

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20124

研究課題名(和文) 脂質エネルギー代謝転写因子SREBPの免疫系干渉を介した生活習慣病制御機構の解明

研究課題名(英文) Unraveling of the regulation of lifestyle-related diseases through the immune system in the lipid synthetic transcription factor SREBP

研究代表者

煙山 紀子 (KEMURIYAMA, Noriko)

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：50747350

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)：小胞体ストレス状態時に、SREBPsがどのように関与するかを検討し、SREBPsの脂質代謝以外の干渉作用も追及して、生活習慣病への関与を検討した。SREBPノックダウン処理あるいは過剰発現による遺伝子発現変動をRNA-seq.またはqPCRにより実施し、小胞体ストレス時に変動が認められた免疫系遺伝子Xを新規候補遺伝子として抽出した。それは、NASHモデルマウスの肝臓において発現が上昇するとともに、発現細胞の周囲から線維化が進展し、部分的に肝星細胞の活性化に関与してい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

これまで生活習慣病態解明に対する研究は、根源的原因とされる肥満・脂肪肝の改善、あるいは炎症制御に対してそれぞれ別の因子に焦点が当てられた研究が主であった。本研究はエネルギー代謝転写因子が、代謝面だけでなく、炎症系への干渉作用をも持ち合わせて病態の発症・進展を制御する可能性を明らかにするという新しい視点で検討し、効率的な生活習慣病の予防・治療の開発を目指す点において、学術的・社会的意義は大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of SREBPs during endoplasmic reticulum (ER) stress, and investigated the involvement of SREBPs in lifestyle-related diseases by investigating their interfering effects other than lipid metabolism. Gene expression analyses by SREBP knockdown treatment or overexpressing cells were performed by RNA-seq. and qPCR. As a result of this study, we identified immune gene X, which was altered during endoplasmic reticulum stress, as a novel target gene for SREBPs. It was found to be upregulated in the livers of NASH model mice through the development of fibrosis around the expressed cells, and partially involved in the activation of hepatic stellate cells. The present results indicated that SREBPs may participate in the chronic inflammation occurring in NASH through the regulation of the immune system.

研究分野：代謝・栄養学

キーワード：SREBP 小胞体ストレス 生活習慣病 NASH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病は、身体の過剰な脂質蓄積と各種ストレス応答を介した非感染性の炎症が持続し、重篤な病態へと進行していくため、代謝・ストレス応答・免疫機能の制御が鍵となる。慢性的な炎症が誘導されるひとつのメカニズムとして、組織内脂質の過剰な蓄積が、リポトキシシティ(脂肪毒性)により種々の細胞内ストレスや炎症シグナルを活性化するというシナリオが提案されてきた。細胞内ストレスのひとつとして、小胞体への異常タンパク質の蓄積と定義される小胞体ストレスがあるが、これは、細胞機能障害や細胞死を引き起こし、過栄養、肥満、脂肪肝やインスリン抵抗性などと密接な関わりが指摘されている。

非アルコール性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis : NASH)は、多飲酒歴が無いにもかかわらず、脂質が肝臓に過剰に蓄積して慢性的な炎症を引き起こされ、肝細胞変性、壊死、線維化と進み、最終的にはがんの進展をもきたすものであり、その病態形成には、肝の脂肪化と細胞内ストレスが複雑に絡み合っているとされている。

脂質が蓄積するメカニズムについては、取り込み・合成・異化を制御する転写因子が支配的な役割を果たしていることが種々の研究から明らかにされつつある。その中の転写因子 sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs)は、脂質合成を司るエネルギー代謝転写因子で、SREBP-1a, 1c, 2 と 3 つのアイソフォームがあり、それぞれ脂肪酸あるいはコレステロールの合成を司る。それらは身体の栄養状態に鋭敏に反応し、組織内の脂質量を制御している。SREBPs の過剰な活性化は脂質合成の促進を介して、種々の細胞内ストレスや炎症シグナルの活性化に加え、小胞体ストレスの原因となると考えられている。近年では小胞体ストレス自体が細胞の脂肪化を引き起こし得るとの説も提唱されており、小胞体ストレスと SREBPs は複雑に関係していることが示唆されるが、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

