

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K11687

研究課題名(和文) GADD34による老化関連疾患の制御メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of the Control Mechanism of Age-related Diseases by GADD34

研究代表者

西尾 尚美(Nishio, Naomi)

埼玉大学・教育学部・准教授

研究者番号：80513457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、GADD34遺伝子欠損(KO)マウスで老化関連疾患の原因である脂肪肝が早期に発症するメカニズムを解明するために、肝臓における糖質代謝と脂質代謝の検討を行った。脂肪肝形成について検討したところ、脂質過剰摂取だけでは脂肪肝は発症しにくく、糖質の存在が必要であることが明らかとなった。KOマウスでは、これまでの報告でインスリンシグナル伝達系が亢進していることに加えて、脂質代謝だけでなく糖質代謝が肝臓で亢進しており、そのため脂肪肝が形成されやすい。さらに、KOマウスの肝臓では炎症系のシグナル伝達系が亢進しており、NASHやインスリン抵抗性を引き起こしやすい状況にあ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

GADD34遺伝子欠損マウスを老化関連疾患発症のモデルとして解析することで、小胞体ストレスにおける役割以外は明確になっていなかったGADD34の役割は、老化におけるシグナル伝達系や代謝系にも関与していることが明らかとなった。このように老化関連疾患の発症メカニズムを解明することは、老化に伴って発症する疾患を抑制する可能性が示唆される。日本は超高齢化社会で、高齢者の健康は社会的にも個人的にも重要な課題である。老化は必然であるが健康に老化することが可能となれば、社会的な医療費抑制につながるだけでなく高齢者の尊厳ある生活の維持が可能となると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanisms of fatty liver disease, a cause of age-related diseases, in GADD34 gene knockout (KO) mice by examining glucose and lipid metabolism in the liver. Our examination of fatty liver formation revealed that fatty liver disease is less likely to develop with lipid overconsumption alone and that the presence of carbohydrates is necessary. In KO mice, in addition to the previously reported hyperactivation of the insulin signaling pathway, both lipid and glucose metabolism are enhanced in the liver, making fatty liver formation more likely. Furthermore, we found that the inflammatory signaling pathway is also enhanced in the liver of KO mice, putting them at a higher risk for developing NASH and insulin resistance.

研究分野：老化、栄養、免疫

キーワード：GADD34 老化 肝臓 糖質代謝 脂質代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化が進む我が国において、老化に伴う様々な疾患は増大し続ける医療費を圧迫するとともに、高齢者の社会的活動に従事することを妨げている。その中でも、中年期以降に多く発症するメタボリックシンドロームは老年期の多くの疾患の原因となるため、そのメカニズムの解明が急がれている。メタボリックシンドロームの病態では慢性炎症が基盤となることが多く、肥満から発症する2型糖尿病、脂肪肝、その結果としておきる肝臓がんなどもその一つである。一方、基礎的老化研究では、細胞の増殖や蛋白合成に関わる2つのシグナル伝達系が種を超えて老化、寿命に影響することが明らかになってきた(3)。1つはTOR(Target of rapamycin, ほ乳類ではmTOR)であり、もう1つはIGF-1/Insulin レセプターシグナルである。酵母、線虫といった下等動物はこの2つのシグナルに関与する分子の変異で寿命が延長する。これとは別の流れで、ほ乳類の特徴としてマクロファージ、好中球といったミエロ系の自然免疫系細胞が老化個体の組織で炎症性サイトカインを放出することで、組織の老化や疾患の原因になることが明らかになってきた。しかし、メタボリックシンドロームをはじめとする加齢にともなって発症する老化関連疾患と寿命を制御するシグナル伝達系の関連については未だ明確ではない。これまで私が研究を行ってきたGADD34 (Growth arrest and DNA damage inducible protein) はDNA傷害性ストレス刺激で、また、ミエロ系細胞をIL-6で刺激したとき上昇する遺伝子としてクローニングされ(4)、DNA傷害性ストレスやアミノ酸欠乏で上昇することから、当初より老化に何らかの影響を与えると期待されていた。また、GADD34遺伝子はPpp1r15aとも呼ばれ、脱リン酸化酵素に結合して、様々なシグナル伝達系に関与する蛋白のリン酸化を抑制することが主な役割であると報告されてきた。私の所属していた研究室でも、若いGADD34KOマウスや培養細胞を使った研究で、蛋白合成の場であるER (endoplasmic reticulum)にストレス刺激が入った時、GADD34 KOマウスは蛋白合成を止めてしまっていて蛋白合成の回復がおくれること、GADD34はeIF2 α という蛋白合成の初期段階に関与する蛋白を脱リン酸化し、蛋白合成を再開することを報告してきた。その他にも、GADD34 KOマウスは絶食によって、mTORを介して肝臓障害からの回復がおくれること、GADD34はmTORを抑制しAutophagyを誘導すること(BiochemBiophys Res Commun. 2011、Sci Rep. 2015)、TGF- β のシグナル伝達系を抑制しコラーゲン産生を制御することによって創傷治癒を正常に促進させること、をGADD34の脱リン酸化機能の観点から報告してきた。さらに、私の行ってきた研究では、インスリンやG-CSFによる刺激で、これまでに報告のない非常に早い段階かつeIF2 α のリン酸化反応が起こらない条件下でもGADD34の発現が上昇し、増殖系のシグナル伝達系が抑制されることが確認された。しかし、GADD34がどのような条件下で、どの部位で、どのようなメカニズムで機能しているかについては明らかにできていない。

