

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21200

研究課題名（和文）CREBHによる小胞体恒常性維持機能を介した肝がん発症抑制機構の解明

研究課題名（英文）CREBH suppresses hepatocellular carcinoma development by maintaining ER homeostasis

研究代表者

齋藤 穂高 (Saito, Hodaka)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・研究員

研究者番号：10963449

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：過食や過度なアルコール摂取による肝臓での栄養代謝異常は、アルコール性脂肪肝や非アルコール性脂肪肝を誘発しその悪性化は肝硬変を経て肝がんを発症する。小胞体結合型転写因子CREBHが栄養代謝異常による肝がん発症を抑制する新規肝がん抑制因子として見出されたが、CREBHによる肝がん発症の抑制機構については未解明である。本研究ではCREBH KOマウス肝臓を用いた網羅的解析により、がん遺伝子としても同定されているERファジー受容体の遺伝子発現がCREBH KOにより変動することを見出した。さらにマウス初代肝細胞を用いてCREBHがERファジー受容体の遺伝子・タンパク質発現を制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓は、コレステロール合成や脂肪酸合成、栄養代謝を制御する重要な臓器である。過度なアルコール摂取や過食は肝臓の栄養代謝を乱し、アルコール性脂肪肝や非アルコール性脂肪肝を誘導し、慢性的な脂肪肝は悪性化し、肝硬変を経て肝がんを発症する。しかし、マウスに高栄養食餌を摂取させ栄養代謝異常を生じさせても、脂肪肝程度しか生じず、肝がん発症まで至らない。栄養代謝異常による肝がん発症を模倣するヒトのマウスモデルが存在しないことは、そのメカニズム解明の障害になってきたが、本研究では、栄養代謝異常により肝がんを発症するCREBH KOマウスを用いることで、栄養代謝異常による肝がん発症要因の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Excess intake of food and alcohol induces the non-alcoholic fatty liver and alcoholic fatty liver, respectively. The malignancy of these fatty liver occurs in hepatocellular carcinoma (HCC) through hepatic cirrhosis. Previously, transcription factor CREBH was indicated as a new suppression factor of HCC. However, it remains unclear how CREBH suppresses HCC via non-alcoholic fatty liver. This study aims to elucidate the suppression mechanism of HCC by CREBH. As these results, RNA-seq analysis revealed the lower gene expression of ER-phagy receptor in the liver of CREBH KO mouse. Additionally, CREBH KO primary hepatocyte showed the reduction of mRNA and protein level of the identified ER-phagy receptor.

研究分野：脂質

キーワード：CREBH 非アルコール性脂肪肝 肝がん

## 1. 研究開始当初の背景

過食や過度なアルコール摂取に起因する肝臓での栄養代謝異常は、アルコール性脂肪肝や非アルコール性脂肪肝を誘発し、その悪性化は肝硬変を経て肝がんを発症する。栄養代謝を制御する小胞体膜貫通型転写因子 CREBH の欠損(KO)マウスでは、通常食では正常だが、高栄養食餌摂取により肝がんを発症する。この結果は、CREBH が栄養代謝異常による肝がん発症を抑制する新規がん抑制因子であることを示唆したが、CREBH が高栄養条件下でどのように肝がん発症を抑制しているか、その詳細なメカニズムはほとんど理解されていない。本研究では、新規がん抑制因子として見出された CREBH がどのように、高栄養負荷による栄養代謝異常から、肝がん発症を抑制するかを明らかにする。本研究で得られた知見により、先進国における解決すべき喫緊の課題である生活習慣病から生じる肝がんの新たな治療戦略の構築が期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、数ある肝がん発症モデルマウスのうち、高栄養負荷で肝がんを発症する CREBH KO マウスを解析に用いて、新規がん抑制因子 CREBH がどのように高栄養摂取による肝がん発症を抑制するのか、CREBH による小胞体恒常性維持機能に着目しながら、そのメカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) CREBH が発現を制御する小胞体選択的オートファジー受容体の同定

普通食または絶食条件下で飼育した CREBH KO マウスの肝臓を用いた RNA-Sequence による網羅的解析により、小胞体恒常性維持に関わる小胞体選択的オートファジー受容体のうち、CREBH が発現制御に関与する受容体を選抜する。

### (2) Fam134b 発現制御解析のためのマウス初代肝細胞の培養条件の確立

Fam134b 発現制御解析のために、マウス初代肝細胞にて小胞体オートファジーが誘導される培養条件を確立する。

### (3) 同定した小胞体選択的オートファジー受容体の CREBH を介した発現制御機構の解析

培養細胞に CREBH を過剰発現させ、(1)で見出した小胞体選択的オートファジー受容体の遺伝子発現が変動するか検討する。さらに、野生型と CREBH KO マウスの初代肝細胞を用いて、小胞体選択的オートファジー受容体の発現変動を、遺伝子・タンパク質レベルで確認する。

## 4. 研究成果

### (1) CREBH が発現を制御する小胞体選択的オートファジー受容体の同定

小胞体恒常性維持に関わり、さらに発がんにも関わる因子として、小胞体選択的オートファジー受容体に着目した。普通食または絶食条件下で飼育した野生型マウスと CREBH KO マウスの肝臓を用いて、その遺伝子発現変動を RNA-Sequence により網羅的に解析した。CREBH やその標的遺伝子 (Apoa4 と Fgf21) は、絶食条件下で発現が亢進するが、CREBH を欠損すると絶食条件下でもそれらの発現は上昇しない。CREBH やその標的遺伝子の遺伝子発現パターンと相関を示す小胞体選択的オートファジー受容体を探索したところ、小胞体の分解だけではなく肝がん発症にも深く関与する Fam134b を同定した。

