

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08914

研究課題名(和文)小胞体膜タンパク質ILDR2が及ぼす生体膜リン脂質の変容と脂肪肝進展機序の解明

研究課題名(英文)The role of ILDR2 in biomembrane phospholipids and hepatic steatosis

研究代表者

渡邊 和寿(Watanabe, Kazuhisa)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：60724416

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)：以前、我々は新規糖尿病感受性遺伝子Ildr2を同定し、ILDR2が脂肪肝発症に重要な因子であることを見出した。この分子機序解明のため、ILDR2結合因子を探索したところ、結合分子としてリン脂質脂肪酸転移酵素(MBOAT7)を同定した。MBOAT7はホスファチジルイノシトール(PI)のアシル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を肝臓特異的ILDR2欠損マウス(LKO-ILDR2)及びILDR2過剰発現マウス(OX-ILDR2)を作製し解析した。その結果、LKO-ILDR2の肝臓中PIは有意に増加、OX-ILDR2の肝臓中PIは有意に減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪肝は2型糖尿病の重要なリスク因子に留まらず、メタボリックシンドロームと相まった脂肪肝からの肝線維化は動脈硬化疾患を増悪させるため、有効な治療法の開発が強く求められている。我々はILDR2の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個体レベルでのILDR2の意義と脂肪肝における影響を明らかにした。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、脂肪肝発症や肝線維化の進展に関与することを示した。脂肪肝の有効な治療法はないため、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 choline-deficient amino acid-defined high fat diet (CDAHFD) compared to AAV-GFP injected Ildr2 floxed (GFP-flox) mice fed on the CDAHFD, liver triglyceride content was significantly increased by LKO-ILDR2 mice compared to GFP-flox mice, hepatic PI was significantly increased. Hepatic PI was significantly decreased in OX-ILDR2 mice. 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：ILDR2 脂肪肝 リン脂質

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

1. 研究開始当初の背景

脂肪肝は2型糖尿病やメタリックシンドロームのリスク因子にとどまらず、脂肪肝からの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、我々は肥満モデルマウスを用いた 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。MOBAT7 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、MOBAT7 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こと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 MOBAT7 に着目し、1) ILDR2 が肝臓中 PI 組成の変化に影響を及ぼすか、2) ILDR2 が脂肪肝線維化に影響を与えるかを検討し、肝臓におけるリン脂質の変容と脂肪肝進展における ILDR2 の役割を明らかにすることを目的とした。

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

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) 及び AAV-ILDR2 を投与した ILDR2 過剰発現マウス (OX-ILDR2) を用いた。肝臓における *Ildr2* 発現量は、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 投与後コリン欠乏・メチオニン減量高脂肪食 (CDAHFD, 45kcal%) を与えて脂肪肝を誘導した LKO-ILDR2 マウス及び OX-ILDR2 マウスを実験に用いて測定・解析した。

(2) 肝臓脂質含量の測定

12時間絶食させた CDAHFD 食 LKO-ILDR2 マウス及び OX-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した。

(3) VLDL 分泌の測定

CDAHFD 食 LKO-ILDR2 マウス及び OX-ILDR2 マウスにおける 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した。

(4) 肝臓中のリン脂質測定

CDAHFD 食 LKO-ILDR2 マウス及び OX-ILDR2 マウスにおける肝臓中リン脂質を測定するため LC-MS を用いてリン脂質分析を行った。

4. 研究成果

(1) CDAHFD 食 LKO-ILDR2 マウス及び OX-ILDR2 マウス肝臓における *Ildr2* mRNA 発現量

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。OX-ILDR2 マウス肝臓 *Ildr2* mRNA は GFP コントロールと比べ 15 倍発現が増加した (Fig. 1)。

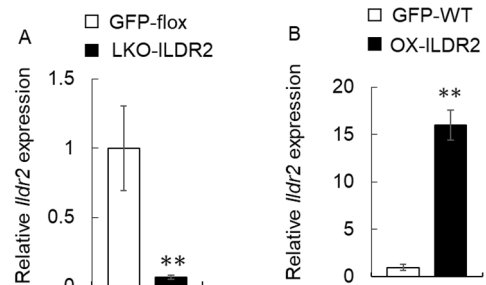


Fig. 1. CDAHFD食を与えたLKO-ILDR2(A)及びOX-ILDR2(B)マウス肝臓の*Ildr2*発現量
**P<0.01

(2) 肝臓脂質への影響

LKO-ILDR2 マウスにおいて、肝臓中中性脂肪 (TG) は 1.6 倍有意に増加し、コレステロール (TCH) においても 2.5 倍有意に増加した。OX-ILDR2 マウスにおいては、肝臓中 TG 及び TCH 値は低下傾向であった (Fig. 2)。