2. 研究の目的

これまで私はGADD34遺伝子欠損(KO)マウスの加齢に伴う変化を観察し、GADD34 KOマウスはG-CSFレセプターからのシグナル伝達系が亢進されることによって、老化に伴い造血幹細胞がミエロ系にシフトすること(Immuno cell bio, 2014)、GADD34 KOマウスはIGF-1/Insulinレセプターシグナル伝達系が亢進することによって老化に伴い肥満になり、加齢や脂質過剰によってIGF-1/Insulinレセプターシグナルが低下し、2型糖尿病や肝臓癌を発症する(Sci Rep, 2015)ことを見いだした。このことはGADD34が加齢に伴って発症するメタボリックシンドロームの制御に炎症と代謝系の2つのシグナル伝達系の制御を介して関与していることを示している。さらに近年では、GADD34 KOマウスの加齢に伴う疾患発症には雌雄差があり、特に雄マウスではメタボリックシンドロームに、雌マウスでは炎症性疾患が発症しやすいことがわかってきた(Geriatri Gerontol Int, 2017)。そこで本研究ではGADD34 KOマウスを用いて、慢性炎症及び脂質や糖質の代謝シグナルをGADD34が制御するメカニズムの解析を行うことによって、慢性炎症及び脂質や糖質の摂取が老化関連疾患の発症に繋がるメカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

3, 6, 10ヶ月齢のGADD34KOとWTマウスの肝臓細胞と肝臓組織のサンプルを作成しWestern Blotting法によって老化や代謝に関係するタンパク質の発現を解析した。

- (1) GADD34 KOマウスの肝臓組織で早期老化のフェノタイプの有無を確認するために、SA β GAL染色を行った。また、若年GADD34 WT・KOマウスと老年マウスGADD34 WT・

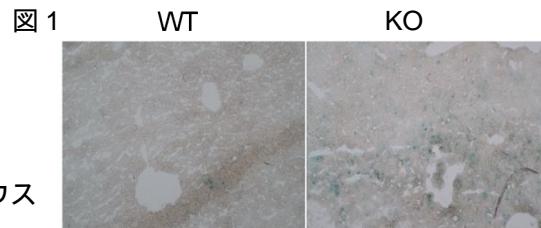
KO マウスから RNA を採取してマイクロアレイにて、網羅的に遺伝子発現を調べた。

- (2) WT マウスと GADD34 KO マウスの肝臓細胞を用いて、肝臓における IGF-1/insulin シグナル伝達系を比較した。
- (3) インスリンシグナル伝達系は脂質及び糖質の代謝と密接に関係する。従って、脂質、糖(グルコース・フルクトース)の投与、糖質カット食の摂餌によるシグナル伝達系への影響について WT マウスと GADD34 KO マウスの肝臓のサンプルを比較検討した。
- (4) GADD34 KO 及び WT マウスを用いて、高脂肪食摂取や糖質などの栄養の過剰摂取における GADD34 の役割とメカニズムを解析した。

