

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：32704

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07982

研究課題名(和文) NASH発症過程におけるリン脂質の産生および転移による脂肪滴形成促進の分子機構

研究課題名(英文) The mechanism of lipid droplet formation

研究代表者

伊藤 雅方 (Ito, Masanori)

関東学院大学・栄養学部・准教授

研究者番号：20459811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪肝では肝細胞において脂肪滴の形成が促進され、過度な中性脂肪(TG)が蓄積している。脂肪滴表面の脂質一重膜はホスファチジルコリン(PC)が大部分を占める。今回、PCを脂質膜間で転移させる活性を有するSTARD10 (Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer domain containing 10)とLands' 経路でPC産生を担うリソPCアシル基転移酵素であるLPCAT1 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 1)が協調して脂肪滴形成を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満人口の増加にともない非アルコール性脂肪性肝疾患(nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD)及びNAFLDが進行した非アルコール性脂肪性肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis; NASH)が増加傾向にある。NASHは肝硬変・肝癌へと進行する。そのためNAFLD/NASHの予防法や診断法の確立が急務である。本研究では脂肪滴表面を構成するリン脂質に着目した。その結果リン脂質を産生するLPCAT1とリン脂質を転移するSTARD10の協調による脂肪滴形成促進機構の存在が示唆された。これはNAFLD/NASHの病態の理解に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Lipid droplet (LD) is surrounded by phospholipid monolayer mainly composed of phosphatidylcholine (PC). Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer domain containing 10 (STARD10) has been shown to transfer PC between membranes in vitro. Lysophosphatidylcholine acyltransferase1 (LPCAT1) catalyzes the conversion of lysoPC to PC. STARD10 and LPCAT1 were partly co-localized at the surface of LD. The number of small LDs was increased by LPCAT1 overexpression, while the number of large LDs was increased by the overexpression of both STARD10 and LPCAT1 in mouse hepatoma cells (Hepa1-6). The percentage of small LDs was significantly higher in Stard10 knockout Hepa1-6 cells than that of normal Hepa1-6 cells. In the liver of Stard10 knockout mice, the total LD area was smaller and the sphericity of LD was lower than those of wild type mice. These results indicate that STARD10 and LPCAT1 are involved in LD formation by regulating surface-to-volume ratio.

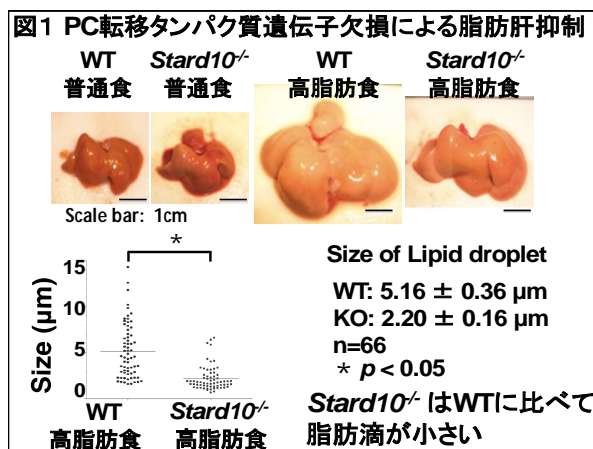
研究分野：栄養生化学、応用遺伝学

キーワード：脂質 脂肪肝 肝炎 NAFLD NASH 脂肪滴 リン脂質 ホスファチジルコリン

1. 研究開始当初の背景

我が国の肝癌による死亡者は年間 3 万人を超え、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD: nonalcoholic fatty liver disease) から引き起こされる非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis; NASH) が原因と考えられる非ウイルス性の肝癌は肥満人口の増加とともに増加傾向にある(平成 27 年度 肝がん白書 日本肝臓学会編)。そのため、NAFLD/NASH の予防法や診断法の確立が急務となっている。NAFLD は肝細胞に過度のトリグリセリド(TG)が蓄積した状態であり、肝細胞には脂肪滴が発達している。脂肪滴表面の脂質一重膜は主としてホスファチジルコリン(PC)を含む。研究代表者らは、肝細胞における脂肪滴発達の分子機構の解明を目指して、PC を脂質膜間で転移させる活性を有する STARD10 (Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer domain containing 10)に着目して研究を遂行してきた。その結果、STARD10 は肝臓で高発現すること、及び *Stard10* 遺伝子欠損マウス (*Stard10*<sup>-/-</sup>) の解析から、STARD10 が胆汁酸代謝および肝臓脂肪蓄積量の制御に関わることを明らかにしてきた (Ito et al., *Biochim Biophys Acta*. 2013)。高脂肪食負荷により *Stard10*<sup>-/-</sup> マウスは野生型マウス(WT)に比べて肝臓への脂肪蓄積が抑制され、脂肪滴の直径も小さい(図 1)。