(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。CDAHFD 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。OX-ILDR2 マウスにおいては VLDL 分泌に有意な差が認められなかった (Fig. 3)。

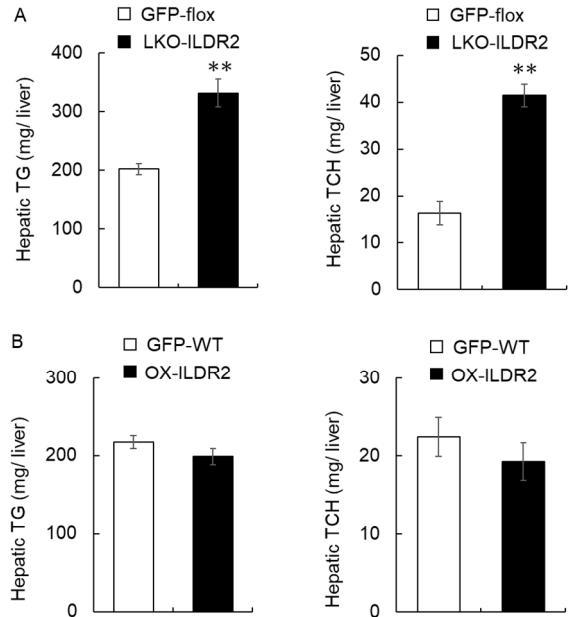


Fig. 2. CDAHFD食を与えたLKO-ILDR2(A)及びOX-ILDR2(B)マウス肝臓の中性脂肪(TG)、総コレステロール(TCH)値
**P<0.01

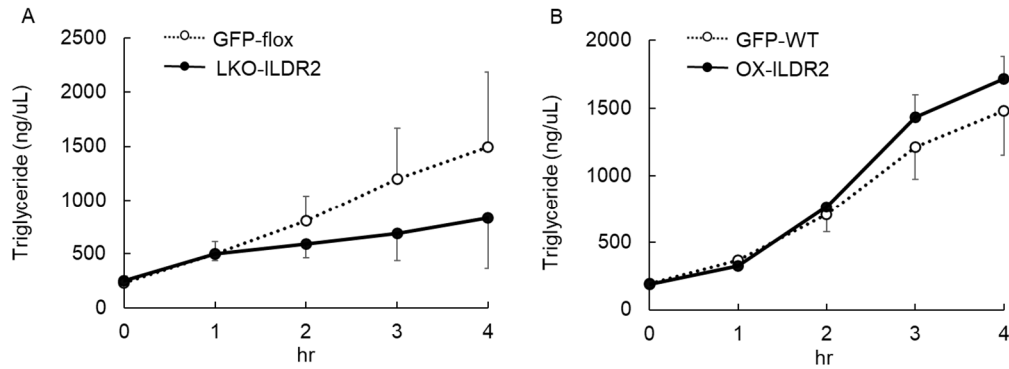


Fig. 3. CDAHFD食を与えたLKO-ILDR2(A)及びOX-ILDR2(B)マウスにおけるVLDL分泌

(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。OX-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減少した。