4. 研究成果

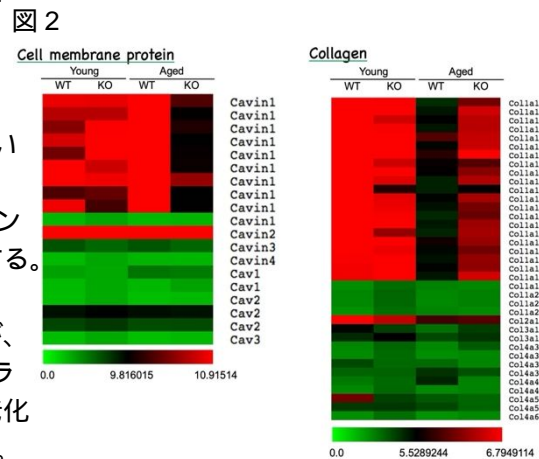
(1) GADD34 による肝臓組織の老化制御

本研究では、10ヶ月齢の GADD34 KO と WT マウスの肝臓組織を老化細胞の指標として用いられる SA- β -gal で染色したところ、KO マウスでは SA- β -gal 陽性細胞が多く見られた(図 1)。



GADD34 はストレス刺激で上昇するタンパク質として見つかり、その後、シグナル伝達系で脱リン酸化酵素 PP1 と結合することで、細胞内の様々な機能を担うことがわかってきた。その中でも ER ストレス時に蛋白合成のシャットオフからの回復に働くことを Ron と私たちが発見し、Ron のグループは GADD34 遺伝子移入が脂肪肝を抑えることを報告した。一方、私たちは、GADD34 KO マウスが老化することで脂肪肝から肝硬変、肝がんへと発展することを報告し、そのメカニズムは ER ストレスではなく、GADD34 がインスリン受容体と間接的に結合してリン酸化を抑え、インスリンシグナル伝達系を抑えることで脂肪肝の抑制につながることを示した。本研究では、GADD34 KO マウスの肝臓の老化による変化を知るために、3ヶ月齢の GADD34 WT・KO マウス(Young)と 10ヶ月齢の GADD34 WT・KO マウス(Old)から RNA を採取してマイクロアレイにて、網羅的に遺伝子発現を調べた。細胞膜に存在し、インスリン受容体に関与してインスリンシグナルを伝達する Cavin-1 は PTRF とも呼ばれ、GADD34 と結合することが報告されている。

解析の結果 Cavin-1 の発現が、WT では老化に伴い増加したが、KO では著しく減少していた(図 2)。このことは脂肪肝発症後、KO マウスではインスリンシグナリングが抑制されるという逆転現象に一致する。さらに GADD34 と結合する BFCOL-1 はコラーゲンの遺伝子発現を抑えることを我々は報告しているが、老化 WT マウスでは GADD34 の発現が上昇し、コラーゲンの遺伝子発現は抑えられていた。しかし、老化 KO マウスでは遺伝子発現は抑えられていなかった。



10ヶ月齢の GADD34 KO の肝臓組織で、WT に比べて膜におけるヘテロクロマチン凝集が減っていることは科研費 16K01827 の報告書で報告したが、今回の結果と合わせて、GADD34 KO の肝臓組織では WT に比べて老化のフェノタイプが観察された。

(2) 脂肪肝形成に関与する因子の解明

これまで GADD34 遺伝子欠損マウスが加齢とともに脂肪肝発症やII型糖尿病を発症し、若齢時には亢進しているインスリンシグナル伝達系、加齢と共に低下をすることがわかっている。加齢と共に脂肪肝やII型糖尿病を発症する原因はインスリンシグナル伝達系のみならず、脂質代謝や糖質からの脂質合成も関与が考えられる。そこで本研究では、GADD34 遺伝子欠損(GADD34 KO)による脂質代謝、糖質代謝の変化を検索するため、まずは C57BL/6 マウスを用いて基本的な肝臓代謝について解析を行った。マウスに高脂肪(HFD)、高糖質の他、NASH 発症モデルとなる高脂肪コリン欠乏食(CDAHFD)、高脂肪高たんぱく質の鶏卵を与え、脂肪肝の形成と肝臓組織における脂質や糖質代謝の酵素やインスリンシグナル伝達系のタンパク質発現を確認した。

その結果、高脂肪(HFD)よりも高糖質(Sugar, Glucose, Fructose)を与えた方がより強い脂肪肝の

発症が認められ、CDAHFDにおいても脂肪肝が発症したがHFDやCDAHFDと脂質含量が同程度鶏卵では脂肪肝やNASHの発症が認められなかった。

また、高糖質に誘導される脂肪肝は鶏卵摂取によって抑制されることが確認され、その重要な要素としてアミノ酸が想定された。そこで、高糖質と同時にアミノ酸を摂取させたところ、脂肪肝形成が軽減した。このことはアミノ酸が脂肪肝抑制に重要な役割を果たしていることを示している。