以上の背景より、本研究の目的は、肥満やインスリン抵抗性、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)など、肝臓に脂質が蓄積された状態において誘導され得る小胞体ストレス状態時に、SREBPs がどのように関与するかを検討し、SREBPs の脂質代謝以外の干渉作用も追及して、生活習慣病への関与を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) HepG2 を用いた SREBP-1 の有無による小胞体ストレス応答と網羅的遺伝子発現解析

ヒト肝がん由来細胞株である HepG2 に siRNA を用いて SREBP-1 をノックダウンさせた。その後、thapsigargin を 200 nM で 24 時間処置し、小胞体ストレスを誘発させた。細胞から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq.あるいは逆転写後に real-time PCR 法を用いた遺伝子発現検索に供した。RNA-seq.解析におけるサンプルごとの発現プロファイルはそれぞれの遺伝子のカウントデータを log CPM 値で標準化して主成分分析を、各群特異的に発現が上昇または低下している遺伝子群を抽出し fold change > ±1.3、p < 0.05 を有意としてベン図を作成した。SREBP-1 の有無により発現差異が見られた遺伝子を抽出し、real-time PCR にて再現性を確認した。さらに、活性型 SREBP-1a, SREBP-1c, SREBP-2 を組み込んだ pcDNA3.1 を用いて、ヒト胎児腎由来細胞株である HEK293 に過剰発現させ、real-time PCR にて SREBPs ならびに RNA-Seq.解析により抽出された遺伝子の発現解析を行った。

(2) NASH 病態におけるマウス肝臓および LX-2 細胞を用いた発現解析

雄性 6 週齢の C57BL/6J マウスに、基礎食、コリン欠乏アミノ酸高脂肪アミノ酸(CDAHFD (メチオニン 0.1%))食、CDAHFD (メチオニン 0.6%)を 26 週間投与し、それぞれ対象群、NASH 様病態群、単純性脂肪肝群として得られた肝臓サンプルを用いた。肝臓の病理組織学的な検査(ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による肝細胞の脂肪化および諸所見の観察、シリウスレッド (SR) 染色による肝臓の線維化の観察)、免疫組織化学染色による炎症性細胞浸潤(マクロファージ)、活性化星細胞の評価を行った他、RNA-Seq.解析により抽出された因子に焦点を絞り、NASH 病態における発現変動ならびに発現している細胞の同定を試みた。さらに、培養ヒト肝星細胞株である LX-2 を用いて星細胞の活性化に関する検討を行った。

4. 研究成果

(1) HepG2 を用いた SREBP-1 の有無による小胞体ストレス応答と網羅的遺伝子発現解析

SREBP-1 について、ノックダウンにより遺伝子発現量が減少することが確認できた。RNA-Seq.解析による主成分分析において、対象群、thapsigargin 処置群に加え、SREBP-1 の有無により、それぞれの群に特異的な遺伝子発現の挙動を示した。第一主成分は thapsigargin 処置によるもので、38.3%の寄与率であった。第二主成分は SREBP-1 のノックダウンによるもので、7.6%の寄与率であったことより、遺伝子発現プロファイルは thapsigargin 処置による影響が大きかったが、SREBP-1 の有無による差異も確認できた。発現差異解析においては、fold change > ±1.3、

p < 0.05 を有意とし、SREBP-1 の有無で、対象群と thapsigargin 群で共通に変動した遺伝子が 5 個であった。それらの遺伝子を real time PCR にて遺伝子発現を確認したところ、免疫系に關与する遺伝子 X が小胞体ストレス刺激で著明に誘導され、SREBP-1 ノックダウンで低下することが明らかとなった。また、異なる配列の siRNA を用いて SREBP-1 をノックダウンした際にも同様の結果が得られた。次に、活性型 SREBP-1a, SREBP-1c, SREBP-2 を組み込んだ pcDNA3.1 を用いて、ヒト胎児腎由来細胞株である HEK293 に過剰発現させた結果、SREBP-1a と SREBP-2 が遺伝子 X の発現を制御している可能性が示唆された。