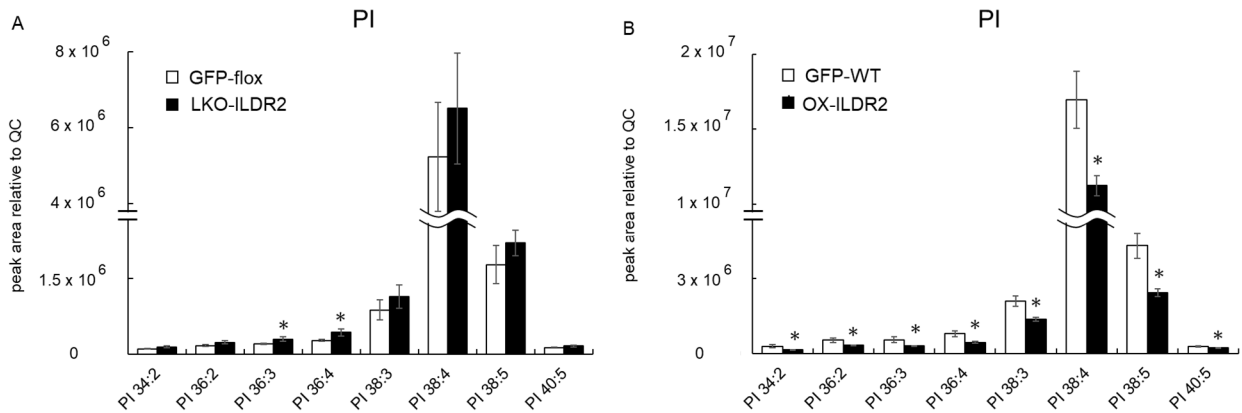


Fig. 4. CDAHFD食を与えたLKO-ILDR2(A)及びOX-ILDR2(B)マウスにおける肝臓中PI分子種の変化

【研究成果のまとめ】

CDAHFD 食負荷 LKO-ILDR2 マウスは VLDL 分泌の低下による肝臓中 TG の増加が認められ、コントロールマウスに比べ脂肪肝がより進行した。OX-ILDR2 マウスにおいては、CDAHFD 食による脂肪肝の進行が抑えられる傾向がみられた。今回の CDAHFD 食負荷 LKO-ILDR2 及び OX-ILDR2 マウスの結果から、ILDR2 が肝臓におけるリン脂質の変容に関与し、脂肪肝の進行に影響を与える可能性が示された。しかしながら、ILDR2 がどのようにリン脂質の変容に影響を及ぼすかは明らかでないため、今後引き続き ILDR2 の機能を明らかにする必要がある。

< 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8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Watanabe Kazuhisa, Nakayama Kazuhiro, Ohta Satoshi, Matsumoto Ayumi, Tsuda Hidetoshi, Iwamoto Sadahiko	4. 巻 11
2. 論文標題 ILDR2 stabilization is regulated by its interaction with GRP78	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-021-87884-7	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 Matsumoto Ayumi, Kojima Karin, Miya Fuyuki, Miyauchi Akihiko, Watanabe Kazuhisa, Iwamoto Sadahiko, Kawai Kensuke, Kato Mitsuhiro, Takahashi Yukitoshi, Yamagata Takanori	4. 巻 43
2. 論文標題 Two cases of DYNC1H1 mutations with intractable epilepsy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 857 ~ 862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.braindev.2021.05.005	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 Watanabe Kazuhisa, Matsumoto Ayumi, Tsuda Hidetoshi, Iwamoto Sadahiko	4. 巻 12
2. 論文標題 N4BP2L1 interacts with dynactin and contributes to GLUT4 trafficking and glucose uptake in adipocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1958 ~ 1966
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13623	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 Yoshida Ken, Yokota Kazuha, Kutsuwada Yukinobu, Nakayama Kazuhiro, Watanabe Kazuhisa, Matsumoto Ayumi, Miyashita Hiroshi, Khor Seik soon, Tokunaga Katsushi, Kawai Yosuke, Nagasaki Masao, Iwamoto Sadahiko	4. 巻 4
2. 論文標題 Genome Wide Association Study of Lean Nonalcoholic Fatty Liver Disease Suggests Human Leukocyte Antigen as a Novel Candidate Locus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 1124 ~ 1135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep4.1529	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 Yoshida Ken, Yokota Kazuha, Watanabe Kazuhisa, Tsuda Hidetoshi, Matsumoto Ayumi, Mizukami Hiroaki, Iwamoto Sadahiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Lack of GPR180 ameliorates hepatic lipid depot via downregulation of mTORC1 signaling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-023-29135-5	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 Watanabe Kazuhisa, Matsumoto Ayumi, Tsuda Hidetoshi, Iwamoto Sadahiko	4. 巻 12
2. 論文標題 KBTBD11, encoding a novel PPAR target gene, is involved in NFATc1 proteolysis by interacting with HSC70 and HSP60	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-022-24929-5	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 Kutsuwada Yukinobu, Yokota Kazuha, Yoshida Ken, Tsuda Hidetoshi, Watanabe Kazuhisa, Matsumoto Ayumi, Iwamoto Sadahiko	4. 巻 105
2. 論文標題 Association of HLA-DPB1, NLRP10, OVOL1, and ABCC11 with the axillary microbiome in a Japanese population	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 98 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2022.01.003	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 Matsumoto Ayumi, Tsuda Hidetoshi, Furui Sadahiro, Kawada Nagashima Masako, Anzai Tatsuya, Seki Mitsuru, Watanabe Kazuhisa, Muramatsu Kazuhiro, Osaka Hitoshi, Iwamoto Sadahiko, Nishino Ichizo, Yamagata Takanori	4. 巻 10
2. 論文標題 A case of congenital fiber type disproportion syndrome presenting dilated cardiomyopathy with <i>ACTA1</i> mutation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Genetics & Genomic Medicine	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) 10.1002/mgg3.2008	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邉和寿、中山一大、横田万葉、吉田健、松本歩、Leibel Rudolph、岩本禎彦
2. 発表標題 脂肪肝におけるリン脂質の変化とILDR2の役割
3. 学会等名 第74回日本栄養食糧学会大会
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
---------	---------