(3) GADD34における脂質代謝、糖質代謝の制御

<脂質代謝>

NASH発症モデルとなる高脂質コリン欠乏食(CDAHFD)を摂取させたところ、GADD34 KOマウスではHFDでのWTに比べて早期脂肪肝は認められたが、CDAHFDではWTとの差は認められなかった。これはコリン欠乏によって発症する脂肪肝にはGADD34は影響しなかったと考えられる。

GADD34 KOマウスを使って2週間の高脂肪食(HFD)摂取を行い、同時にコリンを添加したところ、WTマウスよりも脂肪肝は抑制された。しかし、皮下脂肪が増大し、WTより肥満になったため、脂質増加抑制にGADD34が関与していることが証明された。

さらに、*in vitro*でGADD34タンパク質がアミノ酸欠乏で誘導されるデータ(Sci Rep2015)をもとに、高脂質シスチン・フェニルアラニン欠乏食(CFDHFD)を作成し、GADD34 KOマウスに摂取させ、GADD34の発現が脂肪増加抑制に及ぼす影響の検討を行ったところ、WT、KOともに脂肪肝の発症が認められなかった。*in vitro*でGADD34が誘導される条件が*in vivo*では影響がなかったことから、これまでGADD34の*in vivo*での役割の解明が難航している要因であることが改めて確認された。

<糖代謝>

脂質増加の原因には、体外から摂取する脂肪の量と体内での脂肪酸合成の促進が存在する。そこで本年度は、脂質のde novo合成について検討を行った。脂質のde novo合成は、解糖系に由来するアセチルCoAから始まる。そこで、5週齢のGADD34 KOとWTマウスにGlucoseのみを2週間摂取させ、肝臓の代謝系のタンパク発現を検討した。

その結果、これまで報告されてきたGADD34 KOマウスの若齢期におけるインスリンシグナル亢進は糖の過剰摂取時にはさらに顕著に亢進していることが明らかとなった。同時に、解糖系WTよりKOマウスで発現が上昇していた。一方で、脂肪酸合成酵素の発現を鑑みると、KOマウスでは脂質のde novo合成は低下していた。さらに、KOマウスでは炎症系に関わるタンパクのリン酸化の亢進が見られたことから、糖の過剰摂取ではGADD34の欠損によってNASHが促進される可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naomi Nishio, Ken-ich Isobe	4. 巻 -
2. 論文標題 Hen egg only diets support healthy aging in adult mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jpn.13805	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 Ken-ichi Isobe, Rena Suzuki, Kana Kato, Miki Kawai, Ami Kuzuya, Aoi Kanjya, Chiaki Suitou, Yui Nakano, Manae Nagasaki, Aki Hatanaka, Asuka Konno and Naomi Nishio	4. 巻 30
2. 論文標題 Hen-egg suppresses fatty liver induced by sugar, glucose or fructose.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Nutrition	6. 最初と最後の頁 1-17
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 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 -
1. 著者名 Ken-ichi Isobe, Naomi Nishio	4. 巻 3.4
2. 論文標題 Are Mice Born Normally With an Egg-only Diet?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Research and Reviews	6. 最初と最後の頁 1-5
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 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 Ichiro Tatsuno 1, Masanori Isaka, Masakado Matsumoto, Naomi Nishio, Hideyuki Matsui, Tadao Hasegawa	4. 巻 8(24)
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of emm1 Streptococcus pyogenes 10-85, a Strain Isolated from a Patient with Streptococcal Toxic Shock Syndrome in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcement	6. 最初と最後の頁 e00453-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00453-19	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西尾尚美、磯部健一、長谷川忠男
2. 発表標題 GADD34発現の老化による変化 ; K0マウスを使用した解析
3. 学会等名 第46回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 磯部健一、長谷川忠男、 西尾尚美
2. 発表標題 GADD34 の機能解析
3. 学会等名 第16回 日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naomi Nishio, Ken-ich Isobe
2. 発表標題 Adult mice fed only heneggs are alive healthy until aged, but pups nursed by egg-only mice died early.
3. 学会等名 第45回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 NAOMI Nishio, KEN-ICHI Isobe
2. 発表標題 Mice fed only heneggs are alive healthy until aged.
3. 学会等名 日本基礎老化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 NAOMI Nishio, KEN-ICHI Isobe
2. 発表標題 Adult mice fed only heneggs are alive healthy until aged, but pups nursed by egg-only mice died early.
3. 学会等名 日本基礎老化学会
4. 発表年 2022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
研究分担者	磯部 健一 (Isobe Ken-ichi) (20151441)	修文大学・医療科学部・教授 (33942)	

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
---------	---------