以上の背景から、NAFLD/NASH の発症において STARD10 が促進的に作用することが強く示唆された。しかし、*Stard10*<sup>-/-</sup> マウスは脂肪蓄積をしないわけではない。先に記述したように、脂肪滴は PC を大部分が占める脂質一重膜で形成されているため、脂肪滴形成には PC 産生を担う酵素が必須であると予想される。PC は de novo 経路で合成された後に Lands' 経路で成熟する。Lands' 経路で PC 産生を行うリゾ PC アシル基転移酵素である LPCAT1 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 1) は、コリン欠乏食によりマウスに NASH を誘導すると肝臓における発現が上昇すること、肝癌組織で高発現し、組織中 PC のアシル基構成を変化させることが知られている。また、LPCAT1 と相互作用する分子として STARD10 が同定され、肺サーファクタントの主成分である DPPC (Dipalmitoyl phosphatidylcholine) の形成が STARD10 により促進され得るとの報告がされた。しかし、LPCAT1 の肝臓での機能については報告がない。脂肪滴膜の主成分である PC の産生能は脂肪滴サイズに大きな影響を与えることが予想されることから、肝臓においても LPCAT1 が STARD10 と協調して脂肪滴の形成を促進している可能性が考えられる。



<引用文献>

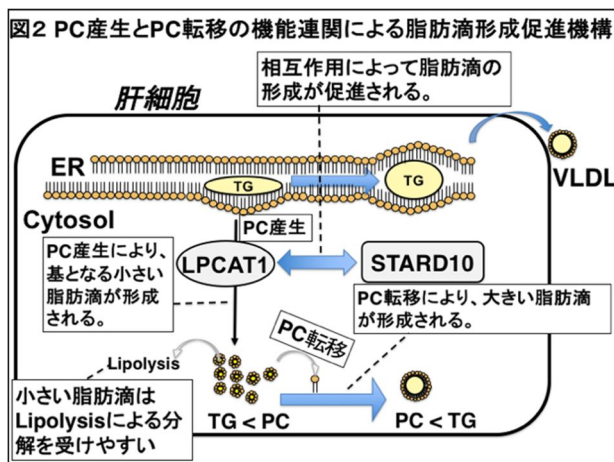
Ito M, Yamanashi Y, Toyoda Y, Izumi-Nakaseko H, Oda S, Sugiyama A, Kuroda M, Suzuki H, Takada T, Adachi-Akahane S.

Disruption of *Stard10* gene alters the PPARα-mediated bile acid homeostasis.

*Biochim Biophys Acta*. 2013; 1831: 459-468.

2. 研究の目的

前項の研究開始当初の背景から、NASH 発症過程で進行する脂肪滴の形成においてリン脂質代謝(PC 転移活性や PC 産生)はどのような役割を担うのかを明らかにすることを研究の目的とした。研究代表者らは PC 転移タンパク質の研究において、*Stard10*<sup>-/-</sup>マウスの作製やゲノム編集による培養細胞の系の確立を行い、PC 転移タンパク質の脂質代謝における役割について研究を進めてきた。肺における PC 転移タンパク質と PC 産生酵素の相互作用は報告されているが、脂肪滴形成における PC 産生酵素と PC 転移タンパク質の機能連関についての研究は皆無である。そこで、『肝細胞において PC 転移タンパク質である STARD10 と PC 産生酵素である LPCAT1 が協調して脂肪滴サイズを制御する』という仮説(図 2)を検証しそのメカニズムを明らかにしたいと考えた。



### 3. 研究の方法

野生型マウスおよび遺伝子欠損マウスにコリン欠乏食負荷を行うことで NAFLD/NASH を誘導した。その後、肝臓の切片を NileRed 染色し、観察することで脂肪滴の発達を組織学的に解析した。さらに、マウス肝臓由来細胞 (Hepa1-6) からゲノム編集により作製した STARD10 のノックアウト株に STARD10 や LPCAT1 を過剰発現させることで脂肪滴形成がどのような影響を受けるかを観察した。

