

令和 3 年 4 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08495

研究課題名(和文) 肝臓における 3脂肪酸欠乏の認識機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of metabolic adaptation to omega-3 fatty acid deficiency in the liver

研究代表者

菱川 大介 (Daisuke, Hishikawa)

東京医科歯科大学・統合研究機構・プロジェクト助教

研究者番号：10569966

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)：オメガ3脂肪酸の1つであるドコサヘキサエン酸(DHA)は生体において必須の役割を有し、その欠乏は精子形成や視覚、神経機能に異常を引き起こす。しかしながら哺乳動物自身はそれらを産生することができないため食事などから摂取する必要がある。本研究はDHA欠乏時の肝臓における脂質代謝における変化について解析を行った。解析の結果、生体におけるDHAの欠乏は肝細胞において認識され、転写因子であるSREBP1を介してDHAの合成に関与する酵素群を誘導するという恒常性維持機構が存在することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドコサヘキサエン酸(DHA)は主要なオメガ3脂肪酸の1つで、脳機能や精子形成、視覚機能などに必須の役割を有することが知られている。しかしながらヒトを含む哺乳動物はDHAを生体内で合成することができないため、食事から摂取する必要がある。過去の研究からDHA欠乏における生体機能の異常については明らかにされてきたが、DHA欠乏時の生体の適応機構については不明な点が多く残されている。本研究は、DHA欠乏は肝臓において認識されること、また肝臓においてDHA欠乏時には代償的に他の多価不飽和脂肪酸を増加させ、全身の組織に供給する機構があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Docosahexaenoic acid (DHA), an omega-3 polyunsaturated fatty acid, plays essential roles in mammals, and its deficiency causes abnormalities in spermatogenesis, visual, and neuronal function. However, mammals cannot produce DHA themselves de novo, thus it is necessary to obtain it from dietary sources. In this study, we investigated the hepatic metabolic changes under DHA deficiency using mice deficient in AGPAT3, a critical enzyme for DHA-containing phospholipid biosynthesis. Our results showed that DHA deficiency is recognized in the hepatocytes and leads to compensatory increase of other polyunsaturated fatty acid through SREBP1-dependent induction of polyunsaturated fatty acid synthesis related genes.

研究分野：脂質生化学

キーワード：ドコサヘキサエン酸 オメガ3脂肪酸 脂質代謝 生体膜リン脂質 多価不飽和脂肪酸 肝臓

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の食の欧米化に伴い、コレステロールや飽和脂肪酸の摂取量が増加した事は、肥満、糖尿病、脂肪肝やそれに付随する心血管系障害のリスクを高めている。逆に、ほ乳類が生体で合成できない必須脂肪酸であり、多価不飽和脂肪酸の一種であるオメガ 3( 3)脂肪酸は、その摂取が心血管系障害のリスクを低減する可能性が示唆されて以来、その効果とその機構について多くの研究がなされてきた。これまでに、 3 脂肪酸欠乏食を使用した研究などにより、発達、生殖、視覚、認知機能などにおける重要性が報告されている(Hishikawa D. et al., FEBS Lett., 2017)。

3 脂肪酸が豊富に存在する組織として、脳や網膜、精巣など 3 脂肪酸の欠乏が機能に異常を及ぼす臓器がよく知られているが、それらに加えて肝臓もまた非常に多くの 3 脂肪酸を有する組織である(Harayama T. et al., Cell Metabolism, 2014)。にもかかわらず、 3 脂肪酸の欠乏が肝臓の機能に与える影響については不明な点が多い。さらに、 3 脂肪酸欠乏食をマウスに与えた場合、肝臓における 3 脂肪酸含量は速やかに減少するのに対し、脳や精巣など、 3 脂肪酸が重要な機能を持つ臓器ではその変化が小さいという報告がある(Stroud CK. et al., J. Lipid Res., 2009)。これらの結果は肝臓が 3 脂肪酸欠乏時には全身に供給する役割を担っていることを示唆しているが、その機構や意義については明らかとなっていない。生体に必須の機能を持ち、かつ上記のように様々な疾患のリスクへの抑制効果が示されている 3 脂肪酸の全身における制御機構の解明は、脂質代謝異常関連疾患の新たな治療標的の発見や、それらの活性を調節する低分子化合物の探索にもつながる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究は、肝臓が全身の 3 脂肪酸の貯蔵庫としての役割を担っており、 3 脂肪酸の欠乏時には、それを認識し全身に供給する、という仮説のもと、肝臓における 3 脂肪酸量のセンサー分子の同定とその認識機構の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