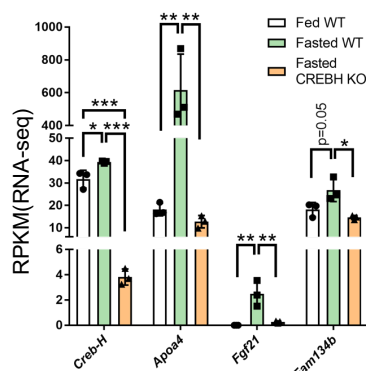


図1. CREBH KOマウス肝臓の遺伝子発現変動の網羅的解析(n=3)

(2) Fam134b 発現制御解析のためのマウス初代肝細胞の培養条件の確立

GFP-LC3B マウスの初代肝細胞を用いて、小胞体オートファジーが促進する培養条件を検討した。GFP-LC3B マウスの初代肝細胞をコラーゲンコートが施されたガラスボトムディッシュに播種し、アミノ酸枯渇培地 (AAS) にて6時間培養した。AAS 条件では、オートファゴソームの形成を示す GFP-LC3B 陽性斑点の数がコントロールに

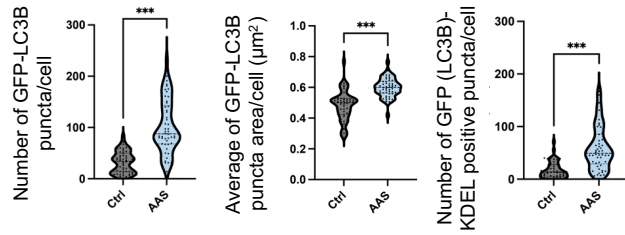


図2. アミノ酸枯渇によって誘導されたGFP-LC3B陽性オートファゴソームの定量

比べ増加し、さらに、GFP-LC3B 陽性斑点の面積も、AAS 条件下で増加した。また、小胞体に局在するタンパク質を抗 KEDL 抗体にて免疫蛍光染色し、GFP-LC3B と共局在する小胞体タンパク質の数を調べることで、小胞体オートファジーがアミノ酸枯渇条件で誘導されるか検討した。その結果、AAS 条件下で、GFP-LC3B と KDEL が共局在する斑点の数が有意に増加した。以上の結果より、マウス初代肝細胞では、アミノ酸枯渇培地 (AAS) 6 時間処理で、小胞体オートファジーが誘導されることが確認された。

(3) 同定した小胞体選択的オートファジー受容体の CREBH を介した発現制御機構の解析

CREBH が(1)にて同定した Fam134b の発現をどのように制御するのか検討した。まず、HepG2 に、FLAG tag を付加した CREBH の核内型タンパク質を過剰発現させ、Fam134b の遺伝子発現レベルを検討した結果、CREBH 過剰発現に伴い Fam134b の遺伝子発現が亢進した。続いて、野生型マウスと CREBH KO マウスの初代肝細胞を用いて CREBH を介した Fam134b 発現制御機構について解析した。AAS 条件下 CREBH KO マウスの初代肝細胞を培養した場合、野生型

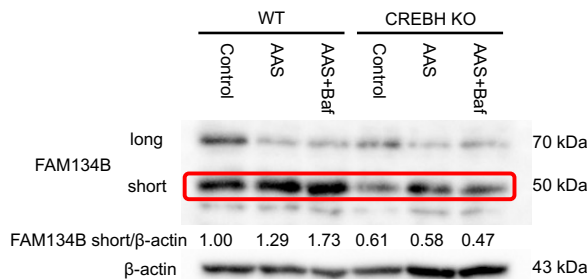


図3 CREBHを介したFam134b発現変動解析

野生型マウス(WT)とCREBH KOマウスの初代肝細胞を用いたFAM134B発現量の比較 (AAS:アミノ酸枯渇、Baf:Bafilomycin A1添加)

マウスと比較し、Fam134b の遺伝子及び、タンパク質の発現が減弱することが明らかになった。さらに、AAS 条件で培養開始後、0~4 時間では、CREBH KO マウスの初代肝細胞においても Fam134b 遺伝子発現がわずかに増加するが、4 時間以降で Fam134b の遺伝子発現は変動しなくなる。したがって、CREBH による Fam134b の発現制御は、アミノ酸枯渇後 4 時間以降で関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Yamada Yasunari, Saito Hodaka, Araki Masaya, Tsuchimoto Yuhei, Muroi Shin-ichi, Suzuki Kyohei, Toume Kazufumi, Kim Jun-Dal, Matsuzaka Takashi, Sone Hirohito, Shimano Hitoshi, Nakagawa Yoshimi	4. 巻 14
2. 論文標題 Wogonin, a Compound in Scutellaria baicalensis, Activates ATF4?FGF21 Signaling in Mouse Hepatocyte AML12 Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3920 ~ 3920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu14193920	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 Kim Jun-Dal, Kwon Chulwon, Nakamura Kanako, Muromachi Naoto, Mori Haruka, Muroi Shin-ichi, Yamada Yasunari, Saito Hodaka, Nakagawa Yoshimi, Fukamizu Akiyoshi	4. 巻 299
2. 論文標題 Increased angiotensin II coupled with decreased Adra1a expression enhances cardiac hypertrophy in pregnancy-associated hypertensive mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102964 ~ 102964
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.102964	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 Saito Hodaka, Tachiura Wakana, Nishimura Mizuki, Shimizu Makoto, Sato Ryuichiro, Yamauchi Yoshio	4. 巻 299
2. 論文標題 Hydroxylation site?specific and production-dependent effects of endogenous oxysterols on cholesterol homeostasis: Implications for SREBP-2 and LXR	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102733 ~ 102733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102733	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0件

〔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
---------	---------