### 4. 研究成果

研究代表者らの予備的検討により、Hepa1-6 細胞における Pull-down 実験で LPCAT1 と STARD10 の相互作用が確認された。さらに、蛍光タンパク質融合遺伝子発現実験では、脂肪滴表面で STARD10 と LPCAT1 の共局在が確認された。コリン欠乏食 (CDAA) 負荷による NASH の発症過程を、野生型マウスと *Stard10*<sup>-/-</sup>マウスとで比較検討した。CDAA 負荷により、体重変化に差はなかったが、肝臓の組織重量の増加率は、野生型マウスと比べて *Stard10*<sup>-/-</sup>マウスでは有意に低かった。肝臓における脂肪滴の大きさは、野生型マウスに比べて *Stard10*<sup>-/-</sup>マウスでは有意に小さかった。さらに、肝臓における炎症性サイトカイン IL-1 (Il1b) や TNF- $\alpha$  (Tnfa) および線維化マーカーの遺伝子発現上昇の程度は、野生型マウスに比べて *Stard10*<sup>-/-</sup>マウスは著明に低かった。また、免疫染色による解析では、CDAA 負荷により野生型マウス肝臓において Kupffer と考えられる F4/80 陽性細胞の数が増加したのに対して、*Stard10*<sup>-/-</sup>マウスではそれらの増加が認められなかった。免疫染色の結果から、肝臓における STARD10 の発現細胞は肝細胞であると考えられるが、Kupffer 細胞に STARD10 が発現している可能性も考え、その確認のため、野生型マウスと *Stard10*<sup>-/-</sup>マウス (陰性対照) の肝臓から F4/80 陽性細胞を回収し qRT-PCR 解析を行った。その結果、F4/80 陽性細胞に *Stard10* 遺伝子の発現は認められなかった。さらに、STARD10 欠損 Hepa1-6 細胞に LPCAT1 を過剰発現させると比較的小さい脂肪滴の割合が増加し、STARD10 及び LPCAT1 の共発現で大きい脂肪滴の割合が増加した。そのことから STARD10 と LPCAT1 とが協調して脂肪滴形成を促進すると考えられた。このことをマウス個体で確認するため、アデノウイルスベクターを用い *Lpcat1* 遺伝子を過剰発現させると肝細胞に脂肪滴が増加した。脂肪滴は TG を PC 等のリン脂質一重膜が覆う構造をしており、TG と PC の比率がその脂肪滴の大きさを決定すると考えられる。つまり TG が一定とすると、PC が多い場合は小さい脂肪滴となり、少ない場合大きい脂肪滴となる。LPCAT1 は PC を産生することにより、基となる小さい脂肪滴の形成を促進する。仮説 (図 2) に基づけば、『STARD10 は、LPCAT1 によって産生された PC を小さい脂肪滴から抜き取り PC : TG 比を低下させ、大きい脂肪滴の形成に貢献する。』と考えられる。以上の結果はその仮説と矛盾しなかった。要約すると、STARD10 はその PC 転移活性により肝細胞における脂肪滴形成を PC 産生酵素である LPCAT1 と協調して促進し、Kupffer 細胞の活性化および IL-1 や TNF $\alpha$  の産生誘導を介して NASH の進行に関与すると考えられる。NAFLD/NASH の予防や診断の開発をする上では肝細胞における脂肪蓄積関連分子の機能についての情報が有用と考えられる。そのため、脂肪滴形成の分子機構を PC 産生や PC 転移の観点から解明を試みた本研究の成果は、NAFLD/NASH の予防及び診断に貢献するものであると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 伊藤雅方	4. 巻 14
2. 論文標題 脂質転移たんぱく質の機能について	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 関東学院大学教養学会年報	6. 最初と最後の頁 17-18
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 伊藤雅方	4. 巻 21
2. 論文標題 生化学の視点からの栄養学	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 関東学院大学人間環境研究所所報	6. 最初と最後の頁 46-48
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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 伊藤雅方
2. 発表標題 生化学視点からの栄養学
3. 学会等名 人間環境研究所 2022年度 第2回研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ito M, Ohshima D, Mikami Y, Tomida T, Adachi-Akahane S
2. 発表標題 Disruption of steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer domain containing 10 (STARD10) prevents the development of nonalcoholic steatohepatitis (NASH)
3. 学会等名 The 94th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ito M, Ohshima D, Tomida T, Mikami Y, Adachi-Akahane S
2. 発表標題 The role of steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer domain containing 10(STARD10) in the development of nonalcoholic steatohepatitis (NASH)
3. 学会等名 The 93rd Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤雅方, 大島大輔, 富田太郎, 三上義礼, 赤羽悟美
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の発症における脂質転移タンパク質STARD10の役割
3. 学会等名 第141日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ito M, Tomida T, Mikami Y, Ohshima D, Adachi-Akahane S
2. 発表標題 STARD10 promotes lipid droplet formation cooperatively with LPCAT1
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 雅方, 富田 太郎, 三上 義礼, 大島 大輔, 赤羽 悟美
2. 発表標題 脂質転移タンパク質とリゾリン脂質アシル基転移酵素による脂肪滴形成促進機構
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 雅方, 富田 太郎, 三上 義礼, 大島 大輔, 赤羽 悟美
2. 発表標題 肝細胞脂肪滴形成における脂質転移タンパク質STARD10 (Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer domain containing 10) の役割について
3. 学会等名 第248回生理学東京談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤 雅方, 富田 太郎, 三上 義礼, 大島 大輔, 高橋 佳一, 進藤 英雄, 清水 孝雄, 赤羽 悟美
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウスを利用した脂肪滴形成におけるリン脂質転移タンパク質とリン脂質産生酵素の役割
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤 雅方, 富田 太郎, 三上 義礼, 大島 大輔, 赤羽 悟美
2. 発表標題 肝細胞における脂質転移タンパク質とPC産生酵素による脂肪滴形成促進機構
3. 学会等名 生理学研究所 研究会 2018「心臓・血管系の頑健性と精緻な制御を支える分子基盤の統合的解明」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ito M, Tomida T, Mikami Y, Murakami S, Adachi-Akahane S
2. 発表標題 Crucial role of STARD10 in regulating lipid storage in mouse model of nonalcoholic steatohepatitis (NASH)
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
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
---------	---------