代表的な 3 脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(DHA)を含め、脂肪酸は細胞内においてその多くが生体膜リン脂質に結合した形で存在している。そこで本研究では、DHA 欠乏動物モデルとして DHA 含有リン脂質の主要な合成酵素である 1-acyl-sn-3-glycerol-3-phosphate acyltransferase 3 (AGPAT3)の欠損マウスを用いた解析を行った。また、全身性 AGPAT3 欠損マウスは脳や網膜など様々な組織において DHA 含有リン脂質が欠乏している。そこで肝細胞特異的な DHA 欠乏モデルを構築するため、アルブミン CreERT2 マウスと AGPAT3 flox マウスを掛け合わせ、生後 1 日目、2 日目にタモキシフェンを投与することにより肝細胞特異的な AGPAT3 欠損マウスを作成し、解析を行った。

上記マウスの組織および血液中のリピドミクス解析には、ガスクロマトグラフィーおよび液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)を用いた。肝臓におけるトランスクリプトーム解析には、DNA マイクロアレイを用いた。

本研究により同定された DHA 含有リン脂質の欠乏感受性転写因子である Sterol regulatory element binding protein-1(SREBP1)の発現抑制実験はアデノウイルスを用いて SREBP1 遺伝子に対する short hairpin RNA を発現させる方法を用いた。本研究で同定した SREBP1 による DHA 含有リン脂質量依存的な発現調節の解析は、 3 脂肪酸含量の異なる二種類の餌をマウスに給餌することにより行った。

### 4. 研究成果

#### (1) LPAAT3KO マウスの肝臓における脂質組成および遺伝子発現

はじめに、AGPAT3 欠損およびコントロールマウス肝臓の脂肪酸組成の比較を行った。AGPAT3 欠損マウスでは予想された通り DHA 量の著しい低下が見られた(図 1A, 青矢印)。加えて、意外なことに 6 脂肪酸であるアラキドン酸が AGPAT3 で特異的に増加していた(図 1A, 赤矢印)。マイクロアレイを用いてコントロールと AGPAT3 欠損マウス肝臓のトランスクリプトーム解析を行

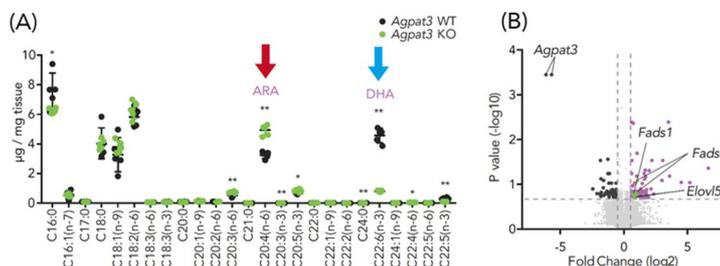


図 1: AGPAT3 欠損(KO)および野生型(WT)マウス肝臓におけるリピドミクス(A)およびトランスクリプトーム(B)解析。(A)肝臓組織重量あたりの脂肪酸含有量の比較。DHA, ドコサヘキサエン酸; ARA, アラキドン酸 (B)マイクロアレイ解析の結果のボルケーノプロット。KO で増加した遺伝子をマゼンタ、減少したものを黒、変動のなかったものをグレーで示した。多価不飽和脂肪酸合成に関与する遺伝子を緑で示している。(Hishikawa et al., iScience, 2021 より一部改変)

った結果、欠損マウスにおいて多価不飽和脂肪酸の合成に関与する遺伝子群が増加していた(図1B)。アラキドン酸とDHA、それぞれの前駆体からの合成には共通の酵素(FADS1, FADS2, ELOVL2, ELOVL5)が使用されるため、DHA 欠乏時にはこれらの酵素が誘導されることで多価不飽和脂肪酸の合成が促進される可能性が示された。

## (2)肝細胞におけるDHA含有リン脂質欠乏の認識

続いて、DHA 欠乏による多価不飽和脂肪酸合成酵素の誘導が肝臓以外の組織でも見られるかについて解析を行った。AGPAT3 欠損マウスにおけるDHA含有リン脂質は解析したすべての組織(脳、褐色脂肪、白色脂肪、腎臓、心臓、骨格筋、小腸)において減少していたにもかかわらず、多価不飽和脂肪酸合成酵素群の誘導は肝臓においてのみ見られた(図2A)。これらの結果はDHA含有リン脂質の欠乏認識は肝臓特異的である可能性を示唆している。この機構を詳細に解析するために、肝細胞特異的AGPAT3欠損(LKO)マウスを作成した。AGPAT3LKOマウスにおいても多価不飽和脂肪酸合成酵素の誘導、アラキドン酸の増加が見られたことから、DHA含有リン脂質欠乏に対する転写応答は肝細胞において起きていると考えられた。また、これら酵素群の転写調節因子のうちSREBP1の核内タンパク量がAGPAT3LKOマウス肝臓において増加していることから、DHA含有リン脂質欠乏時の転写応答にSREBP1が関与する可能性が示唆された。この結果と一致して、SREBP1の発現抑制により肝臓におけるこの転写応答はキャンセルされた(図2B)。