(2) NASH 病態におけるマウス肝臓および LX-2 細胞を用いた発現解析

CDAHFD を給餌したマウスの実験において、CDAHFD 食群では、基礎食群と比較して、病理組織学的に肝細胞の脂肪化を示した。また、炎症性細胞の浸潤と線維化は、CDAHFD (メチオニン 0.1%) 群のみに認められ、CDAHFD (メチオニン 0.6%) 群に見られなかった。これらの肝臓サンプルを用いて検討した結果、基礎食群と CDAHFD (メチオニン 0.6%) 群と比較し、CDAHFD (メチオニン 0.1%) 群では遺伝子 X の発現が著明に上昇しており、CDAHFD (メチオニン 0.1%) 食により誘発されるマウスでの NASH 様病態で発現が亢進していることが示唆された。どの細胞に発現しているかを検討するため、免疫組織学染色を行った結果、発現細胞の周囲から線維化が進展していることが明らかとなった。しかしながらその因子は NASH および肝線維化における機能が明らかでないため、培養ヒト肝星細胞株 LX-2 を用いた解析を進めた。その結果、TGF- β や小胞体ストレス下において発現上昇が認められ、それは、SREBPs のノックダウンで抑制された。さらにその因子の処置により肝線維化関連遺伝子 COL4A1 の発現が誘導されるなどといった結果が得られた。以上の結果より、SREBP s に誘導される免疫系の因子は、星細胞を直接あるいは間接的に活性化し、NASH における肝線維化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

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 Suzuki-Kemuriyama Noriko, Abe Akari, Uno Kiniko, Ogawa Shuji, Watanabe Atsushi, Sano Ryuhei, Yuki Megumi, Miyajima Katsuhiko, Nakae Dai	4. 巻 19
2. 論文標題 A trans fatty acid substitute enhanced development of liver proliferative lesions induced in mice by feeding a choline-deficient, methionine-lowered, L-amino acid-defined, high-fat diet	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lipids in Health and Disease	6. 最初と最後の頁 251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12944-020-01423-3	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 Watanabe Atsushi, Koizumi Toshinori, Horikawa Takumi, Sano Yusuke, Uki Haruka, Miyajima Katsuhiko, Kemuriyama Noriko, Anzai Reo, Iwata Hijiri, Anzai Takayuki, Nakagawa Kenshi, Nakae Dai	4. 巻 33
2. 論文標題 Impact of altered dietary calcium-phosphorus ratio caused by high-phosphorus diets in a rat chronic kidney disease (CKD) model created by partial ligation of the renal arteries	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Toxicologic Pathology	6. 最初と最後の頁 77 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1293/tox.2019-0086	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 煙山紀子、阿部有加里、日高寿美鈴、定留育美、宇野絹子、政所陽菜、山口彩音、小川秀治、渡邊 厚、美谷島克宏、中江大
2. 発表標題 マウス非肥満型NASHと単純性脂肪肝病態における網羅的遺伝子発現差異解析
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 政所陽菜、煙山紀子、澤田ちひろ、宇野絹子、小川秀治、佐野龍平、渡邊厚、美谷島亮宏、中江大
2. 発表標題 培養ヒト肝細胞を用いた肝線維化評価系の確立および肝線維化における免疫因子の関与に関する研究
3. 学会等名 第37回日本毒性病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高臨風、煙山紀子、斎藤奈津美、渡邊聖栄子、龍完次郎、宇野絹子、張舜恵、小川秀治、渡邊厚、美谷島克宏、中江大
2. 発表標題 脂質代謝関連転写因子SREBP-1が小胞体ストレスと慢性炎症に及ぼす影響
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 煙山紀子、阿部有加里、宇野絹子、高臨風、龍完次郎、山口彩音、結城恵美、小川秀治、佐野龍平、渡邊厚、美谷島克宏、中江大
2. 発表標題 コリン欠乏メチオニン低減アミノ酸高脂肪 (CDAA-HT-T(-)) によるマウスNASH合併肝発癌モデルの開発
3. 学会等名 第36回日本毒性病理学会総会及び学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------