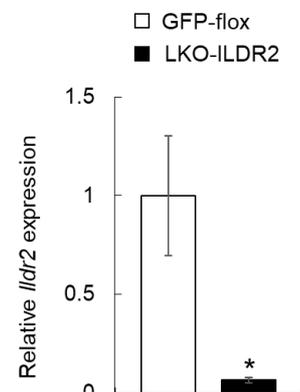


Fig. 1. MCD食を与えたLKO-ILDR2マウス肝臓の *Ildr2* 発現量
*P<0.01

(2) 肝臓脂質への影響

Oil-Red-O 染色において、MCD 食 LKO-ILDR2 ではコントロールに比べ脂肪滴が肥大化し、中性脂肪の蓄積増加が観察された。実際に、肝臓中性脂肪は 1.6 倍有意に増加し、コレステロールにおいても 2.5 倍有意に増加した (Fig. 2)。

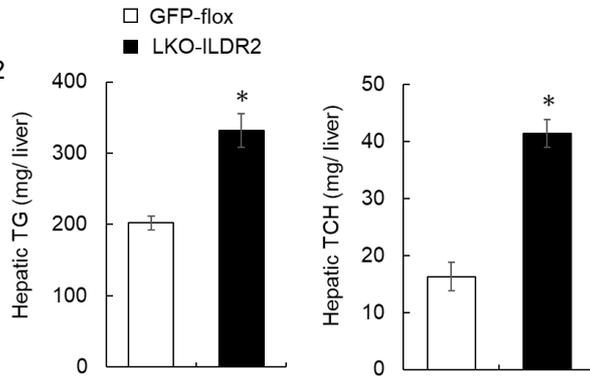


Fig. 2. MCD食を与えたLKO-ILDR2マウス肝臓は中中性脂肪及びコレステロールが有意に増加する。*P<0.01

(左図) 肝臓中中性脂肪。(右図) 肝臓中トータルコレステロール。

(3) VLDL 分泌の影響

LKO-ILDR2 では肝臓脂質が蓄積していたことから、VLDL の分泌に影響がある可能性が考えられた。そこで、Tyloxapol 投与下で VLDL 分泌を検討した。MCD 食 LKO-ILDR2 ではコントロールに比べ VLDL 分泌が低下した。したがって、LKO-ILDR2 の肝臓脂質蓄積は VLDL 分泌低下によるものと考えられた (Fig. 3)。

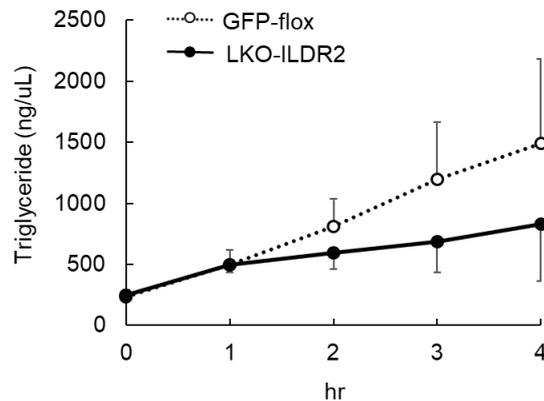


Fig. 3. MCD食を与えたLKO-ILDR2マウス肝臓はVLDL分泌が低下する。

マウスを16時間絶食後Tyloxapolを投与し、経時的に採血し、中性脂肪を測定した。

(4) 肝臓中のリン脂質の影響

LKO-ILDR2 マウスにおいて、肝臓中 PI 分子種はコントロールと比べ増加した (Fig. 4)。

(5) 研究成果のまとめ

当初、LKO-ILDR2 マウスの肝臓中 PI の分子種はこれまで報告されている MBOAT7 ノックアウトマウスの肝臓中 PI 分子種の構成と類似すると推測していたが、予想に反した結果となった。ILDR2 は直接 MBOAT7 の活性に変化を与えなかったが、肝臓中のリン脂質の構成に ILDR2 が関与する可能性があるため、今後さらなる ILDR2 の役割を解明する必要がある。

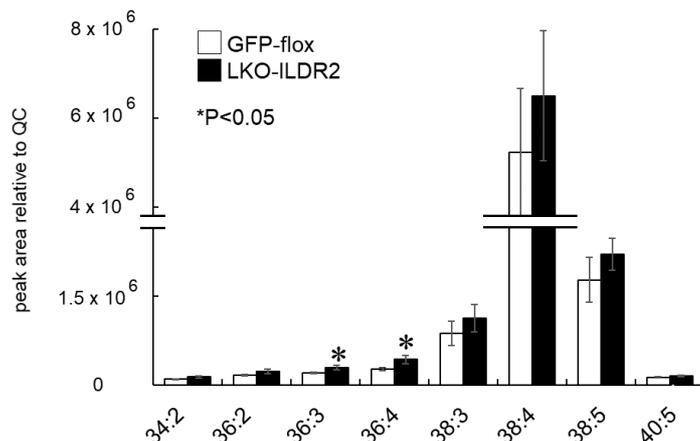


Fig. 4. MCD食を与えたLKO-ILDR2マウスの肝臓中のPI分子種の変化

< 引用文献 >

1. Watanabe K et al. ILDR2: an endoplasmic reticulum resident molecule mediating hepatic lipid homeostasis. PLoS One 8 (2013) e67234.
2. Watanabe K et al. ZNF70, a novel ILDR2-interacting protein, contributes to the regulation of HES1 gene expression. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Sep 2;477(4):712-716.

3. Luukkonen PK et al. The MBOAT7 variant rs641738 alters hepatic phosphatidylinositols and increases severity of non-alcoholic fatty liver disease in humans. *J Hepatol.* 2016 Dec;65(6):1263-1265.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Watanabe K, Yoshida K, Iwamoto S: Kbtbd11 gene expression in adipose tissue increases in response to feeding and affects adipocyte differentiation. *J Diabetes Investig.* 2018 Dec 24. doi: 10.1111/jdi.12995. (査読有)

Millings EJ, De Rosa MC, Fleet S, Watanabe K, Rausch R, Egli D, Li G, LeDuc CA, Zhang Y, Fischer SG, Leibel RL.: ILDR2 has a negligible role in hepatic steatosis. *PLoS One.* 2018 May 30;13(5):e0197548. (査読有)

〔学会発表〕(計2件)

Watanabe K, Nakayama K, Yoshida K, Millings E, LeDuc C, Leibel R, and Iwamoto S; ILDR2 alters hepatic phospholipid composition via Mboat7: effects on liver fat. American Diabetes Association's 78th Scientific Sessions (June 2018, Orlando, USA)

渡邊和寿、中山 一大、吉田健、Millings Elizabeth、Leduc Charles、Leibel Rudolph、岩本 禎彦：脂肪肝におけるリン脂質の変化とILDR2の役割、2018年7月、第50回 日本動脈硬化学会総会・学術集会 Cutting-Edge Symposium、大阪

〔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://www.jichi.ac.jp/laboratory/molecula/human/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

Rudolph Leibel

Columbia University

Department of Pediatrics • Professor