3脂肪酸を多く含む魚油などを摂取することは、本研究で明らかになったDHA含有リン脂質欠乏時とは逆に、肝臓におけるSREBP1を抑制することが知られている(Shimano H. et al. Nature Reviews, 2017)。この抑制にもDHA含有リン脂質量が寄与するかどうかを解析するため、AGPAT3LKOおよびコントロールマウスに3脂肪酸が豊富な魚油もしくは

3脂肪酸をほとんど含まない紅花油を与え、肝臓における遺伝子発現を比較した。過去の報告と一致して、コントロールマウスにおいて、魚油を含む餌の摂取はSREBP1とその標的である多価不飽和脂肪酸合成遺伝子を抑制した。それに対してAGPAT3LKOマウスにおいてはエサによる影響がコントロールに比べて小さかった。これらの結果は、SREBP1がDHA含有リン脂質量に応答して多価不飽和脂肪酸合成酵素発現レベルを調節していることを示している。

## (3)肝臓による全身の多価不飽和脂肪酸量の調節

最後に、肝細胞特異的なDHA含有リン脂質の欠乏が他の組織の脂質組成に与える影響を解析した。肝臓と同様に血液においても、AGPAT3LKOマウスではDHA含有リン脂質の減少とアラキドン酸含有リン脂質の増加が認められた(図3A)。重要なことに、AGPAT3LKOマウスのその他の組織、とりわけ脳においてDHA含有リン脂質の減少とアラキドン酸含有リン脂質の増加がみられた(図3B)。これらの結果から、生体におけるDHA欠乏時には肝臓においてSREBP1依存的な多価不飽和脂肪酸合成が高まり、その結果増加した多価不飽和脂肪酸は血液を介してその他の組織の供給されていることが明らかとなった(Hishikawa D. et al. iScience, 2020)。

DHAやその他の多価不飽和脂肪酸は生体の様々な組織において重要な役割を持つ一方で、不飽和脂肪酸は酸化されやすく、細胞毒

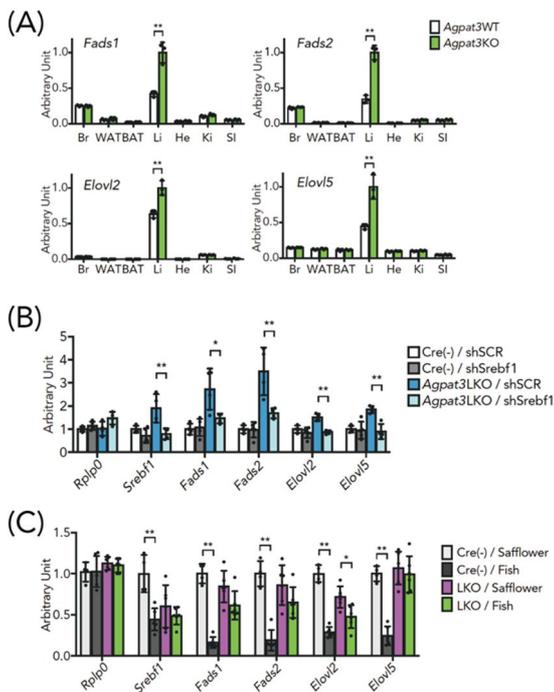


図2: (A)マウス組織における多価不飽和脂肪酸合成酵素遺伝子の発現 (Br, 脳; WAT, 白色脂肪; BAT, 褐色脂肪; Li, 肝臓; He, 心臓; Ki, 腎臓; SI, 小腸)。 (B)AGPAT3LKOマウスおよびコントロールマウス(Cre(-))にSrebf1(SREBP1の遺伝子名)に対するshRNAおよびスクランブルshRNA(shSCR)を発現させた際の肝臓における遺伝子発現。Rplp0は内部標準として用いた。 (C)離乳直後の3週齢から一週間、紅花油(Safflower)もしくは魚油(Fish)を含む餌を与えたマウスの肝臓における遺伝子発現。(Hishikawa et al., iScience, 2021より一部改変)

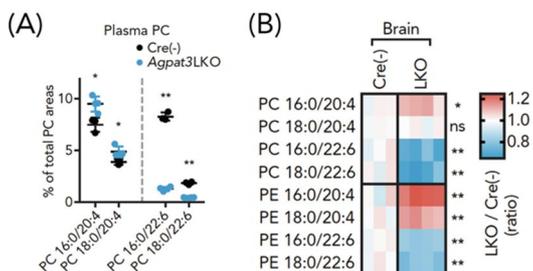


図3: AGPAT3LKOマウスの血液(A)および脳(B)における代表的なリン脂質組成であるホスファチジルコリン(PC)およびホスファチジルエタノールアミン(PE)の脂肪酸組成。リン脂質のsn-1およびsn-2に結合する脂肪酸をXX/YYの形で表記した。16:0, パルミチン酸; 18:0, ステアリン酸; 20:4, アラキドン酸; 22:6, DHA。 (B)脳におけるアラキドン酸およびDHA含有PC、PEのコントロール(Cre(-))とAGPAT3LKOの比をヒートマップで示した。(Hishikawa et al., iScience, 2021より一部改変)

性をもつ過酸化脂質へと変換される。したがって肝臓において SREBP1 が DHA 含有リン脂質量に  
応答して多価不飽和脂肪酸の合成を調節することは、DHA 欠乏時のみならず、過剰な多価不飽和  
脂肪酸の産生を抑制することで全身性の脂肪酸組成の恒常性維持に寄与している可能性が考え  
られる。

これまでの報告から、SREBP1 の過剰な活性化は肥満やがん細胞などの細胞で報告されている  
ことから(Cheng C. et al. 2018, *Cancer Commun.*)、DHA 含有リン脂質量を介した SREBP1 活性  
の調節は、脂質代謝異常関連疾患に限らず、様々な疾患に対する新たな治療法の開発に寄与する  
可能性があると考えられる。

#### <引用文献>

Cheng, C., Geng, F., Cheng, X., Guo, D. Lipid metabolism reprogramming and its potential  
targets in cancer. *Cancer Communication (Lond)*. 2018, 38(1):27.

Harayama, T., Eto, M., Shindou, H., Kita, Y., Otsubo, E., Hishikawa, D., Ishii, S.,  
Sakimura, K., Mishina, M., Shimizu, T. Lysophospholipid acyltransferases mediate  
phosphatidylcholine diversification to achieve the physical properties required in  
vivo. *Cell Metabolism*. 2014, 20(2):295-305.

Hishikawa, D., Valentine, WJ., Iizuka-Hishikawa, Y., Shindou, H., Shimizu, T.  
Metabolism and functions of docosahexaenoic acid-containing membrane  
glycerophospholipids. *FEBS Letters*. 2017, 591(18):2730-2744.

Hishikawa, D., Yanagida, K., Nagata, K., Kanatani, A., Iizuka, Y., Hamano, F., Yasuda,  
M., Okamura, T., Shindou, H., Shimizu, T. Hepatic Levels of DHA-Containing  
Phospholipids Instruct SREBP1-Mediated Synthesis and Systemic Delivery of  
Polyunsaturated Fatty Acids. *iScience*. 2020, 23(9):101495.

Stroud, CK., Nara, TY., Roqueta-Rivera M., Radlowski EC., Lawrence P., Zhang Y., Cho  
BH., Segre M., Hess, RA., Brenna, JT., Haschek WM., Nakamura MT. Disruption of FADS2  
gene in mice impairs male reproduction and causes dermal and intestinal ulceration. *J.  
of Lipid Res*. 2009, 50(9):1870-1880.

Shimano, H., Sato, R. SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology -  
divergent pathophysiology. *Nat Rev Endocrinol*. 2017, 13(12):710-730.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hishikawa D., Yanagida K., Nagata K., Kanatani A., Iizuka Y., Hamano F., Yasuda M., Okamura T., Shindou H., Shimizu T.	4. 巻 23(9)
2. 論文標題 Hepatic Levels of DHA-Containing Phospholipids Instruct SREBP1-Mediated Synthesis and Systemic Delivery of Polyunsaturated Fatty Acids.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101495
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101495	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菱川大介、叶谷愛弓、進藤英雄、清水孝雄
2. 発表標題 DHA欠乏時の肝臓における多価不飽和脂肪酸の維持機構
3. 学会等名 日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菱川大介
2. 発表標題 DHA含有リン脂質の生体における意義
3. 学会等名 JFAS（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 菱川大介、進藤英雄	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 6
3. 書名 「膜リン脂質アシル転移酵素と疾患制御」医学のあゆみ vol.269, No13, p1062-1067	

〔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
---------	---------